

Title	骨格の正常発生における老化細胞の関与の検討
Author(s)	
Citation	令和5（2023）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2024
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/95172">https://hdl.handle.net/11094/95172</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

令和5年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書					
ふりがな 氏名	えびはら かおる 蛸原 薫	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4年
ふりがな 共同 研究者氏 名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	大庭伸介 阿部真土	所属	歯学研究科 組織・発生生物学講座		
研究課題名	骨格の正常発生における老化細胞の関与の検討				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

**【研究目的】**

「細胞老化」とは、細胞の増殖を不可逆的に停止させ、不良な細胞の拡大を防ぐ機序である。老化細胞には細胞死を回避するシステムがあり、SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) と呼ばれる多岐にわたる分泌因子の放出により免疫細胞の集積など周囲の細胞へ積極的な作用をもたらす。一方で、個体の老化に伴う老化細胞の蓄積は、慢性炎症を引き起こし、加齢関連疾患の原因ともなりうる。実験的培養細胞において老化細胞は SA (Senescent-associated) -betaGAL 活性や、p16 タンパク質の発現などを指標として検出され、細胞継代毎にその数は増加することが示されている。近年、p16 発現細胞をラベルすることが可能な動物が複数系統開発されたことで、個体レベルでの老化細胞の局在およびその役割が明らかになってきた。最近、生理的な細胞老化が胎生期（形態形成期）でも起こっていること、また再生能力が最も強い脊椎動物の一つであるイモリの四肢再生過程で多くの老化細胞が暫間的に出現すること、さらに老化細胞の実験的欠失が形態形成の異常や再生の遅延をもたらすことが報告され<sup>1)</sup>、発生・再生過程における細胞老化の重要な役割も見出されつつある。本研究は、胎生期の骨発生過程および若年期の骨格成熟過程において細胞老化が関与する可能性を検討することを目的とした。

**【研究計画】**

本計画では以下の3点を検討する。

**1. 正常顎顔面・四肢骨発生過程での老化細胞の局在の検討**

老化細胞の局在を個体レベルで見出すため、マウス p16 遺伝子座にタモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼ cDNA をノックインしたマウス系統と Cre 誘導性レポーターマウス系統の交配から得られる胎仔・若年マウス (p16-creERT2;R26RLSL-ZsGreen) を解析に用いる。

**2. 老化細胞の正常形態形成への作用の検討**

生理的な老化細胞の除去が若年期マウスの骨形成に与える影響を検討するため、マウス p16 遺伝子座にタモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼ cDNA をノックインしたマウス系統と Cre 依存的にジフテリア毒素受容体 (Diphtheria toxin receptor; DTR) を発現するマウス系統の交配から得られる胎仔・新生仔にジフテリア毒素を投与し、解析に用いる。

**3. 老化誘導骨芽細胞と野生型骨芽細胞の共培養による分化への影響の検討**

蛍光標識したマウス (Fluor マウス) の頭蓋冠より採取した Fluor 骨芽細胞に Doxorubicin 処理を行って老化誘導骨芽細胞としたのちに、野生型マウス頭蓋冠より採取した骨芽細胞と共培養する。Fluor マウスと野生型マウスそれぞれに由来する骨芽細胞の混合割合を変化させることで、老化細胞による細胞分化や Fluor マウス由来の骨芽細胞の局在と石灰化に対する影響を検討する。

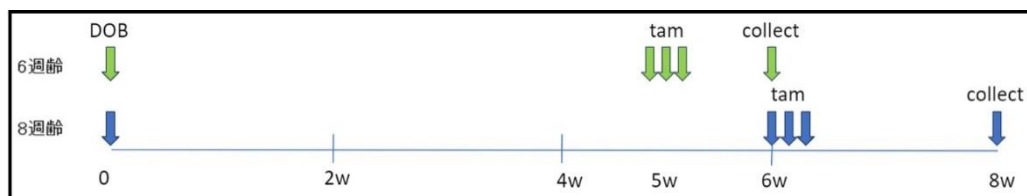
**【研究方法】****1. 正常顎顔面・四肢骨発生過程での老化細胞の局在の検討**

前述の複合変異マウス (p16-creERT2;R26RLSL-ZsGreen) を解析に用い、骨格系細胞の分化が開始する胎生 11 日齢から、組織学的な構造が完成する生後 8 週齢までの個体にタモキシフェンを複数回投与して Cre 活性を誘導した。長管骨、頭蓋骨を回収・固定後、一部は脱水、

透徹、包埋ののちにパラフィン切片を作製し、KEYENCE BZ-X800 蛍光顕微鏡により観察を行った。また、一部は CUBIC-L 試薬による脱脂、CUBIC-R 試薬による屈折率調整を行い、長管骨の透明化標本を作製し、Zeiss Lightsheet 7 顕微鏡による 3 次元的観察を行った。以下に薬剤投与および回収のタイミングを示す。

### 1) 若年期 (下図参照)

- ・タモキシフェン 100  $\mu$ l (10 mg/ml) を 5 週齢で 3 日連続投与し、6 週齢で回収 (緑矢印)
- ・タモキシフェン 100  $\mu$ l (10 mg/ml) を 6 週齢で 3 日連続投与し、8 週齢で回収 (青矢印)

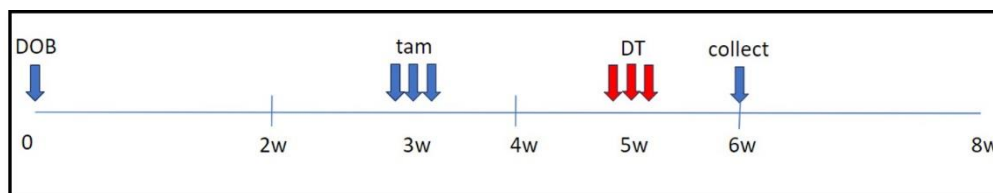


### 2) 胎生期

雌マウスのプラグを確認後、胎生 9.5、10.5 日齢でタモキシフェンを 100  $\mu$ l (10 mg/ml) 腹腔内投与、胎生 11.5~13.5 日齢での回収を試みたが、母胎内で胎仔の吸収が起こり、回収することができなかった。そのため、胎生 9.5 日齢でタモキシフェンを経口投与し体内の薬物濃度上昇を緩和させることで個体の吸収防止を試みた。胎生 12.5 日齢で回収したのちに固定し、凍結切片による蛍光顕微鏡観察を行った。胎生 9.5 日齢でタモキシフェンを経口投与し、胎生 18.5 日において胎仔の回収も試み、4 匹の胎仔の獲得には成功したものの、遺伝子型判定の結果、期待する複合変異マウスを得ることができなかった。

## 2. 老化細胞の正常形態形成への作用の検討

前述のマウス系統 (p16-creERT2;R26RLSL-DTR) に、タモキシフェン投与後、さらにジフテリア毒素を投与することで、任意の時期に標的細胞のみを除去できる Toxin Receptor-mediated Cell Knockout 法 (TRECK 法) を用いた。タモキシフェン 100  $\mu$ l (10mg/ml) は 3 週齢で 3 日間連続して投与 (下図青矢印)、ジフテリア毒素 150  $\mu$ l (10 ng/100 $\mu$ l) は 5 週齢で 3 日間連続投与し、6 週齢で回収した (下図赤矢印)。コントロールマウスも同様に薬物投与した。長管骨、頭蓋骨を固定後、CT 断層撮影を行った。その後、実験 1 と同様にパラフィン切片を作製した。



## 3. 老化誘導骨芽細胞と野生型骨芽細胞の共培養による分化への影響の検討

出生直後に回収した野生型マウスおよび Dermol-cre;R26RLSL-ZsGreen マウスの頭蓋骨から骨芽細胞を採取した。野生型骨芽細胞  $5 \times 10^4$  cell/well に対して、0、0.5、1、2、5、10% の割合で、細胞老化を誘導した Fluor 骨芽細胞、もしくは対照実験として DMSO で処理した Fluor 骨芽細胞を添加し、コンフルエントに到達後、50  $\mu$ g/ml のアスコルビン酸+5 mM ベー

タグリセロリン酸添加の骨誘導培地で培養し、13 日後にホルマリン固定を行った。石灰化の程度と、Fluor 骨芽細胞の分布の違いが細胞老化誘導の有無により変化するか観察した。また Doxorubicin 投与により、特徴的な細胞の大型化が生じている場合、過去の報告に従い細胞老化が誘導されたものとみなした (図 1 ; Doxorubicin による細胞老化が誘導された骨芽細胞。細胞の大型化を認める)。

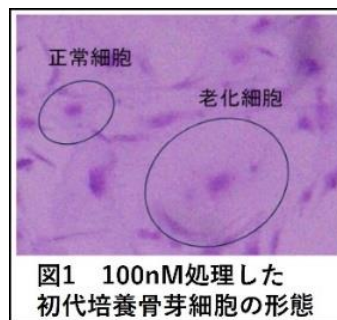


図1 100nM処理した初代培養骨芽細胞の形態

【研究経過および結果】

1. 正常顎顔面・四肢骨発生過程での老化細胞の局在の検討

1) 若年期

大腿骨骨端部の成長板では、増殖層に数層の連続した軟骨細胞の陽性細胞群が僅かに観察されるにとどまったが、成長板直下の一次海綿骨の骨芽細胞には多数の陽性細胞が観察された (図 2A : 緑色蛍光)。骨幹部の海綿骨では、骨梁表面に局在する骨芽細胞に多数の蛍光が見られ、皮質

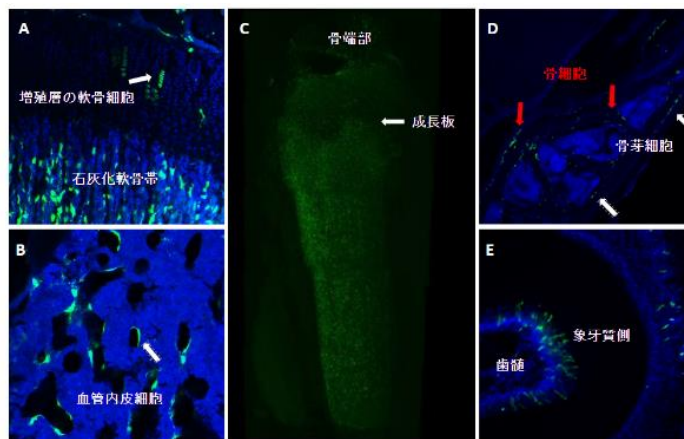


図2. 成獣期の細胞老化陽性細胞  
A)成長板および石灰化軟骨帯、B)骨髄、C)フットシート顕像顕微鏡による長官骨、D)頭蓋骨、E)前歯の歯髄-象牙質の拡大図

骨でも骨細胞の一部に陽性細胞が観察された。骨髄では、類洞の内側に沿うように血管内皮細胞と思われる陽性細胞が観察された (図 2B : 緑色蛍光)。

8 週齢マウス大腿骨透明化標本のライトシート蛍光顕微鏡観察では、骨端部から骨幹部に至るまで、広範囲に多数の陽性細胞の局在が観察された。一方、骨端部軟骨成長板では陽性細胞が少なかった (図 2C)。この結果は二次元的に老化細胞を検出した結果と一致していた。

頭蓋骨では、骨髄側骨膜表層に位置する骨芽細胞に陽性細胞が観察された。また、硬組織中にもごく僅かであるが、骨細胞の陽性細胞が観察された。(図 2D)。歯根膜中や、歯髄表層の象牙芽細胞と思われる細胞群にも多くの陽性細胞が観察された。(図 2E)

2) 胎生期

下顎原基の表層部に、わずかに強く蛍光を発する細胞が観察され、管構造の内壁には沿うように、蛍光の陽性細胞が観察された (図 3 左)。下肢では、表層および深層部共に、いくつかの陽性細胞が観察された (図 3 右)。

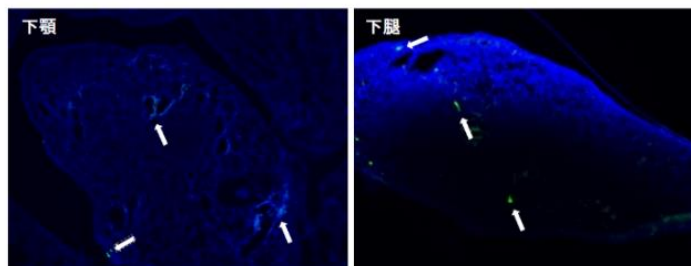


図3. 胎生12.5日齢の下顎および下肢の陽性細胞

## 2. 老化細胞の正常形態形成への作用の検討

生理的老化細胞をジフテリア毒素により実験的に除去したマウスにおいては、コントロールマウスに比べて、遠位大腿骨の一次海綿骨、二次海綿骨における骨梁数が増加した(図4)しかしながら、骨梁の太さに差は見られなかった。

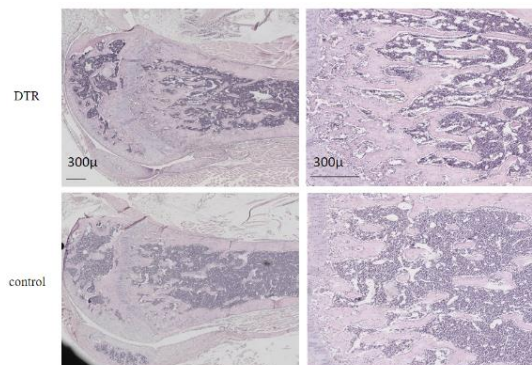


図4. DTR処理マウスとcontrolマウスの海綿骨骨量の比較

## 3. 老化誘導骨芽細胞と野生型骨芽細胞の共培養による分化への影響の検討

1) Doxorubicin の投与濃度の検討において、0~25 nM では老化は誘導されず細胞の増殖が見られ、250~1000 nM では、殆どの細胞で細胞死が誘導されていた。一方、50 nM と 100 nM では細胞の巨大化(=老化細胞)が観察されたため、より老化細胞の数が多かった 100 nM を老化誘導のための Doxorubicin 濃度に決定した(データ示さず)。

2) Fluor 骨芽細胞の割合に関わらず、石灰化の程度に差は見られなかった。DMSO 処理した Fluor 骨芽細胞投与群(図5 下段)では、石灰化物の存在に関わらず、Fluor 骨芽細胞が全体的に存在していた。一方、細胞老化誘導型 Fluor 骨芽細胞投与群(図5 上段)では、増殖が停止しているため、DMSO 群と比較し、Fluor 骨芽細胞自体少なく、いずれのウェルにおいても、老化細胞は石灰化物内には殆ど見られなかった。石灰化物形成部位の外側境界部に局在するか、石灰化部位からは離れた部位に局在していた。

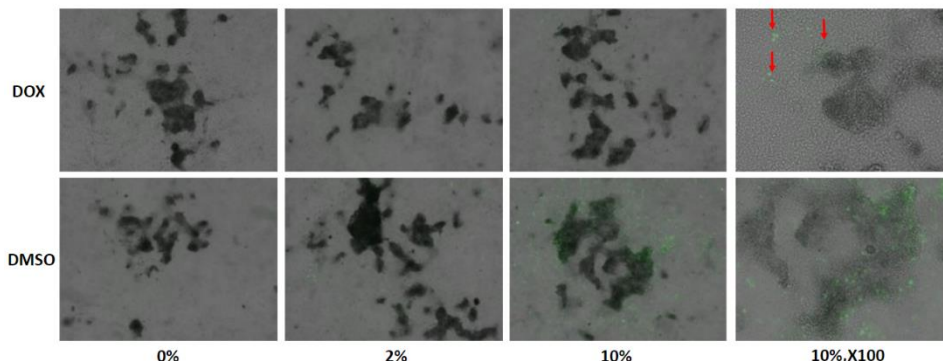


図5. doxorubicinおよびDMSO処理したDermo1-cre骨芽細胞と野生型骨芽細胞の共培養実験

### 【考察】

#### 1. 硬組織を構成する細胞群における生理的老化陽性細胞の検出

若年期の骨成熟過程では、p16-cre で蛍光ラベルされる老化細胞が数多く存在し、長管骨のみならず、頭蓋冠骨芽細胞、歯においては歯根膜中の細胞や象牙芽細胞にも蛍光が観察された。骨芽細胞と骨細胞いずれにも蛍光ラベルが観察され、特に一次海綿骨の骨芽細胞に顕著であった。このことは生理的細胞老化が増殖の止まった骨細胞で初めて見られるのではなく、前段階である骨芽細胞でみられたものが、骨細胞でも観察されている可能性を示唆している。骨芽細胞は分化の際に解糖系を主な糖代謝経路として用いることが示されているが<sup>2)</sup>、老化細胞でも代謝は活発に行われており、骨芽細胞と同様に解糖系を主な糖代謝経路として用いることが知られている<sup>3)4)</sup>。骨芽細胞がその分化過程で老化細胞様の機序を用い、

代謝のバランスを変化させている可能性が考えられた。骨芽細胞や骨細胞で多くの陽性細胞がみられたのに対して、軟骨成長板の軟骨細胞における老化細胞の局在は限定的で、細胞周期が停止していると考えられる肥大化軟骨細胞でも陽性細胞は少なかった。発生時期を変えた更なる検討は必要であるが、骨芽細胞と軟骨細胞の分化過程における細胞老化の関与に大きな違いがあることを示している。

胎生期では、下顎や下肢において、陽性細胞が極わずかであるが観察された。この実験系では妊娠雌マウスへのタモキシフェン投与による胎仔の吸収が高頻度にみられ、明らかに投与方法の改良が必要である。今後は濃度を減らし、1日に複数回投与するなど胎生期の胎仔に耐えうる投与プロトコールを検討していく。

## **2. 生理的老化細胞除去による骨格形成過程への影響の検討**

今回、骨成熟期における p16-cre ラベル老化細胞の除去は、組織学的に海綿骨量の増加をもたらした。前述のように p16-cre でラベルされる骨芽細胞は多数認められるものの、ラベルされない細胞に比べて数的には少ない可能性もあり、老化骨芽細胞は骨形成に対して負の作用を持つことが示唆される。しかし、老化細胞は出現する時期で作用が異なることが報告されている。例えば、Axolotl (ウーパールーパー) の四肢欠損再生の際、再生のごく初期に出現する老化細胞は四肢再生をサポートするために必須の細胞成分であり、再生をサポートするための分泌因子も一部同定されている。しかし、この老化細胞の出現はごく初期に一過性にみられるにとどまり、その消失が後の正常な再生に重要であることも示されている<sup>5)</sup>。骨形成における老化細胞の「正」の役割を見出すには、より早期の過程での老化細胞除去などの検討が必要であると考えられた。

## **3. 老化誘導型骨芽細胞と野生型骨芽細胞の共培養実験**

老化誘導細胞は石灰化領域内にほぼ存在していなかった。実験1の骨芽細胞では老化細胞は多く見られたのに対し、骨細胞ではその割合は少なかったことと矛盾しない。また、マウス個体レベルでラベルされている細胞は p16 をいったん発現した細胞が永久的にラベルされ続けるため、一過性の細胞老化システムの稼働から解除された骨芽細胞が骨細胞として骨基質に埋没していった可能性も考えられた。一方で、培養下の骨芽細胞は一度 Doxorubicin で処理すると細胞老化の状態が継続し、解除されることがないため、石灰化領域への侵入が非常に少なかったと思われる。

### **【結論】**

1. 生理的老化細胞が骨格器系細胞に認められた。
2. 生理的老化細胞の実験的除去により、若年期骨量の増加がみられた。
3. 老化誘導骨芽細胞は培養下で石灰化部位への局在はみられなかった。

### **【参考文献】**

- 1) Storer M et al. Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. Cell. 2013 Nov 21;155(5):1119-30.
- 2) Guntur AR et al. Osteoblast-like MC3T3-E1 Cells Prefer Glycolysis for ATP Production but

Adipocyte-like 3T3-L1 Cells Prefer Oxidative Phosphorylation. *J Bone Miner Res.* 2018 Jun;33(6):1052-1065.

3) Wiley CD, Campisi J. From Ancient Pathways to Aging Cells-Connecting Metabolism and Cellular Senescence. *Cell Metab.* 2016 Jun 14;23(6):1013-1021.

4) James EL et al. Senescent human fibroblasts show increased glycolysis and redox homeostasis with extracellular metabolomes that overlap with those of irreparable DNA damage, aging, and disease. *J Proteome Res.* 2015 Apr 3;14(4):1854-71.

5) Yu Q, Walters HE et al. Cellular senescence promotes progenitor cell expansion during axolotl limb regeneration. *Dev Cell.* 2023 Nov 20;58(22):2416-2427.