

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19553

研究課題名(和文)骨細胞の細胞老化による骨リモデリング制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis on the regulatory mechanism of bone remodeling based on cellular senescence in osteocytes

研究代表者

池淵 祐樹 (Ikebuchi, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20645725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスの蓄積が骨細胞の細胞老化の促進に関わっている可能性を検証するため、骨細胞選択的なSostプロモーター下流でSOD1を発現させたTgマウスを作出した。また、骨細胞選択的に老化細胞の除去を試みたマウスでは、若齢において種々の骨代謝パラメーターには変動が認められず、成体や老齢マウス等での解析を計画している。

マウス骨細胞様IDG-SW3、MLO-Y4細胞を用いた解析から、高濃度の酸素濃度での培養やH2O2の負荷によって酸化ストレスをかけることで、細胞老化を示唆する複数のマーカーの変動が確認された。この培養上清中にはRANKLを含む膜小胞が分泌され、破骨細胞分化支持能を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨代謝回転の起点となる破骨細胞形成が、時間的・空間的にどのように制御されているのかは未解明な点が多い。本研究から、酸化ストレスによる骨細胞の細胞老化誘導が、SASP因子の一つとしてRANKLを搭載した細胞外膜小胞を分泌し、これが破骨細胞の形成を制御している可能性が示唆された。搭載分子等のより詳細な解析に基づき、将来的に、それらを標的とした抗体分子の投与によって骨代謝回転の制御が可能になることを期待している。一連の解析により、骨リモデリングの起点となる破骨細胞形成が時間的、また空間的にどのような制御を受けているのかに関して、重要な知見を得ることが可能と考えている。

研究成果の概要(英文)：To examine the possibility that the accumulation of oxidative stress is involved in the acceleration of cellular senescence in osteocytes, transgenic mice, which expressing SOD1 under the osteocyte-selective Sost promoter, was generated. In addition, osteocyte-selective removal of senescent cells was attempted. Although no changes in various bone metabolism parameters were observed in young mice, we are planning to analyze the results in adult and old mice. Analysis of mouse osteocyte-like IDG-SW3 and MLO-Y4 cells showed that oxidative stress induced by high oxygen concentration or H2O2 loading caused changes in several markers suggestive of cellular senescence. Membrane vesicles containing RANKL were secreted in the culture supernatant, suggesting that they have osteoclastogenesis ability.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 細胞老化 細胞外膜小胞 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の進展につれて、健康寿命を縮める主要因の一つとしてロコモティブ症候群が挙げられ、特に、骨折リスクを高める骨粗鬆症の適切な治療法の確立は臨床的に重要な課題である。骨の強度は継続的な骨リモデリングを通じて維持されており、一連の代謝回転は、造血系の前駆細胞から分化・成熟する破骨細胞による骨基質の吸収が起点となる。次いで、破骨細胞から放出される多様なカップリング因子が骨芽細胞を分化・活性化し、骨吸収を受けた部位を新生骨によって埋め戻すと共に、一部は骨基質の石灰化に伴い内部に埋め込まれ骨細胞へと最終分化する。骨細胞は周囲の骨細胞とネットワークを形成し、重力や運動等の感知センサーとして機能するだけでなく、破骨細胞分化の決定因子である RANKL の提示や、骨芽細胞の活性を負に制御する Sclerostin (Sost) の分泌など多様な機能を有し、骨リモデリング過程で司令塔の役割を担うと想定されている。しかしながら、骨吸収の開始部位はどのように選択され、またその局所に破骨前駆細胞はどうリクルートされるのか、さらに骨基質中の骨細胞から骨髓腔中の破骨前駆細胞への RANKL の送達機構など、リモデリングの起点部分における重要な点が未解明のままとなっている。

骨細胞は、生理的には酸素濃度 5%未満の低酸素環境で生存し、一般的にこのような環境では活性酸素種(ROS)の産生も少ないとされているが、組織部位によるものの、骨細胞内への ROS の蓄積が観察されている。また、骨細胞にシェアストレスがかかると NADPH オキシダーゼ Nox2 が活性化され、細胞膜近傍でスーパーオキシドが産生されるとの報告が近年なされ、骨細胞は断続的に酸化ストレスに曝露されていると想定される。一方、マウス骨細胞由来の培養細胞を用いた検討から、骨細胞を 20% O₂ 条件で培養すると細胞老化マーカーの SA-β-Gal 活性の顕著な上昇が観察された。1% O₂ 条件では細胞老化の誘導は起こらず、酸化ストレスによって細胞老化を生じる可能性が示唆される。細胞老化は DNA ダメージ応答だけでなく酸化ストレス等の種々のストレスによっても引き起こされ、炎症性サイトカインやケモカイン、細胞外膜小胞などの分泌量増大 (SASP) が知られている。予検討においても、20% O₂ 条件で酸化ストレスに曝された骨細胞からは RANKL を含有する膜小胞の分泌が観察された一方、1% O₂ 条件では RANKL の分泌は認められなかった。さらに、若齢マウスの骨組織においても数%程度の割合で老化状態骨細胞が検出される。これらの知見を踏まえて、「累積された酸化ストレスによって細胞老化を生じた骨細胞が、ケモカインや膜小胞の分泌を通じて、破骨前駆細胞の局所誘引と成熟破骨細胞の誘導を中心的に担う」という仮説の立案に至り、本研究を実施した。

2. 研究の目的

以上の背景に基づき、本研究では、累積された酸化ストレスによって細胞老化を生じた骨細胞が、リモデリングが必要となる骨組織の部位・タイミングを知らせるある種のタイマーの様に機能し、ケモカインや細胞外膜小胞などの分泌を通じて骨リモデリングを制御する中心的な役割を担っているとの仮説を検証することで、一連の骨品質制御機構を明らかにすることを目標とした。具体的には、以下の3点の検証を主目的とした。

(1) 骨細胞選択的な酸化ストレス軽減・老化細胞除去マウスでの骨表現型評価

(2) 細胞老化を生じた骨細胞由来の SASP 関連因子の *in vitro* 解析

(3) 細胞老化を生じた骨細胞に由来する SASP 関連因子の、骨リモデリングへの影響評価

本研究の進展により、細胞老化が生理的な組織恒常性維持においても重要な役割を果たすことを示し、骨組織リモデリング研究としてだけでなく、細胞老化研究としても重要な成果が得られると考えている。また、細胞外膜小胞による細胞間コミュニケーションの実証例としても重要な位置付けとなり、多分野に影響を与える研究と言える。さらに、骨粗鬆症をはじめとする種々の骨破壊疾患では骨リモデリングのバランス破綻が大きく影響しており、起点となる破骨細胞形成の詳細な分子機構の解明は、適切な治療法の確立に繋がると期待される。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞選択的な酸化ストレス軽減・老化細胞除去マウスでの骨表現型評価

本研究では、骨小腔内の間質液流動等で生じる酸化ストレスによって骨細胞に細胞老化が誘導される可能性を想定しているため、骨細胞選択的なプロモーター (Sost 遺伝子) を用いて、細胞膜近傍でのスーパーオキシド除去に関わる SOD1 の Tg マウスを作出した。SOD1 によって酸化ストレスが軽減され、細胞老化を起こす骨細胞の減少が想定されるため、結果として、Tg マウスでは骨吸収が抑制された低骨代謝回転型の表現型が考えられる。骨標本での SA-β-Gal 染色および SAHF の検出で細胞老化の生じた骨細胞の割合を、また、併せて骨形態パラメーターの計測を行い、骨吸収および骨形成に与える影響を評価することを計画した。

これに加えて、Sost プロモーターおよび細胞老化特異的なプロモーター (p16 遺伝子) を組み合わせ、細胞老化を生じた骨細胞を選択的に除去できるマウスモデルを構築した。具体的には、

低分子基質 AP20187 依存的にヘテロ二量体を形成する DmrA/C を利用し、p16 プロモーターで DmrA-Caspase8 を発現する Tg マウス、及び Sost プロモーターで DmrC-Caspase8 を発現する Tg マウスをそれぞれ作出し、交配によってダブル Tg マウスを得た。このマウスでは AP21967 の投与によって、DmrA-Caspase8 および DmrC-Caspase8 の双方を発現している老化骨細胞のみにアポトーシスを誘導可能と考えられ、培養細胞を用いた予検討では、両遺伝子を共導入した細胞のみ、AP21967 依存的に細胞死の誘導が可能であった。このダブル Tg マウスを用いて骨形態計測を行い、骨リモデリングにおける老化骨細胞の役割を検証することを計画した。

(2) 細胞老化を生じた骨細胞由来の SASP 関連因子の in vitro 解析

Tg マウスでの in vivo 解析と並行して、マウス初代骨細胞およびマウス骨細胞様細胞株 IDG-SW3、MLO-Y4 を用い、低酸素条件下において H₂O₂ 曝露などで酸化ストレスを負荷することで、細胞老化が誘導される条件を評価した。また、上記の Tg マウスでの検証内容を補完するため、IDG-SW3、MLO-Y4 細胞に内在性に発現する SOD1 を、CRISPR-Cas9 を用いて遺伝的に欠損した細胞株を作出し、細胞老化への影響を検証した。

続いて、細胞老化を誘導した骨細胞の培養上清から膜小胞を単離し、RANKL の含有量及び成熟破骨細胞の誘導活性の評価を行った。さらに、膜小胞をショットガン・プロテオミクス手法によって分析し、プロファイルが細胞老化でどのように変化するか解析した。特に、老化骨細胞由来の膜小胞特異的、あるいは含有量が増加する膜タンパク質に着目し、RANKL シグナルと協調して破骨細胞分化を促進する可能性が示唆される分子に関して、中和抗体を用いて膜小胞の前処理を行い、上述と同様に成熟破骨細胞の分化誘導への寄与を評価することを計画した。

(3) 細胞老化を生じた骨細胞に由来する SASP 関連因子の、骨リモデリングへの影響評価

(2) の in vitro 解析から、骨リモデリング制御に関わる可能性のある膜小胞・分泌タンパク質の特定を試み、最後に、これらに関して生体レベルでの寄与を検証する。コンディショナルノックアウト手法では、細胞老化した骨細胞のみに限定した特定遺伝子の発現調節は困難なため、解析対象分子に対する中和抗体を利用することを計画した。AP21967 未投与の DmrA/C Tg マウス、すなわち老化骨細胞が存在するマウスの場合、対象分子の機能に応じて骨吸収あるいは骨形成の変化が生じると期待された。一方、AP21967 によって老化骨細胞を除去した個体においては中和抗体の標的分子が存在しないため、骨吸収および骨形成に対して作用を発揮しないと想定される。中和抗体に関しては、CDR ランダム化単鎖抗体を提示するファージライブラリーを利用して適切な活性を有するクローンを取得し、中和抗体への組換えとタンパク質取得を行うことで検討に供する。

4. 研究成果

(1) 骨細胞選択的な酸化ストレス軽減・老化細胞除去マウスでの骨表現型評価

骨細胞における酸化ストレスの蓄積が、骨細胞の細胞老化の促進に関わっている可能性を検証するため、SOD1 を骨細胞選択的な Sost プロモーター下流で発現させた Tg マウスを作出した。解析に供するための必要数まで繁殖を続けており、今後、大腿骨・脛骨や椎骨等の骨標本を用いて、骨細胞での細胞老化の頻度を SA-β-Gal 染色および SAHF の検出により観察するとともに、詳細な骨代謝パラメーターを計測することを計画している。

また、骨細胞選択的な Sost 遺伝子、および老化細胞選択的な p16 遺伝子プロモーターを用いて、それぞれ選択的に Caspase8 を発現させ、二量体を形成することで活性化させることが可能な dTg マウスを作出した。AP20187 投与による骨細胞選択的な老化細胞の除去を実施したところ、若齢のマウスにおいて僅かながら老化細胞の割合の低下が確認された一方で、破骨細胞数や骨形成速度等の種々の骨代謝パラメーターには有意な変動が認められなかった。骨吸収と骨形成のバランスが異なる成体、あるいは老齢のマウスでは、骨細胞における細胞老化が骨代謝バランスに影響を与える可能性を考えて、同様の検討を予定している。これに加えて、骨粗鬆症の主要なリスク因子となる女性の閉経に伴うホルモンバランスの変動の影響も踏まえて、閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスを用いた同様の解析を検討している。

(2) 細胞老化を生じた骨細胞由来の SASP 関連因子の in vitro 解析

マウス骨細胞様細胞株 IDG-SW3 は、IFN ガンマの添加と培養温度条件によって細胞の分化状態をコントロール可能である。コラーゲンを重層した培養ウェル上での培養によって、Dmp-1、Sost 等の骨細胞マーカー遺伝子の発現プロファイルは初代培養骨細胞と同様の傾向が確認された。また、同様に MLO-Y4 細胞については、I 型コラーゲン及びマトリゲルの混合ゲルに包埋すると、多数の細胞突起を伸展して骨細胞に特徴的な細胞間ネットワークを形成する様子が観察された。これらの細胞を用いて、通常の酸素濃度 (20%) で培養すると、細胞老化が誘導されることが、細胞老化の指標である ガラクトシダーゼ活性の誘導や p16、p21、p53 と呼ばれる遺伝子の発現量から示唆された。一方で、専用の培養チャンバーを用いた低酸素培養 (3%) を行うと、p16 遺伝子の発現量、および β-galactosidase の活性が抑えられており、さらに、ここに過酸化水素による酸化ストレスを負荷することで細胞老化が進むことを認めている。一連

の結果から、種々の細胞で報告されているように、骨細胞においては通常抑えられている酸化ストレス（高濃度の酸素暴露、あるいは ROS の産生）によって、細胞老化が誘導されることが示唆された。この点をより検証するため、さらに、IDG-SW3、MLO-Y4 細胞に内在性に発現する SOD1 を遺伝的に欠損させた細胞株を CRISPR-Cas9 を用いて作出し、細胞老化への影響を検証した。SOD1 欠損細胞においては、H₂O₂ 負荷により細胞内に生成・蓄積される ROS の量が増加することが確認され、さらに、それに伴って p16 遺伝子の発現量や β -galactosidase の活性の上昇が認められた。このことは、骨細胞における酸化ストレスへの対応に SOD1 が関わっていることを示唆しており、SOD1 Tg マウスでの *in vivo* 解析と合わせた更なる解析を検討している。

高濃度酸素条件、または H₂O₂ 負荷により細胞老化を誘導した IDG-SW3、MLO-Y4 細胞の培養上清を回収し、回収し、段階遠心によって分画を得たところ、主に細胞外膜小胞を含む分画に RANKL の発現が確認された。同分画では、細胞外膜小胞の特徴的なマーカー分子である CD9 や CD63 の発現も確認され、粒子径などの確認はできていないものの、エクソソーム様の膜小胞に RANKL が搭載されている可能性が示唆された。さらに、この RANKL を搭載した細胞外膜小胞を破骨前駆細胞として Raw264.7 細胞、あるいはマウス骨髄マクロファージに添加したところ、破骨細胞の分化を示す TRAP 活性の上昇傾向が確認された。現在、培養条件の最適化を行いつつこの膜小胞分画が破骨細胞形成支持能を有するか検証を進めるとともに、ショットガン・プロテオミクス解析を行うことで、搭載する分子群の解析を行っている。さらに、これら膜小胞の解析に加えて、細胞老化が骨細胞のトランスクリプトームに与える影響も評価し、細胞老化に伴って分泌が亢進する候補分子を取得することを計画している。

（3）細胞老化を生じた骨細胞に由来する SASP 関連因子の、骨リモデリングへの影響評価

上述の *in vitro* 解析の結果に基づき、細胞老化が誘導された骨細胞から分泌される細胞外膜小胞、あるいはケモカイン等の SASP 関連因子を同定した後に、それらを標的とした中和抗体を取得し、骨表現型に与える影響を評価することを最終的に計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医学部附属病院薬剤部試験研究室 / 臨床薬物動態学教室
<https://plaza.umin.ac.jp/~todayak/>

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