

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：34519

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21004

研究課題名（和文）骨リモデリング微小環境老化細胞におけるcGAS-STING経路の活性化

研究課題名（英文）Activation of the cGAS-STING pathway in bone remodeling microenvironment aging cells

研究代表者

服部 洋一（Hattori, Hirokazu）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：50836103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：マクロファージ系破骨前駆細胞様細胞であるRAW264.7細胞は、老化に伴い破骨細胞への分化能が低下し、cGAS-STING経路が活性化しSASPを誘導することが確認できた。老化したRAW264.7細胞にSTING阻害剤を投与したところ、cGAS-STING経路の抑制に伴いSASPの誘導も抑制され、破骨細胞の分化能が回復した。STING経路もしくは抑制したSASP因子に、破骨細胞分化能を制御する因子との関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

破骨前駆細胞は老化するとcGAS-STING経路が活性化し、SASPが誘導され、また、STING阻害剤の使用により、SASPを抑制でき、破骨細胞分化能が回復する可能性が示唆された。c-GAS-STING経路と破骨細胞分化能に関連があることが考えられ、骨粗鬆症を代表とした加齢性の骨代謝性疾患のさらなる病態解明や、新規治療薬の開発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）：RAW264.7 cells, which are macrophage-like osteoclast precursor cells, showed decreased osteoclast differentiation with senescence, activating the cGAS-STING pathway and inducing SASP. When senescent RAW264.7 cells were treated with STING inhibitor, the induction of SASP was suppressed along with the inhibition of cGAS-STING pathway, and osteoclast differentiation was restored. The STING pathway or suppressed SASP factors were suggested to be associated with factors that regulate osteoclast differentiation.

研究分野：口腔外科

キーワード：破骨前駆細胞 老化 骨微小環境

1．研究開始当初の背景

「老化」は未解明な生命現象であり、骨リモデリング微小環境においても例外ではない。加齢性骨粗鬆症患者数は年々増加傾向にあり、その対策が医療のみならず社会的にも重要視されている。骨粗鬆症の治療薬として、その薬効の高さからビスホスホネート製剤およびデノスマブ製剤が頻用されることが多いが、われわれ歯科口腔外科領域において、その副作用である薬剤関連顎骨壊死 (Medication-related osteonecrosis of the jaw: MRONJ) の発症が問題視されている。2003 年に初めてこの副作用が報告されてから、20 年余り経過するが、その全貌は明らかとされていない。MRONJ についてはその他骨代謝性疾患の病態解明のためにも、骨恒常性を破綻させる因子の特定は急務であり、骨リモデリング微小環境と老化に関わる研究を開始した。

2．研究の目的

近年、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さまざまなタンパク質等を分泌していることが明らかとなった。この現象は Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれ、炎症性疾患や発癌などを惹起させる可能性を指摘されている。

骨リモデリング微小環境において、SASP に関する報告は少なく、われわれは、骨リモデリング微小環境は、加齢に伴い細胞老化を起こした骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞などによる SASP を介した因子によって形成され、これが骨恒常性を破綻させる因子の一つではないかと考えた。SASP の誘導には cGAS-STING 経路の活性化が寄与しているという報告があり、本研究では、破骨前駆細胞に焦点を当て、骨リモデリング微小環境における SASP と cGAS-STING 経路との関連の解明を目的とした。

3．研究の方法

マクロファージ系破骨前駆細胞様細胞株である RAW264.7 細胞を使用した。5 代、10 代、20 代継代培養した細胞（以下、P5、P10、P20）を用いて、下記のように比較検討を行った。

RAW264.7 細胞の複製老化の確認

- (1) 老化関連酸性 -ガラクトシダーゼ (SA- β -gal) 染色およびその蛍光強度の測定
Cellular Senescence Detection kit を用いて蛍光染色し、その蛍光強度をフローサイトメトリーにて定量評価した。
- (2) テロメア長測定
各継代細胞より DNA を抽出後、hybridization protection assay にてテロメア長を測定した。
- (3) Western blot 法
老化関連マーカーである p53 および p-H2A.X のタンパク発現を評価した。

老化による cGAS-STING 経路の活性化の解析

- (1) Western blot 法
cGAS および STING のタンパク発現を評価した。
- (2) 細胞内の cGAMP 濃度の測定
cGAS-STING 経路のセカンドメッセンジャーである cGAMP の濃度を enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) で測定し、cGAS-STING 経路の活性化を定量評価した。

STING 阻害剤による cGAS-STING 経路の抑制の影響

STING 阻害剤である C-176 を用いて、各継代細胞を C-176 投与群と非投与群とに分け、下記検討を行った。

- (1) Western blot 法
STING のタンパク発現を評価した。
- (2) 培養上清中の SASP 因子 (IL-6、TNF- α 、NO) の評価
各 ELISA kit を用いて、SASP 因子の濃度を測定した。
- (3) 破骨細胞分化能の評価
NF- κ B リガンド受容体活性化因子 (RANKL) を 50ng/ml 投与し、7 日間作用させた後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) staining kit を用いて、TRAP 陽性多核巨細胞の有無を検討した。また、各継代細胞を RANKL 投与、非投与群とに分け、4 日間培養後、TRAP solution kit を用いて、TRAP 活性を評価した。

4. 研究成果

P20 では、P5 および P10 と比較し、SA-β-gal により強く染色した。フローサイトメトリーにて蛍光強度の定量的な評価を行い、継代数の増加に伴い蛍光強度の増加を認めた。また、テロメア長は、継代数の増加に伴い有意に減少を認めた。老化マーカーである p-H2A.X のタンパク発現は、P20 では発現を認めたが、P5 および P10 では発現を認めなかった。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)。

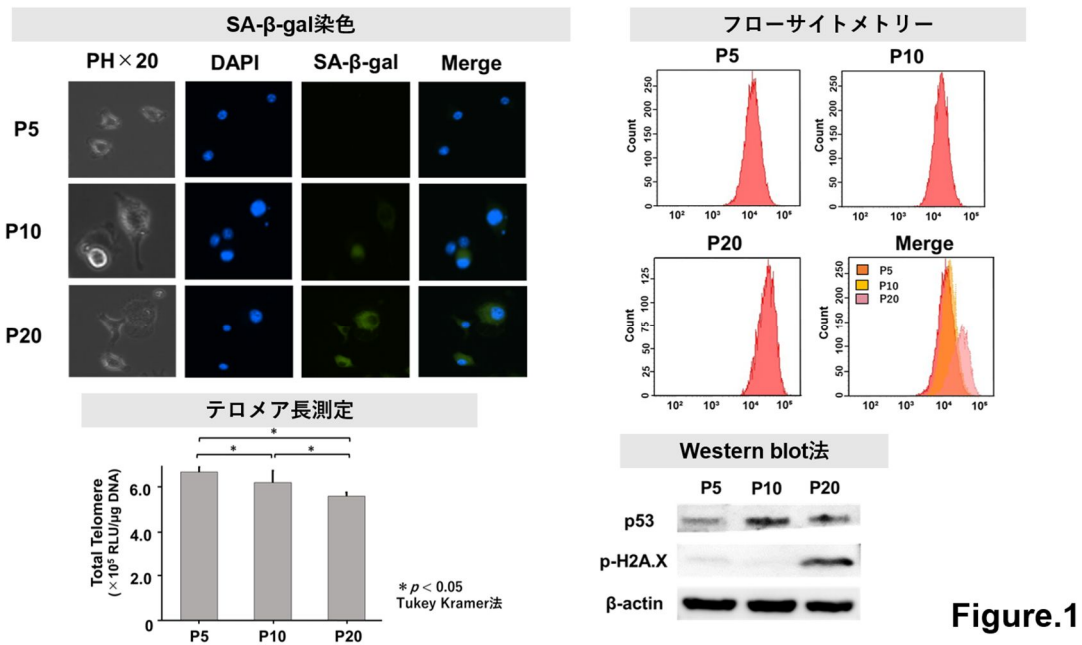


Figure.1

cGAS および STING のタンパク発現は、継代数の増加に伴い増強していた。また、cGAS-STING 経路の活性化の定量的評価のため、cGAS-STING 経路のセカンドメッセンジャーである cGAMP の細胞内濃度を ELISA にて測定した。cGAMP の細胞内濃度は、継代数の増加に伴い有意に上昇しており、これらの結果から、RAW264.7 細胞は、老化とともに cGAS-STING 経路が活性化されていることを確認した (Figure 2)。

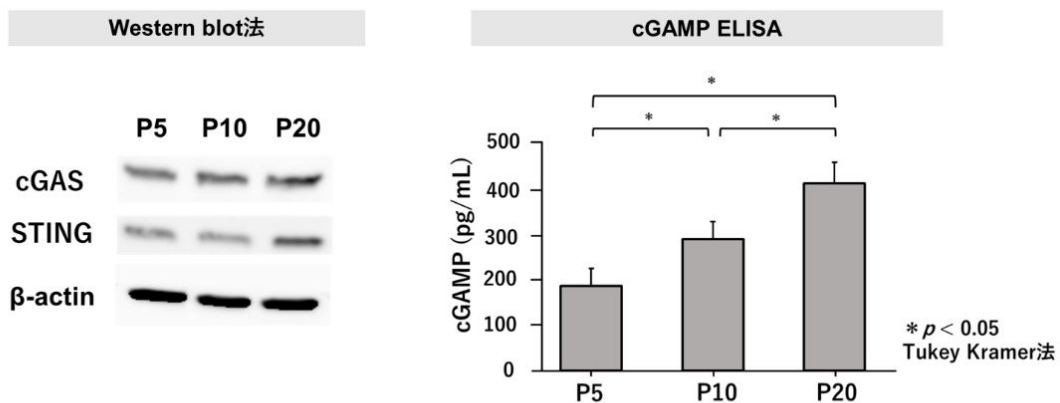


Figure.2

STING 阻害剤である C-176 を投与し、Western Blot 法にて STING のタンパク発現を評価した。いずれの継代細胞においても、STING のタンパク発現の低下を認め、STING が抑制されていることを確認した。C-176 投与群と非投与群とで比較検討を行い、培養上清中の SASP 因子 (IL-6、TNF- α 、NO) の濃度を ELISA にて測定した。C-176 非投与群においては、P5 および P10 と比較し、P20 において有意に上昇しており、老化している P20 において SASP が生じていることを確認した。一方、C-176 投与群では、非投与群と比較し SASP 因子の濃度はいずれの継代細胞でも有意に低下しており、STING を阻害することで SASP が抑制されていることを確認した (Figure 3)。

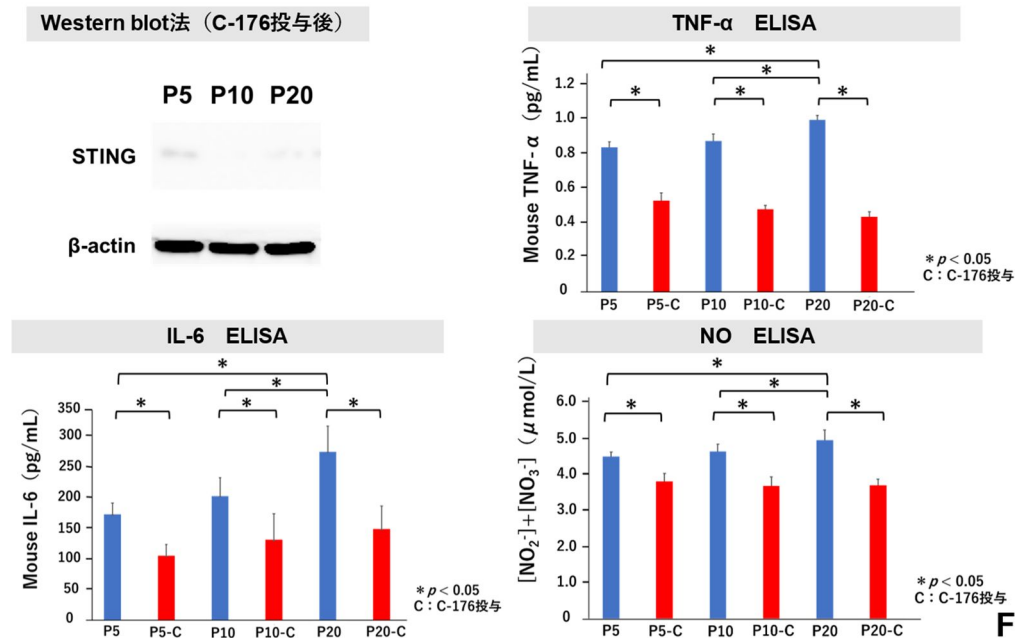


Figure.3

TRAP 染色にて、P20 では TRAP 陽性多核巨細胞をほとんど確認できず、また、TRAP assay にて、P20 では RANKL を投与しても、RANKL 未投与群と比較し、TRAP 活性に有意な差を認めなかった。これらの結果より、RAW264.7 細胞は老化により破骨細胞分化能が低下していることが確認できた。RANKL を投与した P20 群に、C-176 を投与して TRAP 染色、TRAP assay を行った。TRAP 染色にて TRAP 陽性多核巨細胞を認めるようになり、TRAP 活性は、C-176 非投与群と比較し有意に上昇していた (Figure 4)。

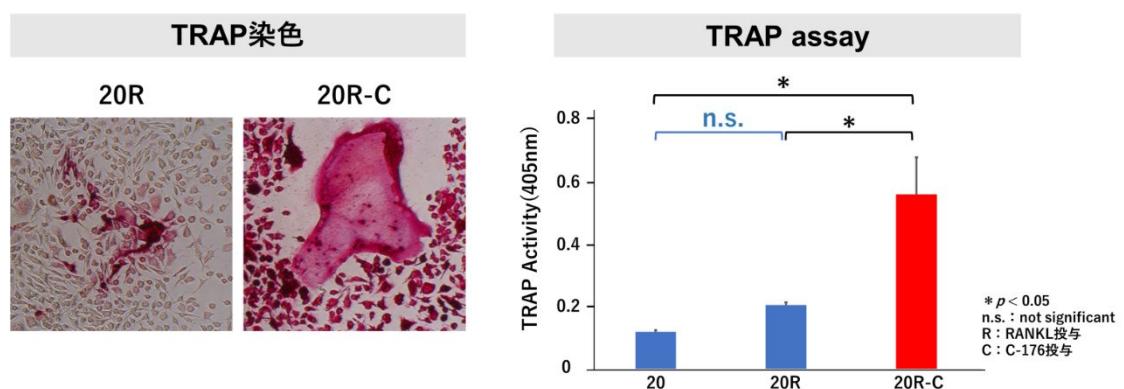


Figure.4

以上の結果より、RAW264.7 細胞は老化に伴い、破骨細胞分化能が低下し、cGAS-STING 経路が活性化され SASP が誘導される。RAW264.7 細胞において、STING を阻害することで SASP の誘導を抑制でき、破骨細胞の分化能が回復することが確認できた。STING 経路もしくは SASP 因子自体に、破骨細胞分化能を制御する因子との関連があることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Hattori H, Takaoka K, Kakimoto T, Nosaka S, Hatanaka A, Oshitani M, Ueta M, Noguchi K, Kishimoto H
2 . 発表標題 Senescence osteoclast precursors induce SASP through cGAS-STING
3 . 学会等名 The American Society for Bone and Mineral Research 2023 Annual meeting (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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