



Title	閉経後骨粗鬆症の新規治療薬開発に向けた骨マクロファージの解析研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	西田, 善郎
Description	配架番号 : 2915
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16423号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95557
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	NISHIDA_Yoshio_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 西田 善郎

学 位 論 文 題 名

閉経後骨粗鬆症の新規治療薬開発に向けた骨マクロファージの解析研究
(Research on osteal macrophages as
a potential innovative therapy for postmenopausal osteoporosis)

【背景と目的】

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランス(骨リモデリング)によって、その機能や強度が保たれている。骨粗鬆症は、種々の要因によって骨リモデリング調節が損なわれ、骨密度および骨強度が低下し易骨折性をきたした状態であり、女性ホルモンに骨吸収を抑える作用があるため、閉経後の女性で特に有病率が高い。骨粗鬆症を背景とした脆弱性骨折は増加傾向であり、たとえ適切な手術加療が行われたとしても、寝たきりや車いす生活を余儀なくされるなど活動性を損なうものである。超高齢社会にある本邦において、脆弱性骨折を防ぐための骨粗鬆症治療は、重要な役割を担っている。現在の骨粗鬆症に対する薬物治療は、主に破骨細胞や骨芽細胞をターゲットとした治療法であるが、その効果は限定的であるため、より有効な治療法が求められている。

近年、骨代謝を制御する新たな細胞として「骨マクロファージ」の概念が提唱されており、骨マクロファージが骨恒常性維持のために、骨リモデリングを調節・制御していることが分かってきている。しかし、女性ホルモン欠乏による骨マクロファージへの影響や、閉経後骨粗鬆症の発症への関与については明らかではない。

以上の背景から我々は、「骨マクロファージが閉経後骨粗鬆症における骨リモデリングを調節しており、その機能を維持することはより有効な骨粗鬆症治療となりうる」と仮説を立てた。本研究では、骨マクロファージのバイオインフォマティクス解析およびモデルマウスにおける *in vivo* 検証を通じ、上記仮説を検証することを目的とした。

【対象と方法】

(1. 骨マクロファージおよび腹腔内マクロファージの遺伝子発現解析)

10 週齢の雌 BALB/c マウスに対して、両側卵巣を切除(Ovariectomy, 以下 OVX)した閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作成した。術後 28 日目に単離した骨マクロファージおよび腹腔内マクロファージに対して RNA シークエンスを用いた網羅的遺伝子解析を行った。

(2. エストロゲンの細胞老化への影響および老化マクロファージ移植が骨吸収に及ぼす影響の検証)

1 の結果から、OVX によって骨マクロファージおよび腹腔内マクロファージにおける細胞老化関連遺伝子が発現上昇することが明らかとなった。そこで、マクロファージに過酸化水素刺激を与え細胞老化を惹起するモデルに対し、エストロゲン刺激および細胞老化抑制刺激を与える影響を *in vitro* と *in vivo* で検証した。さらに、細胞老化刺激を受けたマクロファージの移植が、局所の炎症性骨吸収に及ぼす影響を検証した。

(3. 老化マクロファージ除去が骨粗鬆症に及ぼす影響の検証)

2 の結果から、老化マクロファージが骨吸収を増悪させることが明らかとなった。そこで、老化マクロファージを除去することができれば、骨粗鬆症の進行予防および治療につながるのではないかと考え、*in vivo* 検証を行った。OVX マウスに対して、細胞老化抑制効果を有するグルタミン代謝阻害薬を投与する治療実験を行った。さらに、SCID マウスに対して OVX を行い、老化マクロファージのマーカー候補である CD52 抗体を投与する実験を行った。

【結果】

(1. 骨マクロファージおよび腹腔内マクロファージの遺伝子発現解析)

骨マクロファージに対する bulk RNA-seq では、OVX 群では炎症反応、酸化ストレスおよび細胞老化に関わる遺伝子が発現上昇していた。さらに、scRNA-seq では、骨マクロファージがその遺伝子発現により 6 つのサブセットに分かれることが明らかとなった。OVX 群と Sham 群とでサブセットの分布を比較すると、OVX 群では炎症反応や細胞老化に関わる遺伝子発現も持つサブセットの割合が増加しており、そのサブセットの特異的マーカー候補として CD52 が挙げられた。以上の結果から、OVX 群では炎症や老化に関わる骨マクロファージが増加することで、骨代謝を正常に制御する機能が低下しており閉経後骨粗鬆症の病態に寄与していることが示唆された。腹腔内マクロファージに対する bulk RNA-seq でも、OVX 群で炎症反応、酸化ストレスおよび細胞老化に関わる遺伝子が発現上昇していた。

(2. エストロゲンの細胞老化への影響および老化マクロファージ移植が骨吸収に及ぼす影響の検証)

SA- β -ガラクトシダーゼ(gal)染色による細胞老化アッセイでは、OVX 群では Sham 群に比して陽性細胞が増加していた。また、マクロファージに H₂O₂ を添加し培養した酸化ストレスモデル(in vitro)では、SA- β -gal 陽性マクロファージが増加し、pP53 などの細胞老化関連タンパクおよび遺伝子発現が上昇した。酸化ストレスモデルに対してエストロゲンまたは細胞老化抑制効果を有するグルタミン代謝阻害薬を投与することで、これらの変化は是正された。また in vivo 検証において、エストロゲンを投与された OVX マウス由来のマクロファージは、PBS 投与マウスと比較し SA- β -gal 陽性マクロファージおよび活性酸素種が減少していた。さらに、マウス頭頂骨にマクロファージを移植する炎症性骨吸収モデルでは、OVX マウスおよび酸化ストレスモデル由来マクロファージの移植により、骨吸収が増悪した。

(3. 老化マクロファージ除去が骨粗鬆症に及ぼす影響の検証)

グルタミン代謝阻害薬および CD52 抗体の投与により、OVX による骨量減少の程度は減弱した。組織学的評価においても、TRAP 染色における骨吸収領域および破骨細胞数は薬剤投与群で有意に低値であった。さらに、pP53 に対する免疫染色を行うと、OVX により増加する骨表面の pP53 陽性細胞は、グルタミン代謝阻害薬および CD52 抗体の投与により減少した。

【考察】

本研究では、まず骨マクロファージの遺伝子発現解析を行い、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて炎症や細胞老化に関連するサブセットの割合が増加していることを明らかにした。近年、エストロゲン欠乏が老化細胞の蓄積および女性における加齢性疾患の発症や進行に関与していると報告されている。また、エストロゲンにより抗炎症性・組織修復性に機能する抗炎症型マクロファージへの分化が促進されることが、種々の臓器で報告されている。以上から、卵巣切除によるエストロゲン欠乏が、骨微細環境内の老化細胞蓄積および、骨マクロファージの機能低下を引き起こし、閉経後骨粗鬆症の発症および進行に関与していることが推測された。

また治療実験では、グルタミン代謝阻害が OVX による骨量減少を緩和する効果を示した。グルタミン代謝を阻害することで、老化細胞の蓄積及び微小炎症を防ぎ、加齢性疾患の発症を予防するという概念が、近年注目を集めている。閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいても、老化した骨マクロファージの蓄積を防ぐことで、骨微細構造内の環境が正常化し骨量減少を緩和したと考えられる。さらに、SCID マウスに対して CD52 抗体を投与することでも、同様に OVX による骨量減少を緩和する効果を示した。SCID マウスにおいては、CD52 を発現している細胞は主に老化マクロファージであると考えられるため、老化マクロファージの閉経後骨粗鬆症への関与が強く示唆された。

【結論】

本研究では骨マクロファージの遺伝子発現解析によって、骨マクロファージが 6 つのサブセットに分かれること、閉経後骨粗鬆症モデルでは炎症や細胞老化に関連するサブセットが増加していることを示した。また種々の薬剤で老化細胞の蓄積を防ぐことで、閉経後骨粗鬆症モデルにおける骨量減少を抑制した。骨マクロファージは骨リモデリングの調節に密に関与しており、その機能を正常に保つことが閉経後骨粗鬆症治療のターゲットとなる可能性が示唆された。