

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09850

研究課題名(和文)遊離脂肪酸受容体GPR120遺伝子欠損マウスを用いた肥満と骨代謝の関連性の検討

研究課題名(英文) the analysis of relationship between fatty acids and bone metabolism in free fatty acid receptor GPR120 knockout mice.

研究代表者

木村 桂介 (Kimura, Keisuke)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：70712909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroにおいて野生型マウス由来破骨細胞前駆細胞において、RANKLおよびTNF-により誘導される破骨細胞形成がDHAにより抑制されたのに対し、GPR120ノックアウトマウスではこの抑制効果が確認できなかった。また、in vivoにおいて頭蓋骨にLPSを5日間投与し、破骨細胞形成を検討した実験において、野生型マウスではDHAを同時に投与すると破骨細胞形成が抑制されたのに対し、GPR120ノックアウトマウスではこの抑制効果が認められなかった。以上のことから、in vivoにおけるLPSにより誘導される破骨細胞形成はGPR120刺激により抑制されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、生活習慣病である肥満および肥満に伴う脂肪肝、糖尿病など代謝異常が問題視されている。最近の研究でGPR120遺伝子が欠損したマウスで肥満や脂肪肝などが発生し、このGPR120が肥満に関与していることが発見された。また高年齢化に伴い、骨粗鬆症など骨代謝が問題となってきている。肥満と骨折の関係を調べた報告では、肥満の人は骨量が減少し、骨折の割合が増加することが報告されている。しかしながら、肥満と骨代謝の関係を調べた報告は少ない。これらのことから骨芽細胞形成および破骨細胞形成に対するGPR120の影響を調べることで骨代謝に対する肥満の影響を解明できると考え研究を行なった。

研究成果の概要(英文)：In vitro, RANKL and TNF- $\alpha$ -induced osteoclast formation of wild-type mice was suppressed by DHA in vitro, but not inhibited that of GPR120 knockout mice. LPS was administered to supracalvariae for 5 days and osteoclast formation was examined. Osteoclast formation was suppressed in wild-type mice when DHA was co-administered, but not observed in GPR120 knockout mice. Therefore, it was clarified that LPS-induced osteoclast formation in vivo was suppressed by GPR120 stimulation. In addition, DHA was administered to a model of orthodontic tooth movement mouse model in wild-type mice. DHA had suppressed tooth movement. Furthermore, this inhibitory effect could not be confirmed in GPR120 knockout mice. These results suggested that orthodontic tooth movement is suppressed by DHA via GPR120 signaling.

研究分野：骨代謝

キーワード：GPR120 DHA 破骨細胞 骨芽細胞 肥満 歯の移動

### 1. 研究開始当初の背景

近年、生活習慣病である肥満および肥満に伴う脂肪肝、糖尿病など代謝異常が問題視されている。食事性肥満には遺伝的要因が関連すると考えられていたが、現在までにその原因遺伝子は不明だった。しかし、最近の研究でこの GPR120 遺伝子が欠損したマウスで肥満や脂肪肝などが発生し、この GPR120 が肥満に関与していることが発見された(Ichimura A., et al, Nature., 2012)。一方、この GPR120 には、不飽和脂肪酸と結合することが報告されている。この不飽和脂肪酸であるオメガ 3 脂肪酸は、in vitro の実験で骨を作る骨芽細胞に促進的に働き、骨を吸収する破骨細胞には抑制的に働くことが報告されている (Kim, HJ., et al, J. cell Physiol., 2015)。これらのことから GPR120 への刺激は、肥満にも骨代謝にも関係していることが考えられる。また骨代謝と GPR120 の研究は in vitro では行われているが in vivo では行われていないのが現状である。

高齢化に伴い、骨粗鬆症など骨代謝が重要な問題となってきた。肥満と骨折の関係を調べた報告では、肥満の人は骨量が減少し、骨折の割合が増加することが報告されている (Rousseau C., et al, BMJ., 2016)。しかしながら、肥満と骨代謝の関係を調べた報告は少ない。このようなことから骨芽細胞形成および破骨細胞形成に対する GPR120 の影響を調べることで骨代謝に対する肥満の影響を解明できると考えられる。

矯正学的歯の移動は歯槽骨のリモデリングにより歯の移動が起こる。このリモデリングには破骨細胞による骨吸収および骨芽細胞による骨添加で行われる。これらのことから肥満の患者において矯正治療を行った際に矯正学的歯の移動に影響が出る可能性がある。このことより GPR120 と矯正学的歯の移動に対する関連性を調べることは重要なことである。

### 2. 研究の目的

不飽和脂肪酸と結合する GPR120 への刺激は、破骨細胞形成を抑制的に働き、骨芽細胞形成には促進的に働く。また、GPR120 からの刺激は肥満を抑制することがわかっている。このことから GPR120 へも刺激は、肥満および骨代謝の両方に関連している。GPR120 の骨代謝に関連する影響を解析した報告は少なく、骨代謝と肥満の関係を解明するためには重要な研究であり、独創性がある。また、in vivo での研究はほとんどないことからマウスへの直接的な影響を調べることは臨床的な観点からも重要であると考えられる。矯正学的歯の移動時の骨のリモデリングと肥満の関連を調べた報告、また、GPR120 の影響を調べた報告はない。さらに矯正歯科での歯の移動に肥満を伴う患者の治療の臨床的な指針に役立つ研究であると考えられる。GPR120 の遺伝子欠損マウスを使用することで不飽和脂肪酸の作用が GPR120 を介しているかわかる。本研究は不飽和脂肪酸による GPR120 刺激による骨芽細胞形成および破骨細胞形成などの骨代謝に対する影響を調べることで肥満と骨代謝の関係を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

GPR120 の破骨細胞形成に対する影響の in vitro での解析  
GPR120 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスから骨髓細胞を採取し、3 日間培養し、破骨細胞前駆細胞を作製し、M-CSF および TNF- $\alpha$  または RANKL を組み合わせて培養し破骨細胞を分化誘導させ、その中にオメガ 3 脂肪酸である Docosahexaenoic acid(DHA)を組み合わせて加え、破骨細胞形成に対する GPR120 の影響を検討した。破骨細胞形成の評価は TRAP 染色で行なった。

GPR120 の破骨細胞形成および骨吸収に対する影響の in vivo での解析。

) 野生型マウスと GPR120 欠損マウスの頭蓋部に LPS を 5 日間注入し in vivo での破骨細胞形成を行なった。その際、DHA を組み合わせて注入し、GPR120 の影響を評価した。評価は、頭蓋冠の組織切片の TRAP 染色を行い、破骨細胞の数を測定した。

) マウス頭蓋骨より mRNA を精製し、破骨細胞の分化マーカーである TRAP mRNA の発現を real-time PCR 法を用いて定量的に解析し、破骨細胞の分化の程度を解析した。

) 屠殺時にマウスから血液を採取し、骨吸収マーカーである CTX の血中濃度を ELISA にて計測し骨吸収を評価した。

) マウス頭蓋骨の  $\mu$ CT 撮影を行い骨吸収に対する影響を調べた。

GPR120 の矯正学的歯の移動とその際の破骨細胞形成に対する影響を明らかにした。

我々はマウスの矯正学的歯の移動モデルを確立している (Kitaura, H., et al, J Dent Res., 2008)。その際、DHA を第一臼歯周辺に DHA を注入し、野生型マウスと GPR120 遺伝子欠損マウスにて上顎切歯と左側第一臼歯間に NiTi クローズドコイルスプリングを装着し第一臼歯に牽引力を 12 日間付与し、歯の移動量および破骨細胞形成を評価した。

#### 4 . 研究成果

DHA の in vitro での破骨細胞形成に対する影響

In vitro による RANKL および TNF- $\alpha$  による破骨細胞形成は、DHA により抑制された。また、その抑制効果は、GPR120 遺伝子欠損マウスでの破骨細胞形成は、認められなかった。

DHA の in vivo での破骨細胞形成に対する影響

) 頭蓋骨に LPS を 5 日間投与し、破骨細胞形成を検討した実験において、野生型マウスでは LPS を投与したところ破骨細胞形成が起こったが DHA を同時に投与すると破骨細胞形成が抑制された。これに対して GPR120 ノックアウトマウスではこの抑制効果が認められなかった。さらに、in vitro にて腹腔内マクロファージに LPS を加えて培養した際、TNF- $\alpha$  mRNA の発現が上昇したが、DHA を同時に投与するとこれが抑制された。この際、GPR120 アンタゴニストの AH7614 を同時に投与することで TNF- $\alpha$  の発現は再び上昇した。

) マウス頭蓋骨より mRNA を精製し、破骨細胞の分化マーカーである TRAP mRNA の発現を real-time PCR 法を用いて定量的に解析した。野生型マウスでは増加したが、DHA を同時に投与すると TRAP が抑制された。これに対して、GPR120 ノックアウトマウスではこの抑制効果が認められなかった。

) 屠殺時にマウスから血液を採取し、骨吸収マーカーである CTX の血中濃度を ELISA にて計測し骨吸収を評価したところ野生型マウスでは増加したが DHA を同時に投与すると減少した。

) マウス頭蓋骨の  $\mu$ CT 撮影を行い骨吸収に対する影響を調べたところ野生型マウスでは骨吸収が増加したが、DHA を同時に投与すると骨吸収が抑制された。これに対して、GPR120 ノックアウトマウスではこの抑制効果が認められなかった。

GPR120 の矯正学的歯の移動とその際の破骨細胞形成おに対する影響を明らかにした。  
野生型マウス での矯正学的歯の移動モデルに DHA を投与した。DHA を投与した野生型マウスは、歯の移動が抑制された。さらに GPR120 ノックアウトマウスではこの抑制効果が確認できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Kishikawa Akiko, Kitaura Hideki, Kimura Keisuke, Ogawa Saika, Qi Jiawei, Shen Wei-Ren, Ohori Fumitoshi, Noguchi Takahiro, Marahleh Aseel, Nara Yasuhiko, Ichimura Atsuhiko, Mizoguchi Itaru                   | 4. 巻<br>10         |
| 2. 論文標題<br>Docosahexaenoic Acid Inhibits Inflammation-Induced Osteoclast Formation and Bone Resorption in vivo Through GPR120 by Inhibiting TNF- Production in Macrophages and Directly Inhibiting Osteoclast Formation | 5. 発行年<br>2019年    |
| 3. 雑誌名<br>Frontiers in Endocrinology  | 6. 最初と最後の頁<br>1-13 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fendo.2019.00157   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-          |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Akiko Kishikawa, Hideki Kitaura, Keisuke Kimura, Saika Ogawa, Jiawei Qi, Wei-Ren Shen, Fumitoshi Ohori, Takahiro Noguchi, Aseel Marahleh, Yasuhiko Nara, Atsuhiko Ichimura, Itaru Mizoguchi                   | 4. 巻<br>Volume 10         |
| 2. 論文標題<br>Docosahexaenoic Acid Inhibits Inflammation-Induced Osteoclast Formation and Bone Resorption in vivo Through GPR120 by Inhibiting TNF- Production in Macrophages and Directly Inhibiting Osteoclast Formation | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>frontier in endocrinology   | 6. 最初と最後の頁<br>Article 157 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fendo.2019.00157.  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-                 |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Akiko Kishikawa, Hideki Kitaura, Keisuke Kimura, Masahiko Ishida, Kazuhiro Shima, Saika Ogawa, Jiawei Qi, Wei-Ren Shen, Fumitoshi Ohori, Takahiro Noguchi, Aseel Marahleh, Itaru Mizoguchi |
| 2. 発表標題<br>G Protein-Coupled Receptor 120 signaling inhibited osteoclast formation and bone resorption.   |
| 3. 学会等名<br>American Society for Bone and Mineral Research 2018 annual meeting（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>岸川明子、木村桂介、石田匡彦、島和弘、小川紗衣香、セイカイ、沈威任、大堀文俊、野口隆弘、Aseel Marahleh、北浦英樹 |
| 2. 発表標題<br>破骨細胞形成、骨吸収および破骨細胞関連サイトカインの発現におけるDHAの影響についての検討                   |
| 3. 学会等名<br>第77回日本矯正歯科学会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考            |
|-------|--|------------------------------------|---------------|
| 研究分担者 | 杉澤 晴紀<br>(Sugisawa Haruki)<br>(20792162) | 東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師<br><br>(11301) | 削除：2020年5月14日 |
| 研究分担者 | 北浦 英樹<br>(Hideki Kitaura)<br>(60295087)  | 東北大学・歯学研究科・准教授<br><br>(11301)      |               |
| 研究分担者 | 石田 匡彦<br>(Ishida Masahiko)<br>(80770891) | 東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師<br><br>(11301) | 削除：2020年5月14日 |
| 研究分担者 | 岸川 明子<br>(Kishikawa Akiko)<br>(10827273) | 東北大学・大学病院・医員<br><br>(11301)        | 削除：2020年2月12日 |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|