

骨の幹細胞の疲労による高・老年期女性の骨粗鬆症の発症と骨折治癒遅延メカニズムの解明

Fatigued skeletal stem cells develop osteoporosis and delay fracture healing in older women

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 硬組織発生再生学分野 教授 松下 祐樹
(前：長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学分野 准教授)

要約

超高齢社会のわが国では、2065年には国民の約2.6人に1人が65歳以上になると推計されており、健康寿命を高めることが非常に重要な課題となっている。その中でも骨粗鬆症や、それに起因する骨折は、その後寝たきりに移行することも多く、健康寿命を縮める大きな危険因子である。特に骨粗鬆症は閉経後の女性の罹患率が高く、男性の約2-3倍を占め、高・老年期の女性における社会的な課題となっている。この課題を解決するために、本研究では骨の老化と再生機構を統合的に理解することを目的に研究を行った。骨髄に存在する骨髄間質細胞（骨格幹・前駆細胞）は、脂肪細胞もしくは骨芽細胞へと分化する能力を持ち、生理的な状態ではバランスを保ちながら適切な骨代謝機構が働いているが、骨の老化や骨折治癒などの再生過程では、その運命決定機構のバランスが変化する。本研究ではまずタモキシフェン誘導性に骨髄間質細胞を蛍光分子tdTomatoで標識し、細胞系譜を追跡できる *Cxcl12-CreER; R26R^{tdTomato}* マウスを作出した。そのマウスを長期間観察したところ、老齢マウスでは骨髄の脂肪化が亢進し、骨髄間質細胞は脂肪細胞へ分化することが明らかになった。また、高脂肪食を投与することで老化時と同様、骨髄の脂肪化が顕著に亢進し、Cxcl12陽性骨髄間質細胞は脂肪細胞に分化した。同マウスに対して骨髄損傷を加えたところ、骨再生が起これば、骨髄間質細胞は一旦骨芽細胞へと強く分化し、その後骨髄間質細胞へと再分化した。さらに再度骨髄損傷を加えたところ、骨芽細胞に分化することなく脂肪細胞へと直接分化することが明らかになった。これらのことから老齢期では骨髄間質細胞が老化により脂肪細胞様の性質を示し、老化間質細胞では本来間質細胞が持つべき骨再生能が低下することで、骨折時の治癒不全や遅延が起こることが示唆された。

緒言

超高齢社会のわが国では、2065年には国民の約2.6人に1人が65歳以上になると推計されており、健康寿命を高めることが非常に重要な課題となっている。その中でも骨粗鬆症や、それに起因する骨折は、その後寝たきりに移行することも多く、健康寿命を縮める大きな危険因子である。特に骨粗鬆症は閉経後の女性の罹患率が高く、男性の約2-3倍を占め、高・老年期の女性における社会的な課題となっている。骨髄に存在する骨髄間質細胞は、一部が骨格幹細胞として脂肪細胞もしくは骨芽細胞へと分化する能力を持ち、生理的な状態ではバランスを保ちながら適切な骨代謝機構が働いているが、骨の老化や骨折治癒などの再生過程では、幹細胞の運命決定機構のバ

ランスが変化することで、老化による脂肪細胞分化促進、再生における骨芽細胞分化誘導が起こる。近年、われわれは、骨の幹細胞は骨組織において時期空間特異的に存在することを新たに発見し、幹細胞の集団は加齢によってその局在が移り変わり、性質も変化することを明らかにした^{1,2,3}。この中で、骨髄間質細胞は成体の幹細胞という位置付けであり、加齢や老齢時の骨折治癒に大きな役割を果たすと考えられる。特に、骨折などの損傷過程では骨髄間質細胞が直接骨芽細胞へと分化することで骨再生に貢献し、その後の骨髄腔においては生体恒常性を維持するかのよう再生骨は消失し、再び骨髄間質細胞を含む定常状態と同様の骨髄腔となり、骨髄間質細胞の再生能力が示唆されている。しかしながら、も

とも存在していた骨髄間質細胞と一旦骨再生能を発揮した骨髄間質細胞が完全に同一の機能を持つのか、つまり骨髄間質細胞は無限に再生能力を持つのか、は全く明らかにされていない。

非常に高い再生能力を有するアホロートルでは、切断によって失われた体肢を完全に再生することができる。しかしながら、このようなアホロートルでさえも複数回の体肢切断によってその再生能力を失ってしまうことが明らかになっている⁴。これらの研究結果から、ヒトやマウスなどの哺乳類においても複数回の損傷によって細胞の再生能力が失われてしまう可能性があると考えられ、幹細胞/間質細胞が「疲労」によってその性質や機能を変えるのではないかという仮説を立てた。本研究では幹細胞/間質細胞が老化、再生時にどのような動態を取るか、そしてそのメカニズムは何なのかを明らかにする。老化や再生は互いのバイオロジーに強く影響を与える事象だとわれわれは考えており、「老化して疲労した幹細胞は骨再生能力を持つのか?」、「一旦再生能を発揮した幹細胞は疲労を起こし、最終的に骨代謝バランスを崩してしまうのか?」という老化と再生のインタラクションを課題として設定した。

本研究を完遂することによって、骨粗鬆症や骨粗鬆症時の骨折治療の遅延メカニズムを骨の幹細胞の細胞動態を中心に詳細に明らかにできるだけでなく、どのように骨粗鬆症を予防するか、骨粗鬆症患者の骨折の治療を促進する治療法開発の大きな一歩とすることができる可能性がある。

方法

本研究における全ての実験は長崎大学の動物実験委員会、組換えDNA実験安全委員会によって承認された実験計画書に従って実施された。

マウス

タモキシフェン誘導性に骨髄骨格幹細胞/間質細胞を特異的に赤色蛍光分子で標識できる *Cxcl12-creER*; *R26R^{tdTomato}* マウスと骨芽細胞・骨細胞を緑色蛍光分子で標識する *Coll1a1(2.3kb)-GFP* マウスを交配させ、実験に使用した。これらのマウスは全て米国 Jackson ラボラトリーより入手した。

タモキシフェン

成体マウスに対して2mgのタモキシフェンを単回腹腔内投与した。

高脂肪食投与

8週齢マウスに対して6週間ロジグリタゾン投与した。

骨髄損傷モデル

成体マウスに対して大腿骨の遠位より骨髄内に長軸方向に沿って26G針を挿入し、その後、歯科用根管治療器具 (Kファイル) で #35-#50まで拡大し、骨髄に損傷を加え、治癒過程を観察した。

マイクロCT解析

損傷治癒後の骨再生過程を *in vivo* マイクロCTにて撮影し、解析した。

組織学的解析

大腿骨サンプルを4%パラホルムアルデヒド溶液で固定、15%EDTAで脱灰の後、30%スクロースに置換後、OCTに包埋、10 μ m で凍結切片を作製した。脂肪細胞は Perilipin で、老化細胞は p16 を用いた免疫染色によって標識した。

結果

1) 老化による骨髄間質細胞の脂肪細胞分化

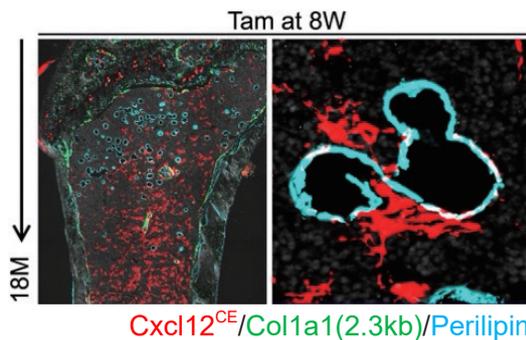


図1. 老化による骨髄間質細胞の脂肪細胞分化

タモキシフェン誘導性に骨髄骨格幹細胞を特異的に赤色蛍光分子で標識できる *Coll1a1(2.3kb)-GFP*; *Cxcl12-creER*; *R26R^{tdTomato}* マウスに対して生後8週でタモキシフェンを投与した。生後9週、12週、6か月、1年、1.5年で大腿骨を採取し、脂肪細胞マーカーである Perilipin を用いて免疫組織学的に解析した。若年期に比べ、骨髄腔内の骨量や *Coll1a1(2.3kb)-GFP* 陽性の骨芽細胞・骨細胞は減少していた。また、骨髄腔内に Perilipin 陽性の脂肪細胞が認められ、*tdTomato* で標識された *Cxcl12* 陽性骨髄間質細胞の系譜細胞の一部は骨髄脂肪細胞に分化することが明らかとなった (図1)。

2) 高脂肪食投与による骨髄間質細胞の脂肪細胞分化

Coll1a1(2.3kb)-GFP; *Cxcl12-creER*; *R26R^{tdTomato}* マウスに対して生後8週でタモキシフェンを投与し、

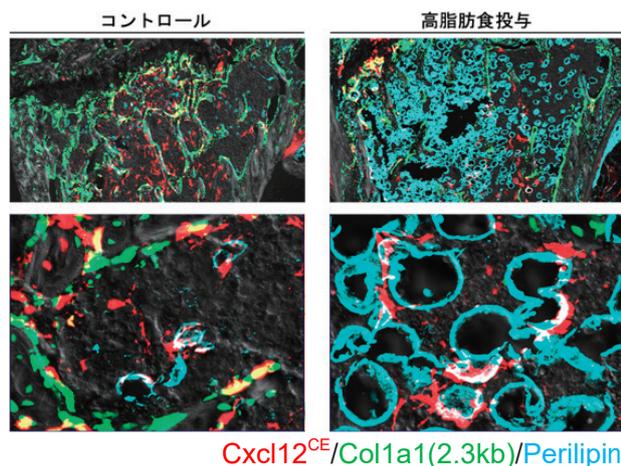


図2. 高脂肪食の投与による骨髄間質細胞の脂肪細胞分化

高脂肪食であるロジグリタゾンを6週間投与した。生後14週で大腿骨を採取し、脂肪細胞マーカーであるPerilipinを用いて免疫組織学的に解析したところ、非常に多くの骨髄脂肪細胞が観察され、tdTomatoで標識されたCxcl12陽性骨髄間質細胞の系譜細胞の一部が骨髄脂肪細胞に分化していることが明らかとなった(図2)。

3) 複数回の骨髄損傷による骨髄間質細胞の疲労・老化と脂肪細胞分化

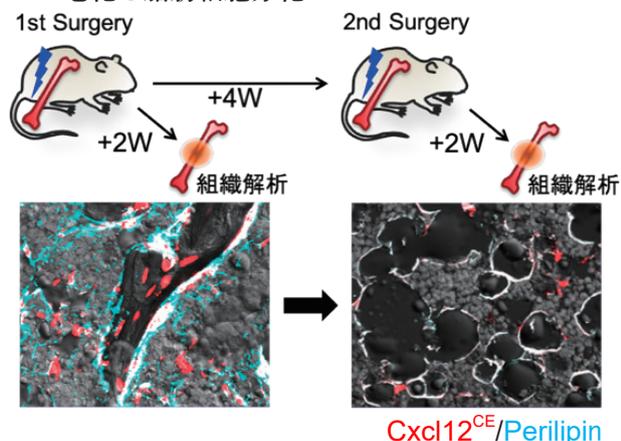


図3. 「疲労」によって骨再生能力を失った骨髄間質細胞

Coll1a1(2.3kb)-GFP; Cxcl12-creER; R26R^{tdTomato} マウスに対して生後8週でタモキシフェンを投与し、下記の3群に分けて骨再生過程における再生骨量や骨髄間質細胞の細胞動態を解析した。

- コントロール群 (骨髄損傷なし、屠殺15週)
- 健康骨髄間質細胞群 (骨髄損傷手術1回13週、屠殺15週)
- 疲労骨髄間質細胞群 (骨髄損傷手術2回9週、13週、屠殺15週)

15週において、マイクロCTで解析を行ったところ、健康骨髄間質細胞群では顕著に骨量の増加が認められた。一方で疲労骨髄間質細胞群では骨髄損傷を加えていないコントロール群と同様に骨量の増加は認めなかった。次に組織学的解析を行ったところ、健康骨髄間質細胞群では新生骨の増生が認められ、tdTomatoで標識されたCxcl12陽性骨髄間質細胞の系譜細胞の多くが新生骨を形成する*Coll1a1(2.3kb)-GFP*陽性骨芽細胞や骨細胞へと分化することが明らかとなった。一方で、疲労骨髄間質細胞群では新生骨の増生は認めなかった。さらに脂肪細胞マーカーであるPerilipinで免疫染色を行ったところ、健康骨髄間質細胞群の骨髄内では脂肪細胞の増加が見られなかったが、疲労骨髄間質細胞群では多くの脂肪細胞が認められ、それらの細胞はCxcl12陽性骨髄間質細胞の系譜細胞であることが明らかとなった(図3)。

これらの3群における老化細胞の割合を解析したところ、疲労骨髄間質細胞群では間質細胞から分化した脂肪細胞では細胞老化が進行していることが明らかとなった。

考察

本研究では、骨粗鬆症や骨折治癒における幹細胞/間質細胞の役割とその疲労・老化のメカニズムに新たな知見をもたらした。骨髄間質細胞は骨折治癒時に骨芽細胞へ分化し、新生骨を形成する能力を持つが、複数回の骨髄損傷によりその再生能力が低下することが示された。特に細胞疲労群では、新生骨の形成が顕著に減少しており、間質細胞が「疲労」することで骨形成能が損なわれる可能性が示唆された。再生に伴う「疲労」は、幹細胞の再生限界を表し、アホートルの複数回の四肢切断実験で観察された再生能力の低下と類似している。この現象は、哺乳類を含む再生不全種における再生限界の重要なメカニズムを示唆している。老化により骨髄間質細胞が骨芽細胞への分化能力を失い、脂肪細胞分化が促進されることが確認された。また、脂肪細胞に分化した間質細胞系譜細胞では、老化マーカー (p16) の発現が増加しており、老化が骨代謝バランスを崩す重要な要因であると考えられた。骨髄間質細胞の動態を詳細に理解することで、骨粗鬆症予防のターゲットや骨折治癒促進のための治療法などへの応用展開が今後期待される。

引用文献

1. Mizuhashi K, Ono W, Matsushita Y, et al. Resting zone of the growth plate houses a unique class of skeletal stem cells. *Nature* 2018, 563: 254-258
2. Matsushita Y, Nagata M, Kozloff KM, et al. A Wnt-mediated transformation of the bone marrow stromal cell identity orchestrates skeletal regeneration. *Nature Communications* 2020, 11: 332
3. Matsushita Y, Liu J, Chu AKY, et al. Bone marrow endosteal stem cells dictate active osteogenesis and aggressive tumorigenesis. *Nature Communications* 2023, 14: 2383
4. Bryant DM, Sousounis K, Payzin-Dogru D, et al. Identification of regenerative roadblocks via repeat deployment of limb regeneration in axolotls. *NPJ Regenerative Medicine* 2017 2: 30

Abstract

In Japan's super-aging society, it is projected that by 2065, approximately one in 2.6 individuals will be aged 65 or older, highlighting the urgent need to extend healthy life expectancy. Osteoporosis and its associated fractures represent significant risk factors, often leading to prolonged immobility and contributing to reduced quality of life. Postmenopausal women are particularly affected, with an incidence rate 2–3 times higher than men, making osteoporosis a critical societal issue among elderly women. To address these challenges, this study aimed to elucidate the mechanisms underlying bone aging and regeneration. Bone marrow stromal cells possess the ability to differentiate into adipocytes or osteoblasts. Under physiological conditions, these cells maintain a balance that supports bone homeostasis; however, this balance shifts during aging and regeneration. Using tamoxifen-inducible *Cxcl12-CreER*; *R26R^{tdTomato}* mice, we tracked stromal cell lineages. In aged mice, increased bone marrow adipogenesis was observed, with stromal cells preferentially differentiating into adipocytes, a phenomenon replicated under high-fat diet conditions. Following bone marrow injury, stromal cells initially differentiated into osteoblasts, contributing to bone regeneration, before reverting to stromal cells. However, repeated injuries disrupted this process, with stromal cells bypassing osteoblast differentiation and directly transitioning into adipocytes. These results indicate that aged stromal cells exhibit enhanced adipogenic properties and reduced regenerative capacity, which may underlie delayed or impaired fracture healing in elderly individuals. This study provides novel insights into the biology of bone aging and identifies potential targets for improving fracture healing in osteoporotic patients.