

氏名	石橋 啓
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第6815号
学位授与の日付	令和5年3月24日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	加齢変化が骨髄ニッチ関連細胞に及ぼす影響に関する1細胞トランスクリプトーム解析
論文審査委員	沢 禎彦 教授 西田 崇 准教授 井澤 俊 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

加齢変化が引き起こす疾患群(歯周病, 骨粗鬆症等)に共通する本質的变化として, ステムセルエイジングが注目されている。骨髄においては, 全ての血液細胞へ分化することで免疫機能など重要な役割を担っている造血幹細胞があり, 造血幹細胞は加齢に伴い再生能力の低下, リンパ球産生能の低下や造血幹細胞数の増加により, 易感染や慢性貧血などの加齢関連血液疾患が引き起こされることがある。造血幹細胞の維持, 分化には骨髄ニッチと呼ばれる微小環境が重要であり, C-X-C Motif Chemokine Ligand 12 (CXCL12)というケモカインを多く分泌する間葉系幹細胞の一つである CXCL12-Abundant Reticular 細胞 (CAR 細胞)が本骨髄ニッチの形成に必須である。この CAR 細胞は間葉系幹細胞として骨芽細胞や脂肪細胞へ分化することで, 骨の恒常性維持や創傷治癒に深く関与する。近年, CAR 細胞には類洞周囲に局在し CXCL12 と Adiponectin (ADIPOQ)を高発現する Adipo-CAR 細胞と, 類洞以外に局在し CXCL12 と Alkaline Phosphatase (ALPL)を高発現する Osteo-CAR 細胞の2つの異なる CAR 細胞が存在し, 骨髄ニッチの維持には類洞周囲に局在する Adipo-CAR 細胞が深く関わっていることが報告された。また, 若齢マウス由来の造血幹細胞を高年齢マウスに移植すると, 移植された若齢マウス由来造血幹細胞は異常増加, リンパ球産生能の低下といった, 老齡マウス由来造血幹細胞と類似した表現型を示すことが知られており, 本結果は, 造血幹細胞の老化には, レシピエント側の骨髄ニッチ環境の老化が深く関与していることを示している。

このような背景より, 加齢による骨髄ニッチ関連細胞の変化が骨髄の機能低下に大きく関与している可能性が推測されるが, 未だその詳細は明らかではない。その要因の一つとして, 骨髄組織は, 血球系細胞, 間葉系細胞, 動脈・類洞内皮細胞など, 様々な細胞から構成されたヘテロな集団であるが, マイクロアレイや bulk RNA-sequencing (RNA-seq)などといった母集団の平均的なトランスクリプトーム解析が実施されてきたため, それぞれの細胞の老化に伴う変化を正確に捉えることができなかつたことが考えられる。そこで本研究では, 1細胞レベルで網羅的なトランスクリプトーム解析が可能な single cell RNA-seq (scRNA-seq)解析を応用し, 加齢に伴う骨髄ニッチ関連細胞の変化を詳細に解析したので報告する。

【方法】

5-8 週齢（若齢）マウスと 50-80 週齢（高齢）マウスを用いて、以下の実験を行った。野生型マウスおよび CAR 細胞が可視化された *Cxcl12*-GFP マウスの長管骨を回収し、通法に従い、micro-CT 解析、Hematoxylin and eosin (HE)染色および免疫組織化学染色による組織学的解析、フローサイトメトリー（FCM）解析を実施した。また、マウス長管骨骨髓細胞から、CD45（白血球）陰性、Ter119（赤血球）陰性の細胞をセルソーターにて分離し、scRNA-seq 解析を行った。具体的には、Seurat 4.0.6.にて次元削減・クラスター解析後、発現変動遺伝子を用いて functional enrichment 解析を行った。また、RNA の unspliced/spliced 比から RNA 速度として疑似時間を推測し、分化経路を推定した。次に、マウス長管骨から線維芽細胞コロニー形成単位アッセイにて骨髓由来間葉系間質細胞を単離し、骨芽細胞および脂肪細胞へと分化誘導した。骨芽細胞への分化能を Alizarin red-S 染色、脂肪細胞への分化能を Oil Red-O 染色にて評価した。また、マウス長管骨の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡（H-7650, 株式会社日立ハイテク）にて類洞の微細構造を解析した。各データの統計学的有意性は、独立 t 検定を実施した。

【結果】

micro-CT および組織学的解析の結果、若齢マウスと比較し、高齢マウスの大腿骨海綿骨量は有意に減少し ($p < 0.01$)、高齢マウスの骨髓は脂肪髄を呈していた。FCM 解析の結果、高齢骨髓において、造血幹細胞の割合は有意に増加していた ($p < 0.01$)。また、CXCL12 を高発現 (GFPhigh)している CAR 細胞の割合は、高齢骨髓と若齢骨髓において有意な差は認めなかった。しかし、若齢骨髓においてほぼすべての CAR 細胞は Sca1 陰性であるが、加齢に伴い Sca1 陽性の CAR 細胞が有意に増加することが明らかとなった ($p < 0.01$)。次に scRNA-seq 解析の結果、骨髓内の血球系以外の細胞は、Adipo-CAR 細胞、Osteo-CAR 細胞、骨芽細胞、類洞内皮細胞に大別され、若齢骨髓と比較し高齢骨髓では、骨芽細胞、類洞内皮細胞の割合が減少していた。高齢骨髓由来 Adipo-CAR 細胞は若齢骨髓由来 Adipo-CAR 細胞と異なるクラスターに分類された。この変化について、発現変動解析により確認したところ、高齢骨髓由来 Adipo-CAR 細胞では、骨芽細胞関連遺伝子や幹細胞関連遺伝子の発現低下を認めた。分化経路推定解析の結果、若齢骨髓由来 Adipo-CAR 細胞は幹細胞性が高く、Osteo-CAR 細胞や骨芽細胞への分化が推測されたが、高齢骨髓由来 Adipo-CAR 細胞は幹細胞性が低く、骨芽細胞への分化推測ができなかった。実際、高齢骨髓由来間葉系幹細胞は、若齢骨髓由来間葉系幹細胞と比較し、骨芽細胞分化能が低下し、脂肪細胞分化能が増加していた。また、高齢骨髓由来 Adipo-CAR 細胞では、若齢骨髓由来 Adipo-CAR と比較し、類洞基底膜関連遺伝子の発現が変動していた。そこで、透過型電子顕微鏡にて類洞を形態学的に解析した。その結果、高齢骨髓では類洞を取り囲む基底膜の存在率が有意に減少し ($p < 0.01$)、類洞内皮細胞同士のタイトジャンクションの欠如や類洞内皮細胞の破裂といった異常所見が有意に増加していた ($p < 0.05$)。

【考察および結論】

本研究では、加齢変化に伴い類洞基底膜形成に関わる細胞にどのような変化が生じているか詳細に解析した。その結果、加齢により CAR 細胞の大部分を占める Adipo-CAR が質的および機能的変化をきたすこと、

さらに、類洞において、基底膜の構造的変化および内皮細胞の異常が生じることが原因で、骨量の低下や脂肪髄、造血幹細胞の機能異常を引き起こしている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

【目的】本研究は single cell RNA-sequencing (scRNA-seq) 解析を応用した網羅的トランスクリプトーム解析で、骨髄ニッチ関連間葉系細胞と類洞内皮細胞の加齢変化について 1 細胞レベルで解明することを目的とした。

【方法】5-8 週齢 (若齢) マウスと 50-80 週齢 (高齢) マウスを用いた。野生型マウスならびに骨髄ニッチの形成を担う CXCL12-Abundant Reticular 細胞 (CAR 細胞) が可視化された *Cxcl12*-GFP マウスの長管骨を回収して micro-CT 解析、Hematoxylin and eosin (HE) 染色、CXCL12 とエンドムチンの免疫染色、およびフローサイトメトリー (FCM) 解析を実施した。また、マウス長管骨骨髄細胞から CD45 (白血球マーカー) と Ter119 (赤血球マーカー) が共に陰性の細胞をセルソーターで分離し scRNA-seq 解析を行った。具体的には、クラスター解析、発現変動遺伝子による functional enrichment 解析、ならびに分化経路推定解析を行った。またマウス長管骨から骨髄由来間葉系間質細胞を収集し間葉系幹細胞 (mBMSCs) を単離した。骨芽細胞および脂肪細胞への分化を Alizarin red-S 染色及び Oil Red-O 染色にて評価、さらにマウス長管骨を 2% グルタルアルデヒド含有 2% パラホルムアルデヒド水溶液にて固定後ウルトラミクロトームにて 80nm の超薄切片を作製、透過型電子顕微鏡にて類洞の微細構造を解析した。

【結果】micro-CT 及び HE 染色の結果、大腿骨の海綿骨量は高齢マウスが若齢マウスより有意に減少し、高齢マウスの骨髄は脂肪髄を呈した。FCM 解析の結果、造血幹細胞の割合は高齢骨髄で若齢骨髄より有意に増加した。また、CAR 細胞の割合は高齢骨髄と若齢骨髄で有意な差はなかったが、高齢骨髄では幹細胞マーカー *Scal* 陽性の CAR 細胞が有意に増加した。scRNA-seq のクラスター解析において、骨髄ニッチ関連細胞は Adipo-CAR 細胞、Osteo-CAR 細胞、骨芽細胞、ならびに類洞内皮細胞に大別され、高齢骨髄では若齢骨髄より骨芽細胞および類洞内皮細胞の割合が有意に減少した。また、高齢骨髄由来 Adipo-CAR 細胞は若齢骨髄由来 Adipo-CAR 細胞と異なるクラスターに分類された。Functional enrichment 解析では、高齢骨髄由来 Adipo-CAR 細胞は若齢骨髄由来 Adipo-CAR 細胞より骨芽細胞、幹細胞、ならびに基底膜の関連遺伝子の発現が低下した。分化経路推定解析の結果、若齢 Adipo-CAR 細胞は幹細胞性が高く、Osteo-CAR 細胞や骨芽細胞への分化が推測されたが、高齢 Adipo-CAR 細胞は幹細胞性が低く、骨芽細胞への分化推測ができなかった。実際、高齢 mBMSCs は若齢 mBMSCs より骨芽細胞分化能が低下し、脂肪細胞分化能が増加していた。超微構造解析では、高齢骨髄の類洞は基底膜の存在率が有意に減少し、タイトジャンクションの欠如や内皮細胞の破裂といった所見が有意に増加した。

【考察】Adipo-CAR 細胞は、骨芽細胞への分化が抑制され、骨量が低下し、脂肪髄を呈する可能性が示された。また、Adipo-CAR 細胞の質的变化、類洞における内皮細胞の異常の増加や基底膜の断裂といった骨髄ニッチ関連細胞の加齢変化が明らかとなり、このことが、造血幹細胞の老化を誘発していると推測された。本研究は骨髄ニッチ関連細胞の加齢変化を scRNA-seq と超微構造解析を駆使して解明したもので、骨髄の加齢変化のメカニズムを大きく拓くものである。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。