

加齢に伴う筋骨格系細胞の細胞外マトリックス 関連因子における変調とその作用解析

[1] 組織

代表者：本田 健

(山口大学大学院医学系研究科)

対応者：小笠原 康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

朝霧 成挙 (山口大学大学院医学系研究科)

酒井 大樹 (山口大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

加齢に伴う運動器障害は、高齢者の運動機能を著しく損なう。患者本人のみならず家族など周囲の負担も大きくなるため、超高齢社会を迎える我が国ではその予防・治療法の確立が急務である。筋肉、骨、関節における退行変性については、その組織における細胞レベルでの解析や、臓器間ネットワークの観点に立った様々な知見が蓄積されてきている。しかしながら、加齢は多因子の絡む複雑な現象であり、退行変性の発症機序など、未だ不明な点が多く残されている。これまで我々は、筋骨格系組織に形成される細胞外マトリックス (Extracellular Matrix: ECM) に着目し、高齢マウスの組織や老化細胞等を用いて、筋骨格系細胞の ECM における変調について解析してきた。その中でも、今年度は特に骨基質の ECM に着目し、骨 ECM の分解に関わる破骨細胞に関する成果について報告する。

骨組織では骨形成と骨吸収のバランスが厳密に制御されることで、骨の健全性が保たれている。そのバランスは、加齢をはじめ、自己免疫疾患や感染症に起因する慢性炎症、薬物などによって破綻することが知られている。骨吸収を担う破骨細胞が骨芽細胞に対して有意になると、病的な骨密度の低下や骨びらんが生じる。そのため、破骨細胞を標的として、その骨吸収機能や分化を抑制するような創薬研究が盛んに行われている。破骨細胞はマクロファージが細胞融合を起こして多核化し、骨吸収能を獲得した細胞であり、その分化は骨芽細胞あるいは骨細胞が提示する

RANKL によって誘導される。破骨細胞は骨基質を構成する ECM、特にその主要な構成タンパク質である I 型コラーゲンを分解するが、その担い手は ECM 制御に関わるタンパク質分解酵素であり、それらは破骨細胞の分化とともに発現が強く誘導される。我々は、生体内に存在する代謝産物において、破骨細胞が産生する骨基質 ECM 分解酵素の発現を抑制するような分子を探索し、これまでに幾つかの候補を見出してきた。その中でも、加齢との関連が示唆されている代謝産物であるポリアミンに着目した (図1)。

ポリアミンは細胞内でアルギニンから生じ、プロレツシン、スペルミジン、スペルミンの順に生合成される。その三者の総称がポリアミンであり、細胞の成長

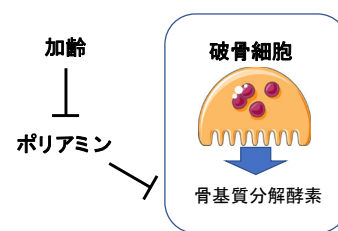


図1. 破骨細胞に対する
ポリアミンの作用

と分化を調節するだけでなく、DNA の安定性、転写、翻訳、アポトーシス、オートファジーなど多岐に渡る細胞プロセスに関わる。また、海外のグループを中心に、加齢との関わりについて新たな知見が次々と報告されている [Madeo *et al.*, *Science*, 26, 359: eaan2788 (2018)]. ポリアミンの生体内濃度は様々な生物学的状況を反映し、例えば加齢はヒト組織中のスペルミジン濃度の減少と相関することが知られている。さらに、心疾患、癌、神経変性疾患など幾つかの病態ではポリアミン濃度との関連が示されており、疾患バイオマーカーとしての利用が検討されている。また興味深いことに、外因性のスペルミジン補充は長寿効果をもたらすことが高等生物において見出されており、加齢に伴う機能障害の回復も認められている。これらの効果はオートファジーの促進や抗炎症、抗酸化作用を介した機序であることが細胞レベルで示されているが、破骨細胞における骨基質代謝およびその制御系に関わるタンパク質群にどのような効果を持つのかは不明である。ここでは、ポリアミンの中でもスペルミジンについて、破骨細胞の骨 ECM 制御関連タンパク質に対する効果を解析した結果を報告する。また、本研究の

実施にあたり、加齢学研究所共同研究者としてご対応頂いた加齢医学研究所・小笠原康悦教授には、研究打ち合わせ（新型コロナウイルス蔓延のためウェブ会議にて）において、本研究遂行に関するご助言や解析結果の解釈、議論を賜った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究では、マウスの大腿骨から骨髓細胞を単離し、マクロファージの生存と増殖を促す M-CSF を添加した培地で 2 日間培養して破骨前駆細胞を調製し、20 ng/mL の可溶性 RANKL 存在下で 3 日間培養することで破骨細胞を得た (図 2)。その過程において、細胞から RNA を抽出し、cDNA へと逆転写して RNA-seq 解析や各種プライマーを用いたリアルタイム qPCR を行い、各遺伝子の mRNA 発現量を解析した。また、破骨細胞の形成は、破骨細胞特異的に発現する TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) を利用した染色法にて、陽性かつ多核化した細胞を顕微鏡下で確認し、また定量 PCR によって分化マーカー遺伝子の mRNA 発現を解析することで確認した (図 2)。

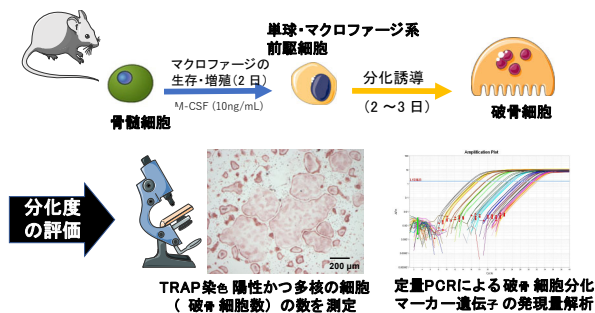


図2. 破骨細胞分化および分化度の評価

RANKL 刺激による分化を 10 μ M スペルミジン存在下で行い、培養 1 日後に骨組織 ECM 分解酵素群の mRNA 発現を解析した。そこで、Cathepsin K (Ctsk) と MMP9 の発現が有意に抑制されていることを確認した (図 3)。多核化した成熟破骨細胞において、Cathepsin K は骨基質を構成する I 型コラーゲンを分解し、MMP9 はその断片化されたコラーゲンをさらに消化するゼラチナーゼとして働き、両者共に骨吸収機能に重要な役割を持つ。詳細な機序は不明ながら、スペルミジンは RANKL による分化誘導で up-regulation される Ctsk および MMP9 の発現を抑え、破骨細胞の骨吸収機能を低下させることを確認した。詳細は割愛するが、その他の ECM 制御に関わるタンパク質群について網羅的に発現量を調べたところ、マクロファージや破骨細胞に発現が認められるもの

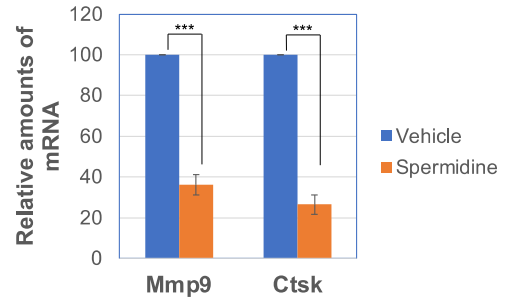


図3. スペルミジンによる骨組織細胞外マトリクス分解酵素の発現抑制

中で、ECM 制御に関わる MMPs、ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase)、ADAMTSs (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) 等の各ファミリーにおいて、スペルミジンによって顕著に発現が変動する一連の酵素が同定された。それらの破骨細胞に対する機能は不明なものも多く、どのような生理的意義があるのか、現在解析中である。また、スペルミジンの合成酵素阻害剤を用いて、加齢によるスペルミジン減少を人為的に模倣し、それによって変動する酵素群を解析中である。これにより、加齢とスペルミジンの生体内挙動、それに関わる破骨細胞の骨基質 ECM 制御の関係性を明らかにしていく。これらの結果について、現在論文を投稿予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

スペルミジンは生体内に比較的多くユニバーサルに存在する代謝産物であり、その内因性のスペルミジンが破骨細胞に対してどのような役割を持つのかは分かっていない。その関係性が解明されれば、加齢と骨代謝を結び、スペルミジンを介した新たな機序が明らかになる可能性がある。また、スペルミジンは腸管吸収に優れていることからスペルミジン自体の摂取による骨代謝の調節が可能かもしれない。また、スペルミジンの作用機序を詳細に理解することで、加齢に伴う骨疾患の新たな治療法あるいは予防法の開発に重要な基盤情報をもたらす可能性がある。

[4] 成果資料

学会発表

- ・日本薬理学会年会 (2022 年 3 月 9 日), 3-P-249
Inhibitory effect of spermidine on differentiation of inflammatory osteoclasts