

令和元年5月16日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18417

研究課題名(和文)胎児期低栄養による骨形成不良と2型糖尿病発症の関連性の解明

研究課題名(英文)Developmental osteogenesis defects and onset of type 2 diabetes in an adult by maternal undernutrition during pregnancy

研究代表者

安永 菜由(Yasunaga, Mayu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究員

研究者番号：70712181

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：胎児期低栄養によるII型糖尿病発症メカニズムの解明を目的に間葉系幹細胞の骨分化誘導系において栄養環境を変化させることで胎児期低栄養モデルをin vitroで作出し、骨分化誘導過程における栄養環境の変化が細胞の分化や増殖、機能に与える影響について検証した。骨分化誘導過程における低グルコース環境は、骨分化マーカーであるALP活性やGla型オステオカルシンの分泌量、細胞増殖能を低下させた。膵臓細胞の増殖やインスリン合成に関わるGlu型オステオカルシンの分泌量は分化度に伴いGla型と同様に变化した。以上より骨分化誘導過程における栄養環境の変化は細胞の分化や増殖、機能に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞の骨分化誘導を用いた当該現象のin vitro低栄養モデルの構築に成功したことは劇的な変化を生じる発生期での複雑な疾患素因の形成メカニズムの解明に大きく寄与すると考えられる。さらに膵臓細胞の増殖や機能に関わるGlu型オステオカルシンは骨分化度に応じて変化する可能性が示唆され、本研究のコンセプトである骨形成不良による膵臓細胞の発生・機能への影響について支持するデータの一つとなった。本研究により未だ全く不明の「低体重で生まれた人で成人期に罹患しやすいII型糖尿病の発症機構」の一端が明らかとなり、発症機構の全体像解明への重要な基礎的知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the mechanism involved in type II diabetes induced by the mother's undernutrition during pregnancy, we developed an in vitro model that rat mesenchymal stem cells (MSCs) were induced osteogenic differentiation at a high and low glucose concentration in osteogenesis induction medium, and verified that impacts on cell differentiation, proliferation and function.

Low glucose decreased osteogenesis differentiation markers, including ALP activity and carboxylated osteocalcin secretion as well as proliferation. Uncarboxylated osteocalcin, which is specifically expressed in osteoblasts and secreted into the circulation, regulates glucose homeostasis by stimulating insulin expression in pancreas, was secreted according to the differentiation mature level of osteoblasts similar to carboxylated osteocalcin. Thus, these results indicate that nutrition change in the osteogenesis differentiation process could impact cell differentiation, proliferation and function.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：低栄養 骨形成 オステオカルシン 間葉系幹細胞 グルコース

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓は血糖値の恒常性維持に関わる臓器の1つで、特に細胞は血糖値を下げるインスリンを分泌する唯一の細胞である。そのため細胞数の減少や機能低下は高血糖状態を引き起こし、2型糖尿病を発症させる。一方、大規模な疫学調査により、妊娠期での母親の栄養不足つまり胎児期低栄養は、胎児の骨形成不良を起こし体重2500g以下の低体重児の出生頻度を増加させるばかりでなく、生まれた低体重児の成人期での2型糖尿病の発症率をも増加させることが報告されている。この「低体重で生まれた人で成人期に罹患しやすい2型糖尿病」の発症原因の1つとして、「細胞の発生、機能障害」が挙げられている。発生障害の分子メカニズムについて、膵臓形成に関わる遺伝子Pdx1の発現低下およびその発現がDNA塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな発現制御を受けることが近年報告された。そして、この異常化したエピジェネティックな発現制御機構が出生後も維持された場合、成人期で2型糖尿病を発症するという仮説が想定されている。しかし、胎児期低栄養による膵臓細胞の発生、機能障害に関わる分子メカニズムは、上記以外で未だ全く明らかにされていない。

また近年、膵臓細胞の増殖やインスリン合成に骨形成マーカーであるオステオカルシンが関わることが報告された。オステオカルシンは骨芽細胞で合成され血中に分泌されると、細胞の増殖やインスリン合成を促進する。そして血糖調節のため血中に分泌されたインスリンは、今度は骨芽細胞のオステオカルシン合成を促進する。このように骨と膵臓の臓器間相互作用は糖代謝に非常に重要で、胎児期低栄養による低体重児では骨形成不良が顕著に見られることから、骨形成不良が細胞の発生、機能障害を引き起こし、2型糖尿病発症に関わる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

妊娠期での母親の栄養管理は、健康な次世代を生み出すために非常に重要である。これまでに妊娠期の母親が栄養不足になると胎児の膵臓で細胞の発生が障害されることが明らかにされている。さらにその胎児が大人になると、高頻度に2型糖尿病を発症することが報告されている。しかし、どのようなメカニズムで細胞の発生が障害され2型糖尿病を発症するのか、その詳細は不明である。一方近年、膵臓細胞の増殖やインスリン合成に骨形成マーカーであるオステオカルシンが関わることが明らかにされ、骨による膵臓を介した糖代謝機能が報告された。栄養不足の胎児では顕著な骨形成不良が見られるが、その分子メカニズムや膵臓細胞の発生・機能への影響は不明である。そこで本研究では、胎児期低栄養による骨形成不良の(1)分子メカニズム、(2)膵臓細胞の発生・機能への影響を検証することで、「胎児期低栄養による骨形成不良と2型糖尿病発症の関連性」を解明する。

3. 研究の方法

当該研究領域においてこれまでに多くのグループにより動物モデルが開発されてきたが、動物種や制限給餌量、その実施期間等が異なる事で表現型が大きく変化することが明らかにされていた。劇的な変化を生じる発生期において、様々な環境要因は大きく影響すると考えられ、動物モデルを使用した実験のみではその分子メカニズムの解明は困難であると判断した。そこでモデルの簡素化を目的に *in vitro* での間葉系幹細胞の骨分化誘導系において、栄養環境を変化させることで、低・高栄養モデルの樹立を試み、前述の2つの課題に取り組むこととした。

(1) 骨髄由来間葉系幹細胞の単離および骨分化誘導

骨髄由来間葉系幹細胞(BMDMSC)の単離および骨分化誘導は先行論文を参考に実施した。ラット近交系 F344/NS1c(7週令、雄)より採取した大腿骨の両骨端を切除し、培地(DMEM+15% FBS)を大腿骨内腔にシリンジで流し入れ、骨髄細胞を回収した。回収した骨髄細胞は速やかに培養皿(T-75 フラスコ)に播種し、37℃、CO₂インキュベーター内で3日間培養し、培養皿に接着した細胞をBMDMSCとした。その後2日に1回培地交換を行い、1週間培養後の細胞を骨分化誘導実験に使用した。骨分化誘導は96 well plateに細胞を播種し(3x10⁴ cells/well)、24時間培養後、分化誘導培地(DMEM+15% FBS, 10 nM Dexamethasone (Dex), 10 μM -glycerophosphate, 258 μM L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n-Hydrate)に交換し、3週間培養した。培地交換は2日に1回行った。ネガティブコントロールはDex非添加(-)群とした。

(2) 脂肪組織由来間葉系幹細胞の単離および骨分化誘導

脂肪組織由来間葉系幹細胞(ADMSC)の単離および骨分化誘導は先行論文を参考に実施した。ラット近交系 F344/NS1c(7週令、雄)より採取した皮下脂肪(背側左右2カ所)を0.1% Collagenase 溶液内で5 mm以下の大きさに細断した。脂肪組織を含む0.1% Collagenase 溶液は37℃で1時間反応させ、10分毎に転倒混和を行った。その後、遠心分離を行いPBSで細胞を洗浄後100 μmのフィルターを通し、培地(DMEM+15% FBS)に懸濁した。細胞懸濁液は培養皿(T-75 フラスコ)に播種し、37℃、CO₂インキュベーター内で3日間培養し、培養皿に接着した細胞をADMSCとした。その後2日に1回培地交換を行い、1週間培養後の細胞を骨分化誘導実験に使用した。骨分化誘導はBMDMSCと同条件に加え、細胞播種数および分化誘導培地についても検討した。

(3) 骨分化評価

アリザリンレッド染色による石灰化評価

分化誘導後の細胞を PBS(-) で洗浄後、10% ホルマリンで固定し、株式会社 PG リサーチ社製の石灰化評価セット (ARD-SET) を利用して評価した。染色後の細胞は顕微鏡観察後、石灰化結節溶解液を用いて溶解し、プレートリーダーにて 450 nm の吸光度を測定し定量化した。

アルカリフォスファターゼ活性による骨分化評価

分化誘導後の細胞を PBS(-) で洗浄後、0.1% TritonX-100 溶液 (150 μ l/well) で溶解し凍結融解により細胞を完全に破碎し、細胞溶解液を調製した。富士フィルム和光純薬株式会社製のラボアッセイ ALP (291-58601) を用いて、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を評価した。

オステオカルシン分泌量による骨分化評価

培養上清中における α -カルボキシグルタミン酸化された (Gla 型) および低カルボキシル化した不活性型 (Glu 型) オステオカルシン量を測定した。それぞれタカラバイオ社製の Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (MK126) および Rat Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (MK146) を使用して定量した。

細胞数評価 (各パラメーターの標準化用)

アルカリフォスファターゼ活性を評価した細胞溶解液を用いて、Thermo Fisher Scientific 社製の Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (P11496) を使用して、DNA 量を測定した。

(4) 栄養環境の骨分化に与える影響

BMDMSC においては、分化誘導 24 時間前の期間のみまたは、分化誘導 24 時間前から分化誘導 3 週間後までの期間、グルコース濃度を 1 g/L の低グルコース培地 (通常培地とした) または 10 g/L の高グルコース培地の 4 条件で骨分化を誘導した。

ADMSC においては、分化誘導培地のグルコース濃度を 1 g/L の低グルコース培地 (通常培地とした) または 4.5 g/L の高グルコース培地の 2 種類の条件下で骨分化を誘導した。いずれの細胞においても分化誘導後の細胞を用いて、(3) の方法により骨分化評価を行った。

4. 研究成果

(1) 骨髄由来間葉系幹細胞の単離および骨分化誘導系の樹立

単離した BMDMSC の骨分化評価

単離した BMDMSC の骨分化能を評価するため、骨分化誘導後の BMDMSC でアリザリンレッド染色を行ったところ、Dex(+) は Dex(-) と比較して、吸光度が優位に高いことが確認できた。さらに ALP 活性および Gla 型オステオカルシンも優位に増加していることが確認できた (図 1)。以上の結果より、単離した BMDMSC は骨分化能を有する細胞であることが確認できた。

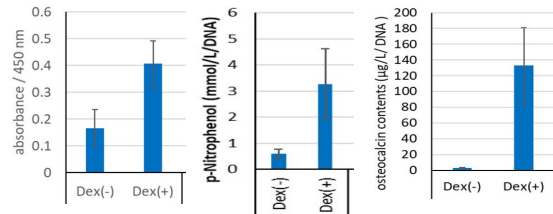


図 1. BMDMSC の骨分化能

(左: アリザリンレッド染色、中央: ALP 活性、右: Gla 型オステオカルシン分泌量)

骨分化度と Glu 型オステオカルシンの関係

次に骨分化度と膵臓細胞の増殖やインスリン合成に関わる Glu 型オステオカルシンの分泌量の関係性を明らかにするため、骨分化誘導後の BMDMSC での Glu 型オステオカルシンの分泌量を測定した。結果、Gla 型と比較して Glu 型オステオカルシンはその分泌量が約 1/30 と低いが、骨分化により約 10 倍に増加することが明らかとなった (図 2)。これは骨分化度に応じて Gla 型と同様に Glu 型も変化する可能性を示しており、骨形成不良が膵臓細胞の発生・機能へ影響している可能性をサポートする結果であると考えられた。

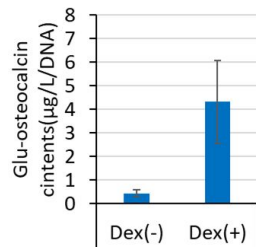


図 2. 分化誘導後の BMDMSC での Glu 型オステオカルシン分泌量

(2) 骨髄由来間葉系幹細胞を用いた骨分化誘導系における栄養環境が骨分化に与える影響

グルコース濃度が BMDMSC の骨分化過程の初期または全体においてどのような影響を与えるか明らかにするため、高グルコース条件での骨分化誘導および分化誘導後の細胞を用いて骨分化評価を行った。分化誘導前 24 時間を高グルコース条件にしたところ、ALP 活性および Gla 型オステオカルシンの分泌量に大きな差異はなかった (図 3)。また高グルコース条件は 5 または 20 g/L も試したが、同様の結果だった。

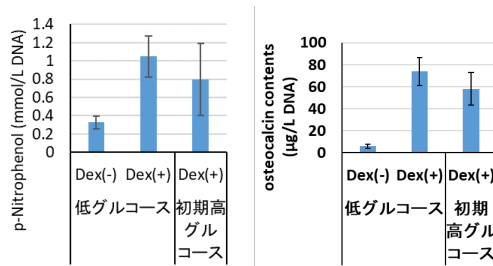


図 3. 初期骨分化過程における高グルコースの影響 (左: ALP 活性、右: Gla 型オステオカルシン)

一方、分化誘導 24 時間前から分化誘導 3 週間後までの期間を高グルコース条件にしたところ、Dex(-)および Dex(+))において ALP 活性の増加傾向が観察された (図 4 左)。また Dex(+))においては Gla 型オステオカルシンの分泌量の増加傾向も観察できた (図 4 右)。Dex(+))においては DNA 量の増加傾向が観察されたことから、高グルコース条件は分化を促進する可能性が高く、Dex(+))条件においては細胞増殖も促進する可能性が考えられた。以上の結果は低栄養が骨分化を抑制することを示しており、樹立した *in vitro* での間葉系幹細胞の骨分化誘導系における低・高栄養モデルは胎児期低栄養モデルを一部模したモデルであると考えられた。現在、引続き再現性を確認している。

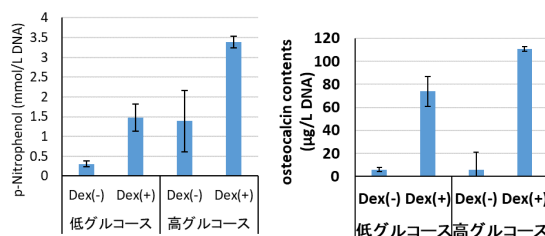


図 4. 骨分化過程における高グルコースの影響 (左: ALP 活性、右: Gla 型オステオカルシン)

(3) 脂肪組織由来間葉系幹細胞の単離および骨分化誘導系の樹立

単離した ADMSC の幹細胞特性評価

単離した ADMSC の幹細胞特性を評価するため、細胞増殖能および分化誘導効率の高い脂肪細胞への分化能を評価した。脂肪細胞への分化誘導は 96 well plate に細胞を播種し (3x10⁴cells/well) 24 時間培養後、分化誘導培地 (DMEM+15% FBS, 1 µM Dex, 0.5 mM IBMX, 200 µM indomethacin, 100 µg/ml insulin) に交換し、3 週間培養した。培地交換は 2 日に 1 回行った。ネガティブコントロールは誘導因子非添加 (-) 群とした。脂肪細胞への分化能評価は Oil Red O 染色による脂質染色により実施した。ADMSC と BMDMSC において増殖能を比較したところ、ADMSC は BMDMSC と比較して増殖能が高く (図 5)、既報 と同様の性質を示した。加えて脂肪細胞への分化誘導後の細胞において、Oil Red O 染色により陽性細胞が観察できたため、単離した ADMSC の脂肪細胞への分化能も確認できた (図 6)。以上より、単離した ADMSC は間葉系幹細胞の特性である増殖能および分化能を有する細胞であることが確認できた。

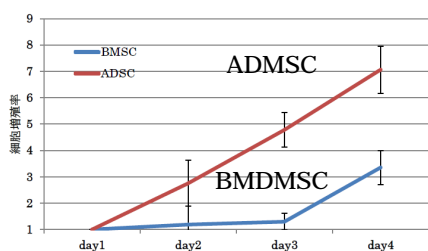


図 5. 各種間葉系幹細胞の増殖率

分化誘導 (-)

(+)

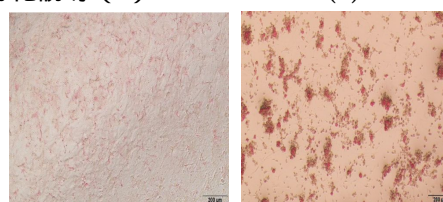


図 6. ADMSC の脂肪分化能

単離した ADMSC の骨分化評価

単離した ADMSC を骨分化誘導したところ、Dex(-)と比較して Dex(+))ではアリザリンレッド陽性細胞が多く、骨分化誘導による石灰化が観察された (図 7)。一方、ALP 活性を測定したところ、Dex(+))は Dex(-)と同等若しくは低い活性を示した (図 8)。また Gla 型のオステオカルシン分泌量を測定したところ、検出限界以下であった (図 9)。以上の結果より、BMDMSC と比較して ADMSC の骨分化誘導効率は低く、ADMSC における骨分化条件を最適化する必要があると判断した。そこで播種細胞数および分化誘導培地の組成を変更し、BMDMSC と同等の分化能を示すか検証した。結果、いずれの条件においても ADMSC の分化能の向上は観察されず、現時点では改良が困難であるため BMDMSC と同条件で検証を進めることとした。

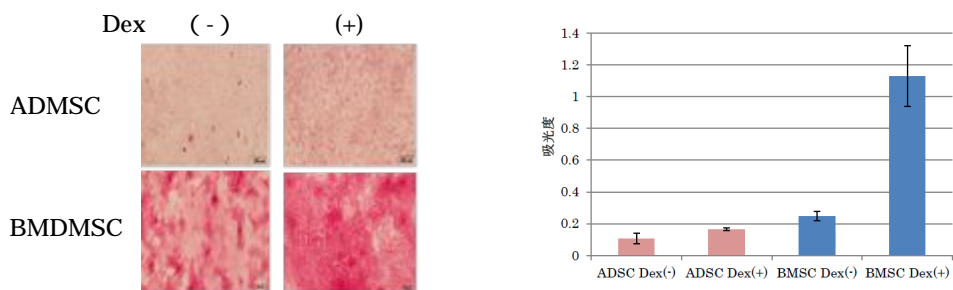


図 7. 骨分化誘導後の ADMSC におけるアリザリンレッド染色

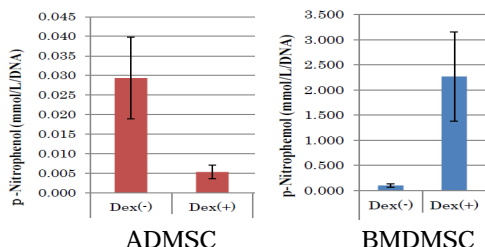


図 8. ALP 活性

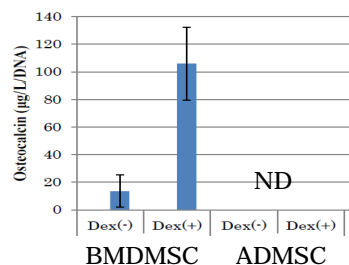


図 9. Gla 型テオカルシン分泌量

(4) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた骨分化誘導系における栄養環境が骨分化に与える影響

グルコース濃度が ADMSC の骨分化過程においてどのような影響を与えるか明らかにするため、高グルコース条件での骨分化誘導および分化誘導後の細胞を用いて骨分化評価を行った。低グルコースおよび高グルコース条件において ALP 活性に大きな差異はなく(図 10) また Gla 型のオステオカルシン分泌量を測定したところ、両条件において検出限界以下であった。以上の結果より、ADSC の骨分化はグルコース濃度に影響を受けないまたはその影響が小さいことが示唆された。

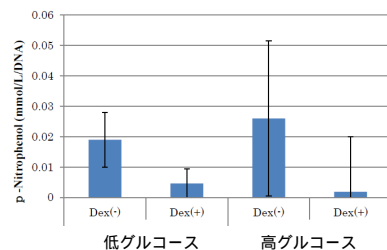


図 10. グルコースによる ALP 活性への影

< 引用文献 >

Boujendar S, et al. Diabetologia. 2002
 Inadera H. Environ Health Prev Med. 2013
 Fulzele K, et al. Cell. 2010
 Cheng K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2013
 Hayashi O, et al. Calcif Tissue Int. 2008

5. 主な発表論文等

該当なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安永 茉由 (YASUNAGA Mayu)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：70712181

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。