

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20413

研究課題名(和文)破骨細胞由来生理活性物質を介した骨-脂肪コミュニケーションと肥満・糖代謝制御

研究課題名(英文) Interaction between bone and adipose tissue and control of obesity and glucose metabolism through the secretion factors derived from osteoclasts

研究代表者

久本 由香里 (Kyumoto, Yukari)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：40729026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、様々な組織間でのコミュニケーションの存在が明らかとなり、生体の恒常性維持や病態の発症に關与することが報告されている。そこで本研究では、骨-脂肪コミュニケーションに注目し、脂肪細胞に対する破骨細胞分泌因子の影響を検討した。その結果、破骨細胞から特異的に分泌されるカテプシンKが脂肪細胞分化を促進する可能性が示唆された。また、IL-1 曝露により誘導された病的活性化破骨細胞ではインスリン抵抗性に關与する遺伝子の発現が変動していることが判明した。以上の結果から、破骨細胞は骨-脂肪コミュニケーションの一端を担う可能性が十分に考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, it is reported that interaction between various tissues is involved in the maintenance of homeostasis and development of various disease. We focused on the interaction between bone and adipose tissue and analyzed the effect of the secretion factors derived from osteoclasts (clastokine) on adipocyte differentiation. We showed that cathepsin K, a clastokine, promotes the adipocyte differentiation, and mRNA expression of genes related to insulin resistance changes in pathologically activated osteoclasts induced by IL-1 exposure. Therefore, osteoclasts may play an important role in the interaction between bone and adipose tissue.

研究分野：分子口腔解剖学

キーワード：破骨細胞 脂肪細胞 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞は摂取したエネルギーを細胞内に中性脂肪として貯蔵し、必要に応じて再供給するエネルギー代謝器官として機能するだけでなく、アディポカインと呼ばれる様々な生理活性物質を産生・分泌する内分泌細胞でもある。このアディポカインは糖代謝や脂質代謝の制御に関与するだけでなく、骨組織を構成する破骨細胞の分化や活性にも作用し、骨代謝を制御していることが明らかとなっている。申請者はこれまでに、糖尿病を惹起するアディポカイン Retinol binding protein 4 (RBP4)が破骨細胞の分化を制御する可能性を明らかにした(論文投稿準備中: 研究スタート支援 26893194; 研究代表)。従来骨組織は骨量や骨質のみを維持する機能を担っていると考えられてきたが、近年骨芽細胞から分泌されるオステオカルシンが血流を介して遠隔の骨細胞や脂肪細胞に作用し、糖代謝を調節する所見が集積している(Lee et al., *Cell* 2007, Zhou et al., *Endocrinology* 2013)。このように、脂肪細胞とともに骨組織も内分泌器官として働き、骨と脂肪組織が互いのコミュニケーションにより骨代謝や糖代謝を調節するものと考えられる。実際、肥満や糖尿病患者において骨折リスクの増大や骨吸収の亢進が認められることから、骨-脂肪コミュニケーションはそれぞれの病態制御において重要な役割を果たしている可能性が高い。

骨吸収を担う破骨細胞が生理活性物質(クラストカイン)を産生し、骨芽細胞の分化および機能調節に関与することが知られているが、骨芽細胞と同じ間葉系幹細胞を起源とする脂肪細胞や糖代謝に対する破骨細胞の機能については不明である。しかしながら、破骨細胞の数および活性が亢進している骨粗鬆症患者の骨髄中では間葉系幹細胞から骨芽細胞の分化が阻害され、脂肪細胞の分化が促進することから(Tokuzawa et al., *PLoS Genet.* 2010)、骨-脂肪コミュニケーションにクラストカインが関与し、肥満や糖代謝を調節することは十分に考えられる。

カテプシン K は破骨細胞に選択的に発現しているシステインプロテアーゼであり、骨基質のコラーゲンを分解する主たる酵素として骨吸収において不可欠である。関節リウマチや歯周病等の病的骨破壊を伴う疾患ではカテプシン K 血中濃度は上昇する。高脂肪食を与えたマウスでは体重が増加し肥満と耐糖能の悪化が惹起されるが、この時骨吸収の亢進とカテプシン K の血中濃度の上昇も認められる。しかしながら、カテプシン K 欠損マウスでは体重の増加と耐糖能の悪化が有意に軽減される(Yang et al. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008)。したがって、病的骨破壊に伴い上昇する破骨細胞由来のカテプシン K が「骨-脂肪コミュニケーション」

」の一端を担っており、脂肪細胞や糖代謝調節に影響を与える可能性が考えられる。

以上の経緯から申請者は、「破骨細胞より産生されるカテプシン K やクラストカインが脂肪細胞分化や糖代謝を制御し、「骨-脂肪コミュニケーション」の一端を担う」という研究仮説を構築し、破骨細胞を産生源とするユニークな分子を標的とした肥満および糖尿病疾患の新規予防法・治療法の開発に関する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、カテプシン K やクラストカインによる脂肪細胞分化・機能や糖代謝制御機構存在の可能性とその分子メカニズムを追究するために、以下の項目を明らかにする。

- 1) カテプシン K による脂肪細胞制御の分子機序と形態学的解析
- 2) 骨破壊を伴う骨代謝疾患病態と脂肪量・耐糖能との関連性の解明
- 3) 脂肪細胞・糖代謝制御に関与する新規クラストカインの探索と分子形態学的解析

以上、破骨細胞由来因子を介した骨-脂肪コミュニケーションの存在を明らかにし、肥満および糖尿病に対する新たな予防・治療法開発への一助としたい。

3. 研究の方法

(1) 3T3-L1 細胞の培養

マウス由来前駆脂肪細胞株である 3T3-L1 細胞は、10% FBS を含む DMEM 中、 2.5×10^4 cells/cm² の密度でプレートに播種し、37℃、5% CO₂ 条件下で 3~4 日間培養した。コンフルエントに達した後、2.5 μg/mL Insulin(Ins)、0.5 mM 3-Isobutyl 1-methylxanthine (IBMX)、0.5 μM Dexamethasone(Dex)により 2 日間分化誘導を行った。その後、2.5 μg/mL Ins を含む培養液に交換し、最大 16 日間培養した。

(2) Oil red O 染色

培養 10 日目の 3T3-L1 細胞を 10%ホルマリンで固定後、2-Propanol で溶解した 60% Oil red O 染色を 20 分間反応させた。任意の視野における染色面積を定量化した。

(3) マウス骨髄由来破骨細胞 (mBMMs) の培養

5 週齢の雄性 ddY マウスの大腿骨および脛骨を摘出し、骨端両部を切断後、骨髄を -MEM 中に回収した。これを 1500 rpm、5 分間遠心後、沈査を 10 ng/mL M-CSF 含む 10% FBS- -MEM に懸濁後プレートに播種し、37℃、5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュ

ベートした。その後、浮遊細胞を回収し、20 ng/mL M-CSF 含む 10% FBS- MEM でさらに 72 時間インキュベートした。接着細胞を PBS で十分に洗浄後、トリプシン処理により細胞を回収し、遠心後、20 ng/mL M-CSF、50 ng/mL RANKL を含む 10% FBS- MEM に懸濁した細胞を 3×10^4 cells/well になるように 96well プレートに播種した。各サイトカインを曝露する際は、このタイミングで添加した。この時点を経営 0 日目とし、最大 4 日間培養した。

(4) TRAP 染色

必要な日数まで培養した mBMMs を、TRAP kit (SIGMA) を用いて固定および染色した。核数が 3 以上の TRAP 陽性細胞数をカウントし、定量を行った。

(5) Real-time PCR

各日数培養した細胞から TotalRNA を回収し、逆転写反応により cDNA を合成した。この cDNA を Real-time PCR 解析に用いた。内部標準には *Actinβ* を用いた。

(6) 骨吸収能の測定

RANKL および各サイトカイン存在下で 48 時間培養した mBMMs を、トリプシン処理により回収後、象牙質切片上に播種し、10% FBS- MEM 中で 5 日間培養した。象牙質上から破骨細胞を除去後、ヘマトキシリン液で象牙質切片を染色し、その染色面積を定量化した。

(7) 酸分泌能の測定

RANKL および 0.5 ng/mL IL-1 存在下で 48 時間培養した mBMMs を、酸性条件下で蛍光を発するプローブ(Rh-PM)で標識した BSA でコーティングした象牙質片上に播種し、10% FBS- MEM 中で 24 時間培養した。酸分泌により赤い蛍光を発するが、その蛍光強度を共焦点顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) 脂肪細胞分化に対するカテプシン K の影響

各日数培養した 3T3-L1 細胞より totalRNA を回収し、Real-time PCR 法により脂肪細胞特異的のマーカおよびカテプシン K の mRNA 発現を検討した。その結果、マーカ発現は分化誘導により日数依存的に上昇したが、カテプシン K の発現は培養 2 日目から著しく低下した (図 1)。

次に、3T3-L1 細胞に分化誘導剤とともに 10 ng/mL の活性型カテプシン K を持続的に曝露し、培養 10 日目に Oil red O 染色によりその分化を評価した。その結果、Oil red O の染色性に変化は認められなかった。しかしながら、培養 2 日目より分化誘導剤 (Ins)

を添加せずに 10% FBS を含む DMEM のみで 10 日間培養した細胞では、カテプシン K 持続曝露により Oil red O の染色性が著明に上昇した (図 2)。

さらに、同じ条件で培養した 3T3-L1 細胞を培養 2 日目および 10 日目に totalRNA を回収し、脂肪細胞分化マーカーの mRNA 発現を解析した。その結果、培養 10 日目ではコントロールとカテプシン K 持続曝露した細胞の両者の間に変化は認められなかったが、培養 2 日目では *Pparγ*、*Fabp4*、*Slc2a4*、*Cd36* の発現の上昇傾向が確認された。

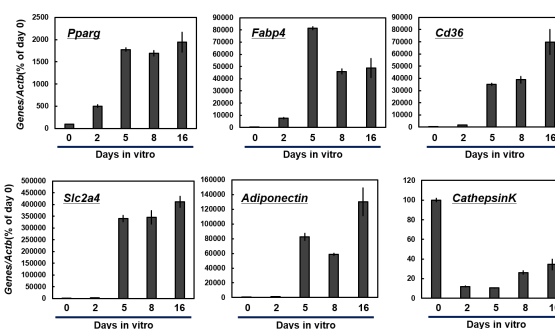


図 1. 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化マーカーの発現変動

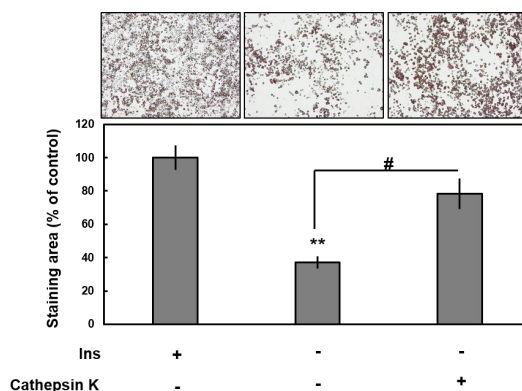


図 2. 脂肪細胞分化に対するカテプシン K の影響

以上の結果より、カテプシン K は脂肪細胞の分化を促進する可能性が示唆された。また、脂肪細胞自身もカテプシン K を産生するが、脂肪細胞以外の細胞由来のカテプシン K も分化に影響する可能性が示唆された。

(2) 脂肪細胞・糖代謝制御に関与する新規クラストカインの探索

初めに、mBMMs を用いて病的活性化破骨細胞を誘導する炎症性サイトカインの探索を行った。RANKL とともに各サイトカイン (IL-1α、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-17、TNF-α) を様々な濃度で mBMMs に曝露し、培養 4

日目において TRAP 染色を行った。その結果、0.5 ng/mL IL-1 を曝露した mBMMs で TRAP 陽性多核細胞数が顕著に増加した。また、象牙質切片上の骨吸収窩も著しく増大していた(図 3)。

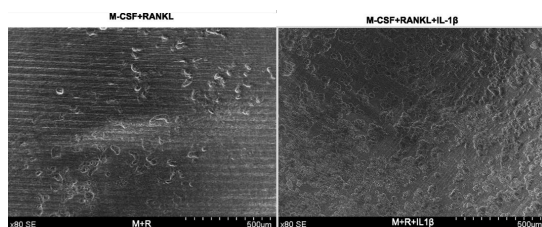


図 3. 骨吸収能に対する IL-1β の影響

さらに mBMMs において酸分泌能を解析した結果、コントロールと比較して IL-1 曝露群で著明に亢進していることが明らかとなった(図 4)。以上の結果より、0.5 ng/mL IL-1 存在下で培養した破骨細胞を病的活性化破骨細胞とした。

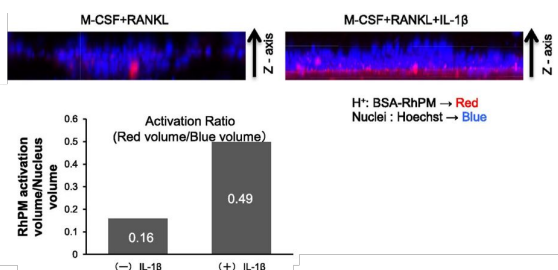


図 4. 酸分泌能に対する IL-1β の影響

次に、0.5 ng/mL IL-1 存在下または非存在下で 48 時間培養した破骨細胞から totalRNA を回収し、マイクロアレイ解析により 2 群間の遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、インスリン抵抗性に関与するいくつかの遺伝子の発現が、IL-1 曝露群で大きく上昇または低下していることが判明した。

以上の結果より、カテプシン K だけでなく病的活性化破骨細胞から分泌されるクラストカインは糖代謝制御に関与する可能性が示唆された。

研究成果(1)(2)より、破骨細胞は骨-脂肪コミュニケーションの一端を担う可能性が十分に考えられる。しかしながらその詳細な機能やメカニズムの解明までには至らなかったため、今後さらなる検討が必要である。また、当初予定していた疾患モデル動物を用いた in vivo 解析も遂行できていないため、今後の重要課題といえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

(Nakamura Y.の Nakamura は、報告者久本由香里の旧姓である。)

Exogenous nitric oxide stimulates the odontogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. (2018) Sonoda S., Mei Y. F., Atsuta I., Danjo A., Yamaza H., Hama S., Nishida K., Tang R., Kyumoto-Nakamura Y., Uehara N., Kukita T., Nishimura F., Yamaza T. *Sci. Rep.* 8(1):3419. 査読有

IL-1β Induces Pathologically Activated Osteoclasts Bearing Extremely High Level of Resorbing Activity Imaged by pH-Sensitive Fluorescence probes: A Possible Pathological Subpopulation of Osteoclasts. (2018) Shiratori T. *, Kyumoto-Nakamura Y. *, Kukita A., Uehara N., Zhang J., Koda K. 他 8 名 *J. Immunol.* 200(1):218-228. * Equally contributed. 査読有

Osteoblast-derived Laminin-332 is a novel negative regulator of osteoclastogenesis in bone microenvironments. (2017) Uehara N., Kukita A., Kyumoto-Nakamura Y., Yamaza T., Yasuda H., Kukita T. *Lab. Invest.* 97(10):1235-1244. 査読有

The transcriptional modulator Ifrd1 controls PGC-1α expression under short-term adrenergic stimulation in brown adipocytes. (2017) Park G., Horie T., Kanayama T., Fukasawa K., Iezaki T., Onishi Y., Ozaki K., Nakamura Y., Yoneda Y., Takarada T., Hinoi E. *FEBS J.* 284(5):781-795. 査読有

Extremely High Expression of Antisense RNA for Wilms' Tumor 1 in Active Osteoclasts: Suppression of Wilms' Tumor 1 Protein Expression during Osteoclastogenesis. (2016) Li YJ., Kukita A., Kyumoto-Nakamura Y., Kukita T. *Am. J. Pathol.* 186(9):2317-2325. 査読有

Transcriptional Modulator Ifrd1 Regulates Osteoclast Differentiation through Enhancing the NF-κB/NFATc1 Pathway. (2016) Iezaki T., Fukasawa K., Park G., Horie T., Kanayama T., Ozaki K., Onishi Y., Takahata Y., Nakamura Y., Takarada T., Yoneda Y., Nakamura T., Vacher J., Hinoi E. *Mol. Cell Biol.* 36(19):2451-2463. 査読有

[学会発表](計 11 件)

Takuma Shiratori, Akiko Kukita, Yukari Kyumoto-Nakamura, Norihisa Uehara, 他 9 名

Osteoclasts Formed under Stimulation

by IL-18 Possess Extremely High Ability to Secrete Protons and to Resorb Dentin with Abnormal Adhesiveness, Imaged by pH-Sensitive Fluorescence Probes
American Society for Bone and Mineral Research 2017 Annual Meeting

久本 由香里、上原 範久、久木田 明子、
山座 孝義、久木田 敏夫
Galectin-9 による破骨細胞分化抑制因子
MafB の発現制御
第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016
年

久本 由香里、上原 範久、久木田 明子、
久木田 敏夫
Galectin-9 による破骨細胞分化抑制と転
写因子 MafB の発現制御メカニズムの解
明
第 34 回日本骨代謝学会学術集会 2016
年

他、8 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久本 由香里 (KYUMOTO, Yukari)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号: 40729026

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし