

令和 7 年 5 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K09403

研究課題名（和文）老化骨細胞の力学的刺激応答：特異的分泌因子を介した骨代謝細胞制御ネットワーク

研究課題名（英文）Mechanical stress response of senescent osteocytes: an intercellular communication between bone resident cells mediated by specific secreted factors.

研究代表者

上原 範久 (Uehara, Norihisa)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：30368211

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨組織内に存在する骨細胞に対し、生理的条件下で発生する0.8-3 Paの流体せん断応力を再現可能な力学的刺激実験系を構築した。マウス骨細胞株MLO-Y4を用い、正常骨細胞および細胞老化誘導した骨細胞に対して軽い運動と同等(1Pa, 1Hz)の刺激を与え、老化骨細胞における力学的刺激応答の遺伝子発現動態の網羅的解析を行った。その結果、正常および老化骨細胞に共通して、力学的刺激により増殖因子、抗炎症サイトカイン、創傷治癒に関連する細胞外マトリクス分子の発現が上昇することを見出した。また、力学的刺激後の正常骨細胞および老化骨細胞いずれの培養上清には、筋線維形成を促進する活性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、力学的刺激に応答して分泌される骨細胞に特徴的な増殖因子、抗炎症サイトカイン、創傷治癒に関連する細胞外マトリクス分子の同定に成功するとともに、老化骨細胞においても、力学的刺激が筋組織に影響を及ぼす分泌因子の産生を誘導することを明らかにした。これらの結果は、高齢者における骨細胞への力学的刺激、すなわち適度な運動負荷が、筋量の維持や健康寿命の延伸に寄与する可能性を示唆している。さらに、加齢に伴い蓄積し、加齢関連疾患の進展に関与するとされる老化細胞であっても、力学的刺激に対する応答性を保持しており、一定の生理的意義を有する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we established a fluid shear stress model capable of generating physiological mechanical forces. Using this model, we applied mild exercise-equivalent shear stress (1 Pa, 1 Hz) to normal and senescent osteocytes. Transcriptomic analysis by RNA-seq revealed the molecular responses to mechanical stimulation. We found that both normal and senescent osteocytes commonly upregulated genes related to growth factors, anti-inflammatory cytokines, and extracellular matrix components involved in wound healing. Additionally, conditioned media from both cell types following mechanical stimulation promoted myotube formation, suggesting that mechanically stimulated osteocytes may influence muscle regeneration even in a senescent state.

研究分野：細胞生物学

キーワード：osteocyte senescence mechanical stress

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨細胞は、力学的刺激に対する生化学的応答(メカノトランスダクション)として、種々のシグナル分子や細胞外小胞を分泌し、骨の恒常性だけでなく、筋肉をはじめ遠隔臓器の機能を制御することが知られており、それらの機能を解明することは、生命現象の理解に重要である。加齢に伴い、骨組織には老化した骨細胞が蓄積することが報告され、その特異的分泌因子は骨量減少の要因の一つになっている。しかしながら、それら分泌因子と老化骨細胞メカノトランスダクション機序との関連には多くの疑問が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、力学的刺激に対する老化骨細胞由来分泌因子の骨リモデリングにおける生理・病理的意義を明らかにする。老化骨細胞への力学的刺激に対する網羅的遺伝子発現解析を基盤として、老化骨細胞のメカノトランスダクション機構の分子の実体と特異的分泌因子を介した新たな細胞間クロストークの分子機序解明を目指す。

3. 研究の方法

3-1. 細胞株および細胞培養

マウス骨細胞様細胞株 MLO-Y4 はそれぞれ Kerfast (Boston, MA, USA) より入手した。マウス骨髄間質細胞株 (ST2) およびマウス筋芽細胞株 C2C12 は理研 BRC より入手した。MLO-Y4 細胞はコラーゲンコートした培養容器で、2.5%FBS、2.5%CS およびペニシリン・ストレプトマイシンを含む、L-グルタミンおよびデオキシリボヌクレオシド含有 MEM で培養を行った。ST2 細胞および C2C12 細胞はそれぞれ 10%FBS を含む MEM および DMEM にて培養を行った。

3-2. 骨細胞老化誘導

MLO-Y4 は、培養容器に 2.0×10^4 cells/cm² の密度で播種を行った。翌日、300 nM Doxorubicin (Selleck #25316-40-9) を培地に添加し、96 時間処理した後、細胞形態変化、 β -gal 染色、老化マーカー発現の確認を行い細胞老化誘導の評価を行った。

3-3. real time PCR

total RNA はカラム精製 (RNeasy Mini kit (Qiagen)) した後、SuperScript VIL0 (Thermo) を用いて cDNA 合成を行い、PCR 反応のテンプレートとした。PCR 反応は、目的遺伝子の特異的プライマーおよび KAPA SYBR FAST qPCR kit (KAPA Biosystems, Boston, MA) を用いて、40 サイクル (95 °C 5 秒、60 °C 20 秒) 行った。mRNA 発現は、比較 Ct 法により定量化した。

3-4. 蛍光免疫染色法

細胞は、10%ホルマリンを用いて室温で 15 分固定を行った後、ブロッキングバッファー (1%Triton/10%BSA/TBS) で 60 分間ブロッキングを行った。p21 (#27296 proteintec) および phospho-Histone H2AX (Ser139) (#9718 Cell Signaling) 抗体を抗体希釈バッファー (1%Triton/10%BSA/TBS) で希釈し、4°C で一晩静置した。洗浄後、蛍光標識二次抗体を加え、遮光して室温で 1 時間インキュベートした。PBS で 3 回、5 分間ずつ洗浄し (最初の洗浄で DAPI (1/10,000) を加える) 蛍光顕微鏡観察を行った。

3-5. 骨細胞への力学的刺激

MLO-Y4 細胞への力学的刺激は、シリンジポンプ (YSP-301) を用いて行った。コラーゲンコーティングを行った μ -Slide I^{0.4} Luer (ibidi 80176) へ 150 μ l の MLO-Y4 細胞 (4.0×10^5 cells/ml) を播種し、次の日まで CO₂ インキュベーター中で静置した。シリンジポンプ (流速 10.55ml/min 流量 175 μ l/sec 1Pa 吸引送液 1Hz, 1hr) を作動させ、液体剪断力 (Fluid shear stress: FSS) を与えた後、静かに装置から取り外し、細胞より RNA、タンパク質の抽出および培養上清を回収した。

3-6. 筋線維形成法

C2C12 を培養容器より剥離し、 2.5×10^4 cells/cm² の密度で播種し、翌日以降、細胞が 80%コンフルエントに達していることを確認した後、PBS で 1 回洗浄後、分化培地 (DMEM/2%HS) に力学的刺激後の細胞培養上清を 10%濃度となるように添加した。その後 2 日おきに培地交換し、筋管の形成を顕微鏡下で観察した。

3-7. RNAseq 解析

total RNA は RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて調製した後、MGIEasy rRNA Depletion Kit を用いて mRNA の精製およびシーケン斯拉イブラリーの作成 (MGIEasy Fast RNA Library Prep

Set) を行った。NGS シークエンスは、MGI DNBSEQ-G400 FAST によりシークエンスを行い(read type:paired-end、リード長:150b)データ解析を行った(受託解析:株式会社セルイノベーター)。リードカウントの正規化後、iDEP (ver.2.01)を用いて発現解析を行った。

4. 研究成果

4-1. MLO-Y4 細胞への細胞老化誘導評価

MLO-Y4 細胞への老化誘導は 300 nM ドキサソルピシン(DXR)を 96 時間処理することで行った。各種細胞老化マーカーの検出を行ったところ、DXR 処理細胞では、老化細胞に特徴的な形態の扁平化、SA-β ガラクトシダーゼ(Fig. 1A)および H2AX 陽性細胞(Fig. 1B)の顕著な増加が確認された。細胞周期停止因子であるサイクリン依存性キナーゼ(CDKs)である *p16*、*p21* および *p53* の mRNA 発現を検討したところ、いずれも DXR 処理後 48 時間から顕著な発現上昇することが明らかとなった。また、老化細胞特異的な分泌表現型に関わる炎症性サイトカイン遺伝子(*IL6*、*Ccl5*、*Tnf*)の発現も同様にその発現上昇をみた(Fig. 1C)。以上の結果から、MLO-Y4 細胞における DXR 処理が細胞老化を誘導することが明らかとなった。

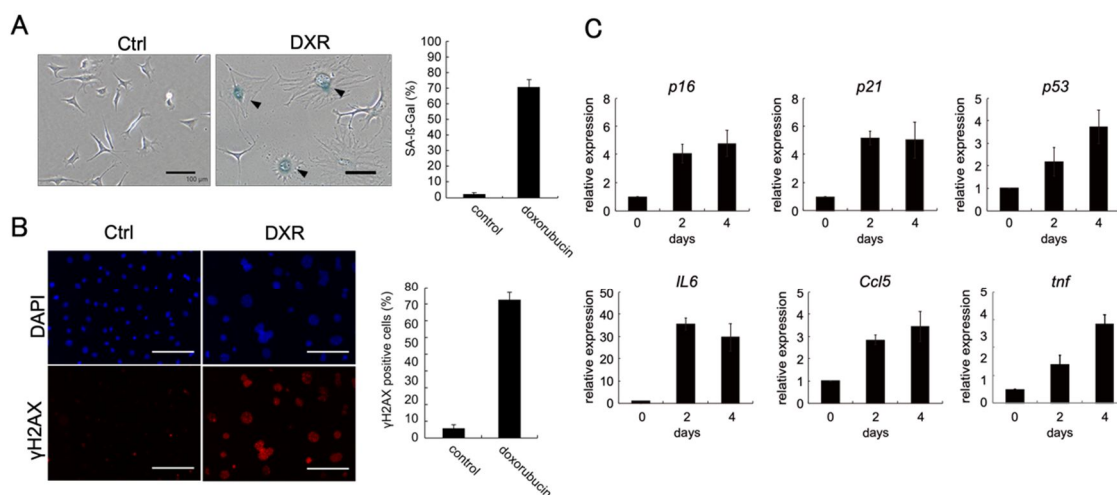


Fig. 1 MLO-Y4細胞への老化誘導評価

4-2. MLO-Y4 細胞への老化誘導に伴う骨細胞特異的な分泌因子の発現変化

MLO-Y4 細胞への老化誘導に伴い、骨細胞が発現する重要な分子の遺伝子発現変化について real time-PCR により検討した。その結果、細胞老化誘導に伴い破骨細胞活性化に必須の *rankl* 遺伝子および骨形成の抑制因子である *sclerostin (sost)*の顕著な発現上昇が確認された。それに対して、骨基質の形成に重要な非コラーゲン性骨基質タンパク質である *dentin matrix protein-1 (DMP-1)*の発現抑制が確認された。破骨細胞形成阻害因子である *osteoprotegerin (opg)*の発現には顕著な影響はなかった(Fig.2)。

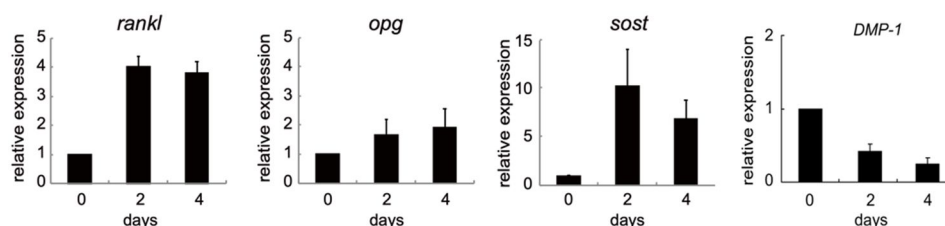


Fig. 2 老化誘導に伴う骨細胞マーカー発現変化

4-3. 老化骨細胞由来分泌因子の筋線維形成に及ぼす影響

力学的刺激に反応して骨細胞から分泌される因子が、筋管形成に影響を及ぼすことが報告されている。そこで本研究では、FSS 後の老化 MLO-Y4 細胞由来分泌因子が筋管形成に与える影響を明らかにするため、マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて免疫蛍光染色および融合指数(Fusion Index)による解析を行った。その結果、コントロール MLO-Y4 細胞への FSS 1 時間後の培養上清添加により顕著な筋管形成の促進($21.3 \pm 2.1\%$)がみられたが、2 4 時間後の培養上清添加ではその促進は見られなかった。一方、FSS 刺激前の老化 MLO-Y4 細胞由来の培養上清を添加した場合、筋管形成はコントロールと比較して有意に抑制された($6.1 \pm 1.1\%$)。しかしながら、老化骨細胞への FSS 1 時間後の培養上清添加により、筋管形成がある程度回復した($10 \pm 2.1\%$) (Fig.3)。これらの結果は、過去の報告と同様に、骨細胞への力学的刺激が、その分泌因子を介して筋芽細胞の融合過程に重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。また老化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Uehara Norihisa, Shibusawa Nobuhide, Mikami Yoshikazu, Kyumoto-Nakamura Yukari, Sonoda Soichiro, Kato Hiroki, Yamaza Takayoshi, Kukita Toshio	4. 巻 750
2. 論文標題 Bone metastatic mammary tumor cell-derived extracellular vesicles inhibit osteoblast maturation via JNK signaling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 109821 ~ 109821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2023.109821	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 Uehara Norihisa, Kyumoto Nakamura Yukari, Mikami Yoshikazu, Hayatsu Manabu, Sonoda Soichiro, Yamaza Takayoshi, Kukita Akiko, Kukita Toshio	4. 巻 113
2. 論文標題 miR-92a-3p encapsulated in bone metastatic mammary tumor cell-derived extracellular vesicles modulates mature osteoclast longevity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4219 ~ 4229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上原 範久, 久本 由香里, 三上剛和, 山座 孝義
2. 発表標題 骨転移癌細胞-破骨細胞間コミュニケーションツールとしてのエクソソームの役割
3. 学会等名 第66回 歯科基礎医学会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 上原 範久, 久本 由香里, 三上 剛和, 園田 聡一朗, 山座 孝義, 久木田敏夫
2. 発表標題 骨転移性乳癌細胞由来細胞外小胞に内包されるmiR-92a-3pは成熟破骨細胞の生存を促進する,
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023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
連携研究者	久本 由香里 (Kyumoto-Nakamura Yukari) (40729026)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

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
---------	---------