

令和 3 年 4 月 14 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17021

研究課題名（和文）骨基质タンパク質オステオカルシンによる脂肪細胞の細胞死誘導機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of cell death of adipocytes induced by osteocalcin

研究代表者

大谷 崇仁（OTANI, Takahito）

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：80759738

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨基质タンパクであるオステオカルシン(OC)は、糖・エネルギー代謝の制御に重要な役割を担っており、このOCが脂肪細胞において糖・脂質代謝活性化ホルモンであるアディポネクチンの発現を亢進させる分子メカニズムを申請者は明らかにしてきた。その研究課程で高濃度のOCを脂肪細胞に作用させると脂肪細胞がネクロトーシスという細胞死に至る分子メカニズムを新たに解明した。この細胞死は脂肪細胞同士が接着することで誘導され、全体の約3割の脂肪細胞が細胞死し、その他は代謝に有利な性質をもつことが分かった。さらに、高濃度GluOCは脂肪細胞の接着タンパクを調節し、脂肪細胞の肥大化を抑制してい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

申請者は高濃度GluOCによる脂肪細胞へのネクロトーシス誘導とその分子メカニズムを解明した。これにより、GluOCは脂肪細胞をアディポネクチンの発現亢進などを介して代謝的に活性化するだけでなく、その細胞数をも調節することで、組織レベルでそのボリュームを正常に保つことが示唆され、このGluOCのもつ多面的な効果には高い学術的意義がある。また、高濃度GluOCは脂肪細胞の接着タンパクの発現を調節することによって、脂肪細胞の肥大化を抑制することが示唆されることから、糖尿病および肥満に対する副作用の少ない予防治療薬の開発に繋がる発展性を有しており、社会的意義も高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Osteocalcin that is the bone matrix protein plays an important role in glucose and energy metabolism. We have shown that osteocalcin promotes the expression of adiponectin activating glucose and lipid metabolism as well as the signaling pathway by which osteocalcin induces adiponectin expression in adipocytes. In this process, we revealed the signaling pathway by which high-dose osteocalcin allowed adipocytes to lead to necroptosis induced by direct cell-cell contact in 30% adipocytes. Further, it is also indicated that high-dose osteocalcin prevents hypertrophy of adipocytes by the regulation of several adhesion molecules.

研究分野：生化学

キーワード：オステオカルシン 脂肪細胞 細胞死 脂質代謝 細胞接着 エピゲノム シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨基質タンパク質として知られるオステオカルシン(OC)は骨芽細胞において翻訳後修飾(カルボキシル化)を受けて分泌され、大部分は骨に埋もれているが、一部は血中に放出される。血中のOCは、3つのグルタミン酸残基がカルボキシル化されたGlaOCと、低(無)カルボキシル化状態のGluOCの2つの形態で存在している。そのうち、ホルモン作用を示して全身の糖・エネルギー代謝活性化に関与するのは後者のGluOCである。申請者はGluOCの標的細胞として脂肪細胞に着目し、GluOCが脂肪細胞においてアディポネクチンとよばれる糖・脂質代謝活性化ホルモンの発現をタンパクレベルで亢進させることおよびそのシグナル伝達経路を明らかにした。その研究過程において、20 ng/ml以上の高濃度のGluOC刺激ではアディポネクチンの発現亢進が著しく減弱することに気づき、それが脂肪細胞への細胞死(ネクロトーシス)誘導によるものである可能性が示唆された。

2. 研究の目的

骨は運動器官の構成要素の1つであるが、最近の研究でホルモンを分泌する内分泌器官としての重要な働きが解き明かされつつある。中でも、骨芽細胞が分泌する骨基質タンパク質であるGluOCは、糖・脂質代謝の制御に重要な役割を担っている。

これらの役割の中で、申請者はGluOCが脂肪細胞に作用し、アディポネクチンの発現を亢進させることとそのシグナル伝達経路を解明した。この研究過程で、高濃度のGluOCはアディポネクチンの発現亢進を著しく減弱させることに気づき、脂肪細胞へのネクロトーシス誘導である可能性が示唆された。このGluOCの濃度による効果の違いはGluOCの実用化を考える際に重要なポイントとなる。そこで、本研究ではなぜ高濃度GluOCによって脂肪細胞にネクロトーシスが誘導されるのかを分子レベルで明らかにし、その全身的な影響を予測することを目的とした。

3. 研究の方法

3T3-L1脂肪細胞を用いて、高濃度GluOCによる脂肪細胞への影響を解析した。高濃度GluOCの濃度は40 ng/mlに統一し、以下の手法で解析を行った。

- (1) 脂肪細胞の形態学的変化を位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で観察した。
- (2) 細胞内シグナル伝達経路についてはウェスタンブロット法を用いてタンパクのリン酸化や発現量の変化等を確認した。
- (3) タンパクの細胞膜局在などはウェスタンブロット法と併用して、共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認した。

4. 研究成果

高濃度GluOC刺激によって、3T3-L1脂肪細胞にネクロトーシスが誘導されるまでのシグナル伝達経路を解明すると同時に、高濃度GluOCは脂肪細胞どうしおよび脂肪細胞と細胞外基質との接着を調節し、脂肪細胞の肥大化を抑制し、integrinシグナルを活性化させている可能性を示唆する結果を得た。以下の3点はその内容である。

(1) 高濃度GluOC刺激によって、3T3-L1脂肪細胞の細胞膜上のGタンパク質共役型受容体であるGPRC6Aが活性化し、細胞内のcAMPの濃度上昇とそれに伴うPKAの活性化が誘導される。低濃度GluOC(<20 ng/ml)刺激の場合では、PKA-ERK-CREB axisにより脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである転写因子PPARの発現量が亢進し、その標的遺伝子であるアディポネクチンの発現が亢進するが、高濃度ではPKAの触媒サブユニットが細胞質のみならず、濃度依存性に核内に移行し、脂肪細胞特異的キナーゼであるSIK2をリン酸化し、その機能を抑制することによって、その標的タンパクであるヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)であるp300を負に制御するリン酸化が抑制される。これにより、CREBの転写共役因子であるp300がCREBに結合し、低濃度刺激では認められない転写因子FoxO1の発現を促し、その標的遺伝子でデス因子として知られるFasLの細胞膜上の発現を促す。このFasLは隣接した脂肪細胞の細胞膜上のFasと結合することによって、隣接した脂肪細胞のFasシグナルが活性化し、活性酸素種(ROS)の産生、ミトコンドリアの分解および細胞内へのカルシウム流入に伴う細胞膜の破綻などが引き起こされ、ネクロトーシスが誘導される(図1)。

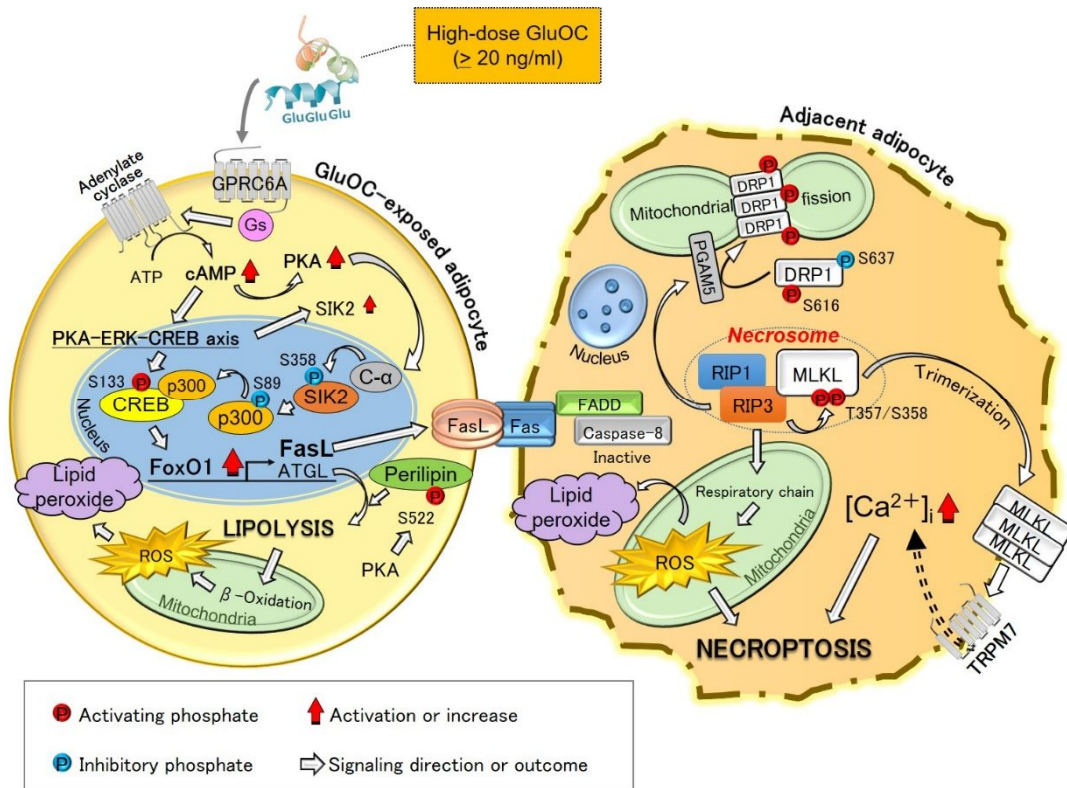


図 1：高濃度 GluOC による脂肪細胞へのネクロトーシス誘導をもたらすシグナル伝達経路

(2) 高濃度 GluOC 刺激によって、3T3-L1 脂肪細胞の細胞膜上に脂肪細胞特異的接着タンパクであり、脂肪細胞の肥大化を抑制することで知られる ACAM(adipocyte adhesion molecule)の発現量が亢進すること(図 2)を確認し、また、ACAM を siRNA を用いてノックダウンした 3T3-L1 脂肪細胞の脂肪滴が実際に約 1.3 倍肥大化することも確認した(図 3)。

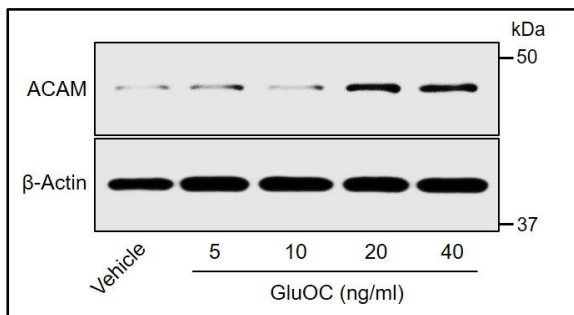


図 2：高濃度 GluOC による脂肪細胞の ACAM 発現亢進

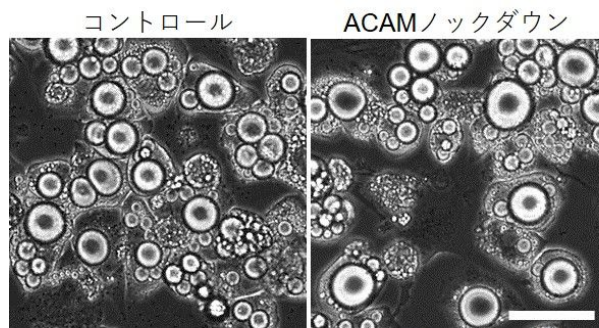


図 3：ACAM ノックダウンによる脂肪滴の肥大化

(3) 高濃度 GluOC 刺激によって、3T3-L1 脂肪細胞の細胞膜上に integrin の発現量が亢進することを確認した。integrin は細胞膜上に発現する細胞と細胞間基質を接着する受容体であり、18 種の サブユニットと 8 種の サブユニットのヘテロ二量体で機能することが知られているが、高濃度 GluOC は脂肪細胞の細胞膜上に 5、V、1 および 3 といった integrin の中でも特に、RGD モチーフをもつ接着性糖タンパク(フィブロネクチンやビトロネクチン)と結合するサブユニット特異的な発現の亢進を認めた(図 4)。また、高濃度 GluOC 刺激による integrin シグナルの活性化の 1 つの指標である FAK(focal adhesion kinase)のリン酸化亢進(図 4)を認め、integrin の発現亢進に伴い、integrin シグナルも活性化していることが示唆された。

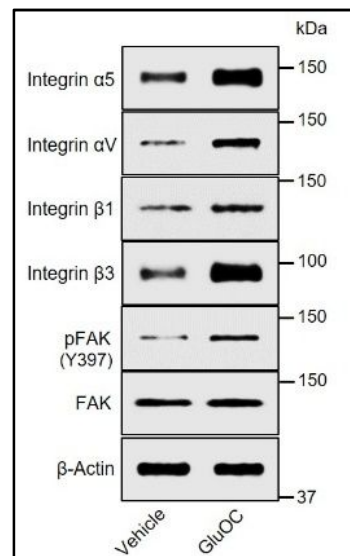


図 4：高濃度 GluOC による脂肪細胞の integrin 発現亢進

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Otani Takahito, Mizokami Akiko, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Takeuchi Hiroshi, Inai Tetsuichiro, Hirata Masato	4. 巻 78
2. 論文標題 The roles of osteocalcin in lipid metabolism in adipose tissue and liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Biological Regulation	6. 最初と最後の頁 100752 ~ 100752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2020.100752	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Mukai Satoru, Mizokami Akiko, Otani Takahito, Sano Tomomi, Matsuda Miho, Chishaki Sakura, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Tang Ronghao, Kanematsu Takashi, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100274 ~ 100274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100274	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Mizokami Akiko, Mukai Satoru, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Otani Takahito, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 244
2. 論文標題 GLP-1 signaling is required for improvement of glucose tolerance by osteocalcin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 285 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0288	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Otani Takahito, Matsuda Miho, Mizokami Akiko, Kitagawa Norio, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Inai Tetsuichiro, Hirata Masato	4. 巻 9
2. 論文標題 Osteocalcin triggers Fas/FasL-mediated necroptosis in adipocytes via activation of p300	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-1257-7	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大谷 崇仁
2. 発表標題 脂肪細胞の「数と質」を改善するオステオカルシン
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷 崇仁
2. 発表標題 脂肪細胞を細胞死へと導く骨基質タンパクOsteocalcin
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masato Hirata
2. 発表標題 Programmed Necrosis of Adipocytes Induced by High-dose Osteocalcin
3. 学会等名 WCP2018-18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷崇仁
2. 発表標題 オステオカルシンによる脂肪細胞のネクローシス
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahito Otani
2. 発表標題 Necroptosis of Adipocytes Induced by Osteocalcin
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center Joint International Symposium 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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