

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18950

研究課題名（和文）骨・骨髄脂肪組織におけるモノカルボン酸トランスポーター1の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of monocarboxylate transporter 1 in bone and bone marrow adipose tissues

研究代表者

笹 清人（SASA, KIYOHITO）

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50823069

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）：老化や肥満では、多分化能を持つ間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化より脂肪細胞への分化が優位になり骨の脆弱化の原因のひとつとなることが知られている。脂肪組織はミトコンドリアの機能低下により乳酸産生が高まることが特徴で、モノカルボン酸トランスポーター（MCT）と関連が深いと考えられた。本研究では、MCTが骨芽細胞および脂肪細胞への分化にどのような影響を及ぼすか、検討を行った。細胞に Mct1 siRNA を導入して、遺伝子ノックダウンを行い脂肪細胞分化の促進および骨芽細胞分化の抑制を確認した。MCT1の脂肪細胞分化時の機能をメタボローム解析により網羅的に代謝産物の変化を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は骨および骨髄脂肪組織におけるMCT1の機能を解析することである。MCT1の機能は、癌細胞、神経および筋肉などの糖代謝が盛んな組織で広く研究されているが、骨組織および脂肪組織におけるMCT1の役割に着目した研究はほとんど報告されておらず、本研究は極めて独創的であると考えられる。また、MCT1は分化の振り分けを介して、骨組織および骨髄脂肪組織の形成に關与する可能性が高いことから骨粗鬆症の新たな治療標的分子となる可能性があり、臨床的にも重要な意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In aging and obesity, it is known that the differentiation of pluripotent mesenchymal stem cells into adipocytes becomes predominant over the differentiation into osteoblasts, which is one of the causes of bone weakening. Adipose tissue is characterized by increased lactic acid production due to decreased mitochondrial function, and is considered to be closely related to the monocarboxylic acid transporter (MCT). In this study, we investigated how MCT affects the differentiation into osteoblasts and adipocytes. Mct1 siRNA was introduced into cells and gene knockdown was performed to confirm promotion of adipocyte differentiation and suppression of osteoblast differentiation. The function of MCT1 during adipocyte differentiation was comprehensively examined by metabolome analysis for changes in metabolites.

研究分野：骨代謝調節

キーワード：脂肪細胞 分化 MCT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は、身体を支える重要な器官である。脂肪組織は余剰なエネルギーを脂肪として貯蓄する器官である。このように性質の全く異なった2つの器官だが、構成する細胞の起源はいずれも間葉系幹細胞である。間葉系幹細胞は、骨組織や脂肪組織の構成細胞である骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などに分化できる多分化能を持つ。これらの分化はそれぞれの転写因子が分化の運命を決定する。老化や肥満では、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化より脂肪細胞への分化が優位になり骨の脆弱化の原因のひとつとなることが知られている。このように骨と脂肪組織は密接な関係が築かれている。

モノカルボン酸トランスポーター(MCT)1は、乳酸、ピルビン酸、ケトン体などのモノカルボン酸をpH依存的に細胞内外へ輸送する担体である。MCT1はコピキタスに発現し、細胞の局在としては細胞膜・ミトコンドリア内膜に存在している。MCT1は、細胞内でグルコースから生じたピルビン酸のミトコンドリアへの輸送、細胞膜を隔てた乳酸の移動を行い、細胞内pHの調節、エネルギー代謝に関与していると考えられている。申請者らの研究グループは軟骨細胞や骨芽細胞、破骨細胞の分化など骨構成細胞においてMCT1の阻害が遺伝子発現を調節し細胞の機能を変化させることを見出している。しかしながら、間葉系幹細胞の分化の振り分け機構におけるMCT1の役割についての報告がほとんど皆無であった。

2. 研究の目的

本研究は骨および骨髄脂肪組織におけるMCT1の機能を解析することである。MCT1の機能は、癌細胞、神経および筋肉などの糖代謝が盛んな組織で広く研究されているが、骨組織および脂肪組織におけるMCT1の役割に着目した研究はほとんど報告されておらず、本研究は極めて独創的であると考えられる。また、MCT1は分化の振り分けを介して、骨組織および骨髄脂肪組織の形成に関与する可能性が高いことから骨粗鬆症の新たな治療標的分子となる可能性があり、臨床的にも重要な意義を持つと考えられる。

3. 研究の方法

本研究ではマウス間葉系幹細胞株C3H10T1/2細胞とマウス前駆脂肪細胞株3T3-L1細胞を使用し、以下の項目について2年間、解析を行った。

MCT1による分化制御機構の解明

2種類の細胞に遺伝子抑制のために*Mct1* siRNAを導入し、脂肪細胞分化誘導培地(インスリン、IBMX、デキサメタゾン)および骨芽細胞分化誘導培地(BMP-2)により各種細胞へ分化させて解析を行った。脂肪細胞分化をOil Red O染色、骨芽細胞分化をアルカリホスファターゼ染色および各種細胞分化マーカー遺伝子の発現量にて評価した。Wnt/ β -Cateninシグナル伝達の変化を解析した。

脂肪細胞分化におけるトランスポーターとしての機能

Mct1 siRNA導入による細胞内代謝物質の変化を網羅的に把握するため、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析計(CE-TOFMS)を用いてメタボローム解析を行った。

4 . 研究成果

MCT1 による分化制御機構の解明

1) 骨芽細胞分化: *Mct1* siRNA は、BMP2 による C3H10T1/2 細胞のアルカリホスファターゼ活性を抑制し、また骨芽細胞分化マーカー遺伝子 (*Runx2*, *Sp7*, *Tnap*) の mRNA 発現を抑制した。また、Oil Red O 染色による脂肪滴も *Mct1* siRNA により、染色される細胞数が増加することも確認している。以上の結果から MCT1 は骨芽細胞分化を促進する役割を持つことを明らかにした。

2) 脂肪細胞分化: *Mct1* siRNA は、脂肪細胞分化を促す DMI 培地(Insulin, Dex, IBMX)で C3H10T1/2 細胞および 3T3-L1 細胞の脂肪滴の合成を促進した。また、脂肪細胞のマスター転写因子である *Pparg* や脂肪細胞分化マーカー遺伝子 (*aP2*, *Cd36*, *Plin1*, *Afp*) の発現量も増加することを確認した。これらの結果は C3H10T1/2 細胞および 3T3-L1 細胞の両方で同様な結果が得られている。以上の結果から MCT1 は脂肪細胞分化を抑制する役割を持つことを明らかにした。

細胞内乳酸濃度を測定した結果、*Mct1* siRNA を導入した 3T3-L1 細胞は有意に細胞内乳酸濃度が増加していた。これは、解糖系によるグルコースの分解で、乳酸が産生され、*Mct1* siRNA により、細胞外へ放出できずに細胞内に乳酸が蓄積したと考えられた。細胞内乳酸濃度が増加する代償として乳酸からピルビン酸に変換する酵素である乳酸脱水素酵素 B の遺伝子発現量が *Mct1* siRNA によりが増加した。しかしながら、*Mct1* siRNA と *Ldh B* siRNA の同時導入した細胞において *Mct1* siRNA による脂肪細胞分化の促進を回復することはなかった。

脂肪細胞分化におけるトランスポーターとしての機能

Mct1 siRNA により細胞内の代謝産物の詳細な変化を観察するため質量分析装置 CE-TOFMS によるメタボローム解析による網羅的解析を実施した。その結果、*Mct1* siRNA はグルコース代謝経路では解糖系(乳酸、ホスホエノールピルビン酸、フルクトース 1,6 ビスリン酸など)および TCA 回路(リンゴ酸、フマル酸、クエン酸、 α -ケトグルタル酸など)、ペントース・リン酸回路(6-ホスホグルコン酸など)の代謝物が増加することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Izumida E., Suzawa T., Miyamoto Y., Yamada A., Otsu M., Saito T., Yamaguchi T., Nishimura K., Ohtaka M., Nakanishi M., Yoshimura K., Sasa K., Takimoto R., Uyama R., Shirota T., Maki K., Kamiyo R.	4. 巻 99
2. 論文標題 Functional Analysis of PTH1R Variants Found in Primary Failure of Eruption	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 429 ~ 436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520901731.	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 該当する

1. 著者名 Sugisaki Risa, Miyamoto Yoichi, Yoshimura Kentaro, Sasa Kiyohito, Kaneko Kotaro, Tanaka Motohiro, Itose Masakatsu, Inoue Sakie, Baba Kazuyoshi, Shirota Tatsuo, Chikazu Daichi, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 132
2. 論文標題 Possible involvement of elastase in enhanced osteoclast differentiation by neutrophils through degradation of osteoprotegerin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115216 ~ 115216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115216	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 該当する

1. 著者名 Imai Hiroko, Yoshimura Kentaro, Miyamoto Yoichi, Sasa Kiyohito, Sugano Marika, Chatani Masahiro, Takami Masamichi, Yamamoto Matsuo, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 9
2. 論文標題 Roles of monocarboxylate transporter subtypes in promotion and suppression of osteoclast differentiation and survival on bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52128-2	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 Kato Tadashi, Mizobuchi Masahide, Sasa Kiyohito, Yamada Atsushi, Ogata Hiroaki, Honda Hirokazu, Sakashita Akiko, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 532
2. 論文標題 Osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in uremic rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 11 ~ 18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.05.096	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 該当する

1. 著者名 Takimoto Reiko, Suzawa Tetsuo, Yamada Atsushi, Sasa Kiyohito, Miyamoto Yoichi, Yoshimura Kentaro, Sasama Yuji, Tanaka Motohiro, Kinoshita Mitsuhiro, Ikezaki Kaori, Ichikawa Makoto, Yamamoto Matsuo, Shirota Tatsuo, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 162
2. 論文標題 Zoledronate promotes inflammatory cytokine expression in human CD14 positive monocytes among peripheral mononuclear cells in the presence of T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunology	6. 最初と最後の頁 306 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imm.13283	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 該当する

1. 著者名 笹 清人, 吉村 健太郎, 宮本 洋一, 上條 竜太郎	4. 巻 29(2)
2. 論文標題 モノカルボン酸トランスポーターによる骨・軟骨代謝の調節	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 口腔組織培養学会誌	6. 最初と最後の頁 49 - 56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 笹 清人, 吉村健太郎, 今井裕子, 山本松男, 上條竜太郎
2. 発表標題 モノカルボン酸輸送担体は骨形成と骨吸収の両者を調節する
3. 学会等名 日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹 清人, 吉村健太郎, 今井裕子, 山本松男, 上條竜太郎
2. 発表標題 モノカルボン酸トランスポーター (MCT) は新規骨代謝調節因子である
3. 学会等名 日本ヒト細胞学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Sasama, Kentaro Yoshimura, Yoichi Miyamoto, Kiyohito Sasa, Takaaki Akaike, Masanobu Morita, Tetsuro Matsunaga, Tatsuo Shirota, Ryutaro Kamijo
2. 発表標題 Respiration using hydrogen sulfide promotes chondrocyte proliferation and bone growth
3. 学会等名 第67回JADR総会・学術大会 / (第4回IADR APR (Asia Pacific Region) 学術大会 (4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019) (国際学会))
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹清人, 吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎
2. 発表標題 モノカルボン酸トランスポーター1は骨芽細胞分化の負の調節因子p53の抑制を介して骨芽細胞分化を促進する
3. 学会等名 歯科基礎医学会 (招待講演)
4. 発表年 2020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