

氏名	北川 若奈		
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7019号		
学位授与の日付	令和6年3月25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	高齢マウス長管骨の創傷治癒遅延メカニズムの解明における1細胞トランスクリプトーム解析		
論文審査委員	久保田 聡 教授	上岡 寛 教授	池亀 美華 准教授

学位論文内容の要旨

I. 目的

骨髄の老化は、脂肪髄を伴う骨量減少の結果、骨折リスクの増大や抜歯窩/骨折など損傷部位における治癒不全を引き起こすことが知られている。加齢による骨組織の創傷治癒不全については、間葉系前駆細胞の数の減少、遊走能の低下、局所的または全身的な血流の低下など、多くの理由が考えられているが、詳細は明らかではない。一方我々は、骨髄間葉系幹細胞として骨芽細胞や脂肪細胞へと分化するとともに、造血幹細胞が血球系細胞に分化・成熟するための環境（骨髄ニッチ）を形成しているCAR (Cxcl12 Abundant Reticular)細胞に着目し、骨髄組織の1細胞解析 (single cell RNA sequencing: scRNA-seq)を行った。その結果、老化に伴い、類洞基底膜周囲に局在するAdiponectin (*Adipoq*)陽性のCAR細胞 (Adipo-CAR細胞)の質的変化が骨髄老化の要因の一つである可能性を報告した。しかし、長管骨の創傷治癒過程において、加齢に伴いAdipo-CAR細胞や血球系細胞の遺伝子発現レベルでの挙動に、どのような変化が生じるのか、その詳細は未だ不明である。そこで、本研究では老化による長管骨創傷治癒不全メカニズムを明らかにすることを目的に、scRNA-seqを応用し、創傷治癒モデルマウスの長管骨骨髄を1細胞レベルで詳細に解析した。

II. 方法

8~12週齢（若齢）マウスと80~100週齢（高齢）マウスを対象に、大腿骨に歯科用ラウンドバーで直径0.8 mmの骨欠損を作製した。1, 3, 5, 7日後の大腿骨および未処置の大腿骨（0日）を回収し、micro-CTによる骨形態解析および、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色による組織学的解析を行った。また、大腿骨骨髄細胞から血球系細胞および、CD45陰性とTER119陰性の非血球系細胞をセルソーターにて分離し、scRNA-seqを行った。データ解析には、ソフトウェアSeurat (Cell. 2021;184:3573-3587)を使用した。また、細胞間相互作用解析にはソフトウェアCellChat (Nat commun. 2021;12:1088)を使用した。

III. 結果と考察

Micro-CT像を用いた損傷部位における新生骨体積量の骨形態解析および、HE染色像を用いた損傷部位における新生骨面積量の組織学的解析を行った結果、どちらも若齢骨髄と比較して高齢骨髄では有意に少なく ($p < 0.0001$, Unpaired *t*-test)、本マウスモデルにおいても治癒遅延が確認できた。1細胞解析の結果、骨髄内の非血球系細胞は、*Adipoq*, *Cxcl12*共陽性のAdipo-CAR細胞、Alkaline phosphatase (*Alpl*), *Cxcl12*共陽性のOsteo-CAR細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞に大別された。その中でも、高齢骨髄と若齢骨髄のAdipo-CAR細胞はトランスクリプトーム的に異なる集団を形成し、加齢による質的変化が生じていた。また、0日の若齢骨髄と比較し高齢骨髄では、骨芽細胞、血管内皮細胞の割合が減少していた。

創傷治癒過程の解析において、若齢骨髄では、1, 3日目にAdipo-CAR細胞の割

合が減少し、骨芽細胞、血管内皮細胞の割合が増加し、7日目には未処置の状態にほぼ戻った。一方、高齢骨髄では、1,3日目には大きな変化は認めず、7日目にAdipo-CAR細胞の割合の減少、骨芽細胞、血管内皮細胞の割合の増加を認めた。つまり、高齢骨髄では創傷治癒過程における細胞の挙動が遅延しており、それが治癒遅延の一因である可能性が見出された。

老化は細胞生物学的な現象だけでなく、細胞間相互作用が深く関わっていることが知られていることから、骨髄ニッチ形成細胞の一つであるAdipo-CAR細胞と、免疫関連細胞をはじめとする血球系細胞との細胞間相互作用を解析した。その結果、高齢骨髄Adipo-CAR細胞は若齢骨髄Adipo-CAR細胞と比較して血球系細胞との細胞間相互作用が低下していた。さらに、血球系細胞のデータから、創傷治癒過程において重要な役割を果たす単球/マクロファージ分画のみを詳細に解析すると、3日目の高齢骨髄にのみInterleukin 1 beta ($IL1\beta$)陽性単球が確認されるなど、Adipo-CAR細胞の変化が免疫関連細胞にも影響している可能性が示唆された。

IV. 結論

CAR細胞が骨髄ニッチ形成細胞であるとともに、骨芽細胞の起源細胞の一つであることが知られているが、長管骨創傷治癒過程において、高齢骨髄では、骨髄間葉系幹細胞の大部分を占めるAdipo-CAR細胞の質的变化により、骨芽細胞への分化の遅延と、血球系細胞との細胞間相互作用の低下が生じ、骨創傷治癒不全を引き起こす可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

【緒言】骨髄の老化は、長管骨の骨量低下や、造血幹細胞の機能異常、創傷治癒遅延などを生むことが知られており、その要因の一つに、造血幹細胞ニッチを形成している骨髄間葉系幹細胞の一つであるCAR (Cxcl12 Abundant Reticular) 細胞が寄与していることが知られているが、その詳細は未だ不明である。そこで本研究では、骨髄老化および老化に伴う長管骨創傷治癒遅延の機序を明らかにすることを目的に、主に1細胞解析 (single cell RNA sequencing: scRNA-seq)を用いて解析を行った。

【方法】8~12週齢 (若齢)マウスと80~100週齢 (高齢)マウスを対象に、大腿骨に直径 0.8 mmの骨欠損を作製した。1,3,5,7日後の大腿骨および未処置の大腿骨 (0日)を回収し、micro-CT像、およびヘマトキシリン・エオジン (HE)染色像による組織学的解析を行った。また、大腿骨骨髄細胞から血球系細胞と非血球系細胞をセルソーターにて分離し、それぞれscRNA-seqを行った。

【結果と考察】組織学的解析の結果、骨欠損部位の新生骨量は若齢骨髄と比較して高齢骨髄では有意に少なく、本マウスモデルにおいても治癒遅延が確認できた。1細胞解析の結果、非血球系細胞は、*Adipoq*、*Cxcl12*共陽性のAdipo-CAR細胞、*Alkaline phosphatase (Alpl)*、*Cxcl12*共陽性のOsteo-CAR細胞等に大別された。特にAdipo-CAR細胞は、高齢骨髄と若齢骨髄ではトランスクリプトーム的に異なる集団を形成し、加齢による質的变化が生じていた。創傷治癒過程では、Adipo-CAR細胞の割合の減少、骨芽細胞、血管内皮細胞の割合の増加を認めたが、高齢骨髄ではこれらの挙動が遅延しており、治癒遅延の一因である可能性が見出された。Adipo-CAR細胞と血球系細胞の細胞間相互作用を解析した結果、高齢骨髄では若齢骨髄と比較して低下していた。また、創傷治癒において重要な役割を果たす単球/マクロファージ分画を詳細に解析すると、3日目の高齢骨髄にのみInterleukin 1 beta (*Il1β*)陽性単球が確認されるなど、Adipo-CAR細胞の変化が免疫関連細胞にも影響している可能性が示唆された。

【結論】骨髄ニッチ形成細胞であるとともに、骨芽細胞の起源細胞の一つであるCAR細胞の中でも、骨髄間葉系幹細胞の大部分を占めるAdipo-CAR細胞に質的变化が生じることにより、高齢骨髄では骨芽細胞への分化の遅延と、血球系細胞との細胞間相互作用の低下が生じ、骨創傷治癒遅延を引き起こす可能性が示唆された。

本研究では創傷治癒過程の1細胞解析を行うことで、高齢骨髄の創傷治癒遅延にはAdipo-CAR細胞の質的变化が影響するという新しい知見を得た。得られた成果は新規性に富んでおり、また骨髄の加齢変化を解明するうえでの礎となるものである。今後、*in vitro*および*in vivo*でのさらなる研究の展開が期待される。

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。