



|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 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                                                                |
| 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                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k16423">https://doi.org/10.14943/doctoral.k16423</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/95957">https://hdl.handle.net/2115/95957</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | NISHIDA_Yoshio.pdf                                                                              |



学位論文

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)

2025 年 3 月

北海道大学

西田善郎



学位論文

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)

2025 年 3 月

北海道大学

西田善郎

## 目次

|                 |           |      |
|-----------------|-----------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録 | ・ ・ ・ ・ ・ | 1 頁  |
| 要旨              | ・ ・ ・ ・ ・ | 2 頁  |
| 略語表             | ・ ・ ・ ・ ・ | 5 頁  |
| 緒言              | ・ ・ ・ ・ ・ | 6 頁  |
| 方法              | ・ ・ ・ ・ ・ | 8 頁  |
| 結果              | ・ ・ ・ ・ ・ | 14 頁 |
| 考察              | ・ ・ ・ ・ ・ | 25 頁 |
| 総括および結論         | ・ ・ ・ ・ ・ | 29 頁 |
| 謝辞              | ・ ・ ・ ・ ・ | 30 頁 |
| 利益相反            | ・ ・ ・ ・ ・ | 31 頁 |
| 引用文献            | ・ ・ ・ ・ ・ | 32 頁 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Yoshio Nishida, M Alaa Terkawi, Gen Matsumae, Shunichi Yokota, Taiki Tokuhira, Yuki Ogawa, Hotaka Ishizu, Junki Shiota, Tsutomu Endo, Hend Alhasan, Taku Ebata, Keita Kitahara, Tomohiro Shimizu, Daisuke Takahashi, Masahiko Takahata, Ken Kadoya, Norimasa Iwasaki

Dynamic transcriptome analysis of osteal macrophages identifies distinct subset with senescence features in experimental osteoporosis.

JCI Insight. 2024 Dec 6;9(23): e182418.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 西田善郎、松前元、横田隼一、照川ヘンド、清水智弘、高橋大介、遠藤努、照川アラール、岩崎倫政

細胞老化に着目した骨マクロファージの骨代謝調節機能の検討

第38回日本整形外科学会基礎学術集会、2023年10月19日-20日、つくば市

2. Yoshio Nishida, M Alaa Terkawi, Keita Kitahara, Junki Shiota, Taiki Tokuhira, Tomohiro Shimizu, Hend Alhasan, Tsutomu Endo, Daisuke Takahashi, Norimasa Iwasaki

Targeting senescent osteal macrophages ameliorate excessive bone loss in postmenopausal osteoporosis: a new approach for prevention of osteoporotic fractures.

Orthopaedic Research Society 2024 Annual Meeting. February 2-6, 2024, Long Beach, CA. USA.

3. 西田善郎、徳廣泰貴、照川ヘンド、清水智弘、高橋大介、遠藤努、照川アラール、岩崎倫政

抗CD52抗体は骨マクロファージの機能を維持し閉経後骨粗鬆症を予防する

第39回日本整形外科学会基礎学術集会、2024年10月17日-18日、東京

## 要旨

### 【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)により、機能や強度が保たれている。骨粗鬆症は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、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、適切な加療が行われたとしても ADL の低下を招きうる。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ているが、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いる。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が、閉経後骨粗鬆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、「骨マクロファージは閉経後骨粗鬆症の病態に関与しており、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)

雌 BALB/c マウスの両側卵巣を切除(Ovariectomy, 以下 OVX)し、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 により骨マクロファージおよび腹腔内マクロファージで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  $H_2O_2$  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除去が骨粗鬆症の進行予防および治療につながると考え、OVX マウスに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を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し正常な骨代謝が損なわれることで、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- $\beta$ -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、酸化ストレスモデル(in vitro)では、SA- $\beta$ -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。in vivo 検証では、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- $\beta$ -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、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。組織学的評価では、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 に対する免疫染色では、OVX により増加する骨表面の pP53 陽性細胞が、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により、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて炎症や細胞老化関連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、エストロゲンが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を促進されることが報告されている。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。

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。グルタミン代謝阻害により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。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

|         |                                                  |
|---------|--------------------------------------------------|
| BP      | Bisphosphonate                                   |
| CD      | Cluster of differentiation                       |
| CT      | Computed tomography                              |
| DEG     | Differentially expressed genes                   |
| EDTA    | Ethylenediaminetetraacetic acid                  |
| FACS    | Fluorescence-activated cell sorting              |
| FBS     | Fetal bovine serum                               |
| FDR     | False discovery rate                             |
| GAPDH   | Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase         |
| GIC     | Glutaminase inhibitor compound                   |
| H&E     | Hematoxylin and Eosin                            |
| HRP     | Horseradish peroxidase                           |
| IL      | Interleukin                                      |
| LPS     | Lipopolysaccharide                               |
| MEM     | Minimum essential medium                         |
| pMΦ     | peritoneal Macrophages                           |
| NF-κB   | Nuclear factor kappa B                           |
| Omacs   | Osteal macrophages                               |
| OVX     | Ovariectomy                                      |
| PBS     | Phosphate buffered saline                        |
| qRT-PCR | quantitative real-time polymerase chain reaction |
| RANKL   | Receptor activator of NF-kappa B ligand          |
| ROS     | Reactive oxygen species                          |
| SASP    | Senescence-associated secretory phenotype        |
| SCID    | Severe combined immunodeficiency                 |
| SEM     | Standard error of the mean                       |
| SPF     | Specific pathogen free                           |
| TNF     | Tumor necrosis factor                            |
| TRAP    | Tartrate-resistant acid phosphatase              |

## 緒言

骨粗鬆症は、骨量が減少し骨の強度が低下する骨代謝疾患である。2021 年時点で世界で 3 億 7000 万人が骨粗鬆症に罹患しており、50 歳以上の女性の 40%は骨粗鬆症を背景とした脆弱性骨折を生涯で受傷すると報告されている(Wade et al., 2014)。骨粗鬆症を背景とした脆弱性骨折は、たとえ適切に治療が行われたとしても、寝たきりや車椅子生活を余儀なくされるなど活動性を著しく損なうものである。超高齢社会にある本邦における脆弱性骨折の患者数は増加傾向にあり、その背景にある骨粗鬆症の治療への需要が高まっている。実際に臨床現場では、典型的な脆弱性骨折である大腿骨近位部骨折の患者に対する「二次骨折予防継続管理料」が 2022 年 4 月の診療報酬改定で新設された。これは骨折患者に対して、次の骨折を起こさないための骨粗鬆症治療介入を推進するものであり、有効かつ継続的な骨粗鬆症治療が国策としてすすめられている。

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成の一連のサイクルである、「骨リモデリング」によって代謝バランスが保たれている組織である。骨リモデリングは多様なサイトカイン、ホルモン、成長因子などによって高度に制御され、生理的環境下においては骨吸収と骨形成は均衡のとれた状態に保たれている。種々の原因で骨リモデリングの制御機構が破綻し、破骨細胞の活性化による過度の骨吸収が生じることで、骨量が減少し骨粗鬆症に至る。この骨リモデリングを調節する種々の薬剤が現在臨床使用されている。キードラッグのひとつである bisphosphonate (BP)剤は、骨表面に吸着し破骨細胞に取り込まれることで破骨細胞のアポトーシスを誘導し、骨吸収を抑制する。Denosumab は receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)を標的としたヒト型 IgG2 モノクローナル抗体であり、破骨細胞の分化に必要な RANKL を阻害することで強力な骨吸収抑制効果を有する。Teriparatide はヒト副甲状腺ホルモンの 1~34 番目のアミノ酸に相当する遺伝子組換えペプチドであり、骨芽細胞による骨形成を促進し BP 剤や denosumab とは違う機序の骨粗鬆症治療薬である。しかしながら、これらの薬剤による骨粗鬆症の治療効果は限定的であり、脆弱性骨折の増加を食い止めるまでには至っておらず、より有効な骨粗鬆症治療薬の開発が求められている。上述の薬物療法は、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ため、骨芽細胞・破骨細胞を制御する細胞やメカニズムをターゲットとした別のアプローチが必要ではないかと考えた。

近年、骨に存在する組織特異的なマクロファージである「骨マクロファージ(Osteal macrophages, 以下、Omacs)」の概念が提唱されている。骨マクロファージの枯渇が骨形成減少や骨粗鬆症と関連するなど、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(Terkawi et al., 2022)。し

かしながら、骨マクロファージがどのようにして破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を制御しているかは不明であり、骨マクロファージをターゲットとした治療法はこれまで報告されていない。骨マクロファージの骨代謝制御における機能を解明すれば、骨リモデリング調節機構そのものを是正することができる、より有効な骨粗鬆症治療につながるのではないかと着想した。

本研究では、新規骨粗鬆症治療薬の開発を目指し、遺伝子発現解析と動物実験モデルによる検証を通して骨マクロファージの骨代謝制御機能を解明することを目的とした。はじめに、偽手術マウスと骨粗鬆症モデルマウスから単離した骨マクロファージを網羅的遺伝子解析にかけ、遺伝子発現の変化を明らかにした。続いて、この網羅的遺伝子解析結果から骨粗鬆症モデルマウスでは「細胞老化」が起きていることに着目し、老化細胞の除去が骨粗鬆症に及ぼす影響を調査した。

## 方法

### 0. 倫理審査の承認および患者説明

本研究で使用したヒトサンプルは全て、北海道大学病院における IRB の承認を受けた後に取得し使用した (承認番号：018-0334)。検体の取得に際しては、患者に対して文書による説明および同意を得た後に、臨床検体を回収し研究に使用した。また本研究における動物実験は、全て北海道大学大学院医学研究院における動物実験委員会の承認を受けて行った(承認番号：22-0135, 23-0151, 24-0083)。

### 1. 骨マクロファージおよび腹腔内マクロファージの網羅的遺伝子解析

両側卵巣を切除した閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作成し、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。

#### 1-1. 閉経後骨粗鬆症モデルマウスの作製

SPF-BALB/c 10 週齢雌マウスに 100 mg/kg のケタミンと 10 mg/kg のキシラジンを腹腔内注射することで麻酔をかけ、両側卵巣摘出(ovariectomy, 以下、OVX)を行った。麻酔下に腹膜切開のみを行ったマウスを Sham マウスと設定した。

#### 1-2. 骨マクロファージの単離

OVX マウスと Sham マウスの大腿骨および椎体骨を、術後 28 日目に採取した。骨髓腔を洗浄し骨髓細胞を除去した後に、骨組織を小片に切断し 0.25%トリプシンを用いて 37℃で 30 分間、続いて 0.25 U/ml コラゲナーゼ D (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて 37℃で一晩処理した。その後、蛍光活性化細胞選別(FACS)を用いて細胞を選別し、CD11b, F4/80, CD68 (BioLegend, CA, USA)に対する特異的抗体を用いて、CD11b-F4/80 二重陽性および CD11b-CD68 二重陽性の細胞を骨マクロファージとして使用した。

#### 1-3. 腹腔内マクロファージの単離

OVX マウスと Sham マウスを安楽死させ、腹腔内に PBS 10ml を注入した後に回収し、腹腔内マクロファージを単離した。単離した腹腔内マクロファージに対して、細胞老化アッセイおよびタンパク、遺伝子発現評価、免疫蛍光染色を行った。

#### 1-4. RNA の抽出及び bulk RNA シークエンス

1-2 および 1-3 で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を、TRIzol

Reagent (Invitrogen, USA) を用いて溶解し、NucleoSpin® RNA(TAKARA, Tokyo, Japan) を用いて Total RNA 抽出した。1μg の RNA から NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (MA, USA)を用いてライブラリを作成し、Illumina NovaSeq 6000 (Illumina)を用いて塩基配列を決定した。150bp×2 ペアエンド、1 サンプルあたり 2670 万リード平均で fastp でトリミングし、Hisat2 を用いてマウスゲノム(mm10)をアライメントとして使用しマッピングを行った。False discovery rate (FDR)が 0.05 未満のものを Differentially expression genes (DEGs)とした。

#### 1-5. Single cell RNA シークエンス

1-2 で単離した骨マクロファージを CellDropFL(DeNovix, DE)を用いて AO/PI 染色し計数した。TotalSeq(BioLegend, USA)を用いて標識して得られた細胞(OVX: 1037, Sham: 1084)を 10X Chromium(10X Genomics, USA)にかけて、Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1 を用いて解析した。ライブラリは KAPA Library Quantification Kit(KAPA Biosystems, USA)を用いて定量し、MGI DNBSEQ-G400(MGI Tech, China)を用いて塩基配列を決定した。得られた 435,107,683 リードは、マウスゲノム(mm10)をアライメントとして使用し 10X Genomics Cell Ranger pipeline v6.0.1(10X Genomics, USA) を用いて定量し、BBrowserX software(BioTuring Inc., USA: <https://bioturing.com/bbrowserx>)によってクラスタリングなどの解析を行った。

#### 1-6. バイオインフォマティクス

DEGs に対して Gene Ontology エンリッチメント解析およびパスウェイ解析を行った。データベースは A gene Annotation & Analysis Resource Metascape (<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) および Transcriptional Regulatory Relationship TRRUST (<https://www.grnpedia.org/trrust/>)を使用し、作図には SRplot tools (<http://www.bioinformatics.com.cn/srplot>)、Venny 2.1 および ImmGen (<https://www.immgen.org/Databrowser19/DatabrowserPage.html>)を使用した。

#### 1-7. 細胞老化アッセイ

1-3 で単離した腹腔内マクロファージを 96-well プレートに  $1 \times 10^4$  の割合で播種した。細胞接着後に、Senescence  $\beta$ -Galactosidase staining kit (Cell Signaling Technology, USA)を用いて老化関連酸性  $\beta$ -Galactosidase(SA- $\beta$ -gal)活性を評価した。

#### 1-8. ウェスタンブロッティング

1-3 で単離した腹腔内マクロファージを RIPA lysis buffer (ATTO, Tokyo, Japan) を用いて溶解した。マクロファージ溶解液を samples buffer EzApply (ATTO)と混合し、100°C

で 5 分間加熱処理した後、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。電気泳動後のゲルをメンブレンに転写した後、5%スキムミルクを用いて 1 時間室温でブロッキングを行った。次に、1 次抗体溶液でメンブレンを 1 時間室温で振盪した後、HRP 標識 2 次抗体を 1 時間室温で反応させた。十分に洗浄した後に、Quantity One v. 4.6.9 (Bio-Rad) software を用いて、標的タンパク質のバンドを検出し、ImageJ を用いて標的タンパク質のバンドの定量化を行った。本研究で使用した抗体は、実験方法セクション末尾の Table 1 に示した。

### 1-9. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

1-3 で単離した腹腔内マクロファージを TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, USA)を用いて溶解し、NucleoSpin RNA (Takara, Shiga, Japan)を用いて Total RNA を採取した。500ng の Total RNA から GoScript™ reverse transcriptase and random primer (Promega)を用いて逆転写し cDNA を合成した。次に、SYBR Premix Ex Taq™ II (Takara)と標的遺伝子のプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応を行った。遺伝子発現の定量評価には、 $2^{-\Delta\Delta CT}$  method を用いた。本研究で使用したプライマーは、実験方法セクション末尾の Table 2 に示した。

## 2. 酸化ストレスによるマクロファージ細胞老化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、マクロファージへの酸化ストレスおよびエストロゲン刺激・細胞老化抑制刺激の影響を解析した。さらに、細胞老化刺激を受けたマクロファージが、局所の炎症性骨吸収に及ぼす影響を検証した。

### 2-1. マクロファージ酸化ストレスモデル(in vitro)

SPF-BALB/c マウスから 1-3 と同様に腹腔内マクロファージを単離し、24-well および 96-well プレートにそれぞれ  $1 \times 10^5$  および  $1 \times 10^4$  の割合で播種した。細胞接着後に、過酸化水素(Wako, Osaka, Japan)を培地に付加することで酸化ストレス刺激( $100 \mu\text{M}$  で 1 時間、30 分の無刺激期間の後に  $200 \mu\text{M}$  で 1 時間)を与えた。酸化ストレスと同時に、 $100 \text{ nM}$  の  $\beta$ -estradiol(MedChemExpress, USA)または  $10 \mu\text{M}$  の glutaminase inhibitor compound (GIC) 968 (Cayman Chemical, USA)による刺激を加える群を設定した。各種薬剤刺激後、培地のみで細胞を 24 時間培養した後に、各種評価を行った。

## 2-2. OVX マウスに対するエストロゲン補充実験(in vivo)

1 と同様に OVX マウスおよび Sham マウスを作製し、術後 4 日目から  $5 \mu\text{g/kg}$  の  $\beta$ -estradiol (MCE, NJ, USA) もしくは PBS を連日腹腔内投与した。術後 28 日目に腹腔内マクロファージを単離し、96-well プレートに  $1 \times 10^4$  の割合で播種した。1-7 と同様の SA- $\beta$ -gal 活性と、活性酸素種(Reactive Oxygen species, 以下、ROS)を、ROS Assay Kit - Photo-oxidation Resistant DCFH-DA-(DOJINDO, Kumamoto, Japan)を用いて検出した。

## 2-3. マクロファージ移植による炎症性骨吸収モデル(in vivo)

1 と同様に OVX および Sham マウスから、術後 28 日目に腹腔内マクロファージを単離した。マクロファージを単離したマウスとは別の SPF-BALB/c マウスの頭頂部を麻酔下に 5mm 切開し、頭蓋骨上に OVX マウスおよび Sham マウス由来のマクロファージ( $1 \times 10^6/100 \mu\text{l}$ )を移植することで、炎症性骨吸収モデルを作製した。別の実験セットとして、無処置のマウスから腹腔内マクロファージを単離後、3-1 と同様に酸化ストレス刺激を加えたマクロファージを移植した。マクロファージ移植術の 5 日後にマウスを安楽死させ頭頂骨を採取し、マイクロ Computed Tomography (CT) (R-mCT2, Rigaku, Tokyo, Japan)を撮影し骨吸収域評価を行った。R-mCT2 で 3 次元画像を作成した後に、これを 2 次元画像としてダウンロードし、ImageJ で頭頂骨表面における骨吸収域を定量評価した。頭頂骨は CT を撮影後に 10% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid ; Wako) で 3 日間脱灰した後に、パラフィン包埋を行った。5  $\mu\text{m}$  厚の切片を作製し、各々のサンプルに対して Hematoxylin and Eosin (H&E)染色と TRAP 染色をそれぞれ行い組織学的に評価した。H&E 染色切片については、マウス頭頂骨の上に堆積している細胞浸潤厚を ImageJ で定量評価した。TRAP 染色については、赤色に染色される TRAP 染色領域を ImageJ で定量評価した(Figure 1)。

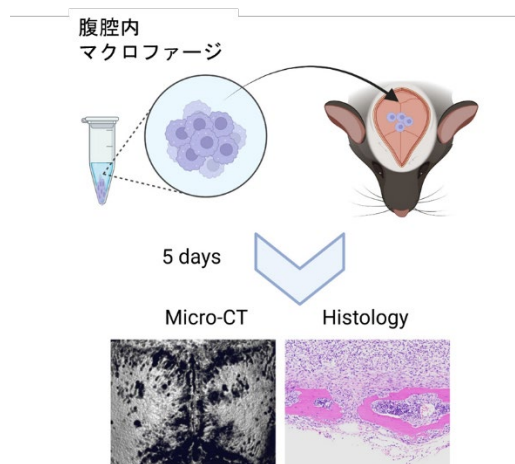


Figure 1. マクロファージ移植による炎症性骨吸収モデル

### 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着想を得た。

#### 3-1. グルタミン代謝阻害薬投与による閉経後骨粗鬆症進行予防効果の検証

1 と同様に OVX マウスを作製し、2 でも使用した GIC 968 を 5% DMSO (Wako) を溶媒として 10mg/ kg 腹腔内投与した(Treat 群)。コントロールとして Sham 群(Sham 手術、5% DMSO 投与)と Vehicle 群(OVX 手術、5% DMSO 投与)を設定した。薬剤は術後 8 日から週 3 回、3 週間投与し、術後 28 日目に右大腿骨を採取し、10 %ホルマリン(Wako)で 24 時間固定した。

#### 3-2. 免疫不全マウスに対する CD52 抗体投与実験

C.B17/Icr-scid マウスに対して、3-1 と同様に OVX マウスを作製し、抗 CD52 抗体(MBL, Nagoya, Japan)を 10 µg 腹腔内投与した。コントロールとして Sham 群(Sham 手術、PBS 投与)と control 抗体群(OVX 手術、control 抗体(Bio-X-Cell, NH, USA)投与)を設定した。薬剤は術後 14, 18, 21, 25 日目に投与し、術後 28 日目に右大腿骨を採取し、10 %ホルマリン(Wako)で 24 時間固定した。

#### 3-3. マイクロ CT および組織学的評価

採取した大腿骨および脊椎骨を、マイクロ CT (R-mCT2, Rigaku)撮影し、組織体積あたりの骨体積(BV/TV)、海綿骨数(Tb.N)、厚さ(Tb.Th)および間隙(Tb.Sp)、体積性骨密度(vBMD)などのパラメーターを、TRI/3D-BON(Ratoc System Engineering)を用いて測定した。続いて、骨の組織形態解析のため、固定した大腿骨を EDTA(pH 7.0)で 3 週間脱灰した後に、パラフィンに包埋した。5 µm 厚の縦断面を作成し TRAP 染色を行い、二次海綿骨領域における破骨細胞数/骨表面(N.Oc/B.Pm)を ImageJ で測定した。成長板の近位 250 µm を一次海綿骨領域、成長板の近位 250 µm から 1000 µm を二次海綿骨領域と定義した。

### 4. 統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差(SEM)をもって表記した。3 群以上の平均値を検定する場合は、ANOVA と Tukey の多重比較検定を用いた。2 群間の平均値の検定には、t 検定を用いた。すべての統計解析は、統計解析ソフト GraphPad Software Inc (La Jolla, CA, USA)を用いて行い、有意水準は 5%未満とした。

Table 1. 本研究で用いた各種抗体

| Antibody                                | Dilution | Manufacturer   | Research Resource Identifier (RRID) |
|-----------------------------------------|----------|----------------|-------------------------------------|
| <b>CD11b FITC</b>                       | 1:100    | BioLegend      | AB_312788                           |
| <b>F4/80 PE</b>                         | 1:100    | BioLegend      | AB_2832546                          |
| <b>CD68 PE</b>                          | 1:100    | BioLegend      | AB_10613469                         |
| <b>CD169 FITC</b>                       | 1:100    | BioLegend      | AB_2563106                          |
| <b>GFP</b>                              | 1:1000   | Invitrogen     | AB_221570                           |
| <b>P21</b>                              | 1:1000   | GeneTex        | AB_2888121                          |
| <b>pP21</b>                             | 1:1000   | Bioss          | AB_11097560                         |
| <b>P53</b>                              | 1:1000   | GeneTex        | AB_1952339                          |
| <b>pP53</b>                             | 1:1000   | GeneTex        | AB_2886801                          |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>           | 1:1000   | Cell signaling | AB_2715503                          |
| <b><math>\beta</math>-Galactosidase</b> | 1:1000   | Invitrogen     | AB_2851905                          |
| <b>CD52</b>                             | 1:1000   | Invitrogen     | AB_2901327                          |
| <b>GAPDH</b>                            | 1:1000   | Bioss          | AB_10856675                         |
| <b><math>\beta</math> actin</b>         | 1:1000   | Cell Signaling | AB_330288                           |
| <b>Anti-rabbit HRP</b>                  | 1:3000   | BioLegend      | AB_2099368                          |
| <b>Anti-mouse HRP</b>                   | 1:3000   | BioLegend      | AB_315009                           |

Table 2. 本研究で用いたプライマーの塩基配列

| Target                          | Forward                 | Reverse               |
|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <i><math>\beta</math>-actin</i> | GGCTGTATTCCCCTCCATCG    | CCTTCTGACCCATTCCCACC  |
| <i>Il-6</i>                     | TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC | TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC |
| <i>Il-1<math>\beta</math></i>   | TGAAATGCCACCTTTTGACAGTG | AGCCCTTCATCTTTTGGGGTC |
| <i>Tnf-<math>\alpha</math></i>  | AGCCGATGGGTTGTACCTT     | ATAGCAAATCGGCTGACG    |
| <i>Mmp-9</i>                    | GCCAGCCGACTTTTGTGGTC    | GTGTCCGTGAGGTTGGAGGT  |
| <i>Cd52</i>                     | CTTGGGACAAGCCACTACGG    | TGGATGAGGCCCACTCTTT   |

## 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網羅的遺伝子解析

閉経後骨粗鬆症モデルマウス由来骨マクロファージでは、炎症反応や酸化ストレス応答および細胞老化に関する遺伝子発現が増大していた

両側卵巣摘出(OVX)による閉経後骨粗鬆症モデルマウス由来の骨マクロファージに生じる変化を解析するため、bulk-RNA シークエンスを用いた網羅的遺伝子解析を行った。OVX 群では偽手術(Sham)群と比較し、231 の遺伝子が発現上昇しており、383 の遺伝子が発現減少していた(Figure 2A)。発現上昇していた 231 の遺伝子について Gene Ontology エンリッチメント解析およびパスウェイ解析を行うと、“inflammatory response”や、“RHO GTPases Activate NADPH oxidases”, “MAPK signaling pathway”, “Oxidative damage response”など、炎症反応および酸化ストレス応答に関するタームが有意に上昇していた(Figure 2B)。さらに、転写制御ネットワーク解析を行うと、p53 関連シグナルである Bcl2l1, Cdkn1b, EphA2, Gadd45a, Gpnmb などが有意に上昇していた(Figure 2C)。in vivo 実験においても、OVX マウスから採取した大腿骨に対して phospho-P53 免疫染色を行うと、骨表面における陽性細胞が存在した。さらには臨床検体においても、骨粗鬆症患者から採取した大腿骨組織では、骨表面に phospho-P53 陽性細胞が存在していた(Figure 2D)。これらの結果から、閉経後骨粗鬆症では骨マクロファージが細胞老化に傾き、骨微細環境内に老化した骨マクロファージが蓄積されることが示唆された。

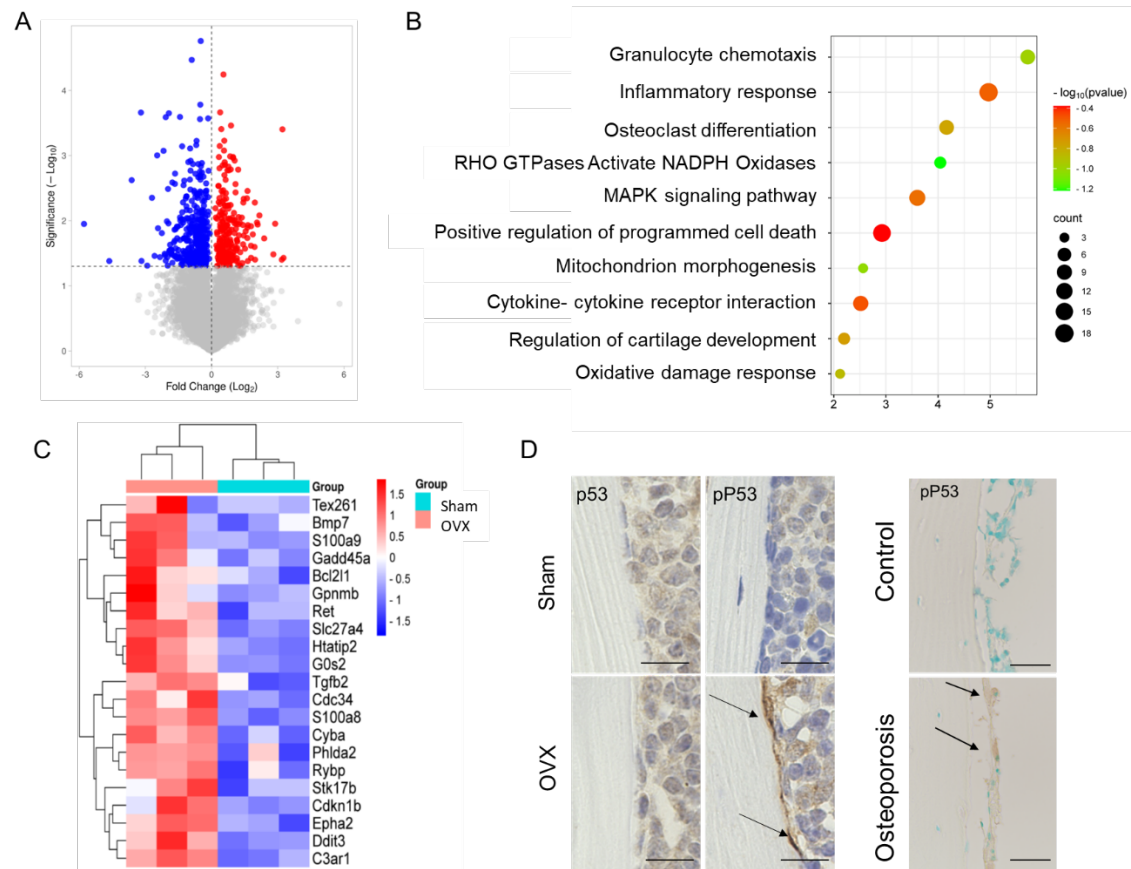


Figure 2. 骨マクロファージの bulk RNA シークエンス解析

- A. OVX マウスで有意に発現変動した遺伝子の Volcano plat 図。赤丸は発現上昇遺伝子を、青丸は発現減少遺伝子を示す。
- B. 発現上昇遺伝子の Gene Ontology エンリッチメント解析およびパスウェイ解析。
- C. Sham マウスと OVX マウスのヒートマップ。データは標準化され、赤が発現上昇、青が発現減少を示す。
- D. マウスおよびヒト大腿骨の免疫染色。左は Sham および OVX マウス、右はヒトの健常コントロールおよび骨粗鬆症患者検体。矢印は骨表面の陽性細胞を示す。

骨マクロファージは6つのサブセットに分かれ、閉経後骨粗鬆症モデルマウスでは炎症反応や細胞老化に関連するサブセットが増加していた

OVX が骨マクロファージの遺伝子発現に及ぼす影響をより詳細に明らかにするため、single cell RNA シークエンスを行った。その結果、OVX マウスおよび Sham マウスから単離された骨マクロファージは6つのサブセットに分かれることが明らかになった(Figure 3A)。これらは Major サブセットである Omacs 3,4,5 と、minor サブセットである Omacs 1,2,6 とに大別され、OVX マウスと Sham マウスとを比較すると、OVX マウスでは Omacs 3 の割合が増加し、Omacs 5 の割合が低下していた(Figure 3B)。trajectory 解析を行うと、Omacs 3 と 5 とは plot がほぼ重なっており、OVX によって Omacs 5 から 3 へシフトすることが示唆された(Figure 3C)。Omacs 3 について、Bulk-RNA シークエンスの際と同様に Gene Ontology エンリッチメント解析およびパスウェイ解析を行い他のサブセットと比較すると、“inflammatory response”や “positive regulation of programmed cell death”、“Trp53”などのタームが有意に上昇していた(Figure 3D)。さらには、酸化ストレスに関連する Ggt1, Ggt5, Mefv, Fas などの遺伝子は、Omacs 3 で有意に発現が上昇していた(Figure 3E)。これらの結果から、OVX により Omacs 3 の割合が上昇し、酸化ストレスを受け細胞老化した Omacs が蓄積することが示唆された。Omacs 3 の特徴を明らかにするため、major サブセットである Omacs 3,4,5 に関して追加で解析を行うと、Omacs 3 の特異的マーカーの候補として CD52 が挙げられた(Figure 3F)。

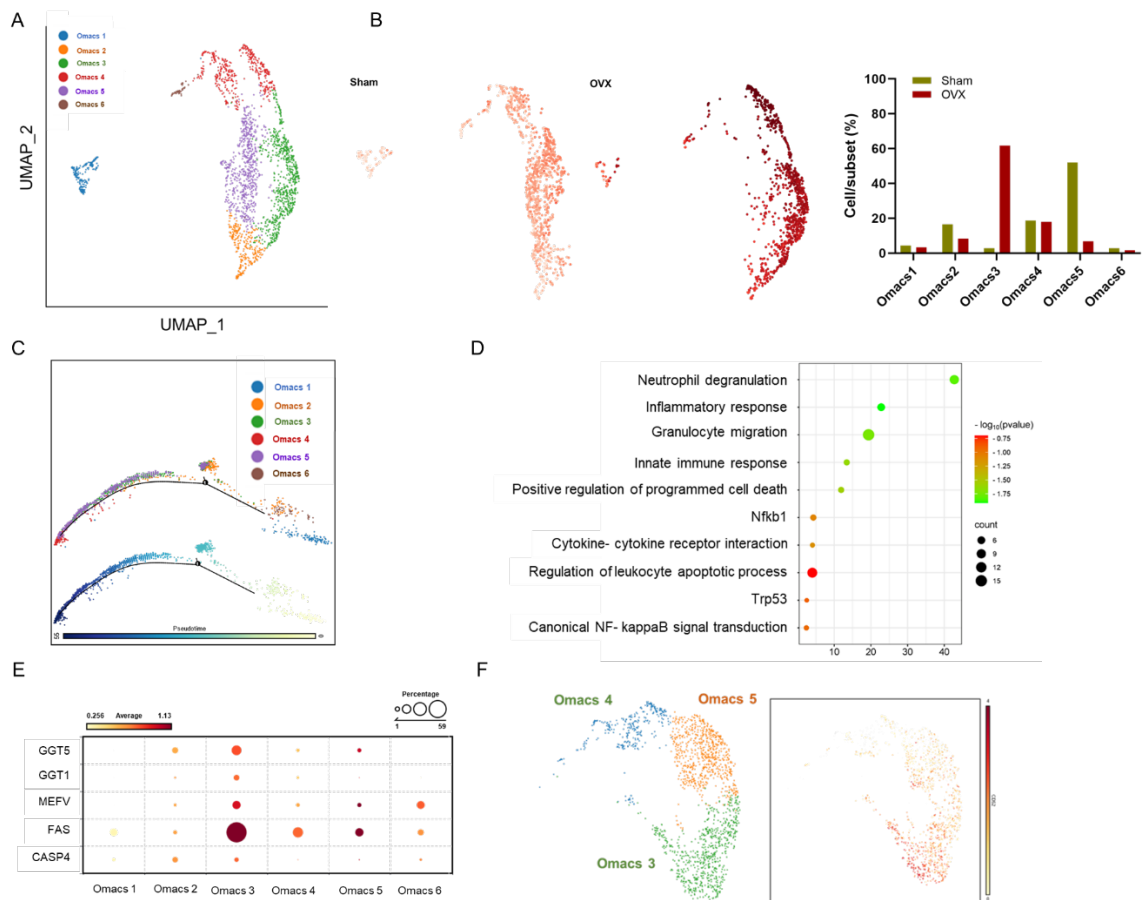


Figure 3. 骨マクロファージの single cell RNA シークエンス解析

- A. Sham マウスと OVX マウスから単離した骨マクロファージの UMAP プロット。
- B. Sham マウスと OVX マウスの骨マクロファージサブセット比較。右図は Sham と OVX それぞれの骨マクロファージサブセットの割合を示す。
- C. 骨マクロファージサブセットの trajectory 解析。下は pseudotime 解析で右から左に擬似時間が進む。
- D. Omacs 3 における発現上昇遺伝子の Gene Ontology エンリッチメント解析およびパスウェイ解析。
- E. 各サブセットにおける細胞死や酸化ストレス関連遺伝子発現を示すバブルヒートマップ。
- F. Omacs 3,4,5 における CD52 の発現比較。右図は色が濃いほど CD52 の高発現を示す。

閉経後骨粗鬆症モデルマウスでは腹腔内マクロファージにおいても酸化ストレス応答および細胞老化に関する遺伝子発現が上昇しており、タンパクレベルでも CD52 や pP53 の発現が亢進していた

閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおけるマクロファージの変化をより詳細に調査するため、腹腔内マクロファージについても bulk RNA シークエンスを行った。その結果、やはり酸化ストレスや p53 シグナル関連遺伝子である、mT-Atp6, mT-Ndu, mT-Co1, Txnrd1, Trp53i11 などの遺伝子発現が有意に上昇していた(Figure 4A)。ウエスタンブロッティングおよび qRT-PCR による検証でも、OVX マウスでは pP21 や pP53 などの既知の細胞老化マーカー、IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインおよび CD52 の発現が亢進していた(Figure 4B, C)。また細胞老化アッセイによる評価でも、老化マーカーである SA- $\beta$ -gal 陽性細胞数が有意に高値であった(Figure 4D)。さらに、CD52 が老化マクロファージのマーカーとなるかどうかを検証するため、P21 と CD52 の蛍光二重染色を行ったところ、OVX マウスでは二重陽性のマクロファージが観察された(Figure 4E)。以上の結果から、OVX により腹腔内マクロファージも酸化ストレスを受け細胞老化することが推察された。

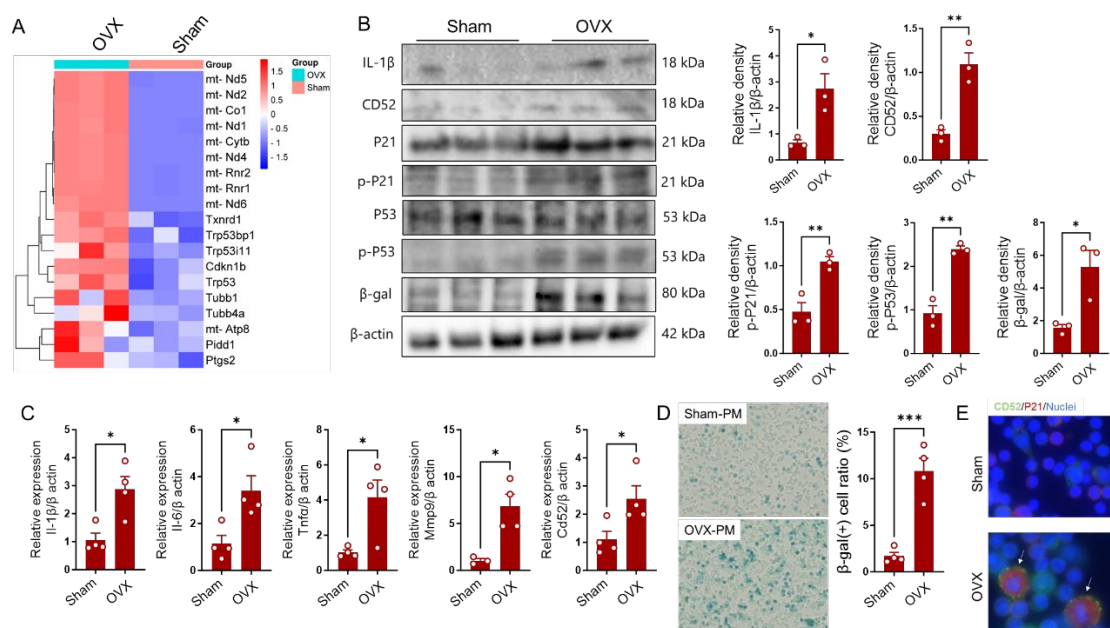


Figure 4. 腹腔内マクロファージのRNA シークエンス解析と in vitro 実験

- A. Sham マウスと OVX マウスのヒートマップ。赤が発現上昇、青が発現減少を示す。
- B. ウェスタンブロッティングによる腹腔内マクロファージのタンパク定量。右図は  $\beta$ -actin に対する相対的なバンド強度の解析。
- C. qRT-PCR による腹腔内マクロファージの遺伝子発現解析。
- D. 細胞老化アッセイ。老化マーカーである SA- $\beta$ -gal 陽性細胞は青く染まる。右図は陽性細胞数の解析。
- E. CD52 と P21 の免疫蛍光染色。青が核、緑が CD52 陽性、赤が P21 陽性を示す。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$

## 2. 酸化ストレスによるマクロファージ細胞老化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

**In vitro** において、マクロファージは過酸化水素刺激により細胞老化し、エストロゲンおよびグルタミン代謝阻害薬によって細胞老化を抑えることが可能であった

マウスから単離した腹腔内マクロファージに過酸化水素刺激を与え、酸化ストレスモデルを作成した。酸化ストレスによってSA- $\beta$ -gal 陽性マクロファージは増加したが、エストロゲンを投与すると陽性細胞数は減少した(Figure 5A)。ウェスタンブロッティングでも、IL-1 $\beta$ 、p-P21、p-P53、 $\beta$ -gal は酸化ストレスにより高発現となったが、エストロゲンの投与によりその変化は減弱、消失した(Figure 5B)。同様に、グルタミン代謝阻害薬である GIC968 を投与することで、酸化ストレスによるマクロファージの変化

は相殺された(Figure 5C, D)。

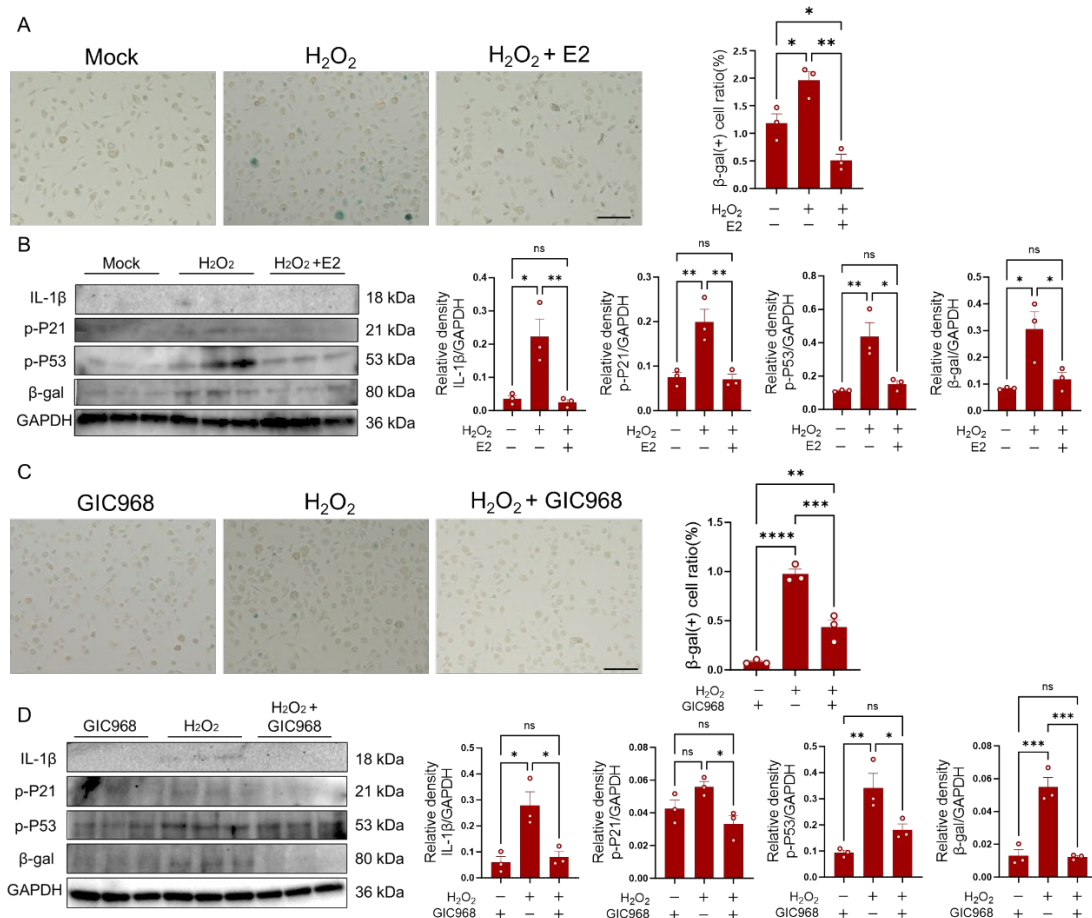


Figure 5. 酸化ストレスによる細胞老化モデルの実験結果

- A. エストロゲン投与実験の細胞老化アッセイ。SA-β-gal 陽性細胞は青く染まる。右図は陽性細胞数の解析。
- B. エストロゲン投与実験のウエスタンブロッティング。右図は GAPDH に対する相対的なバンド強度の解析。
- C. GIC968 投与実験の細胞老化アッセイ。
- D. GIC968 投与実験のウエスタンブロッティング。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\*\*\* :  $p < 0.0001$

エストロゲンを補充することで OVX マウス由来マクロファージの細胞老化は抑制された

エストロゲンが酸化ストレスによるマクロファージの老化を緩和することを *in vitro* で示したが、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいても同様のことが起きているかどうかを *in vivo* 検証した。Estradiol を投与された OVX マウス由来の腹腔内マクロファージ

ジは、PBS 投与マウスと比較し SA- $\beta$ -gal 陽性マクロファージは減少していた(Figure 6A)。さらに、ROS についても Estradiol の投与により有意に減少した(Figure 6B)。

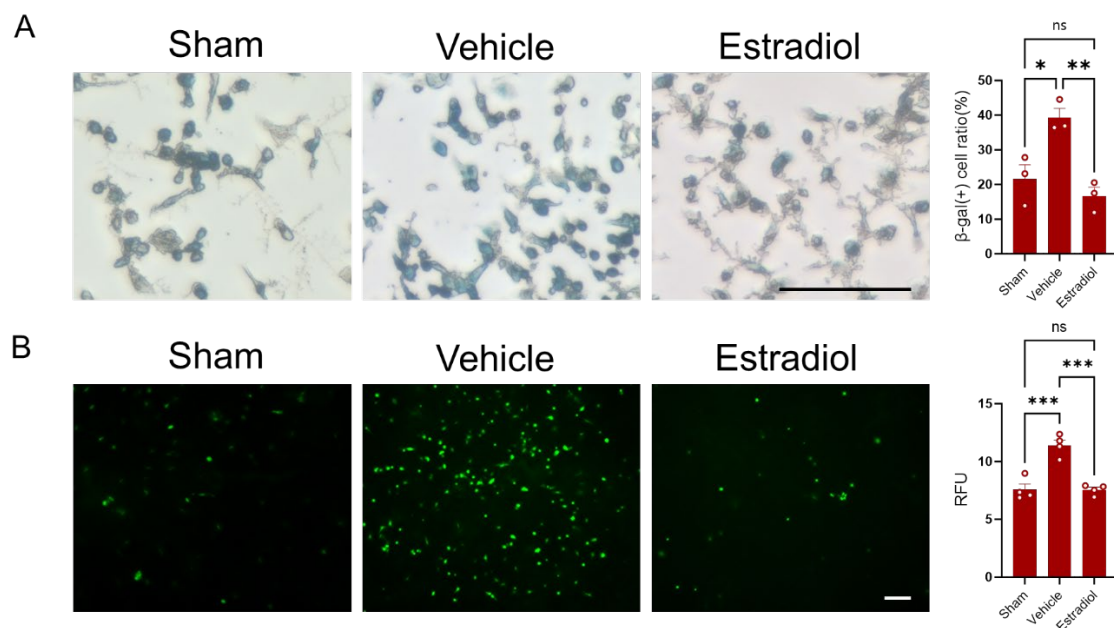


Figure 6. OVX マウスに対するエストロゲン補充の実験結果

A. 細胞老化アッセイの結果。SA- $\beta$ -gal 陽性細胞は青く染まる。右図は陽性細胞数の解析。

B. ROS 検出キットの結果。ROS を検出すると緑に染まる。右は蛍光シグナル強度の解析。RFU; Relative Fluorescence Unit

\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$

### 老化マクロファージの移植により局所の炎症性骨吸収は増悪した

ここまでの研究結果から、OVX および酸化ストレスによりマクロファージが細胞老化することが示された。細胞老化したマクロファージが骨に及ぼす影響を検証するため、OVX マウス由来マクロファージと過酸化水素刺激を受けたマクロファージを頭頂骨上に移植した。マイクロ CT 解析の結果、OVX マウス由来腹腔マクロファージと酸化ストレスマクロファージを投与したマウスは、コントロールマクロファージを投与したマウスに比べ、有意に大きな溶骨性病変を生じた(Figure 7A,B)。組織学的評価でも、これらのマウスはコントロールマウスと比較して、TRAP 染色陽性面積と炎症細胞浸潤の領域が有意に大きかった(Figure 7A,C,D)。これらの結果は、老化マクロファージが炎症と局所骨吸収を促すことを示し、閉経後骨粗鬆症の骨微細環境内での炎症発症にマクロファージが密接に関与していることを示唆する。

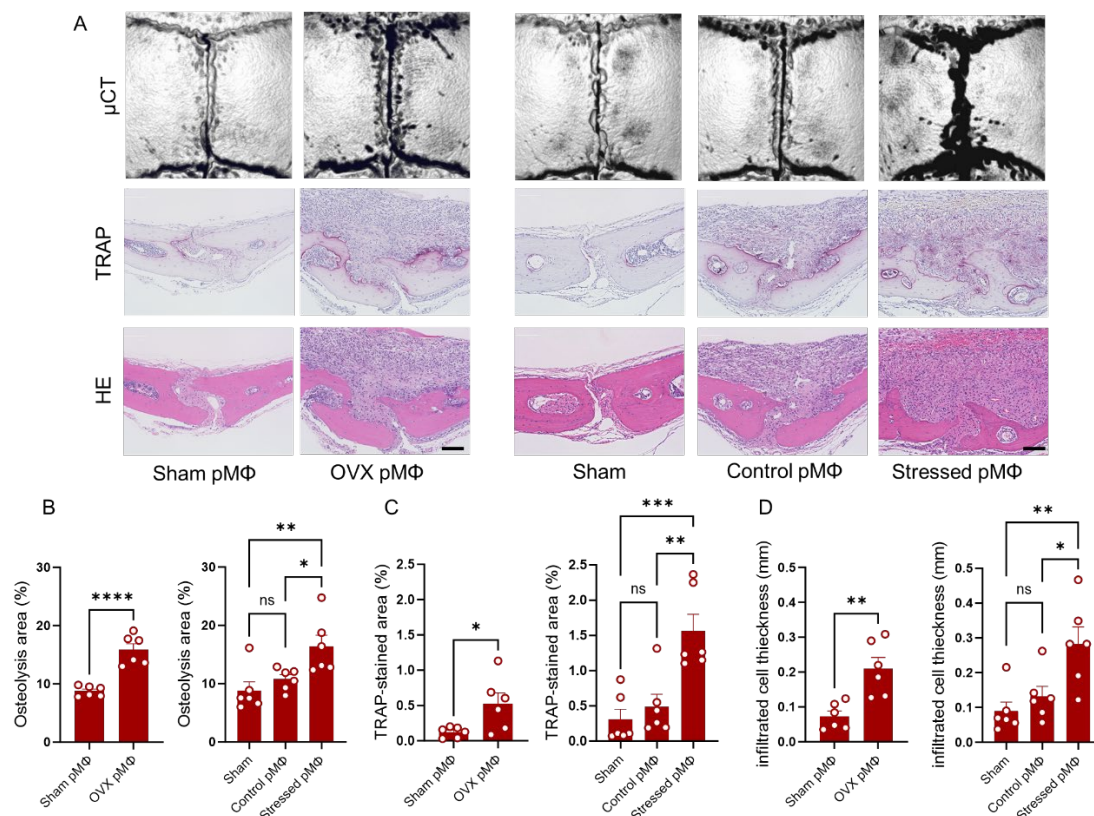


Figure 7. マクロファージ移植による炎症性骨吸収モデルの実験結果

A. マイクロ CT および組織学的評価の代表画像。左は OVX 由来マクロファージ移植、右は酸化ストレスマクロファージ移植。上段がマイクロ CT、中段が TRAP 染色、下段が HE 染色。

B. マイクロ CT の解析結果 C. TRAP 染色の解析結果

D. HE 染色の解析結果

\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$ 、\*\*\*\* :  $p < 0.0001$

### 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により OVX マウスにおける骨量減少は緩和された

1,2 の実験から、閉経後骨粗鬆症モデルでは骨マクロファージは細胞老化しており、老化した骨マクロファージの蓄積は炎症を惹起し骨量減少に関連するという知見を得た。そこで老化細胞の蓄積を防ぐことができれば、閉経後骨粗鬆症モデルにおける骨量減少を緩和することができるのではないかと考え、OVX マウスに対してグルタミン代謝阻害薬 GIC968 を腹腔内投与した。大腿骨遠位のマイクロ CT 評価では、GIC968 を投与した Treat 群では Vehicle 群よりも骨量が有意に高値であった。(Figure 8A)。組

組織学的評価では、大腿骨二次海綿骨領域における TRAP 陽性破骨細胞の数および骨吸収面は Treat 群で Vehicle 群と比較して有意に低値であった(Figure 8B)。さらに、免疫染色による骨表面の pP53 陽性、pP21 陽性細胞数についても、Treat 群で Vehicle 群と比較して有意に低値であった(Figure 8C)。

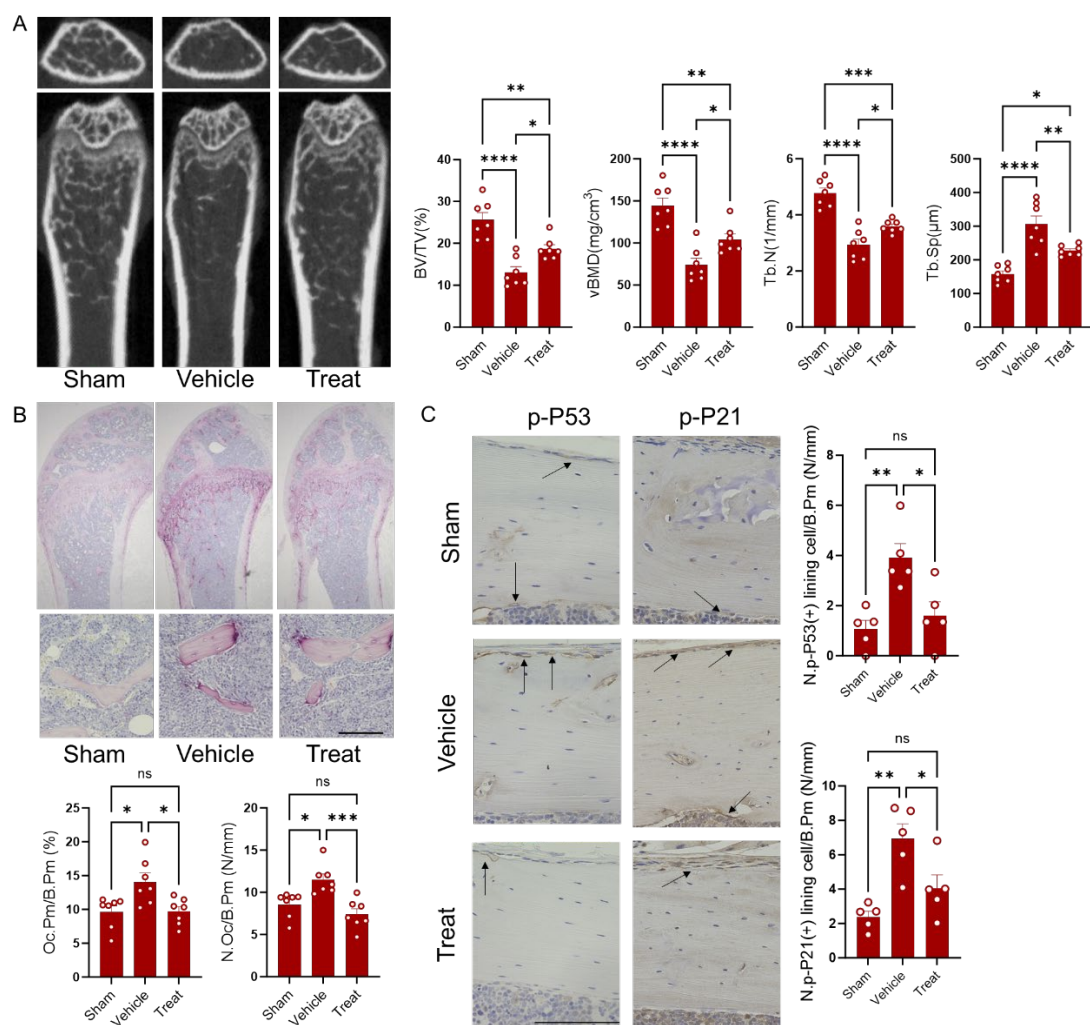


Figure 8. グルタミン代謝阻害薬による骨吸収抑制効果の治療実験結果

A. マイクロ CT の代表画像とその解析結果。

B. TRAP 染色の代表画像とその解析結果。

C. 免疫染色の代表画像と解析結果。矢印は p-P53 と p-P21 陽性細胞を示す。

\* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ , \*\*\*\* :  $p < 0.0001$

リンパ球を持たない SCID マウスに対する抗 CD52 抗体の投与は、閉経後骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少を緩和した

さらに、これまでの実験で老化マクロファージのマーカーとして挙げた CD52 を阻害し、老化マクロファージを除去する実験を行った。SCID マウスに対して OVX 手術を行い抗 CD52 抗体を投与すると、コントロール抗体を投与した群と比較してマイクロ CT 評価における骨量が有意に高値であった(Figure 9A)。TRAP 染色による組織学的評価でも、TRAP 陽性破骨細胞の数および骨吸収面は抗 CD52 抗体投与群で低値であった(Figure 9B)。さらに、骨表面における pP53 陽性細胞についても、抗 CD52 抗体投与群で低値であった(Figure 9C)。

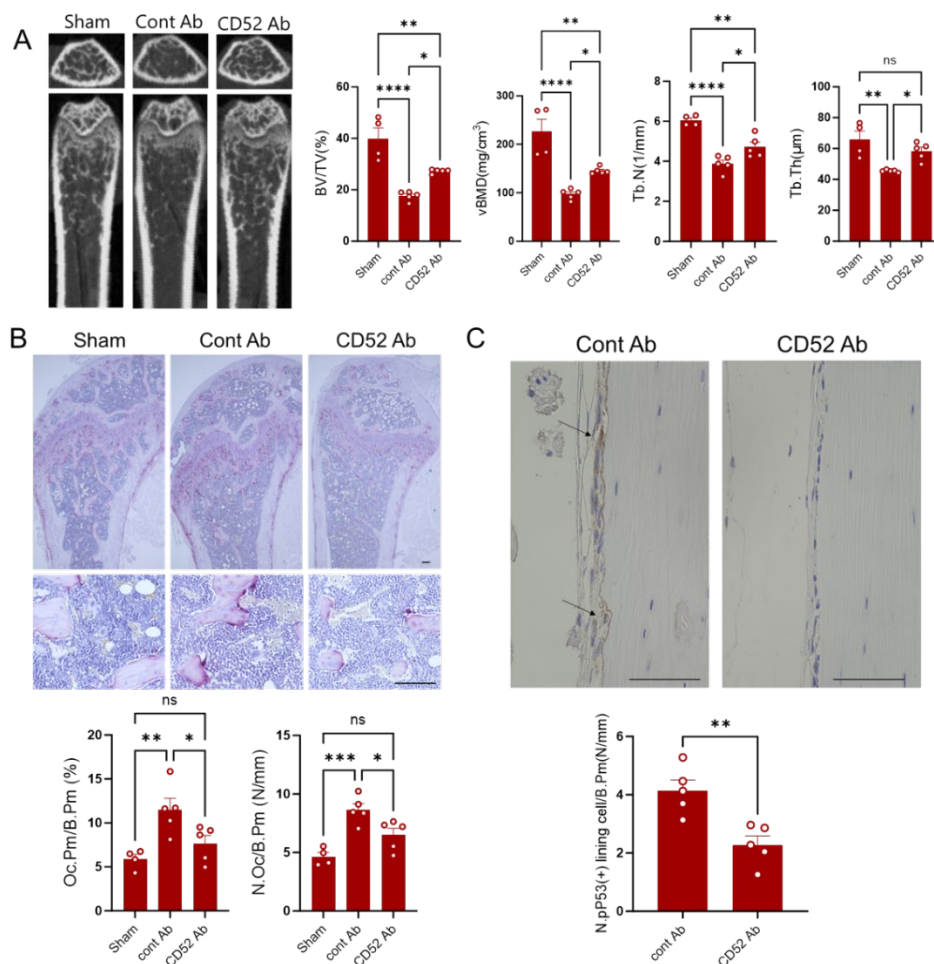


Figure 9. 抗 CD52 による骨吸収抑制効果の治療実験結果

A. マイクロ CT の代表画像とその解析結果。

B. TRAP 染色の代表画像とその解析結果。

C. 免疫染色の代表画像と解析結果。矢印は pP53 陽性細胞を示す。

\* :  $p < 0.05$ 、\*\* :  $p < 0.01$ 、\*\*\* :  $p < 0.001$ 、\*\*\*\* :  $p < 0.0001$

## 考察

閉経後骨粗鬆症による骨量減少は2つの段階に分かれる。閉経開始時に起こる骨量減少は海綿骨における骨吸収の増加を特徴とするが、2段階目の骨量減少は閉経後4-8年に起こり、骨形成の減少による海綿骨と皮質骨の持続的かつ緩やかな減少を特徴とする。この現象は、骨吸収を促進する因子の増加を伴うエストロゲン分泌量減少の結果である(Lerner, 2006) (Garnero et al., 1999)。マクロファージが組織において恒常性を維持する機能を持ち、周囲環境の変化に応答して骨代謝に影響を及ぼすという事実に基づき、我々は閉経後骨粗鬆症の新規治療法開発のために、閉経後骨粗鬆症モデルマウス内の骨マクロファージで起こる分子変化について探索した。

はじめに我々は骨マクロファージが6つのサブセットに分かれることを明らかにし、閉経後骨粗鬆症に関連するサブセットを同定した。閉経後骨粗鬆症モデルマウスでは、細胞老化や炎症に関連する遺伝子学的特徴を持つサブセットが増加していた。また、モデルマウスから採取した骨マクロファージと腹腔内マクロファージは、細胞老化の重要な調節因子として知られるNADPH オキシダーゼが活性化していた。エストロゲンの減少により、エストロゲン受容体を有する各臓器において老化細胞が増加し、それによって肺機能障害、心血管障害、神経変性、糖尿病などの加齢関連疾患の発症と進行を促進するということが報告されている(Liu et al., 2016) (Pepe et al., 2018) (Bayne et al., 2008)。また細胞レベルでは、エストロゲンは上皮細胞におけるテロメラーゼ活性、骨髄間質細胞におけるER $\beta$ -SATB2経路、骨髄間葉系幹細胞におけるJAK2/STAT3経路など、様々な経路を制御することにより、細胞老化を緩和する(Bayne et al., 2008) (Wu et al., 2018) (Wu et al., 2020)。さらに、エストロゲンがマクロファージの生理的活性化シグナルとして作用し、マクロファージの発生、自己複製、機能特化を制御していることが知られており、エストロゲンはマクロファージの貪食活性と極性を調節し、抗炎症性と修復性の表現型にシフトさせる(Pepe et al., 2018) (Bolego et al., 2013) (Campbell et al., 2014)。

閉経後骨粗鬆症モデルマウスではマクロファージが細胞老化していたという我々の結果は、骨微小環境における老化した骨髄系細胞の蓄積が、高齢者の骨量減少に寄与しているという知見と一致している(Khosla et al., 2022) (Farr et al., 2016)。細胞老化と骨代謝についてLiらは、p16欠損マウスでは骨細胞の老化と酸化ストレスの減少を示し、OVXマウスの骨密度、海綿骨量、コラーゲン陽性骨芽細胞数の増加をもたらしたと報告している(Li et al., 2020)。細胞老化は一般に、栄養欠乏、低酸素、ミトコンドリア機能障害、p16/Rb経路やp21/p53経路の活性化など、多くのストレス因子に細胞が反応した状態と考えられている。老化細胞の主な表現型の特徴としては、不可逆的な細胞周期の停止、Senescence-Associated Secretory Phenotype(SASP)分泌の増加を伴うア

ポトシスに対する抵抗性などが挙げられる。またミスフォールドタンパク質や異常タンパクの蓄積は、老化細胞で起こる特徴的な事象である (Khosla et al., 2022) (Gorgoulis et al., 2019)。さらに、エストロゲンはプロテアソームを介した経路で ER タンパク質の分解調節に関与しているとも報告されている (Alarid et al., 1999)。これらの報告と我々の研究結果とを踏まえると、閉経後骨粗鬆症モデルマウスではエストロゲンの減少により骨マクロファージ内のミスフォールドタンパク質や異常タンパク質が蓄積し、その機能が障害され骨代謝異常をきたす可能性が示唆される。しかしながら、エストロゲンの減少がどのようにして骨マクロファージにおけるタンパク質分解調節異常を惹起し、老化を引き起こすかという点については、さらなる研究が必要である。

近年、細胞老化と SASP の分泌により引き起こされる慢性炎症が加齢性疾患の原因となるという ”inflammaging” という概念が提唱されている (Barth et al., 2019)。慢性炎症と細胞老化の悪循環を引き起こし、臓器機能障害、組織損傷、加齢性疾患の発症を伴うというものである。骨代謝に関しても、慢性炎症は加齢に伴う骨量減少の原因であることが報告されており (Lencel and Magne, 2011)、治療ターゲットとしての研究も進んでいる (Livshits and Kalinkovich, 2022)。老化マクロファージは、TNF- $\alpha$ 、IL-6、MMP9、IL-1 $\beta$  などの SASP 産生増加を伴って、細胞周期チェックポイント阻害因子 p16INK4a や p21CIP1 のアップレギュレーションやミトコンドリアの機能不全、DNA 損傷の修復不全を示すことが報告されている (Li et al., 2023)。この過程では、ROS の増加による酸化ストレスが、老化細胞の蓄積と炎症を促進する悪循環をもたらす。今回我々は、OVX マウスにエストロゲンを補充すると、腹腔内マクロファージにおける ROS および老化マーカーの発現が減少することを示した。以上の知見から、更年期におけるエストロゲンの減少は、老化した骨マクロファージの蓄積を悪化させ、SASP を産生することによって骨微小環境における炎症発症の一因となり、過剰な骨量減少を促す可能性が示唆された。

さらに我々は、グルタミン代謝阻害薬の全身投与により、OVX マウスの骨量減少が緩和されることを示した。加えて、この治療により大腿骨中の老化骨マクロファージの数が減少した。今回我々が投与した Glutaminase Inhibitor Compound 968 は、マクロファージだけでなくあらゆる種類の細胞の老化を標的とするが、骨粗鬆症の骨微小環境において老化マーカーを発現している主要な細胞は骨髄表面の細胞であることが、我々のデータと以前の報告から明らかになった (Farr and Khosla, 2019)。これらの結果は、骨粗鬆症に伴う骨量減少と骨折のリスクを軽減するために、細胞老化をターゲットとすることが画期的な戦略であるという報告と一致している (Farr and Khosla, 2019) (Farr et al., 2017) (Geng et al., 2019)。この戦略を支持するものとして Johmura らは、glutaminase 1 の阻害による老化細胞の除去が、組織の微小炎症を改善し加齢に伴う障害を予防することを報告している (Johmura et al., 2021)。老化細胞を選択的に除去する

抗老化薬は、老年期の身体機能や活動を改善することにより、骨格系に有益な効果をもたらす(Xu et al., 2018)。実際に老化モデルに対する抗老化薬投与が、老化に伴う慢性疾患の発症を遅らせ、臓器機能を改善し、健康寿命を延ばすという報告が近年散見される(Baker et al., 2011, Baker et al., 2016) (Xu et al., 2015) (Roos et al., 2016) (Jeon et al., 2017)。

同様に、CD52 に対する抗体を用いて老化骨マクロファージである Omacs3 を減少させると、閉経後骨粗鬆症モデル SCID マウスの過剰な骨量減少が抑制された。この結果は、閉経後骨粗鬆症において老化骨マクロファージを標的とすることの重要性を補強する結果である。CD52 は CAMPATH-1 抗原と呼ばれ、成熟リンパ球や炎症を起こした単球や樹状細胞の表面に存在する糖タンパク質である。CD52 に対する抗体は、アレムツズマブとして B 細胞性慢性リンパ性白血病の治療に臨床使用されているが、近年では多発性硬化症や喘息、炎症性腸疾患に対する治療薬としての可能性も報告されている(Coles et al., 2012) (Liu et al., 2018) (Han et al., 2020)。加えて、多発性硬化症、喘息および臓器・細胞移植後の拒絶反応では、マクロファージと細胞老化が病態に関与していることも示されている(Oost et al., 2018) (Wan et al., 2023) (McGovern et al., 2023)。すなわち、抗 CD52 抗体アレムツズマブの治療効果は、老化した骨髄系細胞の除去効果によるものである可能性がある。しかしながら、老化マクロファージのマーカーとしての CD52 の有用性および骨粗鬆症治療への応用については、さらなる研究が必要である。

本研究にはいくつかの limitation が存在する。第 1 に、治療実験で用いたグルタミン代謝阻害薬および抗 CD52 抗体は、骨マクロファージ特異的に作用しているわけではないという点である。他の細胞への影響を完全には除去できていないが、免疫染色の結果からは骨マクロファージが少なからず関与していることは示していると考ええる。第 2 に、酸化ストレスと細胞老化のどちらが *in vivo* において最初に誘導されるのかについては示されていない点であり、今後さらに研究を進める必要がある。本研究結果から、骨マクロファージが 6 つのサブセットに分かれ、閉経後骨粗鬆症モデルマウスでは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示した。老化骨マクロファージをターゲットすることは、閉経後骨粗鬆症の治療および予防のための革新的な戦略であると考えられる(Figure 10)。

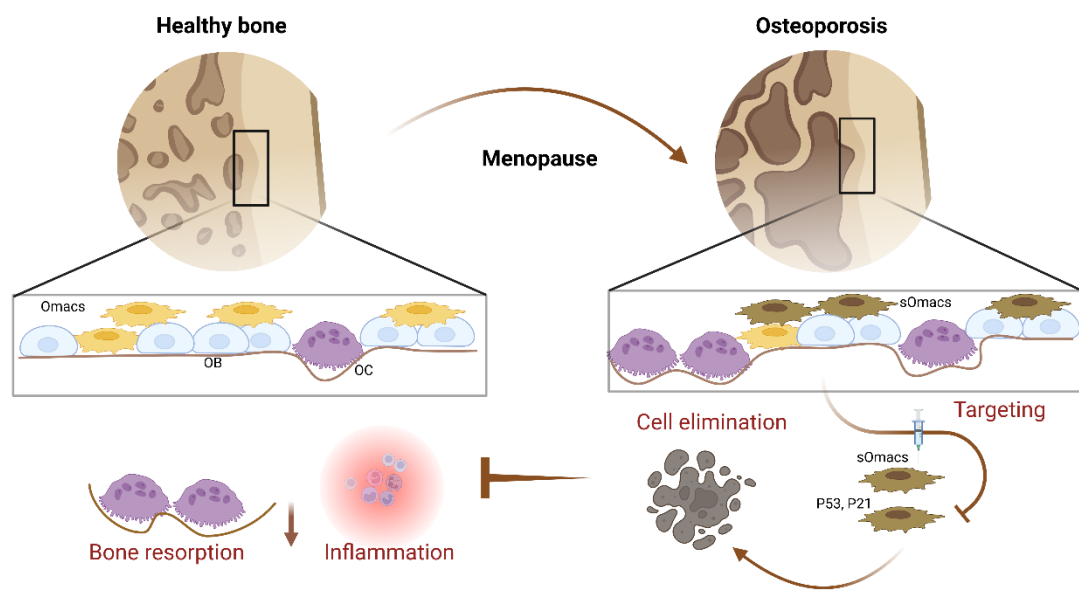


Figure 10. 本研究の総括。

## 総括および結論

- ・ 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける遺伝子発現解析と動物実験検証により、骨マクロファージの骨代謝制御機能を検討した。
- ・ 閉経後骨粗鬆症モデルマウスでは、骨マクロファージは酸化ストレスを受け細胞老化していた。
- ・ 骨マクロファージは 6 つのサブセットに分かれ、閉経後骨粗鬆症モデルマウスでは酸化ストレスや細胞老化に関する遺伝子学的特徴を有する Omacs3 の割合が増加していた。
- ・ 細胞老化をターゲットとしたグルタミン代謝阻害薬および抗 CD52 抗体の投与により、閉経後骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少は緩和された。
- ・ 老化骨マクロファージを除去することで骨マクロファージの機能が保たれ、骨リモデリング異常を是正できる可能性が示唆された。

本研究結果から、骨マクロファージが骨リモデリング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。既存の骨粗鬆症治療薬は、破骨細胞や骨芽細胞に作用するものであるが、骨マクロファージはそれらの細胞の上流に位置し骨リモデリング調節を行っている。そのため、骨マクロファージに直接はたらきかけるという概念は、これまでになく革新的な治療戦略として期待される。

## 謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学院医学専攻博士課程整形外科学教室の在学中に行った研究をまとめたものです。稿を終えるにあたり、研究の機会をくださった北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室教授岩崎倫政先生に深い感謝の意を表します。また本研究全般にわたり直接のご指導ご鞭撻を賜りました同助教 照川アラー先生に心より感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室の教官各位、教室員の皆様に心より感謝を申し上げます。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費助成事業(基盤研究 B; 23H03025)、公益財団法人ヒロセ財団、公益財団法人小林財団の助成を受けたものです。

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

- ALARID, E. T., BAKOPOULOS, N. & SOLODIN, N. 1999. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. *Mol Endocrinol*, 13, 1522-34.
- BAKER, D. J., CHILDS, B. G., DURIK, M., WIJERS, M. E., SIEBEN, C. J., ZHONG, J., A. SALTNESS, R., JEGANATHAN, K. B., VERZOSA, G. C., PEZESKI, A., KHAZAIE, K., MILLER, J. D. & VAN DEURSEN, J. M. 2016. Naturally occurring p16Ink4a-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, 530, 184-189.
- BAKER, D. J., WIJSHAKE, T., TCHKONIA, T., LEBRASSEUR, N. K., CHILDS, B. G., VAN DE SLUIS, B., KIRKLAND, J. L. & VAN DEURSEN, J. M. 2011. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature*, 479, 232-236.
- BARTH, E., SRIVASTAVA, A., STOJILJKOVIC, M., FRAHM, C., AXER, H., WITTE, O. W. & MARZ, M. 2019. Conserved aging-related signatures of senescence and inflammation in different tissues and species. *Aging*, 11, 8556-8572.
- BAYNE, S., JONES, M. E., LI, H., PINTO, A. R., SIMPSON, E. R. & LIU, J.-P. 2008. Estrogen deficiency leads to telomerase inhibition, telomere shortening and reduced cell proliferation in the adrenal gland of mice. *Cell Research*, 18, 1141-1150.
- BOLEGO, C., CIGNARELLA, A., STAELS, B. & CHINETTI-GBAGUIDI, G. 2013. Macrophage Function and Polarization in Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33, 1127-1134.
- CAMPBELL, L., EMMERSON, E., WILLIAMS, H., SAVILLE, C. R., KRUST, A., CHAMBON, P., MACE, K. A. & HARDMAN, M. J. 2014. Estrogen Receptor-Alpha Promotes Alternative Macrophage Activation during Cutaneous Repair. *Journal of Investigative Dermatology*, 134, 2447-2457.
- COLES, A. J., TWYMAN, C. L., ARNOLD, D. L., COHEN, J. A., CONFAVREUX, C., FOX, E. J., HARTUNG, H. P., HAVRDOVA, E., SELMAJ, K. W., WEINER, H. L., MILLER, T., FISHER, E., SANDBRINK, R., LAKE, S. L., MARGOLIN, D. H., OYUELA, P., PANZARA, M. A. & COMPSTON, D. A. 2012. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet*, 380, 1829-39.
- FARR, J. N., FRASER, D. G., WANG, H., JAEHN, K., OGRODNIK, M. B., WEIVODA, M. M., DRAKE, M. T., TCHKONIA, T., LEBRASSEUR, N. K., KIRKLAND, J. L., BONEWALD, L. F., PIGNOLO, R. J., MONROE, D. G. & KHOSLA, S. 2016. Identification of Senescent Cells in the Bone Microenvironment. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31, 1920-1929.
- FARR, J. N. & KHOSLA, S. 2019. Cellular senescence in bone. *Bone*, 121, 121-133.
- FARR, J. N., XU, M., WEIVODA, M. M., MONROE, D. G., FRASER, D. G., ONKEN, J. L., NEGLEY, B. A., SFEIR, J. G., OGRODNIK, M. B., HACHFELD, C. M., LEBRASSEUR, N. K., DRAKE, M. T.,

- PIGNOLO, R. J., PIRTSKHALAVA, T., TCHKONIA, T., OURSLER, M. J., KIRKLAND, J. L. & KHOSLA, S. 2017. Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nature Medicine*, 23, 1072-1079.
- GARNERO, P., SORNAY-RENDU, E., DUBOEUF, F. & DELMAS, P. D. 1999. Markers of Bone Turnover Predict Postmenopausal Forearm Bone Loss Over 4 Years: The OFELY Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14, 1614-1621.
- GENG, Q., GAO, H., YANG, R., GUO, K. & MIAO, D. 2019. Pyrroloquinoline Quinone Prevents Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis by Inhibiting Oxidative Stress and Osteocyte Senescence. *International Journal of Biological Sciences*, 15, 58-68.
- GORGOLIS, V., ADAMS, P. D., ALIMONTI, A., BENNETT, D. C., BISCHOF, O., BISHOP, C., CAMPISI, J., COLLADO, M., EVANGELOU, K., FERBEYRE, G., GIL, J., HARA, E., KRIZHANOVSKY, V., JURK, D., MAIER, A. B., NARITA, M., NIEDERNHOFER, L., PASSOS, J. F., ROBBINS, P. D., SCHMITT, C. A., SEDIVY, J., VOUGAS, K., VON ZGLINICKI, T., ZHOU, D., SERRANO, M. & DEMARIA, M. 2019. Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179, 813-827.
- HAN, Y., JIA, Q., JAHANI, P. S., HURRELL, B. P., PAN, C., HUANG, P., GUKASYAN, J., WOODWARD, N. C., ESKIN, E., GILLILAND, F. D., AKBARI, O., HARTIALA, J. A. & ALLAYEE, H. 2020. Genome-wide analysis highlights contribution of immune system pathways to the genetic architecture of asthma. *Nat Commun*, 11, 1776.
- JEON, O. H., KIM, C., LABERGE, R.-M., DEMARIA, M., RATHOD, S., VASSEROT, A. P., CHUNG, J. W., KIM, D. H., POON, Y., DAVID, N., BAKER, D. J., VAN DEURSEN, J. M., CAMPISI, J. & ELISSEEFF, J. H. 2017. Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nature Medicine*, 23, 775-781.
- JOHMURA, Y., YAMANAKA, T., OMORI, S., WANG, T. W., SUGIURA, Y., MATSUMOTO, M., SUZUKI, N., KUMAMOTO, S., YAMAGUCHI, K., HATAKEYAMA, S., TAKAMI, T., YAMAGUCHI, R., SHIMIZU, E., IKEDA, K., OKAHASHI, N., MIKAWA, R., SUEMATSU, M., ARITA, M., SUGIMOTO, M., NAKAYAMA, K. I., FURUKAWA, Y., IMOTO, S. & NAKANISHI, M. 2021. Senolysis by glutaminolysis inhibition ameliorates various age-associated disorders. *Science*, 371, 265-270.
- KHOSLA, S., FARR, J. N. & MONROE, D. G. 2022. Cellular senescence and the skeleton: pathophysiology and therapeutic implications. *Journal of Clinical Investigation*, 132.
- LENCEL, P. & MAGNE, D. 2011. Inflammaging: the driving force in osteoporosis? *Med Hypotheses*, 76, 317-21.
- LERNER, U. H. 2006. Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res*, 85, 596-607.
- LI, J., KARIM, M. A., CHE, H., GENG, Q. & MIAO, D. 2020. Deletion of p16 prevents estrogen deficiency-induced osteoporosis by inhibiting oxidative stress and osteocyte senescence. *Am J Transl Res*,

12, 672-683.

LI, X., LI, C., ZHANG, W., WANG, Y., QIAN, P. & HUANG, H. 2023. Inflammation and aging: signaling pathways and intervention therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8.

LIU, J., WANG, H., LI, Y., SHI, P., GONG, J., GU, L., ZHU, W. & LI, J. 2018. Anti-mouse CD52 Treatment Ameliorates Colitis through Suppressing Th1/17 Mediated Inflammation and Promoting Tregs Differentiation in IL-10 Deficient Mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41, 1423-1429.

LIU, Z., WANG, L., YANG, J., BANDYOPADHYAY, A., KAKLAMANI, V., WANG, S. & SUN, L. Z. 2016. Estrogen receptor alpha inhibits senescence-like phenotype and facilitates transformation induced by oncogenic ras in human mammary epithelial cells. *Oncotarget*, 7, 39097-39107.

LIVSHITS, G. & KALINKOVICH, A. 2022. Targeting chronic inflammation as a potential adjuvant therapy for osteoporosis. *Life Sci*, 306, 120847.

MCGOVERN, K. E., SONAR, S. A., WATANABE, M., COPLEN, C. P., BRADSHAW, C. M. & NIKOLICH, J. Ž. 2023. The aging of the immune system and its implications for transplantation. *GeroScience*, 45, 1383-1400.

OOST, W., TALMA, N., MEILOF, J. F. & LAMAN, J. D. 2018. Targeting senescence to delay progression of multiple sclerosis. *Journal of Molecular Medicine*, 96, 1153-1166.

PEPE, G., LOCATI, M., DELLA TORRE, S., MORNATA, F., CIGNARELLA, A., MAGGI, A. & VEGETO, E. 2018. The estrogen–macrophage interplay in the homeostasis of the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, 24, 652-672.

ROOS, C. M., ZHANG, B., PALMER, A. K., OGRODNIK, M. B., PIRTSKHALAVA, T., THALJI, N. M., HAGLER, M., JURK, D., SMITH, L. A., CASACLANG - VERZOSA, G., ZHU, Y., SCHAFER, M. J., TCHKONIA, T., KIRKLAND, J. L. & MILLER, J. D. 2016. Chronic senolytic treatment alleviates established vasomotor dysfunction in aged or atherosclerotic mice. *Aging Cell*, 15, 973-977.

TERKAWI, M. A., MATSUMAE, G., SHIMIZU, T., TAKAHASHI, D., KADOYA, K. & IWASAKI, N. 2022. Interplay between Inflammation and Pathological Bone Resorption: Insights into Recent Mechanisms and Pathways in Related Diseases for Future Perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 1786.

WADE, S. W., STRADER, C., FITZPATRICK, L. A., ANTHONY, M. S. & O'MALLEY, C. D. 2014. Estimating prevalence of osteoporosis: examples from industrialized countries. *Arch Osteoporos*, 9, 182.

WAN, R., SRIKARAM, P., GUNTUPALLI, V., HU, C., CHEN, Q. & GAO, P. 2023. Cellular senescence in asthma: from pathogenesis to therapeutic challenges. *eBioMedicine*, 94, 104717.

WU, G., XU, R., ZHANG, P., XIAO, T., FU, Y., ZHANG, Y., DU, Y., YE, J., CHENG, J. & JIANG, H. 2018. Estrogen regulates stemness and senescence of bone marrow stromal cells to prevent osteoporosis via ER $\beta$ -SATB2 pathway. *J Cell Physiol*, 233, 4194-4204.

WU, W., FU, J., GU, Y., WEI, Y., MA, P. & WU, J. 2020. JAK2/STAT3 regulates estrogen-related

senescence of bone marrow stem cells. *Journal of Endocrinology*, 245, 141-153.

XU, M., PIRTSKHALAVA, T., FARR, J. N., WEIGAND, B. M., PALMER, A. K., WEIVODA, M. M., INMAN, C. L., OGRODNIK, M. B., HACHFELD, C. M., FRASER, D. G., ONKEN, J. L., JOHNSON, K. O., VERZOSA, G. C., LANGHI, L. G. P., WEIGL, M., GIORGADZE, N., LEBRASSEUR, N. K., MILLER, J. D., JURK, D., SINGH, R. J., ALLISON, D. B., EJIMA, K., HUBBARD, G. B., IKENO, Y., CUBRO, H., GAROVIC, V. D., HOU, X., WEROHA, S. J., ROBBINS, P. D., NIEDERNHOFER, L. J., KHOSLA, S., TCHKONIA, T. & KIRKLAND, J. L. 2018. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nature Medicine*, 24, 1246-1256.

XU, M., TCHKONIA, T., DING, H., OGRODNIK, M., LUBBERS, E. R., PIRTSKHALAVA, T., WHITE, T. A., JOHNSON, K. O., STOUT, M. B., MEZERA, V., GIORGADZE, N., JENSEN, M. D., LEBRASSEUR, N. K. & KIRKLAND, J. L. 2015. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112, E6301-E6310.