

## 学 位 論 文 要 旨

### 研究題目

Senescent RAW264.7 cells exhibit increased production of nitric oxide and release inducible nitric oxide synthase in exosomes

(老化した RAW264.7 細胞は一酸化窒素の産生を増加しエクソソームとして誘導型一酸化窒素合成酵素を放出する)

兵庫医科大学大学院医学研究科

医科学専攻 器官・代謝制御系

口腔科学 (指導教授 岸本 裕充 )

氏 名 服部 洋一

老化は未解明な生命現象であり、骨リモデリングが行われる骨微小環境においても例外ではない。骨リモデリングは破骨細胞と骨芽細胞による連関した制御システムであり、このバランスの破綻が、骨量減少などの骨代謝性疾患につながる。近年、老化した細胞は、単に細胞増殖を停止しているのではなく、Senescence-associated secretory phenotype (SASP) と呼ばれる炎症性サイトカインなどのタンパク分泌現象を生じていることが明らかとなった。SASP と骨微小環境との関連した報告は少なく、本研究は、老化に伴う破骨前駆細胞の分化および SASP への影響を解明することを目的とした。

細胞は、マクロファージ系破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞を使用した。5、10、20 代継代培養した細胞 (それぞれ P5、P10、P20) を用いて比較検討を行った。破骨細胞への分化能については、P5、P10、P20 に NF- $\kappa$ B リガンド受容体活性化因子 (RANKL) を投与し検討を行った。

P5、P10 と比較して、P20 では細胞増殖能は有意に抑制され、増殖関連因子である mTOR タンパク発現は低下した。また、テロメア長は継代数の増加につれて有意に短縮を認め、老化関連酸性  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性および老化マーカーである p-H2A.X タンパク発現は、P20 で高発現を認めた。これらの結果より、P20 が複製老化していることを確認した。P20 の酒石酸耐性ホスファターゼ活性は、P5、P10 と比較し有意に低下していた。また、破骨細胞分化マーカーである RANK および NFATc1 タンパク発現は、P5、P10 では発現を認めるも、P20 ではほぼ発現を認めなかった。SASP 因子である TGF- $\beta$ 1、HIF-1 $\alpha$ 、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) のタンパク発現は、継代数の増加に伴い発現が上昇し、培養上清中の SASP 因子 (IL-6、TNF- $\alpha$ 、NO) の濃度も有意に増加を認めた。また、エクソソームの解析において、P20 において、培養上清中に放出されたエクソソームの粒子数は有意に増加しており、エクソソーム内の iNOS タンパク発現が上昇していた。

以上の結果より、破骨前駆細胞は老化により分化が抑制され、骨微小環境内に老化破骨前駆細胞は蓄積されていく。さらに、老化破骨前駆細胞は SASP を介して、周囲細胞の老化および炎症を誘導し、またエクソソームとして iNOS を放出することで炎症性疾患を引き起こす可能性が考えられた。