

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05982

研究課題名(和文) アディポカインであるアクチビンBによるイヌ破骨細胞分化・活性制御

研究課題名(英文) Regulation of canine osteoclast differentiation and activation by the adipokine, activin B

研究代表者

村上 賢 (MURAKAMI, Masaru)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：80271360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：アクチビン B鎖のホモ二量体であるアクチビンBはアディポカインとして機能する可能性が指摘されている。本研究では、イヌアクチビン B鎖遺伝子の単離、アクチビンB形成、細胞内情報伝達、イヌ脂肪組織での発現に影響を及ぼす因子の同定、破骨細胞形成に及ぼす影響を検討した。類縁動物で推定されているアクチビン B鎖の塩基配列を基に単離されたイヌアクチビン B鎖遺伝子はアクチビンBを産生、分泌した。受容体としてALK7を利用し、TGF- β /アクチビン経路だけでなく、BMP経路も活性化すること、イヌ脂肪組織において、脂肪代謝に関わる遺伝子発現と関係したが、破骨細胞形成に影響を与えなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アディポカインは、健康を維持する上で重要な役割を担っている。アディポカインの一つと認識されつつあるアクチビンB (TGF- β スーパーファミリーの一員)の細胞内情報伝達、イヌ脂肪組織におけるアクチビンB発現に影響を及ぼす要因、生物学的機能を検討した。イヌアクチビンBはTGF- β スーパーファミリー全般の細胞内情報伝達系を活性化すること、脂肪組織での発現は脂肪代謝関連遺伝子と関係すること、破骨細胞形成には関与しないことが判明した。本研究は、イヌの健康維持に関する基盤情報を提供する。

研究成果の概要(英文)：Activin B, a homodimer of activin B subunit, has been suggested to act as an adipokine. The present study isolated canine activin B gene and verified production and secretion of activin B. The present study also characterized signal transduction of activin B and factors affecting canine activin B expression in perigonadal fat. Furthermore, effect of canine activin B on osteoclastogenesis was examined. Canine activin B elicited cell signaling induced by the TGF- β family via ALK7. Expression levels of genes related to lipid metabolism were related to adipose activin B expression, and activin B did not affect osteoclastogenesis.

研究分野：分子生物学、基礎獣医学

キーワード：イヌ アディポカイン アクチビンB 脂肪細胞 破骨細胞分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 臨床獣医学ならびに予防獣医学の目覚ましい発展は、伴侶動物の長寿化を可能にした。その結果、ヒトと同様イヌにおいても、椎体の圧迫骨折や骨塩密度の低下など、加齢に伴う疾病が増加している。骨粗しょう症はその一つであり、これに起因する体幹部の圧迫骨折は、結果として QOL (Quality Of Life) を著しく損なう。
- (2) ヒトの骨粗しょう症に影響を及ぼす要因は多岐にわたり、その保護要因やリスク要因が示されている。保護要因の一つとして、従来、肥満 (体重過多) が指摘されており、肥満による重量負荷が皮質骨形成を引き起こし、結果として骨量増加につながると理解されてきた (*Nat Clin Pract Rheumatol*, 2: 35. 2006)。
- (3) しかしながら、肥満患者の脂肪組織において産生される炎症性サイトカインが破骨細胞活性を高めるとの研究 (*Front Physiol*, 7: 439. 2016) から、肥満はむしろ骨粗しょう症のリスク要因になると理解されるようになった。
- (4) 具体的にどの因子が骨代謝をどのように制御して骨粗しょう症のリスクが高まるかについては不明である。
- (5) アクチビン B は、インヒピン/アクチビン β B (アクチビン β B) 鎖のホモ二量体からなる分泌性タンパク質であり、多機能成長因子群の TGF- β スーパーファミリーのうちのアクチビングループの一員である。同グループのアクチビン A (アクチビン β A 鎖のホモ二量体) に比べて、アクチビン B の機能ならびに情報伝達経路に関する知見は乏しい。
- (6) アクチビン β B 鎖はヒト脂肪組織において高発現すること、脂肪組織におけるアクチビン β B 鎖の発現レベルは減量によって低下することが明らかにされている (*Biochem Biophys Res Commun*, 344: 1308. 2006) もの、その機能についての多くは不明である。
- (7) イヌのアディポカインとしてのアクチビン B の役割を考える上で、イヌアクチビン β B 鎖の characterization は重要なポイントであるものの、イヌアクチビン β B 鎖遺伝子の単離はなされていない。
- (8) したがって、イヌアクチビン B が産生されているか、その情報伝達経路はどのようなものなのか、全く知られていない。
- (9) 予備的な検討で、イヌアクチビン β B 鎖には遺伝子バリエーションがあることを見出していた。また、NCBI (国立生物工学情報センター、アメリカ) のデータベースに登録されているイヌアクチビン β B 鎖の配列は、実は偽遺伝子である可能性を考えていた。

2. 研究の目的

- (1) イヌアクチビン β B 鎖遺伝子の単離とアクチビン B 形成能の評価
- (2) イヌアクチビン B の情報伝達経路の解明
- (3) イヌアクチビン B 受容体の同定
- (4) イヌ脂肪組織におけるイヌアクチビン β B 鎖発現に影響を及ぼす要因の解明
- (5) イヌアクチビン B が破骨細胞分化・機能制御で果たす役割

3. 研究の方法

- (1) イヌアクチビン B に関する研究に着手する過程で、アクチビン β B 鎖に遺伝子バリエーションがあることを見出した。NCBI のデータベース (XM_005631933) に登録されたアクチビン β B の塩基配列から推測されるアミノ酸配列は、前駆体の大きさが他の動物種のそれよりも明らかに小さい上、開始コドンが明示されていない。したがって、この配列はアクチビン β B 鎖の

部分配列と考え、イヌ卵巣より 5'-RACE ならびに 3'-RACE により遺伝子全長の単離を試みた。また、類縁の動物のアクチピン β B 鎖の遺伝子配列を基にイヌアクチピン β B 鎖遺伝子の単離を行った。

- (2) ヒトやマウスのアクチピン β B 鎖はホモ二量体を形成してプロセッシングを経たのちアクチピン B として細胞外に分泌され、機能する。単離されたイヌアクチピン β B 鎖バリエーションがアクチピン B を産生するかどうか HEK293 細胞を用いて評価した。具体的には、イヌアクチピン β B 鎖遺伝子を HEK293 細胞に導入して、培養上清を回収し、アクチピン B の形成を評価した。
- (3) 上述のようにアクチピン B は、TGF- β スーパーファミリーの一員である。TGF- β スーパーファミリーは TGF- β グループ、アクチピングループ、BMP グループに大別され、固有の情報伝達を行う。細胞膜上に発現する固有の受容体を介して転写因子である Smad3 をリン酸化し、情報を伝達する経路を古典的 TGF- β /アクチピン経路という。したがって、Smad3 のリン酸化を評価すれば古典的 TGF- β /アクチピン経路の活性化を評価できる。また、Smad3 が活性化すると CAGA-luc レポーター遺伝子の転写が亢進する。したがって、このレポーターを利用して古典的 TGF- β /アクチピン経路活性化を評価できる。一方、Smad1/5/8 のリン酸化を介した情報伝達もあり、これを古典的 BMP 経路という。古典的 BMP 経路は、Hamp-luc レポーター遺伝子の転写によっても評価できる。これらの評価系を利用してイヌアクチピン B の細胞内情報伝達経路を評価した。
- (4) 去勢・避妊手術のために動物病院に来院したイヌより性腺周囲脂肪を採取し、各アクチピン β B バリエーションの発現を RT-qPCR 法にて検討した。様々な犬種のイヌの脂肪組織を検討する。ボディコンディションスコア (BCS) を含むカルテ情報を基に、アクチピン β B 鎖の発現レベルに影響を及ぼす要因を重回帰分析により推定した。また、脂肪細胞分化に関わる PPAR γ 発現や他のアディポカイン、炎症性サイトカインの発現レベルも測定し、アクチピン β B 鎖の発現との関係を検討した。
- (5) RAW264.7 マクロファージ系細胞を RANKL で破骨細胞に誘導する際にイヌアクチピン B で処理し、破骨細胞形成を評価した。

4. 研究成果

- (1) 5'-RACE ならびに 3'-RACE により 320 個のアミノ酸からなると推定されたイヌアクチピン β B 鎖遺伝子 (short form アクチピン β B 鎖と命名) を単離した。また、*Canis lupus dingo* で推定されているアクチピン β B 鎖遺伝子の配列をもとに 407 個のアミノ酸からなると推定されたアクチピン β B 鎖遺伝子 (long form アクチピン β B 鎖と命名) を単離した。
- (2) Long form アクチピン β B 鎖遺伝子は short form アクチピン β B 鎖遺伝子より上流 194 bp 伸長したものであった。
- (3) ヒトならびにマウスアクチピン β B 鎖遺伝子を単離し、イヌアクチピン β B 鎖遺伝子ともども Cytomegalovirus プロモーター制御下で発現するベクターに組み込み、HEK293 細胞に導入した。培養上清を非還元/還元条件下で SDS-PAGE し、抗アクチピン B 抗体でウェスタンブロットを行った。その結果、ヒト、マウスアクチピン β B 鎖遺伝子発現の場合と同様、イヌ long form アクチピン β B 鎖遺伝子を発現させた細胞上清中には非還元条件下で 25 kDa ならびに 14 kDa、還元条件下で 14 kDa にバンドが認められた。これらの結果は、イヌ long form アクチピン β B 鎖遺伝子はホモ二量体 (アクチピン B) を形成し、細胞外に分泌されることを示している。

- (4) 一方、イヌ short form アクチピン β B 鎖遺伝子を発現させた場合には培養上清中にアクチピン B は認められなかった。TGF- β スーパーファミリーは前駆体として産生され、二量体形成後に前駆体領域が切断され、成熟体として分泌される。前駆体領域のアミノ酸配列は二量体形成において重要であり、アクチピン β B と類縁のアクチピン β A 鎖の場合、62 番目のイソロイシン、66 番目のロイシンが成熟体形成に必須であることが示されている。イヌ short form アクチピン β B 鎖遺伝子から作られるタンパク質には相当するアミノ酸が欠如している。Long form アクチピン β B に含まれるが short form アクチピン β B には含まれないアミノ酸の存在が、short form アクチピン β B 鎖遺伝子を発現させてもアクチピン B が産生されない理由と考えられた。
- (5) HepG2 細胞は TGF- β スーパーファミリーの細胞情報伝達系を評価するうえで頻用される細胞である。この細胞を使って、イヌアクチピン β B 鎖遺伝子産物が、どの TGF- β スーパーファミリー情報伝達を行うかを検討した。HepG2 に short form アクチピン β B 鎖遺伝子を発現させても CAGA-luc や Hamp-luc 転写を促進しなかった。また、HEK293 細胞の培養上清を用いた場合も同様で、Smad3 リン酸化や Smad1/5/8 リン酸化は確認されなかった。
- (6) 一方、ヒトあるいはマウスアクチピン B と同様に、イヌ long form アクチピン β B 鎖遺伝子を発現させた HEK293 細胞上清処理により Smad3 リン酸化は促進され、CAGA-luc 転写は亢進した。また、Smad1/5/8 リン酸化ならびに Hamp-luc 転写も促進され、Hamp-luc の BMP 応答領域を変異させたレポーターを用いた場合、この転写促進は起こらなかった。同様の結果は、イヌ long form アクチピン β B 鎖遺伝子を HepG2 細胞で発現させた場合も観察された。つまり、イヌ long form アクチピン β B はアクチピン B を産生し、古典的 TGF- β / アクチピン経路を活性化させるだけでなく、古典的 BMP 経路も活性化させることが明らかになった。
- (7) HepG2 細胞は、ヒト由来細胞であるので、イヌ細胞由来の MDCK 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、MDCK 細胞はイヌアクチピン B に対して全く応答しなかった。アクチピンが用いる可能性のある既知の受容体発現を HepG2 細胞と MDCK 細胞で検討したところ、MDCK 細胞では ALK7 発現が認められないことが明らかになった。
- (8) イヌ ALK7 遺伝子を単離し、発現ベクターを構築し、MDCK 細胞に遺伝子導入して、イヌアクチピン B に対する応答性を検討したところ、HepG2 細胞と同様の反応を示したことから、イヌアクチピン B は ALK7 を介して細胞内情報伝達を行っていると考えられた。
- (9) イヌアクチピン B による古典的 TGF- β / アクチピン経路活性化と古典的 BMP 経路活性化の相互関係を明らかにするため、古典的 TGF- β / アクチピン経路を抑制する A-83-01 ならびに古典的 BMP 経路の阻害剤である LDN-193189 を用いた検討を行った。
- (10) その結果、イヌアクチピン B による古典的 TGF- β / アクチピン経路に BMP 活性は関与しないのに対して、TGF- β / アクチピン活性化は古典的 BMP 経路活性化に必要であることが明らかになった。
- (11) この結果は、イヌインヒピン B が、TGF- β スーパーファミリー内の情報伝達経路でクロストークすることを明示するものであり、今後の研究の展開が期待される結果といえる。
- (12) 動物病院に来院した 34 頭のイヌの性腺周囲脂肪組織におけるアクチピン β B 鎖遺伝子を含むさまざまな遺伝子の発現を検討し、BCS を含む様々な要因との相互関係を検討したところ、BCS を説明できる要因にアクチピン β B 鎖遺伝子発現量は含まれないこと、しかしながら、脂肪組織における UCP1 発現量は部分的にアクチピン β B 鎖遺伝子発現量で説明できること、アクチピン β B 鎖遺伝子発現はホルモン感受性リパーゼ発現、脂肪酸合成酵素発現、ならびに BMP 受容体である ALK3 発現によって説明できることが明らかになった。

- (13)UCP1 は、褐色 / ベージュ脂肪細胞で高発現するエネルギー消費の責任遺伝子であることから、アクチビン β B 遺伝子はイヌにおけるエネルギー代謝調節に関与している可能性が考えられ、今後、この点に着目した研究の必要性が考えられた。
- (14)また、アクチビン β B 遺伝子発現レベルは、インスリン抵抗性に関与する TNF- α 発現量と負の関係を示す傾向にあった。この点についても今後追及に値する研究課題と考えられた。
- (15)RAW264.7 マクロファージ系細胞を可溶化 RANKL 処理すると破骨細胞に分化することが知られている。イヌアクチビン B が破骨細胞形成に及ぼす影響を明らかにするため、可溶化 RANKL 添加時にイヌアクチビン B も同時添加して破骨細胞形成を評価したが、イヌアクチビン B の影響は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国際学術雑誌へ投稿中

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	迫田 翔太郎 (SAKOTA Shotaro)		
連携研究者	舟場 正幸 (FUNABA Masayuki) (40238655)	京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------