

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：37114

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19658

研究課題名(和文) 副甲状腺ホルモンによる神経ペプチドYの制御

研究課題名(英文) Regulation of neuropeptide Y expression by parathyroid hormone

研究代表者

山下 潤朗 (Yamashita, Junro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：70775337

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：副甲状腺ホルモン(PTH)は骨細胞に作用して神経ペプチドY(NPY)の発現を刺激するが、その生理的意義はわかっていない。本研究では、NPYとエネルギー代謝との関連を調べた。その結果、骨細胞をPTHで刺激するとグルコース伝搬に関わる遺伝子が抑制され、その経路の鍵を握っているのがNPYであることがわかった。NPYを骨細胞から欠落させると、グルコース伝搬が活性化されエネルギー代謝は亢進する。このことから、PTHの刺激に対して、NPYはグルコース伝搬を抑制し、エネルギー代謝を停滞させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副甲状腺ホルモンは生体カルシウム恒常性の維持を司る重要なホルモンである。副甲状腺機能亢進症でホルモンの分泌が持続的に過多になると骨からカルシウムが吸収され続け骨粗鬆症になる。本研究では、この副甲状腺ホルモンが骨で最も多い骨細胞の糖代謝を神経ペプチドYを介して制御していることを明らかにした。このことは、副甲状腺ホルモンが生体のエネルギー代謝の調節に関与していることを示しているもので、糖尿病の病理進行にも影響している可能性がある。今後、副甲状腺ホルモンが糖尿病患者の病状進行にあたえる影響を明らかにすることで、糖尿病治療に対する新たなアプローチを確立していく所存である。

研究成果の概要(英文)：Parathyroid hormone (PTH) stimulates osteocytes to express neuropeptide Y (NPY). However, its physiological significance remains unknown. In this project, we investigated the role of NPY in energy metabolism of osteocytes and osteoblasts. We found that when osteocytes were exposed to PTH, genes related to the glucose transport were suppressed and that NPY is a center for this signaling pathway. Indeed, when NPY was deleted from osteocytes, glucose transporter genes such as Glut1 and Glut4 were activated. This suggests that the activation of NPY suppresses the transportation of glucose in osteocytes in response to PTH, resulting in slowing energy metabolism in osteocytes.

研究分野：骨学，再生医療

キーワード：parathyroid hormone glucose transporter osteoblasts osteocytes energy metabolism

1. 研究開始当初の背景

副甲状腺ホルモン (PTH) は生体カルシウムの恒常性をつかさどるホルモンである。PTH の分泌が持続的に過多になると副甲状腺機能亢進症であり、骨よりカルシウムを吸収し続け、骨粗鬆症がおこる。PTH についてはカルシウムの調節以外に生理的に重要な機能は報告されていない。我々は、PTH が骨細胞の神経ペプチド Y (NPY) の発現を調節することを見いだした。NPY は脳や脊髄などの神経組織で活性化している遺伝子で神経細胞のグルコース代謝に関与していることが明らかとなっている。しかし、生体カルシウムの恒常性には関与していない。これらの事実より、PTH が骨細胞の NPY を調節する意義を解明することは意義がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨細胞が PTH の刺激を受けたときの、NPY の活性化がもつ生理的機能を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) コラーゲンによる 3 次元細胞培養で、骨芽初代細胞から骨細胞を誘導し PTH で刺激して NPY とグルコース代謝関連遺伝子 *Glut1*, *Glut2*, *Glut3*, *Glut4* の遺伝子発現を定量した。

生後 1 週以内の幼若マウス頭蓋骨より、骨芽細胞をトリプシン酵素法で抽出した。まず、この骨芽初代細胞を 10 日間 2 次元培養して骨芽細胞を確立した。次に、これらの骨芽細胞を深さ 1 cm のコラーゲンジェル内に包埋し 10 日間 3 次元立体培養を行なった。3 次元培養では、コラーゲンでボトムアップし、その上に細胞を含むコラーゲンジェルの細胞層、最後に液体培地を添加することでジェルの収縮を抑制して実験を行なった。3 次元培養を行なった細胞は突起を伸ばし骨細胞特有の形態に変化する。形態変化とともに骨細胞特異的である *Dmp1* 遺伝子を強く発現する (1)。これら骨芽細胞と骨細胞に対して、PTH (Bachem, Swiss) 10^{-7} M で刺激して、投与直後、1, 3, 24 時間後のグルコース代謝関連遺伝子の発現を RT-qPCR を用いて調べた。cDNA の作製は PrimeScript RT reagent kit (Takara) を用いた。初代細胞での実験はマウス由来骨芽細胞株 MC3T3E1 細胞でも同じ手法で行い、結果を比較検討した。さらに、*in vivo* での反応を調べるために、マウスの頸部に 10 μ g の PTH を皮下投与して、投与直後、1, 3, 8 時間後にマウスを屠殺し、直ちに頭蓋骨を液体窒素中で破砕し RNA を抽出、遺伝子解析を行なった (2)。特に *in vivo* での各ドミナント細胞は、Trizol 抽出 3 回行ったものを骨芽細胞ドミナントとして、4 回以降の抽出画分を骨細胞ドミナントとして解析した。

(2) MC3T3-E1 細胞、初代頭蓋骨由来細胞を用いた骨芽細胞および骨細胞の NPY ノックアウト細胞の構築と PTH による刺激反応の解析

(3) CRISPR-Cas9 テクノロジーを使った NPY cKO マウス作製のための loxP 配列導入法の確率。guide RNA の構築には GeneArt™ Precision gRNA Synthesis kit (Invitrogen) を使った。

4. 研究成果

(1) 副甲状腺ホルモン (PTH) の刺激による骨芽細胞および骨細胞での代謝遺伝子の発現
PTH の主要な機能は、生体カルシウム恒常性の維持である。*in vitro* の条件で、初代頭蓋骨由来細胞を用いた骨芽細胞 (2 次元培養) では、PTH を添加すると 1 時間後に *c-fos*, *glut1*, *ocn* の発現量がそれぞれ約 7 倍、2 倍増加した (Figure 1)。一方、骨細胞 (3 次元立体培養) では、PTH 添加後 1 時間で *c-fos* および *ocn* はわずかに増加したが、*glut1*, *glut4*, *sost* および *npy* の発現量は顕著に低下した (Figure 2)。特にエネルギーバランスを制御している *glut1*, *glut4*, および *npy* 発現量も抑制されていることから、長期的な PTH の存在は、骨細胞のエネルギー代謝を抑制す

るものと考えられる。これは副甲状腺ホルモンの過剰分泌が骨粗しょう症や糖尿病の一因を担っていることを示唆している。

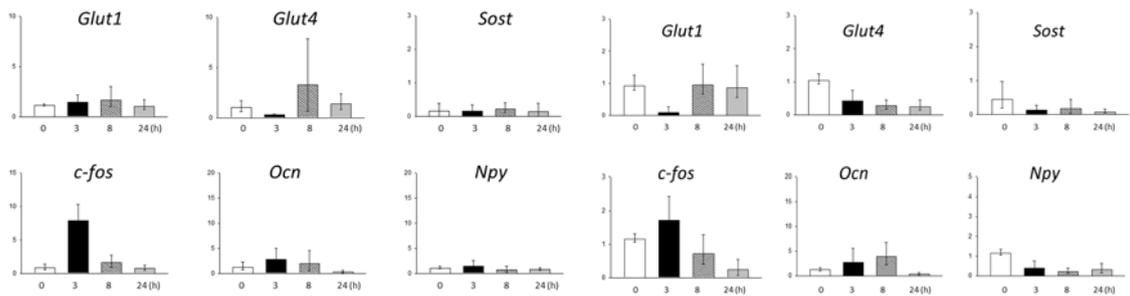


Figure 1. PTH-induced Gene expression in primary osteoblast (2D)

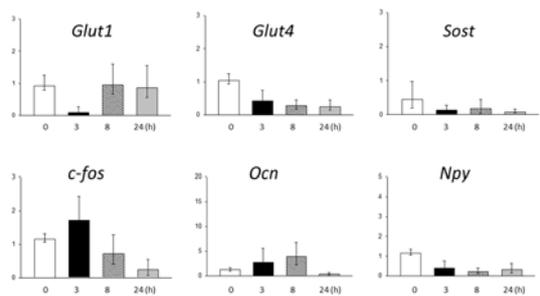


Figure 2. PTH-induced Gene expression in primary osteocytes (3D)

in vivo における PTH 単回投与マウスの遺伝子発現解析は、骨芽細胞では *in vitro* で増加した遺伝子群に加え *glut4* および *npy* の増加も見られた。一方、骨細胞では一時的に *c-fos* が僅かに増加したものの、他の遺伝子は *in vitro* の結果と同様に低下傾向を示した (Figure 3, 4)。

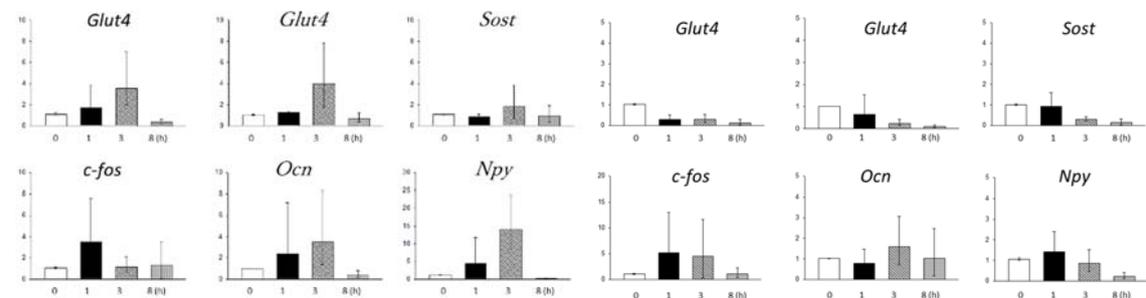


Figure 3. PTH-induced Gene expression in primary osteoblasts (2D)

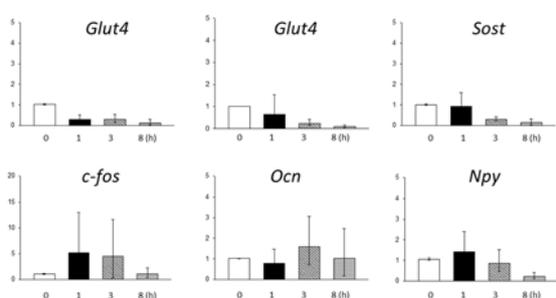


Figure 4. PTH-induced Gene expression in primary osteocytes (3D)

さらに MC3T3-E1 細胞、初代頭蓋骨由来細胞を用いた骨芽細胞および骨細胞の NPY ノックアウト細胞を構築した。NPY ノックアウト株の 2 次元培養では MC3T3-E1 細胞および初代細胞双方において、PTH 添加によって *glut1* および *glut4* 発現量が顕著に増加した (Figure 5, 6)。特に初代細胞では、PTH 添加後 1 時間で *glut1* (21.9), *glut4* (16.8), および *c-fos* (27.3) が増加していた。これは骨芽細胞においては、PTH によってグルコーストランスポータによるエネルギー代謝が正に制御され、*npy* が負に制御されているためと考えられる。一方、NPY ノックアウト骨細胞では、*glut4* などの初期発現量は若干増加がみられたが、PTH 添加後、各遺伝子発現の増減傾向は通常の細胞それとほぼ変わらない結果となった (Figure 7, 8)。これらのことより、*in vitro* の実験において NPY ノックアウト骨細胞は、エネルギー代謝関連の遺伝子に直接は影響していないと考えられる。以上のことより、*npy* は増殖や代謝が盛んな細胞に強く影響すると考えられる。

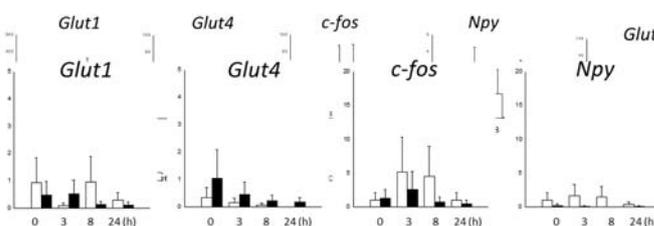


Figure 7. PTH-induced Gene expression in NPY-Knockout primary osteocytes

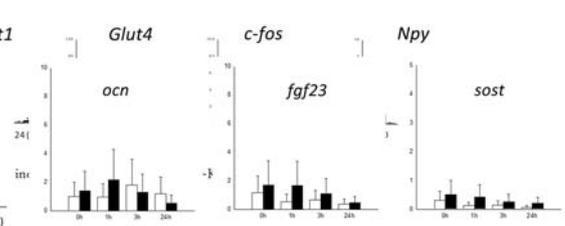


Figure 8. PTH-induced Gene expression in NPY-Knockout primary osteocytes

ノックアウト用の guideRNA は GeneArt™ Precision gRNA Synthesis kit (Invitrogen)に従って gRNA を構築した(Table 1). また MC3T3 細胞への導入は, Neon Transfection system のプロトコールに従った. その結果, 上流 (left arm) は mgRNApy2.F および mgRNApy2.R, 下流 (right arm) は mgRNApy4.F および mgRNApy4.R で構築した gRNA が, 最も良い切断効率であった (Supplemental data, wild sequence bold 参照). この切断部位に 150-mer で構築した left ssODN および right ssODN の loxP 配列導入 (Supplemental data) を試みた. 現在までに MC3T3-E1 細胞に, 0.2 ug (cas9): 100-400 ng (left ssODN) : 100-400 ng (light ssODN)の濃度で, Neon #14 or #16 のプロトコールで行ったが loxP 配列の導入には至っていない. これは ssODN の長さが, ゲノムに導入されるには適切ではないためであったと考えられた. ssODN はより長く作成することで特異性を上げることができ, もしくは短くすることで導入効率を上げることができると考えられる. 今後は, 導入する ssODN の長さを調整することで loxP 配列を導入する, もしくは left ssODN および light ssODN を 1 つにした long ssODN (CLICK: one-step generation of conditional knockout mice)(3) を用いることで, NPY コンディショナルノックアウトマウスが作成を目指す.

参考文献

1. Sawa N, Fujimoto H, Sawa Y, Yamashita J. Alternating Differentiation and Dedifferentiation between Mature Osteoblasts and Osteocytes. *Sci Rep* 2019; 9: 13842.
2. McCauley LK, Koh-Paige AJ, Chen H, Chen C, Ontiveros C, Irwin R, McCabe LR. Parathyroid hormone stimulates fra-2 expression in osteoblastic cells in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2001; 142: 1975-1981.
3. Miyasaka Y, Uno Y, Yoshimi K, Kunihiro Y, Yoshimura T, Tanaka T, Ishikubo H, Hiraoka Y, Takemoto N, Tanaka T, Ooguchi Y, Skehel P, Aida T, Takeda J, Mashimo T. CLICK: one-step generation of conditional knockout mice. *BMC Genomics* 2018; 19: 318.

Table 1. gRNA synthesis

1	mgRNApy1.F	TAATACGACTCACTATAGACCGTGCTAGAGACAA	Npy-intron1
	mgRNApy1.R	TTCTAGCTCTAAAACAGTATTGTCTCTAGCACGG	Npy-intron1
2	mgRNApy2.F	TAATACGACTCACTATAGAGGCTCAGTTCGGATT	Npy-intron1
	mgRNApy2.R	TTCTAGCTCTAAAACCCAAAATCCGAAGTGGAGCC	Npy-intron1
3	mgRNApy3.F	TAATACGACTCACTATAGCCTCCGATTCTCCTGG	Npy-intron1
	mgRNApy3.R	TTCTAGCTCTAAAACCTCACCAGGAGAATCGGAG	Npy-intron1
4	mgRNApy4.F	TAATACGACTCACTATAGCCTAGAGCCGGGAAA A	Npy-intron2
	mgRNApy4.R	TTCTAGCTCTAAAACCAAGTTTTCCCGGCTCTAG	Npy-intron2
5	mgRNApy5.F	TAATACGACTCACTATAGCTCTAGATAAATATGT	Npy-intron2
	mgRNApy5.R	TTCTAGCTCTAAAACGCTCACATATTTATCTAGA	Npy-intron2
6	mgRNApy6.F	TAATACGACTCACTATAGTTTTCCCGGAGATATG	Npy-intron2
	mgRNApy6.R	TTCTAGCTCTAAAACAGCACATATCTCGGGGAA	Npy-intron2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Michalski M.N., Zweifler L.E., Sinder B.P., Koh A.J., Yamashita J., Roca H., McCauley L.K.	4. 巻 98
2. 論文標題 Clodronate-Loaded Liposome Treatment Has Site-Specific Skeletal Effects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 459 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034518821685	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 該当する
1. 著者名 Miyazono S, Shinozaki Y, Sato H, Isshi K, Yamashita J	4. 巻 83
2. 論文標題 The use of digital technology to improve objective and reliable assessment in student simulation laboratories	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Dent Education	6. 最初と最後の頁 1224-1232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21815/jde.019.114	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 3.Sawa N, Fujimoto H, Sawa Y, Yamashita J	4. 巻 25
2. 論文標題 Alternating Differentiation and Dedifferentiation between Mature Osteoblasts and Osteocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50236-7	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 -
1. 著者名 Yamashita J, McCauley LK	4. 巻 3
2. 論文標題 Intermittent Administration of Parathyroid Hormone and Fracture Healing: A Narrative Review of Animal and Human Studies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JBMR Plus	6. 最初と最後の頁 e10250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbm4.10250	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 -

1. 著者名 Yamashita J	4. 巻 17
2. 論文標題 The Therapeutic Potential of Parathyroid Hormone in Dental and Oral Medicine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 3-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1023	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計16件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Hirano M, Fujimoto H, Sugihara A, Yamashita J.
2. 発表標題 Concomitant suppression of osteoclasts and macrophages hinders osseous wound healing
3. 学会等名 The 104th Annual Meeting of American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Fujimoto H, Hirano M, Sugihara A, Yamashita A.
2. 発表標題 Effect of Antiangiogenic agents in tooth extraction socket healing
3. 学会等名 The 104th Annual Meeting of American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Takeyama H, Sugihara A, Fujimoto H, Hirano M, Miyazono S, Yamashita J. The effect of neutropenia and anti-resorptives in tooth extraction socket healing
2. 発表標題 The effect of neutropenia and anti-resorptives in tooth extraction socket healing
3. 学会等名 The 104th Annual Meeting of American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Hirano M, Fujimoto H, Miyazono S, Sugihara N, Sawa N, Yamashita J.
2. 発表標題 Influence of macrophages and osteoclasts on healing of osseous wounds
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Fujimoto H, Hirano M, Sugihara N, Miyazono S, Sawa N, Yamashita J.
2. 発表標題 Antiangiogenesis and osseous wound healing
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 宮園祥爾, 平野雅裕, 藤本啓貴, 山下潤朗
2. 発表標題 マウス骨髄炎モデルの確立
3. 学会等名 第45回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 8. 藤本啓貴, 平野雅裕, 宮園祥爾, 山下潤朗
2. 発表標題 血管新生抑制剤が抜歯窩の治癒に与える影響
3. 学会等名 第45回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 平野雅裕，藤本啓貴，宮園祥爾，山下潤朗
2. 発表標題 マクロファージと破骨細胞の抑制による骨壊死
3. 学会等名 第45回福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 平野雅裕，山下潤朗
2. 発表標題 マクロファージ枯渇と骨創傷治癒不全
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 宮園祥爾，山下潤朗
2. 発表標題 マウス骨髄炎モデルの樹立と骨髄炎治療・予防法の確立
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤本啓貴，山下潤朗
2. 発表標題 腫瘍性疾患治療に有効な血管新生抑制剤サリドマイドと口腔粘膜骨創傷治癒
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第128回学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤本啓貴，山下潤朗
2. 発表標題 抗癌剤による血管新生抑制は，癌組織と口腔組織で効果が大きく異なる
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 平野雅裕，山下潤朗
2. 発表標題 抜歯時の菌血症は，局所の骨量を低下させるだけでなく肝臓と脾臓にも大きな負荷となる
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第129回学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 藤本啓貴，平野雅裕，山下潤朗
2. 発表標題 抗RANKL抗体は骨吸収を抑制するだけでなく全身の免疫応答に影響を与える
3. 学会等名 第40回骨形態計測学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 平野雅裕，藤本啓貴，山下潤朗
2. 発表標題 抜歯に伴う一過性の菌血症が長管骨骨量と腎臓や肝臓に与える影響
3. 学会等名 第40回骨形態計測学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 山下潤朗，宮園祥爾，藤本啓貴，平野雅裕
2. 発表標題 敗血症マウスにゾレドロン酸を投与すると免疫系が賦活され治癒が加速する
3. 学会等名 第40回骨形態計測学会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1st Author, The Japanese Society for Bone and Mineral Research http://www.jsbmr.jp/1st_author/408_yamashita_sawa.html

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