

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09825

研究課題名(和文)骨微小環境における老化の解明

研究課題名(英文)Elucidation of cellular senescence in bone microenvironment

研究代表者

高岡 一樹 (TAKAOKA, KAZUKI)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60373122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：老化した細胞は、単に細胞増殖を停止しているのではなく、SASP (senescence-associated secretory phenotype)と呼ばれる炎症性サイトカインなどのタンパク分泌現象を生じていることが明らかにされている。本研究の結果、破骨前駆細胞は老化により徐々に自己複製能が低下し、破骨細胞への分化が抑制され、骨微小環境内に老化破骨前駆細胞が蓄積されていく可能性が考えられた。さらに、老化破骨前駆細胞はSASP因子(IL-6, TNF- α , NO)の産生およびエクソソームの放出数が増加しており、またエクソソームとして炎症性因子であるiNOSを放出していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

老化破骨前駆細胞は、単に細胞増殖を停止しているのではなく、炎症性サイトカインなどのタンパク質を分泌していることが明らかとなった。また、老化破骨前駆細胞からのエクソソームといわれる小胞(様々なタンパク質やRNAを含んでいる)の放出数が増加し、エクソソームとして炎症性物質を放出することは、遠隔における炎症にも関与している可能性が考えられた。加齢は骨リモデリング変化による骨量減少性疾患や骨破壊性疾患を生じの原因となるが、その病態解明とその対策や治療の発展につながるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Aging cells not only cease growth, but also secrete various proteins such as inflammatory cytokines. This secretory phenomenon is called the senescence-associated secretory phenotype (SASP). Our results suggest that osteoclast precursors gradually lose their self-renewal and regenerative potentials, and cannot differentiate into osteoclasts while aging. As a result, the number of senescent osteoclast precursors in the bone microenvironment may continue to increase because many osteoclast precursors are unable to differentiate into osteoclasts. Senescent osteoclast precursors increase production of SASP factors (IL-6, TNF- α , and NO) and the number of exosomes, and then release iNOS in exosomes.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨微小環境 破骨細胞 老化

1. 研究開始当初の背景

「老化」は未解明な生命現象であり、現在の高齢化社会において、健康寿命の延伸のため解明が望まれている。骨粗鬆症の患者が年々増加しつつあり、その対策が医療のみならず社会的にも重要な課題となっている。また、骨粗鬆症の治療薬の副作用であるビスホスホネート関連顎骨壊死が 2003 年に初めて報告されてから 15 年近く経過し、徐々に BRONJ の病態に対する理解が深まり、治療方法も確立されつつあるが、難治性の場合も少なくない。このような状況において、生体内での骨リモデリングにおける微小環境の解明は急務である。骨リモデリングは「古い骨を新しい骨に置き換えること」であるが、一連の過程はまだまだ解明されていない部分が多い。

2. 研究の目的

老化した細胞は、単に細胞増殖を停止しているのではなく、炎症性サイトカインやケモカインなどのタンパク質を分泌していることが明らかとなった。この分泌現象は SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれ、骨リモデリング微小環境との関連した報告は少ない。本研究は、老化に伴う破骨前駆細胞の分化および SASP への影響を解明するとともに、老化破骨前駆細胞から SASP 因子がエクソソームとして分泌され、情報伝達している可能性も踏まえて検討することを目的とした。

3. 研究の方法

細胞は、マクロファージ系破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) を使用した。5、10、20 代継代培養 (それぞれ P5、P10、P20) した細胞を用いて、以下の検討を行った。

RAW 細胞の複製老化の確認

- ① 細胞増殖能測定
Cell Counting Kit-8 を用いて、培養 3 日目まで経日的に比較検討した。
- ② 老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA- β -gal) 染色および蛍光強度の測定
Cellular Senescence Detection Kit を用いて、細胞の SA- β -gal を蛍光染色し、SA- β -gal 陽性細胞の有無を検討した。
- ③ Telomere 長測定
phenol-chloroform extraction method にて細胞の DNA を抽出し、抽出した DNA を用いて hybridization protection assay によってテロメア長を測定した。
- ④ Western blot 法
mTOR (増殖関連因子)、老化マーカーである p53、p-H2A.X のタンパク発現を比較検討した

老化による RAW 細胞の分化能への影響

- ① 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色および活性測定
NF- κ B リガンド受容体活性化因子 (RANKL; 50 ng/ml) を投与、7 日間作用後に、TRAP staining kit を用いて、TRAP 陽性多核細胞の有無を検討した。また、各継代において RANKL 投与・非投与群に分け、4 日間培養後に、TRAP solution Kit を用いて、TRAP 活性を測定した。
- ② Western blot 法
破骨細胞分化マーカーである RANK、NFATc1 のタンパク発現を比較検討した。

老化による RAW 細胞の SASP 因子の解析

- ① 培養上清中の IL-6、TNF- α 、NO の測定
RAW 細胞を 24 時間培養後、培養上清中の SASP 因子 (IL-6、TNF- α 、NO) の濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法で測定した。
- ② Western blot 法
SASP 因子 (TGF- β 1、HIF-1 α 、iNOS) および SASP 誘導因子 (NF- κ B) のタンパク発現を比較検討した。

老化による RAW 細胞のエクソソームの解析

- ① エクソソーム抽出、粒子径の測定
ExoQuick-TC を用いて培養上清中のエクソソームを抽出し、nanosight particle tracking analysis にてその粒子径および粒度分布を測定した。
- ② エクソソームの定量
抽出したエクソソームの粒子数を、CD63 ExoELISA ELISA kit を用いて定量評価した。
- ③ Western blot 法
エクソソームマーカーである CD63 および TSG101、SASP 因子 (TGF- β 1、HIF-1 α 、iNOS) のタンパク発現を比較検討した。

4. 研究成果

P20 の細胞増殖能は、P5、P10 と比較し有意に抑制され、mTOR のタンパク発現も継代数の増加に伴い低下した。SA- β -gal 陽性細胞は、P20 で有意に増加し、蛍光強度も上昇した。p-H2A.X は

P20 で発現を認め、P5、P10 では認めなかった。テロメア長は継代数の増加に伴い有意に減少し、これらの結果より、P20 が複製老化していることを確認した (Figure 1)。

P20 の TRAP 活性は、P5、P10 と比較し有意に低値であり、TRAP 陽性多核細胞数の減少を認めた。P5、P10 では RANK および NFATc1 のタンパク発現を認めたが、P20 では認めなかった。これらの結果より、老化した P20 では破骨細胞分化能の著しい低下を認めた (Figure 2)。

P20 の培養上清中の SASP 因子 (IL-6、TNF- α 、NO) 濃度は、P5、P10 と比較し有意に上昇した (Figure 3)。継代数の増加に伴い、細胞内の SASP 因子 (TGF- β 1、HIF-1 α 、iNOS) および SASP 誘導因子である NF- κ B のタンパク発現は上昇した (Figure 4)。これらの結果より、RAW 細胞においても SASP は生じており、SASP は老化細胞随伴現象であるため、P20 が複製老化していることを裏付ける結果ともなった。

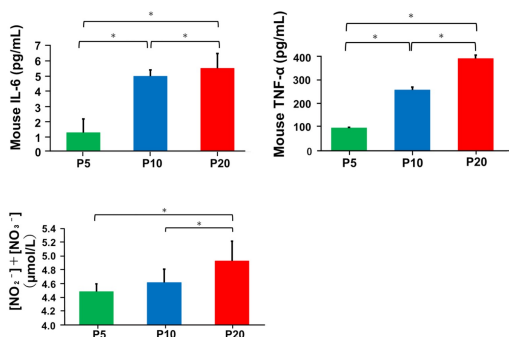


Figure 3

RAW 細胞の培養上清から ExoQuick-TC を用いて抽出した粒子は、エクソソームマーカーである CD63 および TSG101 の発現を認めた。また P5、P10、P20 の粒子径のピークはそれぞれ、 128 ± 10.9 nm、 100 ± 4.3 nm、 133 ± 9.4 nm であり、エクソソームの粒子径 (50-150nm) と矛盾せず、抽出した粒子がエクソソームであることを確認した。培養上清中に放出されたエクソソームの粒子数は、P5、P10 と比較し P20 では有意に上昇した。また、P20 において、エクソソーム内の iNOS のタンパク発現が上昇した (Figure 5、6)。

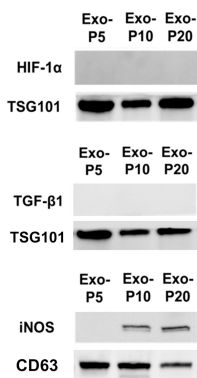


Figure 5

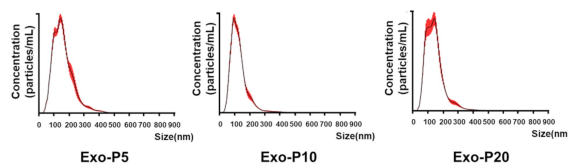


Figure 6

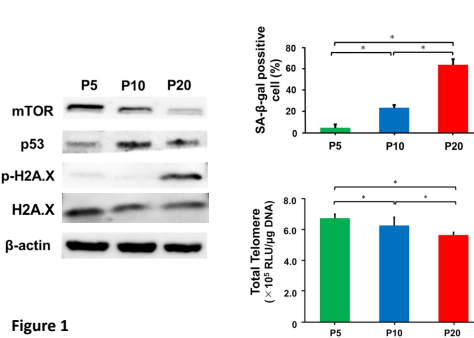


Figure 1

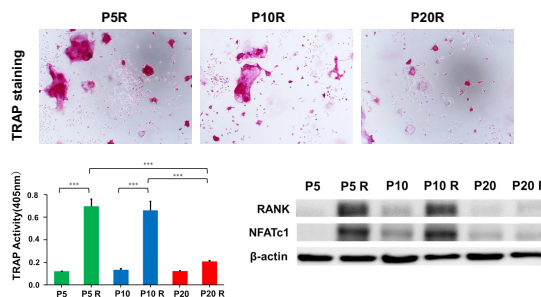


Figure 2

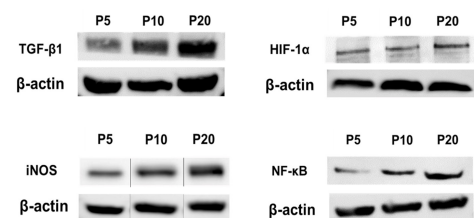


Figure 4

破骨前駆細胞の老化は、RANK 発現を阻害し、RANKL 誘導性の破骨細胞分化を抑制していることが考えられた。また、SASP は周囲の細胞老化を誘導し、NO は破骨細胞分化を抑制することが報告されている。これらの結果より、老化した破骨前駆細胞は自己複製能および分化能を失い、骨微小環境に蓄積する。さらに、老化破骨前駆細胞は SASP を介して、周囲細胞の老化および炎症を誘導し、またエクソソームとして iNOS を放出することで遠隔における炎症性疾患を引き起こす可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tamaoka J, Takaoka K, Hattori H, Ueta M, Maeda H, Yamamura M, Yamanegi K, Noguchi K, Kishimoto H	4. 巻 17
2. 論文標題 Osteonecrosis of the jaws caused by bisphosphonate treatment and oxidative stress in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1440-1448
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/etm.2018.7076.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueta M, Takaoka K, Yamamura M, Maeda H, Tamaoka J, Nakano Y, Noguchi K, Kishimoto H	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of TGF- 1 on the migration and morphology of RAW264.7 cells in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 4331-4339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2019.10662.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 高岡一樹	4. 巻 35
2. 論文標題 骨吸収抑制薬関連顎骨壊死(ARONJ)の現状	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 56-70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ueta M, Takaoka K, Tamaoka J, Maeda H, Nishida M, Noguchi K, Kishimoto H
2. 発表標題 Effect of TGF- 1 on osteoclast precursors in the bone microenvironment
3. 学会等名 AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tamaoka J, Takaoka K, Ueta M, Hattori H, Noguchi K, Kishimoto H
2. 発表標題 Osteonecrosis induction using bisphosphonate and oxidative stress inducer in mice
3. 学会等名 AADR/CADR Annual Meeting & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部洋一, 高岡一樹, 上田美帆, 玉岡丈二, 押谷将之, 野口一馬, 岸本裕充
2. 発表標題 破骨細胞前駆細胞の複製老化におけるSASPへの影響
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部洋一, 高岡一樹, 上田美帆, 玉岡丈二, 押谷将之, 野口一馬, 岸本裕充
2. 発表標題 RAW264.7細胞における細胞老化とSASPの分析
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	山根木 康嗣 (YAMANEGI KOJI) (00434944)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------