

学位論文

間葉系間質細胞の骨芽細胞分化に及ぼす
細胞老化の影響

松井 龍一

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員: 小林 泰浩 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Effect of cellular senescence on osteoblast differentiation of
mesenchymal stromal cells

Ryuichi Matsui

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Yasuhiro Kobayashi)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要旨

加齢に伴い、骨量が減少し骨髄脂肪が増加することが知られている。この原因として、細胞老化が骨芽細胞への分化を抑制し、脂肪細胞への分化を促進するためであると考えられている。しかし、細胞老化が間葉系間質細胞の骨芽細胞への分化を抑制する機構は、十分に解明されていない。我々は骨髄間質系株化細胞である ST2 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす細胞老化の影響を検討した。ST2 細胞を 55 回以上継代し、細胞老化を誘導した。この継代数 55 回以上 (late passage) の ST2 細胞の性質を継代数 8 回以下 (early passage) の ST2 細胞と比較した。Late passage ST2 細胞は early passage ST2 細胞と比較し、顕著な細胞増殖の低下を示した。また、老化マーカーである Senescent-Associated β -Gal (SA- β -Gal) 染色陽性を示した。リアルタイム PCR 解析の結果 late passage ST2 細胞は老化マーカー *p16* mRNA, *p21* mRNA の発現が増加し、*Lamin B1* mRNA の発現が減少した。これらの結果から late passage ST2 細胞は細胞老化を呈することが示唆された。次に、ST2 細胞を石灰化誘導培地で培養すると、late passage ST2 細胞は石灰化不全を示した。Early passage ST2 細胞を Wnt3a で刺激するとアルカリホスファターゼ活性が誘導された。一方、late passage ST2 の培養では、Wnt3a によるアルカリホスファターゼ活性の誘導が低下した。Wnt3a 誘導性が減少する原因を検討するために Wnt/ β -カテニンシグナル阻害因子の遺伝子発現を調べると late passage ST2 細胞において *Dkk1* mRNA の発現

が上昇した。CHIR99021 を用い、Wnt/ β -カテニンシグナルを活性化させると継代数にかかわらずアルカリホスファターゼ陽性細胞が増加した。late passage ST2 細胞へ si-Dkk1 を導入すると *Dkk1* mRNA の発現量が減少し Wnt3a への感受性が改善された。他の老化誘導方法（p16 あるいは H-Ras G12V の過剰発現）を行った ST2 細胞において老化マーカーや *Dkk1* mRNA 発現の上昇が確認できた。また、p16 や H-Ras G12V の過剰発現による細胞老化誘導された ST2 細胞において Wnt3a によるアルカリホスファターゼ活性の誘導は低下した。以上の結果から細胞老化を誘導された ST2 細胞は *Dkk1* の発現が上昇し、Wnt 誘導性のアルカリホスファターゼの発現が低下することで骨芽細胞への分化が抑制される可能性が示唆された。

緒言

超高齢化社会の今日、骨粗鬆症患者数は増加の一途をたどっている¹⁾。運動機能障害をもたらすフレイルをはじめ、骨粗鬆症やサルコペニア（筋減少）を防ぐことは QOL 向上やサステイナブルな社会を実現するための喫緊の課題である。加齢に伴う骨量減少の原因として、骨芽細胞や軟骨細胞の前駆細胞である骨髄間葉系幹細胞の増殖が低下すること、さらに破骨細胞の分化が促進するため、骨吸収が亢進することが報告された²⁾。しかし、このような加齢に伴う変化が骨幹細胞の老化に起因するものか、幹細胞を支持する細胞が老化するため起こるのかは明らかでない。

ヒトは加齢に伴い骨形成および骨吸収が低下した低骨代謝回転型の骨量減少を呈する。この原因として、骨組織でのコラーゲン糖化産物の蓄積、老化細胞の増加や幹細胞の減少などが考えられている³⁾。また、加齢により骨髄内では老化細胞が蓄積し老化幹細胞の骨芽細胞/脂肪細胞への分化が脂肪細胞への分化へ転換が亢進するため脂肪髄を呈することも報告されている⁴⁾、⁵⁾、⁶⁾。細胞老化はテロメア短縮、DNA 損傷、酸化ストレス、がん遺伝子活性化などによって、細胞周期の非可逆的な停止が老化細胞の主要な機能であると考えられている⁷⁾、⁸⁾、⁹⁾。一方で、細胞老化は DNA 損傷などのストレスを受けた細胞の癌化を防ぐ有益な一面を持つため、加齢性疾患における老化細胞の役割解明は非常に重要な問題である。細胞老化が開始する際には、まず細胞周期調節因子 p16, p21 の発現上昇により細胞増殖が停止し、Lamin

B1 の減少により、細胞周期が停止することが知られている^{6)・10)}。また、老化細胞は単に細胞周期が停止するだけでなく、近年の研究によれば、老化細胞の新たな機能が明らかになりつつある。老化細胞由来培養上清を用いた実験から、老化細胞からは様々な因子を分泌し正常な細胞に影響を及ぼすことが示された^{11)・12)}。注目すべきこととして、炎症性サイトカイン (IL-6, TNF- α 等)、ケモカイン (MCP1, CCL 等)、成長因子 (PDGF-AA 等)、タンパク分解酵素 (MMP 等) などの様々な炎症性タンパク質の細胞外への分泌が増加することが明らかにされた^{7)・8)・9)}。これら老化細胞由来分泌因子は、老化関連分泌表現型 (senescence-associated secreted phenotype, SASP) と呼ばれ、主な作用としては腫瘍抑制、組織再生、胚発生、さらには腫瘍形成促進に寄与していると報告されている^{8)・9)}。従って、SASP の誘導を制御することで、恒常性の維持や疾患発症に大きな影響を与える可能性がある¹³⁾が、このプロセスの正確なメカニズムは全くわかっていない。そこで本研究では、マウス骨髄間質細胞株 ST2 細胞を用いて細胞老化を誘導し、老化細胞が骨芽細胞への分化がどのように抑えられているかを明らかにしようとした。

実験材料及び方法

1. 使用材料

ST2 細胞は American Type Culture Collection (Virginia, USA) より購入した。細胞数測定機材として Scpeter2.0 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を用いた。SA- β -Gal 染色を行うために Cellular Senescence Assay Kit は Merck KGaA から購入した。細胞固定液として 4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を用いた。Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification Medium (α -MEM 培地) は Sigma-Aldrich Japan (東京, 日本) より購入した。Fetal Bovine Serum (FBS) は Sigma-Aldrich Japan より購入した。 α -MEM 培地のコンタミネーションを予防するための Antibiotic Antimycotic Solution (100 \times), Stabilized は Sigma-Aldrich Japan より購入した。Recombinant mouse Wnt3a protein, Recombinant human Dkk1 protein, Recombinant human/mouse/rat BMP-2 protein は R&D systems 社 (Minneapolis, USA) から購入した。GSK-3 β 阻害剤である CHIR99021 は Sigma-Aldrich Japan より購入した。

2. 継代及び細胞培養

マウス間葉系幹細胞株 ST2 細胞を用い, 継代を連続的に繰り返し (55 回

以上) 細胞老化を誘発させた. 10 cm-dish に播種し 10% FBS・抗真菌剤含有 α -MEM にて培養し, サブコンフルエントになった時点で細胞を回収し新しい 10 cm-dish に 1/10 の濃度にて再播種, 培養し継代を行った. Early passage ST2 細胞は \leq passage 8 を示し, late passage ST2 細胞は \geq passage 55 を示す.

3. 細胞数測定

ST2 細胞を 6 well-plate に 1×10^3 個/well 播種し 10% FBS・抗真菌剤含有 α -MEM にて培養した. 2 日おきに Scpeter 2.0 を使用し細胞数を測定した.

4. SA- β -Gal 染色

ST2 細胞を 48 well-plate へ播種し, 10% FBS・抗真菌剤含有 α -MEM にて培養した. コンフルエントになった時点で 4% PFA にて固定し, Cellular Senescence Assay Kit により SA- β -Gal 染色を行った. 染色範囲は Image J (NIH, USA) にて定量した^{14), 15)}.

5. 石灰化誘導培地による細胞培養

ST2 細胞を 48 well-plate あるいは 96 well-plate へ播種し, サブコンフルエントになった後骨芽細胞分化誘導させるために石灰化誘導培地 (10%

FBS・抗真菌剤含有 α -MEM+アスコルビン酸: AA (100 μ g/ml) + β -グリセロリン酸: β -GP (2 mM) +骨形成タンパク質 2: BMP-2 (100 ng/ml)) へ培地交換を行った. 7 日間培養を行った後培養細胞を 4%PFA で固定しアルカリホスファターゼ染色 (ALP 染色) を行い, ALP 陽性細胞を観察した. 14 日間培養を行った後培養細胞を固定しアリザリンレッド S 染色 (ARS 染色) を行い, 石灰化度を観察した. 石灰化誘導培地に Dkk1 添加実験は細胞がサブコンフルエントになったことを確認したのち Dkk1 (500 ng/ml) を添加し, 24時間後 Dkk1 を加えた石灰化誘導培地に培地交換した. 以後、石灰化誘導培地には Dkk1 を添加し培地交換を行った. 7 日培養後、細胞を 4%PFA にて固定し ALP 染色を行った.

6. アルカリホスファターゼ染色

ALP 染色液は 1 mg Naphthyl AS-MX Phosphate (Sigma-Aldrich Japan, 東京, 日本), 100 μ l N-N-dimethyl formamide (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本), 6 mg FastBlue BB salt (Sigma-Aldrich Japan, 東京, 日本) を 0.1 M Tris-HCl (pH8.5) にて 10 ml までメスアップし作成した. 4%PFA にて固定を行い, その後染色液を加えて染色を行った. 染色範囲は Image J にて定量した.

7. アリザリンレッド S 染色

1%の濃度になるようアリザリンレッド S (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を蒸留水に溶解し, 28%アンモニア水 (富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪, 日本) を 100 倍希釈し作成した 0.028%アンモニア水を加え pH 6.4 に調節し染色液を作成した. 4%PFA にて固定を行い, その後染色液を加えて染色を行った. 染色範囲は Image J にて定量した.

8. ST2 細胞への Wnt3a 添加実験

ST2 細胞を 48 well-plate あるいは 96 well-plate へ播種し 10%FBS・抗真菌剤含有 α -MEM にて培養した. サブコンフルエントになったことを確認したのち, Wnt3a を添加し 48 時間培養した. その後培養細胞を 4%PFA にて固定し ALP 染色を行い, ALP 発現細胞を観察した. 染色範囲は Image J にて定量した.

9. ST2 細胞への CHIR99021 添加実験

ST2 細胞を 48 well-plate あるいは 96 well-plate に播種し 10%FBS・抗真菌剤含有 α -MEM にて培養した. サブコンフルエントになったことを確認したのち, GSK-3 β 阻害薬である CHIR-99021 を 50 nM 添加し 7 日培養後、細胞を 4%PFA にて固定し ALP 染色を行い, ALP 発現細胞を観察した. 染色範囲は Image J にて定量した.

10. real-time RT-PCR

TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を使用して培養細胞を回収した。その後、RNA 分離キット (NucleoSpin, MACHEREYN AGEL, Düren, Germany) を使用し Total RNA を回収し、oligo (dT) 12-18 primers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) と ReverTra Ace (東洋紡, 大阪, 日本) を使用して total RNA を逆転写し、cDNA を合成した。cDNA の定量は Fast SYBR Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) と StepOnePlus システム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) を使用した。PCR 反応は 95°C で 20 秒間、続いて 95°C で 3 秒間および 60°C で 30 秒間を 40 サイクル行った。使用したプライマーは表 1 のとおりである。*Gapdh* を正規化の内部コントロールとして使用した。

11. Si-RNA トランスフェクション

ST2 細胞を 48well-dish, 96well-dish へ播種、定着した後に jetPrime 試薬 (Poly plus transfection SA, Illkirch, France) を用いて、製造元のプロトコールに従い si-RNA (si-control, si-Dkk1) (Santa Cruz Biotech, CA, USA) を ST2 細胞へ導入した。次の日に 10% FBS・抗真菌剤含有 α -MEM へ培地交換し、48 時間後に ST2 細胞を回収し実験に利用した。

12. H-Ras G12V, p16 トランスフェクション

細胞を 24 well-plate あるいは 48 well-plate に播種し一晩培養後, 一過性トランスフェクションのため, コントロールとして pcDNA3.1 (+) ベクター (ThermoFischers Scientific, Waltham, USA) を pSPORT-CMV-p16 発現ベクター (ダナフォーム社、横浜, 日本) および pLenti-CMV-H-Ras G12V 発現ベクター (Addgene, MA, USA) を製造元のプロトコールに従い jetOPTIMUS 試薬を用いて, 細胞にトランスフェクションさせた. 16 時間後, 10%FBS・抗真菌剤含有 α MEM へ培地交換をした. 5 日間培養後, 一過性に p16 あるいは H-Ras G12V を過剰発現された細胞を実験に使用した.

13. 統計処理方法

3 サンプル以上の平均値 \pm 標準偏差 (standard deviation, SD) として示した. 2 群間の差の分析には, 対応のない両側の t 検定を用いた.

結果

1. ST2 細胞における細胞老化誘導に及ぼす細胞継代の影響

主に知られている細胞老化の方法として連続に繰り返した継代が細胞老化を引き起こすと報告されている¹⁶⁾ため、ST2 細胞にて長期間継代を繰り返し細胞老化が引き起こされるかを観察した。初めに late passage の ST2 細胞が細胞老化様の変化が起きているか細胞増殖能や SA- β -Gal 染色、老化細胞遺伝子の発現量を調べた¹⁷⁾。late passage の ST2 細胞は early passage の ST2 細胞と比べ細胞増殖能の低下がみられた (図 1A)。他にも late passage 細胞では SA- β -Gal 染色では SA- β -Gal 陽性細胞数が細胞数全体の 60% 近くまで増加しており、老化細胞マーカーである *p16* mRNA, *p21* mRNA の発現上昇, *LaminB1* mRNA の発現の低下がみられた (図 1B, C, D)。これらの結果より ST2 細胞は継代によって細胞老化が引き起こされていた。

2. 骨芽細胞分化に及ぼす細胞老化の影響

次に老化した間葉系幹細胞は骨芽細胞分化能が低下していると報告されている^{4), 5)}ため、late passage の ST2 細胞にて骨芽細胞分化能に変化があるか調べた。ST2 細胞を 7 日間または 14 日間骨芽細胞分化培地にて培養し ALP 染色, ARS 染色を

行った。Late passage の ST2 細胞は early passage の ST2 のものと比べ ALP 発現範囲，石灰化の範囲が約 1~2%まで減少していた（図 2A-D）。これらの結果より老化した ST2 細胞は骨芽細胞分化能が低下していることが示唆された。

3. Wnt3a に対する反応に及ぼす細胞老化の影響

骨芽細胞への分化には Wnt/ β -カテニンシグナル経路が重要と報告されているため^{18), 19), 20)}，late passage の ST2 細胞における Wnt3a 処理に対する反応を調べた。ST2 細胞を Wnt3a にて 48 時間処理し ALP 染色を行い，late passage の ST2 細胞では early passage の ST2 細胞と比べ ALP 発現範囲の減少がみられた（図 3A, B）。また、Wnt3a 処理を行った ST2 細胞を用いた real-time RT-PCR を実施した結果，late passage の ST2 細胞では early passage の ST2 細胞と比較し Wnt3a 処理による *Alpl* mRNA の発現が低下していた（図 3C）。老化 ST2 細胞培養上清に Wnt3a に対する反応を抑制する効果があるかを確かめるために Wnt3a を添加した老化 ST2 細胞培養上清にて通常の ST2 細胞を 48 時間培養し，ALP 染色を行った。老化 ST2 細胞培養上清を使用し通常の ST2 細胞を培養すると Wnt3a に対する反応性が低下した（図 3D, E）。これらの結果より老化 ST2

細胞は *Wnt3a* への反応性が低下することが示唆された。

4. *Dkk1* の発現に及ぼす細胞老化の影響

上記の結果から late passage の ST2 細胞は *Wnt/β*-カテニンシグナルが阻害されていると仮説を立て、early passage, late passage の ST2 細胞における *Wnt/β*-カテニン伝達経路阻害因子 (*Dkk1*~4, *sFRP1*~5, *Sost*)^{20), 21), 22)} の発現を調べた。Real-time RT-PCR の結果から late passage の ST2 細胞では early passage の ST2 細胞と比べ *Dkk1* mRNA の発現が非常に高いことが分かった (図 4A)。実際に *Dkk1* が骨芽細胞分化を阻害するか確かめるために組換え型 *Dkk1* を添加した石灰化誘導培地へ ST2 細胞を 7 日間培養し ALP 染色を行った¹⁸⁾。*Dkk1* を添加したものは ALP 陽性細胞が定量結果から 7.7%まで減少しており *Dkk1* は ST2 細胞の骨芽細胞分化を阻害していた (図 4B, C)。これらの結果より late passage の ST2 細胞は *Dkk1* mRNA 発現が増加しており、骨芽細胞分化が抑制されていることが示唆された。

5. 老化細胞における ALP 発現に対する *Dkk1* 発現抑制の効

Dkk1 mRNA の発現上昇が実際に老化 ST2 細胞にて

Wnt/ β -カテニン伝達経路を阻害しているか確かめるために、si-RNA コントロール配列 (si-control) と si-RNA Dkk1 配列 (si-Dkk1) を ST2 細胞へ導入した。最初に si-Dkk1 の導入により late passage の ST2 細胞において *Dkk1* mRNA の発現低下がされていること確認した (図 5A)。 *Dkk1* mRNA 発現の低下が確認されたので Wnt3a の 48 時間処理を行い、ALP 染色を実施した。 Si-Dkk1 を導入した late passage の ST2 細胞では ALP 陽性範囲が si-control と比較して約 30% 増加していた (図 5B, C)。これらの結果より late passage ST2 細胞で産生された Dkk1 が老化細胞で見られる骨芽細胞抑制作用に直接的に関与することが示唆された。

6. 老化細胞の ALP 発現の対する Wnt 活性化剤の効果

Wnt/ β -カテニン伝達経路の活性化薬として GSK3 β 阻害薬である CHIR99021²³⁾ を使用し、継代によって細胞内の Wnt/ β -カテニン伝達経路に変化が起きているか確かめた。 early passage, late passage の ST2 細胞に CHIR99021 を 1 週間処理し ALP 染色を実施した。 CHIR99021 で処理を行うと late passage の ST2 細胞でも early passage の ST2 細胞と同様に約 40%~50% の ALP 発現を確認できた (図 6A, B)。

これらの結果より late passage ST2 細胞の細胞内 Wnt/ β -カテニンシグナルが正常であることが示唆され、*Dkk1* mRNA 発現の上昇によって Wnt/ β -カテニンシグナルが阻害されている可能性が考えられる。

7. ST2 細胞の *Dkk1* 発現に対する H-Ras G12V 及び p16 過剰発現の効果

ST2 細胞を他の方法により細胞老化を誘導すると継代を繰り返したときと同様の表現型を示すか確かめるために p16 の過剰発現または発がん性 Ras の変異体である H-Ras G12V を過剰発現させ細胞老化を誘導した^{24), 25), 26)}。それぞれを過剰発現させた時の real-time RT-PCR 結果を示す。H-Ras G12V を過剰発現させた ST2 細胞では *p16* mRNA, *Dkk1* mRNA の有意な発現上昇や *Lamin B1* mRNA の有意な発現低下がみられた。p16 を過剰発現させた ST2 細胞では *Dkk1* mRNA の有意な発現上昇がみられたが *p16* mRNA 以外の老化細胞マーカーの変化はみられなかった (図 7A, B)。*Dkk1* mRNA の発現上昇がみられたため、H-Ras G12V あるいは p16 を過剰発現させた ST2 細胞を Wnt3a 添加培地にて 48 時間培養し、ALP 染色を実施した。その結果、p16 または H-Ras G12V を過剰発現させた ST2 細胞で

は ALP 陽性範囲は約 6%まで低下した (図 7C). これらの結果より、継代以外の方法 (ここでは, p16 や恒常活性型 Ras の過剰発現) で細胞老化を誘導した ST2 細胞も *Dkk1* mRNA 発現が上昇し, *Wnt3a* に対する反応性が低下していることが示唆された.

考察

細胞老化の特徴として p16, p21 の発現上昇, Lamin B1 の減少, SA- β -gal の蓄積, 細胞増殖抑制, SASP の発現が挙げられる^{8), 9), 10)}. 継代を繰り返すことによって, テロメア短縮によるストレス応答により細胞老化が引き起こされることが報告されている^{8), 27)}. そこで, マウス骨髄由来間質細胞株 ST2 細胞を使用し継代を繰り返して細胞老化を誘導した. 図1で示したように細胞老化によって誘導される老化マーカー発現 (p16 mRNA, p21 mRNA, SA- β -Gal 陽性細胞) が増加して, Lamin B1 mRNA や細胞増殖速度は有意に抑制されていたことから, 継代を繰り返すことによって ST2 細胞は細胞老化を引き起こされていることが明らかとなった (図 1).

既報では, BMSC の継代を繰り返すと細胞老化が誘導されて, BMP に対する OB 分化抑制が報告されている^{4), 5)}. そこで, 石灰化誘導培地 (AA 100 μ g/ml, β -GP 2 mM, BMP-2 100 ng/ml を含む培地) で培養を行って, ALP 染色と ARS 染色を行ったところ, late passage の細胞 (老化細胞) で既報の通り ALP 活性と石灰化が有意に抑制されており, late passage すなわち、老化 ST2 細胞は骨芽細胞分化能が低下していることが示唆された (図 2).

Wnt タンパク質は, マウスとヒトの両方で骨芽細胞の分化と活性の重要な調節因子である分泌型糖タンパク質のファミリーである²⁰⁾. 骨形成における Wnt シグナル伝達の媒介における β -カテニンが骨形成に必要であり, 骨芽細胞と

破骨細胞の両方を調節するために骨芽細胞分化の複数の段階で作用すると報告されている²⁰⁾。そこで、ST2細胞（early and late passage）にWnt3aを添加し、その反応性を比較検討した。その結果、図3で示すようにALP発現範囲はlate passageで4.3%まで減少し、石灰化は図2で示すように1.9%まで減少していた。これらの結果より、継代を繰り返して誘導したlate passageすなわち老化ST2細胞ではWnt3aに対する応答性が低下し骨芽細胞分化が有意に抑制されていることが示唆された。

Wntシグナル伝達は、多くの細胞外アンタゴニストによって調節されており、Lrp5またはLrp6の細胞外ドメインに結合し、Wntタンパク質との相互作用を妨げるDickkopf (Dkk) およびSclerostin (Sost) さらにSecreted frizzled related proteins (sFRP) はWntリガンドに直接結合するため、Wnt-Fzd複合体の形成を阻害する²⁰⁾。さらにsFRP1, SostまたはDkk1の遺伝子の欠失によるWntシグナル伝達の活性化は、骨芽細胞の数と活性を増加させる報告もある^{28), 29), 30)}。そして、老化細胞ではこうした阻害因子の発現が骨芽細胞分化を負に制御している可能性が示唆されたため、既知の阻害因子についてreal-time RT-PCRでスクリーニングを行った。その結果、Dkk1のみが有意にlate passageのST2細胞で強く発現していた（図4A）。つづいて、組み換え型Dkk1をearly passage ST2細胞に添加するとlate passage ST2細胞を骨芽細胞分化させた時と同様に骨芽細胞分化を抑制させたことからlate passage ST2はDkk1が分泌しており、骨芽細胞分化が

抑制されていることが示唆された (図 4A, B).

これまでの結果から, late passage ST2 細胞中の *Dkk1* の発現上昇が実際に Wnt/ β -カテニン伝達経路阻害をしているか確かめるために, late passage ST2 細胞に si-*Dkk1* を導入して *Dkk1* の発現を抑制させた (図 5A). その結果, *Dkk1* を抑制させると ALP 陽性細胞数が si-control と比較して, 有意に増加した. この実験から late passage の ST2 細胞では *Dkk1* mRNA の発現上昇が原因で Wnt3a への反応性が低下しており, si-*Dkk1* を導入すると Wnt3a への反応性が回復することが分かった. このことから late passage ST2 細胞で産生された *Dkk1* が老化細胞で見られる骨芽細胞抑制作用に直接的に関与することが示唆された.

さらに, これが Wnt/ β -catenin 系の細胞内でのシグナルが老化によって異常を生じているか否かを調べるため, GSK-3 β 阻害薬として報告されている CHIR99021²³⁾を用いて late passage, early passage の ST2 に刺激を行うと, ALP 活性が抑制されていないことから, Wnt/ β -catenin シグナル系は老化 ST2 細胞でも正常に作用しており, 老化 ST2 細胞では *Dkk1* の産生促進のみが起こっていることが示唆された (図 6).

p16 は細胞老化に重要な因子であり, H-Ras G12V はがん遺伝子 Ras の活性型変異体で, これを細胞に導入すると細胞老化を誘発すると報告されて

いる^{8), 24), 26)}. そこで, H-Ras G12V が細胞老化を起こすために本研究で使用した. p16 あるいは H-Ras G12V を ST2 細胞へ遺伝子導入し, 細胞老化を人為的に引き起こした (図 7). 老化マーカーである *p16* mRNA が上昇し, *Lamin B1* mRNA は減少していたことから, p16 あるいは H-Ras G12V を過剰発現させると ST2 細胞は細胞老化が誘導されたことを示している (図 7A). このとき, H-Ras G12V あるいは p16 を過剰発現させた ST2 細胞では *Dkk1* mRNA 発現を上昇し Wnt3a 誘導性の ALP 発現が減少していた. このことから、継代以外の方法 (p16 や恒常活性型 Ras の過剰発現) で細胞老化を誘導した ST2 細胞も *Dkk1* mRNA 発現が上昇し, Wnt3a に対する反応性が低下していることが示唆された (図 7C).

以上の結果から, ST2 細胞は株化されていたとしても, 継代を繰り返すことにより細胞は老化する. また, 人為的に H-Ras G12V, p16 を過剰発現させることによっても老化が誘導されることが確認された. 老化細胞からは Wnt/ β -カテニン阻害因子である Dkk1 が分泌され, 骨芽細胞分化を負に調節することが明らかとなった.

本研究において, *Dkk1* mRNA の上昇する機序については不明のままである. しかし, 近年では老化細胞では核膜構成タンパク質が消失した際, 漏洩した自己 DNA に対する反応として cGAS-STING 経路の活性化により SASP の発現が上昇するとい

う知見も存在する¹⁶⁾。また SASP 因子の一種である TNF- α は Dkk1 の発現を誘導するという報告もある³¹⁾。これらのことから仮説として老化細胞では TNF α の発現亢進が原因で Dkk1 の発現亢進が起こる可能性が考えられる。また、T 細胞特異的 Dkk1 遺伝子欠失マウスが骨粗鬆症発症を予防するという報告も出始めている³²⁾。今後は、老齢マウスの骨組織に老化細胞の蓄積を確認し血中 Dkk1 が老齢マウスで増加しているかを検討できれば、抗 SOST 中和抗体や抗 RANKL 中和抗体のように^{33), 34), 35)}抗 Dkk1 中和抗体による加齢性骨粗鬆症の治療へ臨床応用できる道を開く可能性がある。

総括

継代を繰り返し行うことで ST2 細胞において細胞老化が誘導でき、老化 ST2 細胞は骨芽細胞分化、石灰化度が低下した。また継代を繰り返した ST2 細胞は *Dkk1* mRNA の発現が増加を確認できた。継代を繰り返した ST2 細胞は *si-Dkk1* の導入によって *Wnt3a* に対する反応が回復した。*H-Ras G12V* あるいは *p16* の過剰発現によって細胞老化を誘導した ST2 細胞においても *Dkk1* mRNA の発現が増加した。以上の結果から細胞老化は *Dkk1* の発現亢進を介して *Wnt/β*-カテニンシグナルを阻害し骨芽細胞分化を抑制することが示唆された。

謝辞

本研究に際し、終始御懇意なる御指導を賜りました松本歯科大学大学院歯学独立研究科・硬組織疾患制御再建学講座・小林泰浩教授、宇田川信之教授、石田昌義講師に謹んで謝意を申し上げます。さらに本研究に多大なる御指導、御助言を賜りました松本歯科大学生化学講座・上原俊介講師に厚く感謝申し上げます。本研究の遂行および論文の作成にあたり、御助言、御協力頂きました松本歯科大学総合歯科医学研究所の皆様にご礼申し上げます。

最後にこの研究を絶えず支え励ましてくれました両親（睦，典子），弟（豪，慧），妹（渚）に心から感謝致します。

文献

1. Coughlan T, Dockery F (2014) Osteoporosis and fracture risk in older people. *Clin Med (Lond)*. 14:187-91.
2. Ambrosi TH, Marecic O, McArdle A, Sinha R, Gulati GS, Tong X, Wang Y, Steininger HM, Hoover MY, Koepke LS, Murphy MP, Sokol J, Seo EY, Tevlin R, Lopez M, Brewer RE, Mascharak S, Lu L, Ajanaku O, Conley SD, Seita J, Morri M, Neff NF, Sahoo D, Yang F, Weissman IL, Longaker MT, Chan CKF (2021) Aged skeletal stem cells generate an inflammatory degenerative niche. *Nature* 59:256–262.
3. Khosla S, Farr JN, Tchkonina T, Kirkland JL (2020) The role of cellular senescence in ageing and endocrine disease. *Nat Rev Endocrinol* 16:263–275.
4. Demontiero O, Vidal C, Duque G (2012) Aging and bone loss: new insights for the clinician. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 4:61-76.
5. Li H, Liu P, Xu S, Li Y, Dekker JD, Li B, Fan Y, Zhang Z, Hong Y, Yang G, Tang T, Ren Y, Tucker HO, Yao Z, Guo X (2017) FOXP1 controls mesenchymal stem cell commitment and senescence during skeletal aging. *J Clin Invest* 127:241–1253.
6. Li CJ, Xiao Y, Yang M, Su T, Sun X, Guo Q, Huang Y, Luo XH (2018) Long noncoding RNA Bmncr regulates mesenchymal stem cell fate during skeletal aging. *J Clin Invest* 128:5251-5266.

7. Campisi J, d'Adda di Fagagna F (2007) Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 729-40.
8. Herranz N, Gil J (2018) Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest* 128:1238-1246.
9. Birch J, Gil J (2020) Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes Dev* 34:1565-1576.
10. Freund A, Laberge RM, Demaria M, Campisi J (2012) Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol Biol Cell* 23:2066-75.
11. Farr JN, Xu M, Weivoda MM, Monroe DG, Fraser DG, Onken JL, Negley BA, Sfeir JG, Ogrodnik MB, Hachfeld CM, LeBrasseur NK, Drake MT, Pignolo RJ, Pirtskhalava T, Tchkonja T, Oursler MJ, Kirkland JL, Khosla S (2017) Targeting cellular senescence prevents age-related bone loss in mice. *Nat Med* 23:1072-1079.
12. Josephson AM, Bradaschia-Correa V, Lee S, Leclerc K, Patel KS, Muinos Lopez E, Litwa HP, Neibart SS, Kadiyala M, Wong MZ, Mizrahi MM, Yim NL, Ramme AJ, Egol KA, Leucht P (2019) Age-related inflammation triggers skeletal stem/progenitor cell dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:6995-7004.
13. Xu M, Pirtskhalava T, Farr JN, Weigand BM, Palmer AK, Weivoda MM, Inman CL, Ogrodnik MB, Hachfeld CM, Fraser DG, Onken JL, Johnson KO, Verzosa GC, Langhi LGP, Weigl M,

Giorgadze N, LeBrasseur NK, Miller JD, Jurk D, Singh RJ, Allison DB, Ejima K, Hubbard GB, Ikeno Y, Cubro H, Garovic VD, Hou X, Weroha SJ, Robbins PD, Niedernhofer LJ, Khosla S, Tchkonja T, Kirkland JL (2018) Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat Med* 24: 1246-1256.

14. Rasband WS ImageJ, U, S, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/> 1997-2012.

15. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-675.

16. Takahashi A, Loo TM, Okada R, Kamachi F, Watanabe Y, Wakita M, Watanabe S, Kawamoto S, Miyata K, Barber GN, Ohtani N, Hara E (2018) Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat Commun* 9:1249.

17. Demaria M, Ohtani N, Youssef SA, Rodier F, Toussaint W, Mitchell JR, Laberge RM, Vijg J, Van Steeg H, Dollé ME, Hoeijmakers JH, de Bruin A, Hara E, Campisi J (2014) An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell* 31: 722-33.

18. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N (2012) Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and

- osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med* 18: 405-12.
19. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y (2005) Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell* 8: 739-50.
20. Karner CM, Long F (2017) Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cell Mol Life Sci* 74:1649-1657.
21. Kawano Y, Kypta R (2003) Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 116:2627-34.
22. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D (2005) Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 280:19883-7.
23. Naujok O, Lentjes J, Diekmann U, Davenport C, Lenzen S (2014) Cytotoxicity and activation of the Wnt/beta-catenin pathway in mouse embryonic stem cells treated with four GSK3 inhibitors. *BMC Res Notes* 7:273.
24. Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW (1997) Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88:593-602.
25. Kuilman T, Michaloglou C, Vredeveld LC, Douma S, van Doorn R, Desmet CJ, Aarden LA, Mooi WJ, Peeper DS (2008) Oncogene-induced senescence relayed by an

interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* 133:1019-31.

26. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, Ramon y Cajal S (2011) p16 (Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene* 30:2087-97.
27. Hayflick L, and Moorhead, PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
28. Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G (2006) Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res* 1:934-45.
29. Bodine PV, Billiard J, Moran RA, Ponce-de-Leon H, McLarney S, Mangine A, Scrimo MJ, Bhat RA, Stauffer B, Green J, Stein GS, Lian JB, Komm BS (2005) The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 controls osteoblast and osteocyte apoptosis. *J Cell Biochem* 96:1212-30.
30. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ, Paszty C (2008) Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 23:860-9.

31. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M, Scheinecker C, van der Heide D, Landewe R, Lacey D, Richards WG, Schett G (2007) Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nat Med.* 13:156-63.
32. Lehmann J, Thiele S, Baschant U, Rachner TD, Niehrs C, Hofbauer LC, Rauner M (2021) Mice lacking DKK1 in T cells exhibit high bone mass and are protected from estrogen-deficiency-induced bone loss. *iScience* 24:102224.
33. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Boone T, Geng Z, Niu QT, Ke HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C (2009) Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 24:578-88.
34. Saag KG, Petersen J, Grauer A (2018) Romosozumab versus Alendronate and Fracture Risk in Women with Osteoporosis. *N Engl J Med* Jan 378:195-196.
35. Khosla S, Hofbauer LC (2017) Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *Lancet Diabetes Endocrinol* 5:898-907.

図の説明

図 1. ST2 細胞における細胞老化誘導に及ぼす細胞継代の影響

- A) Early passage と late passage の ST2 細胞の 2 日おきに生細胞数を Scpeter2.0 で数え増殖能を調べた. ($n=4$)
- B) 継代初期と継代後期の ST2 細胞で SA- β -Gal 染色を行った. ($n=4$)
- C) SA- β -Gal 染色の定量データ. Image J にて定量した ($n=4$)
- D) Early passage と late passage の ST2 細胞を用い老化マーカー遺伝子である *p16* mRNA (*Cdkn2a*), *p21* mRNA (*Cdkn1a*), *Lamin B1* mRNA の発現リアルタイム PCR にて調べた. ($n=4$)

Bar = 10 μ m

(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$) データは平均値 \pm SD を示す.

図 2. 骨芽細胞分化に及ぼす細胞老化の影響

- A) 骨芽細胞分化培地にて 7 日間培養後 ALP 染色を行った. ($n=3$)
- B) ALP 染色定量データ Image J にて定量した ($n=3$)
- C) 骨芽細胞分化培地にて 14 日間培養後 ARS 染色を行った. ($n=3$)
- D) ARS 染色定量データ Image J にて定量した ($n=3$)

石灰化 (+) は石灰化誘導培地 (10%FBS・抗真菌剤含有 α -MEM へアスコルビン酸 100 μ g/ml, β -グリセロリン酸 2 mM, 骨形成タンパク質 2 100 ng/ml を添加) にて培養したことを示す.

石灰化 (-) は 10%FBS 含有 α -MEM で培養したことを示す.

Bar = 10 μ m

(** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) データは平均値 \pm SD を示す.

図 3. 老化細胞の Wnt3a に対する反応に及ぼす細胞老化の影響

- A) Wnt3a (100 μ g/ml) にて 48 時間刺激後 ALP 染色を行った. ($n=3$)
- B) ALP 染色定量データ. Image J にて定量した ($n=3$)
- C) Wnt3a 24 時間刺激後の ST2 細胞を用いてリアルタイム PCR を行った. ($n=3$)

- D) Wnt3a を加えた late passage ST2 細胞の培養上清にて early passage ST2 細胞を 48 時間培養しその後 ALP 染色で行った.
($n=3$)
- E) ALP 染色定量データ Image J にて定量した ($n=3$)

Early passage CM (+) は ST2 細胞の passage 8 の ST2 細胞培養上清にて培養, late passage CM (+) は ST2 細胞の passage 65 の培養上清にて培養したことを示す.

Bar=10 μ m

(*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$) データは平均値 \pm SD を示す.

図 4. Dkk1 の発現に及ぼす細胞老化の影響

- A) Early passage と late passage の ST2 細胞を用いてリアルタイム PCR を実施し, Wnt/ β -カテニンシグナル阻害因子の発現を調べた. ($n=6$)
- B) 組換え Dkk1 (500 ng/ml) を添加した骨芽細胞分化培地に ST2 細胞を 7 日間培養し ALP 染色を行った. ($n=3$)
- C) ALP 染色定量データ. Image J にて定量した ($n=3$)

Bar =10 μ m

(**: $p<0.01$, ***: $p<0.001$) データは平均値 \pm SD を示す.

図 5. 老化細胞における ALP 発現に対する Dkk1 発現抑制の効果

- A) Late passage の ST2 細胞に si-cont, si-Dkk1 を導入し Dkk1 の発現をリアルタイム PCR にて確認した. ($n=4$)
- B) si-cont, si-Dkk1 を遺伝子導入した late passage の ST2 細胞を Wnt3a にて 48 時間刺激し ALP 染色を行った.
- C) ALP 染色定量データ. Image J にて定量した ($n=4$)

Bar =10 μ m

(*: $p<0.05$, **: $p<0.01$) データは平均値 \pm SD を示す.

図 6. 老化細胞の ALP 発現の対する Wnt 活性化剤の効果

A) CHIR99021 にて 7 日間培養した ST2 細胞に ALP 染色を行った. ($n=4$)

B) Early passage ST2 細胞と late passage ST2 細胞に対して CHIR99021 (50 μ M) を添加し 7 日間, また Wnt3a を添加し 48 時間後培養し ALP 染色を行った. ($n=3$)

C) ALP 染色定量データ. Image J にて定量した ($n=4$)

Bar = 10 μ m

(** : $p < 0.01$) データは平均値 \pm SD を示す.

図 7. ST2 細胞の Dkk1 発現に対する H-Ras G12V 及び p16 過剰発現の効果

A) H-Ras G12V を過剰発現させた ST2 細胞を用いたリアルタイム PCR. ($n=4$)

B) p16 を過剰発現させた ST2 細胞を用いたリアルタイム PCR. ($n=4$)

C) H-Ras G12V または p16 を過剰発現させた ST2 細胞を Wnt3a にて 48 時間刺激し ALP 染色を行った. ($n=4$)

D) ALP 染色定量データ. Image J にて定量した ($n=4$)

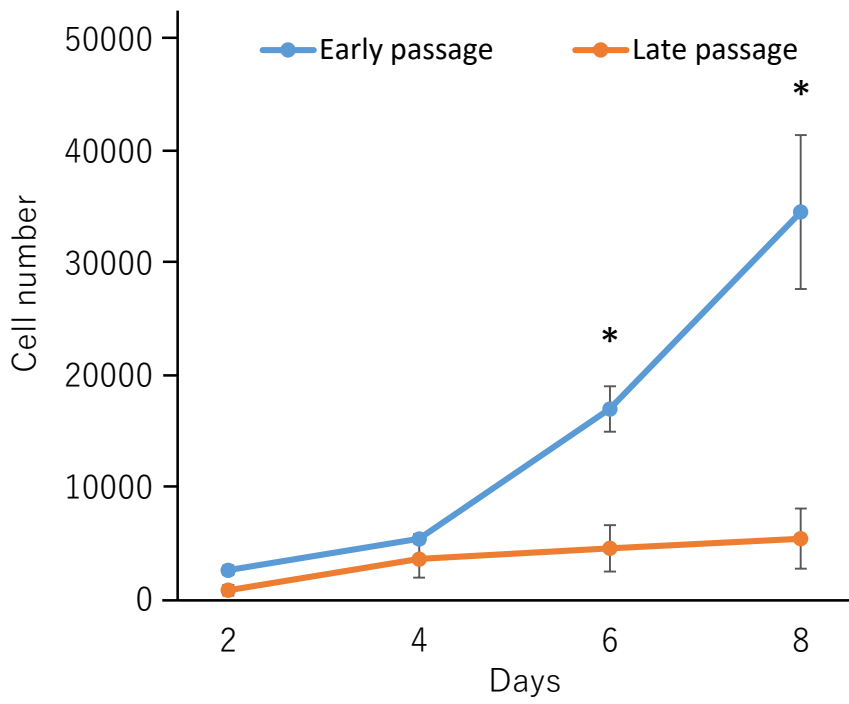
Bar = 10 μ m

(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) データは平均値 \pm SD を示す.

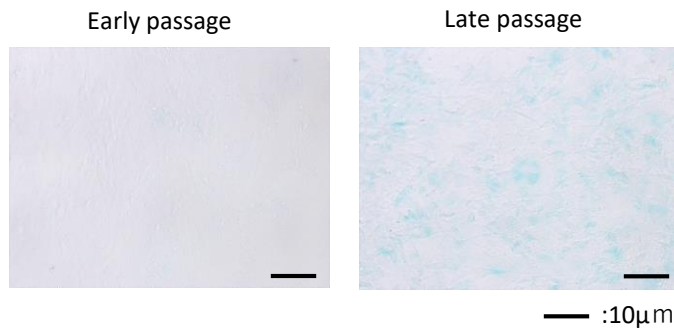
表 1: リアルタイム PCR 使用プライマー一覧

Primers (5' to 3')	
<i>p16</i>	Forward: TCTTTGTGTACCGCTGGGAAC Reverse: GCATCGCTAGAAGTGAAGCTAAGAA
<i>p21</i>	Forward: GTCGCTGTCTTGCACTCTGG Reverse: CCAATCTGCGCTTGGAGTGATA
<i>Lamin B1</i>	Forward: AGGACCTGCGGAACCTCATC Reverse: CTGTAAGTGTGGCGTGCTA
<i>Alpl</i>	Forward: ACACCTTGACTGTGGTTACTGCTGA Reverse: CCTTGTAGCCAGGCCCGTTA
<i>Dkk1</i>	Forward: CAGGTCTGCACCAAGCACAA Reverse: TCTGGCAGGTGTGGACCCTA
<i>Dkk2</i>	Forward: AATACAAGCACAGGGCAGAATTGTC Reverse: GTATGTGCTCATCCCGTCATTCAG
<i>Dkk3</i>	Forward: CAAAGTCGCTTAGCAACAATGGAA Reverse: TGGCACCTGAAACCGTCATC
<i>Dkk4</i>	Forward: ACACAAGGCCAGTGATGGACAG Reverse: GCGAGCACAGCAAAGTCCAG
<i>sFRP1</i>	Forward: TGACCAGCGTTGCCAATGA Reverse: CACCAACCATGAGCTCTGACGA
<i>sFRP2</i>	Forward: ACGACGACAACGACATCATGG Reverse: GTTCAGCTTGTAATGGTCTTGCTC
<i>sFRP3</i>	Forward: CCGACACCTTGGACTGGGTAA Reverse: GGTAACAATCGGTCACGAGCA
<i>sFRP4</i>	Forward: AAGCCGACCCTGGCAACATA Reverse: TTGTGACCTCATTGCAACCACTC
<i>sFRP5</i>	Forward: GCCCAGTGTGAGCTGCAGCA Reverse: CTTCTGGGCTCCAATCAACTTTC
<i>SOST</i>	Forward: TCCTGAGAAGAACCAGACCA Reverse: GCAGCTGTCCTCGACACATC
<i>H-Ras G12V</i>	Forward: CCAGCTGATCCAGAACCATT Reverse: ATGGCAAACACACACAGGAA
<i>Gapdh</i>	Forward: TCCTGAGAAGAACCAGACCA Reverse: GCAGCTGTCCTCGACACATC

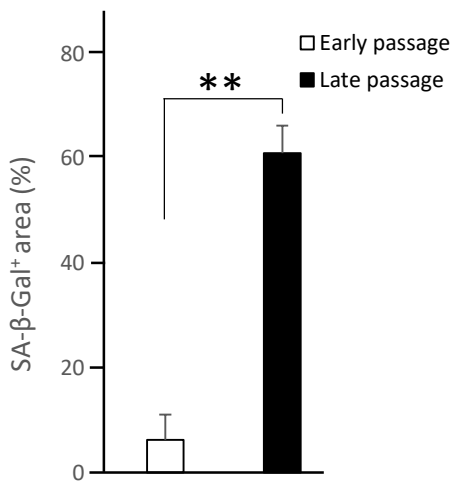
A



B



C



D

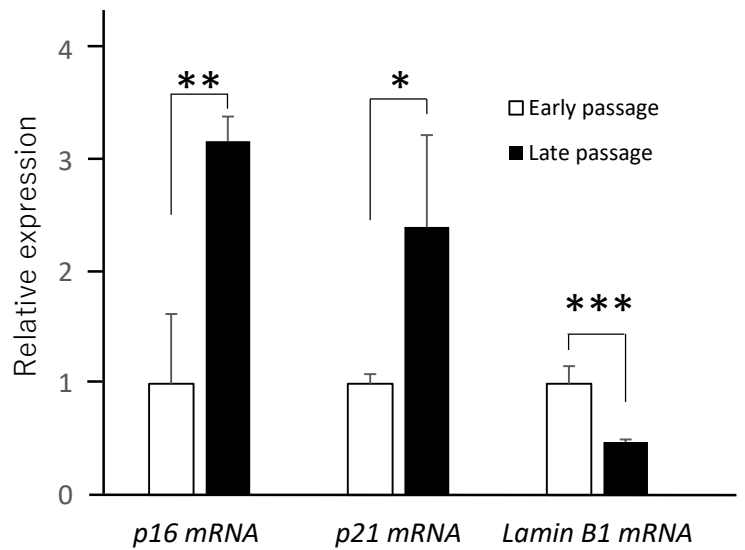


図1. ST2細胞における細胞老化誘導に及ぼす細胞継代の影響

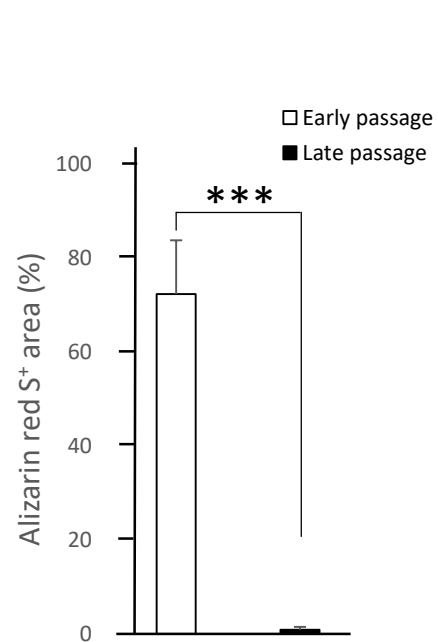
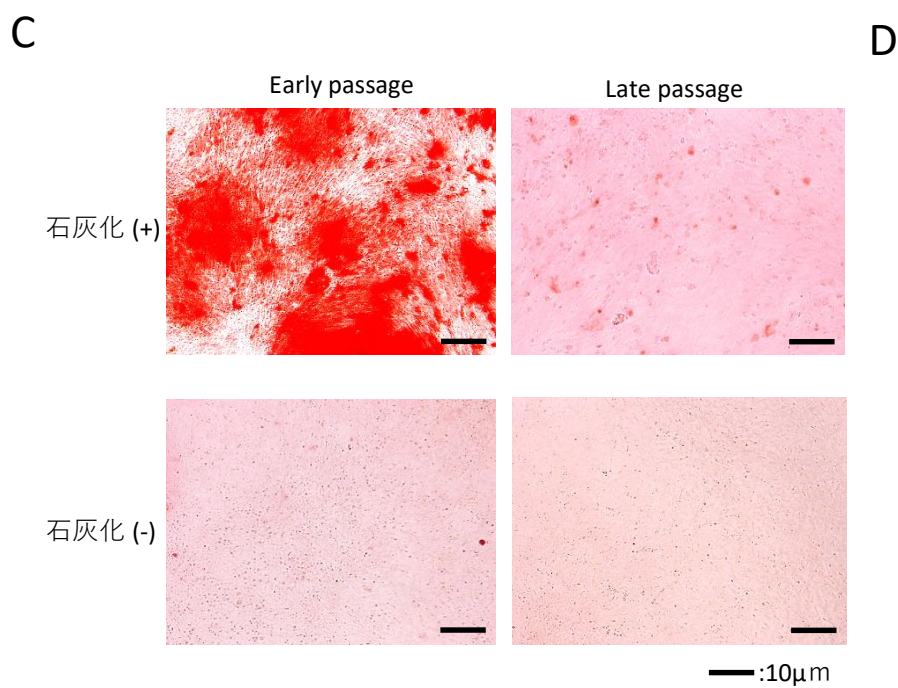
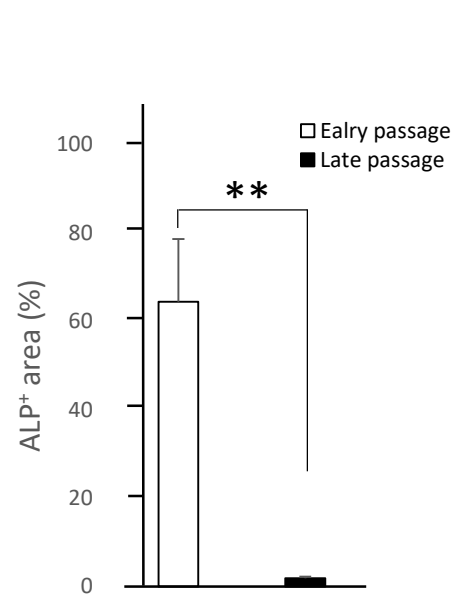
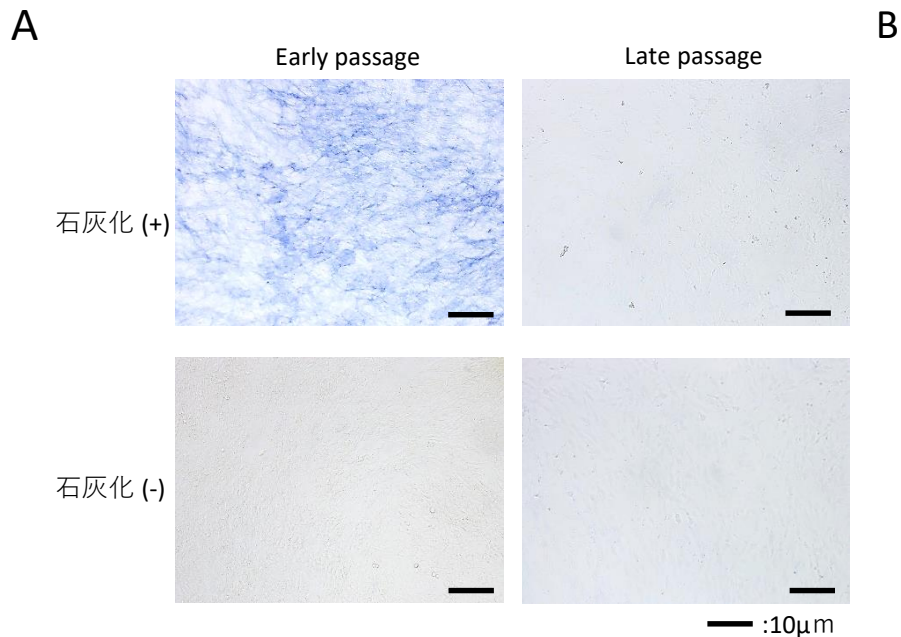


図2. 骨芽細胞分化に及ぼす細胞老化の影響

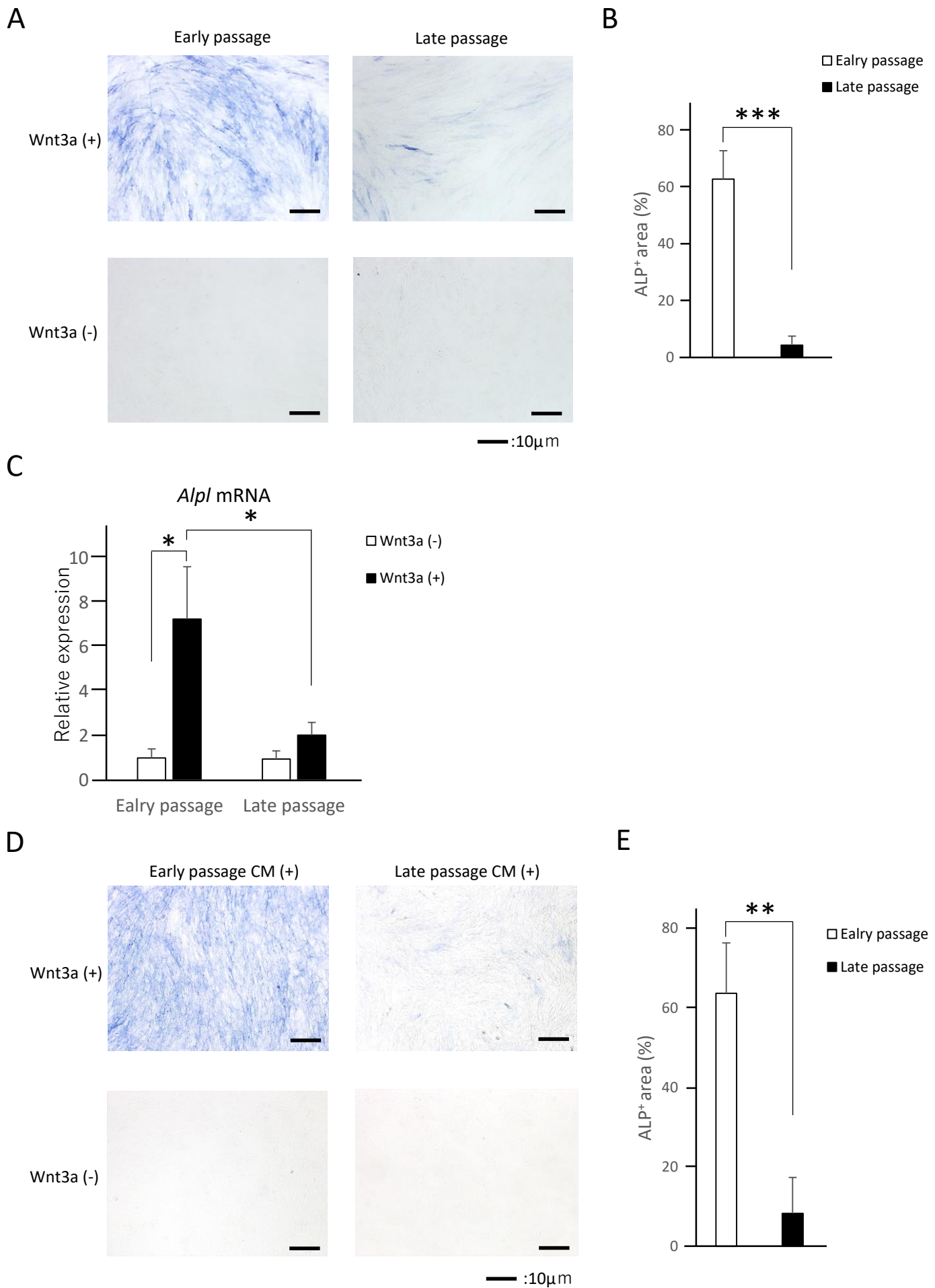
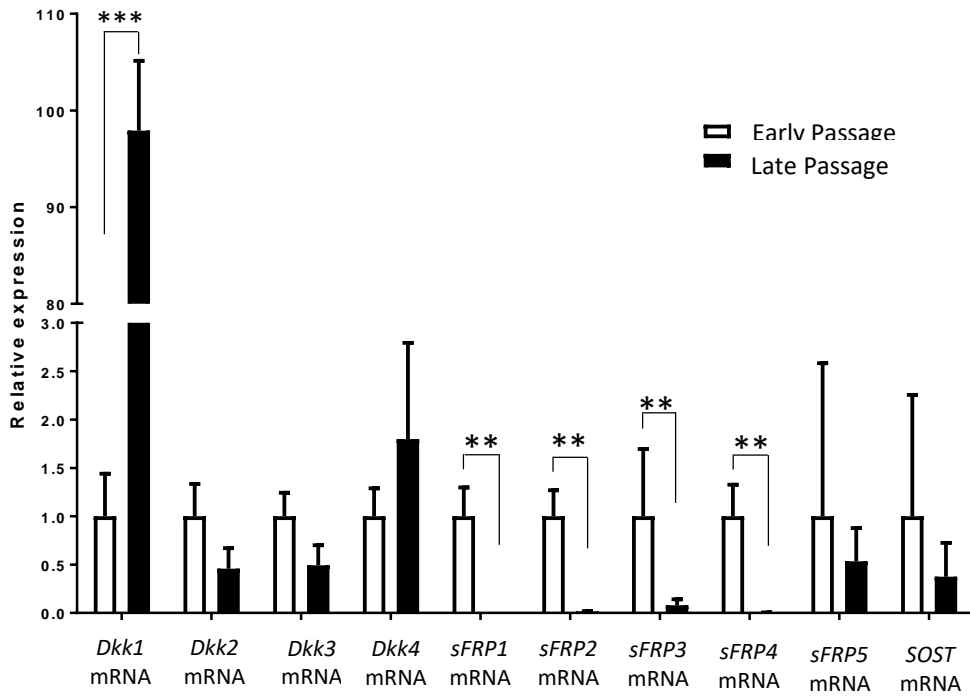
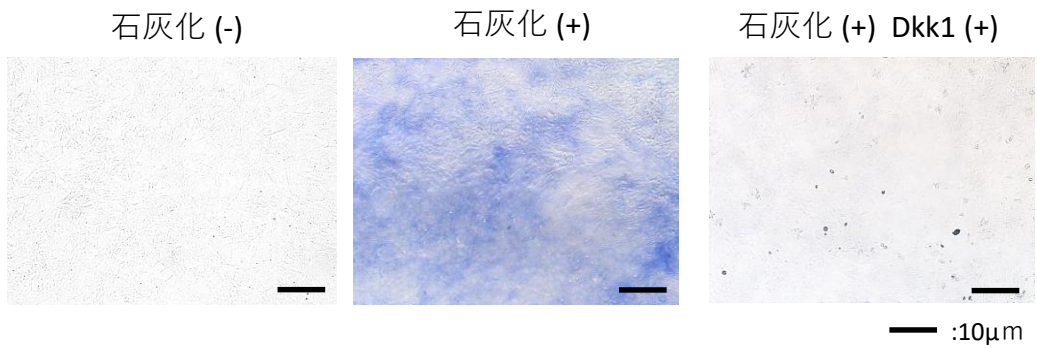


図 3. 老化細胞のWnt3aに対する反応に及ぼす細胞老化の影響

A



B



C

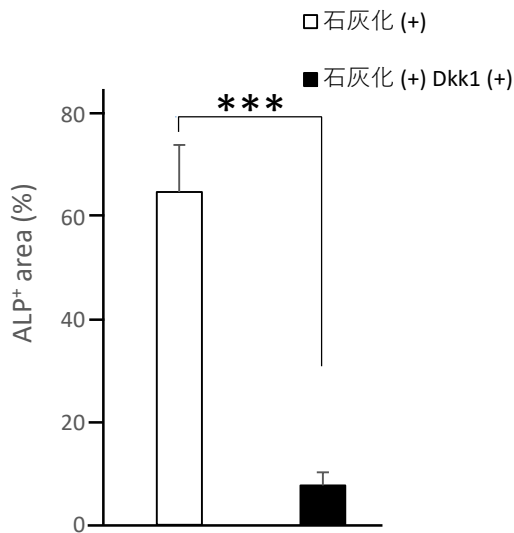


図4. Dkk1の発現に及ぼす細胞老化の影響

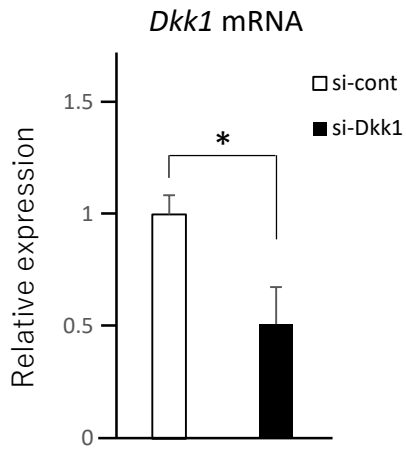
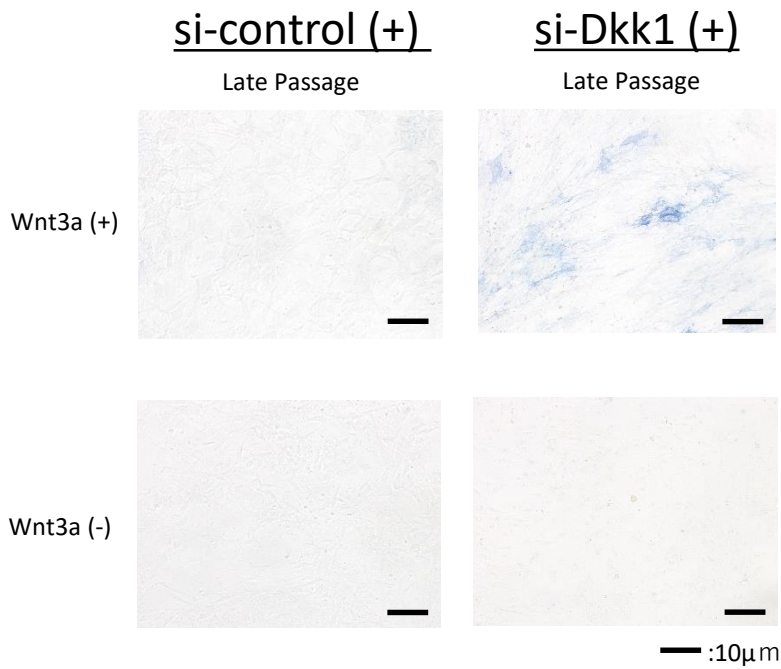
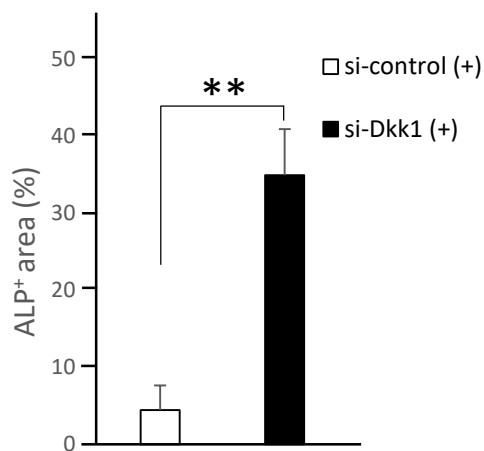
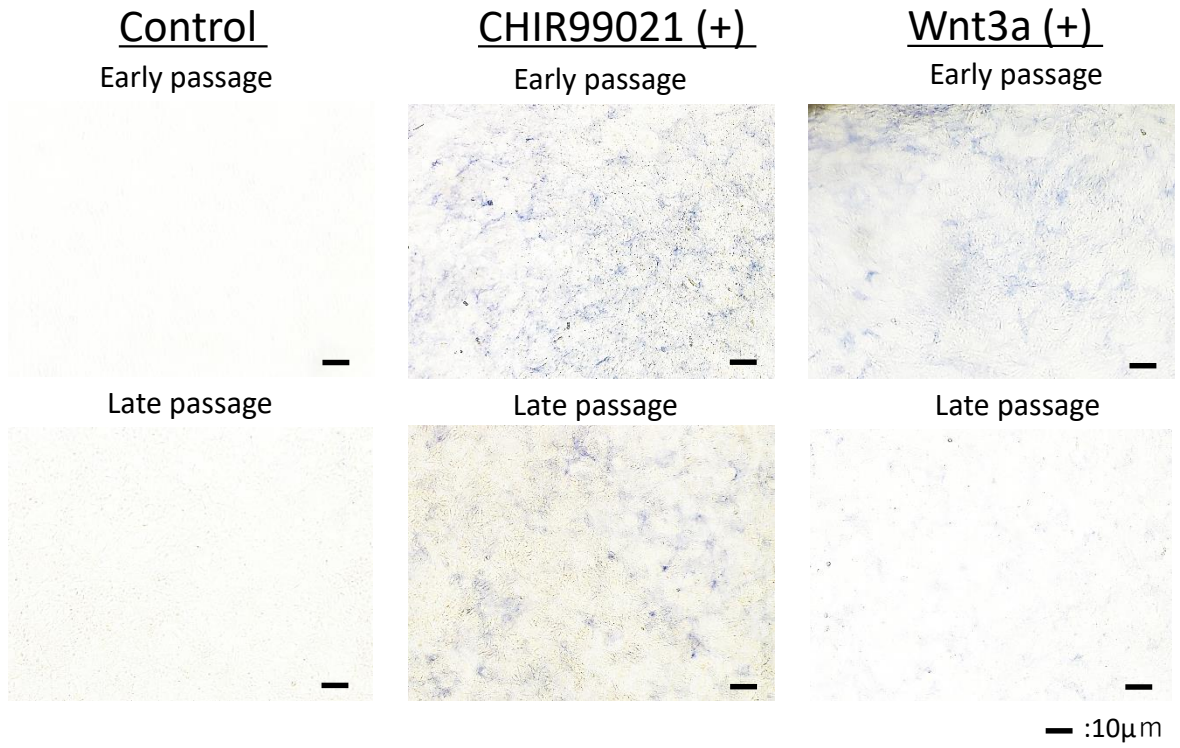
A**B****C**

図 5. 老化細胞におけるALP発現に対するDkk1発現抑制の効果

A



B

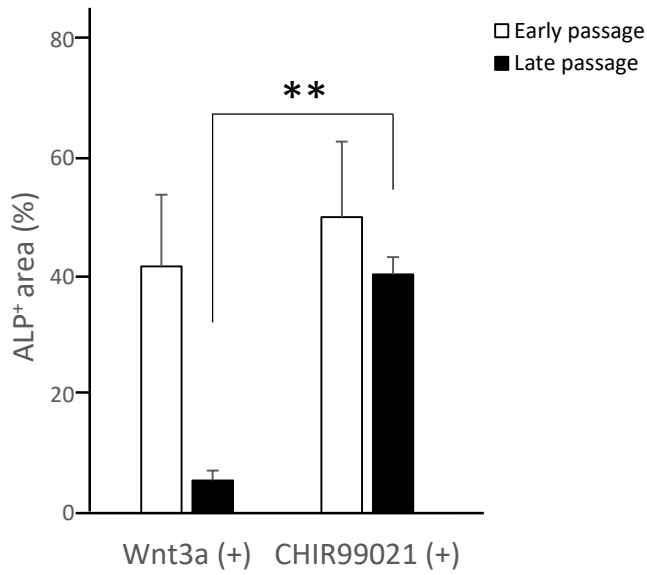
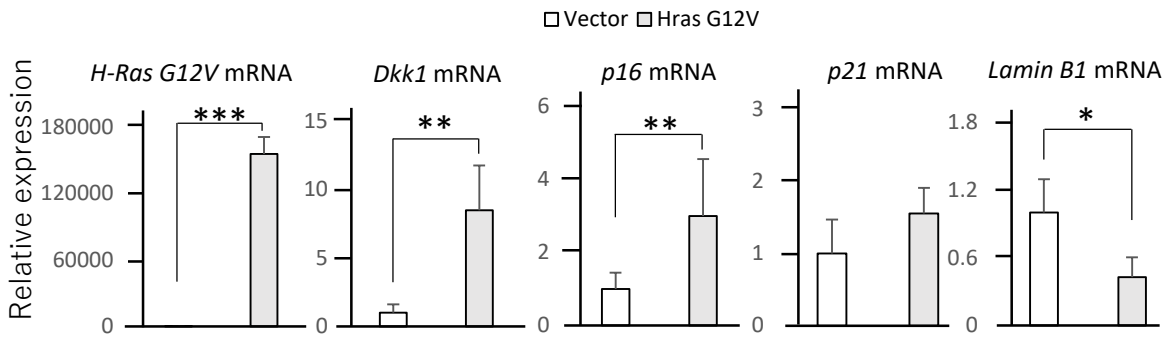
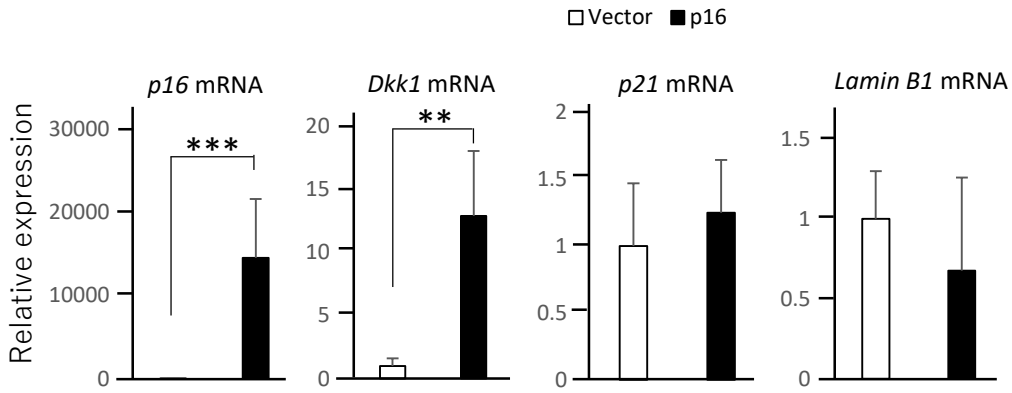


図 6. 老化細胞のALP発現の対するWnt活性化剤の効果

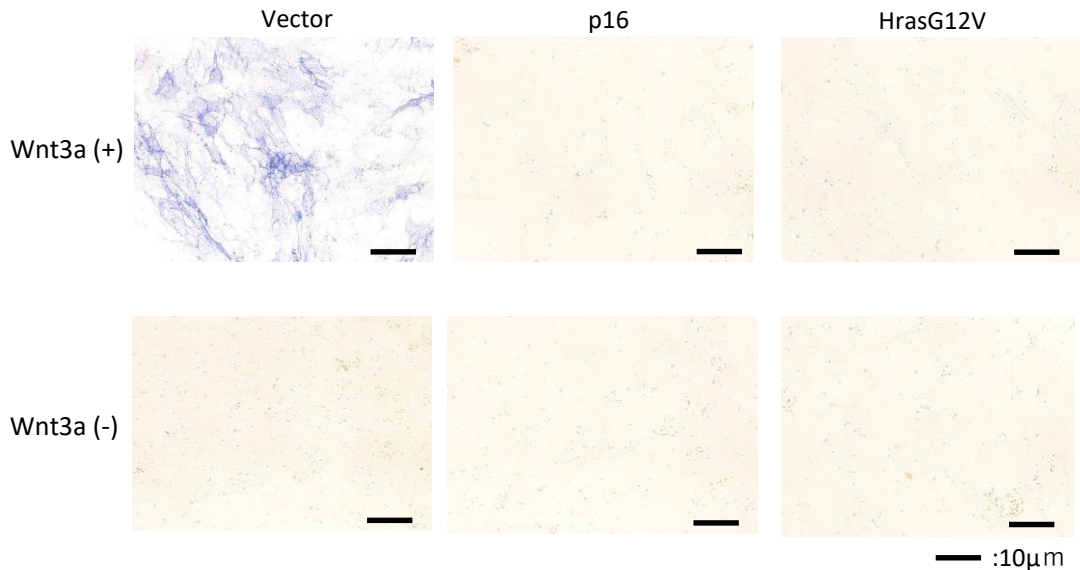
A



B



C



D

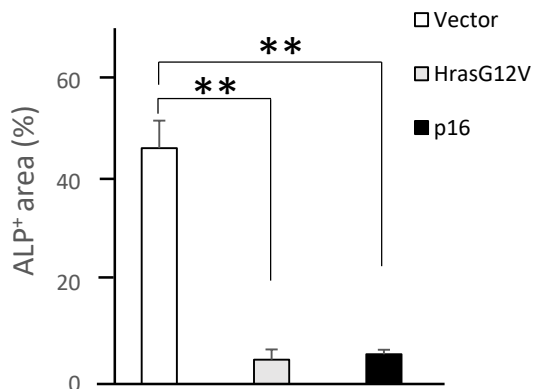


図7. ST2細胞のDkk1発現に対するH-Ras G12V及びp16過剰発現の効果