

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K09432
研究課題名(和文) 血漿プロテオーム解析による骨組織由来生理活性物質の同定と全身性代謝制御機構

研究課題名(英文) Identification of biological factors derived from bone tissue by plasma proteome analysis and their systemic metabolic control mechanisms

研究代表者
堀家 なな緒 (Horike, Nanao)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教

研究者番号：30589221
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)：本研究では、新しく骨から分泌され、他の臓器にシグナルを伝達し、エネルギー代謝、細胞増殖に影響する未発見の物質を探索する。ヒトiPS細胞由来軟骨組織を移植したマウスにインスリン刺激をおこない、分泌される因子を同定することで、生理的意義の高い物質が検出されると期待できる。骨と他臓器の間をつなぐ生理活性物質を同定することは、エネルギー代謝・糖代謝に関わる新たな機能が解明される。

研究成果の学術的意義や社会的意義
寿命の延伸が健康寿命の延伸に直結しないことは、超高齢社会において大きな問題となっている。加齢に伴う罹患疾患数の増加により、疾患相互の影響を考慮する必要がある。近年、代謝疾患と骨粗鬆症の関係については、多くの知見が集積され、世界的な注目を浴びているが、両者の関係は、糖尿病等の患者が高齢化しているため、より一層重要である。骨や軟骨は、身体を支えたり、カルシウムを貯蔵するだけでなく、内分泌臓器として機能する可能性がある。他臓器の間をつなぐ骨、軟骨生理活性物質同定することは、エネルギー代謝・糖代謝の恒常性維持に関わる新たな機能解明につながり、人類の健康に関わる大きな発見となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we will discover novel secreted substances from bone, transmit signals to other organs, and affect energy metabolism. We expect to detect substances of physiological significance by stimulating insulin or high fat diet in mice transplanted with human iPS cell-derived cartilage tissue and identify factors. Identification of physiologically active substances that connect bone to other organs will elucidate new functions related to energy metabolism.

研究分野：軟骨分化、生化学

キーワード：骨 軟骨 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

ヒトの全ての臓器は細胞を構成単位としており、細胞の増殖、修復、代謝、細胞間の情報交換の機能低下は、結果的に、疾病の発症や老化の大きな危険因子となる。情報交換を担うのは、組織から分泌される「ホルモン」や「サイトカイン」などである。高齢者では、脳、腎臓、筋肉、骨、胸腺、褐色脂肪など多くの組織に退行性萎縮が見られ、これらの組織では細胞数は減少して生理機能も低下している。この中でも骨は、加齢の影響を最も強く受ける組織である。さらに、食事や運動、ホルモンにも影響を強く受ける。運動の中心的役割を担う器官である骨や骨格筋が健康と深く係わることが示唆されている。

2. 研究の目的

骨は体を支え、血中カルシウム調節を行う器官としか考えられなかったが、オステオカルシンの発見により、骨から分泌されるオステオカルシンが全身のエネルギー代謝に関与しているという見方が出てきた。一方、このオステオカルシンには懐疑的な意見も存在し、オステオカルシンの生理的意義が確立されていない。そこで、本研究では、新しく骨から分泌され、他の臓器にシグナルを伝達し、エネルギー代謝、細胞増殖に影響する未発見の物質を探索する。

SCID マウスにヒト組織を移植すると、移植されたマウスの血液には、移植組織由来の分泌因子が存在し、アミノ酸配列の違いから、移植組織から分泌された物質であることを確定できる。ヒト骨組織を移植したマウスにインスリン刺激、高脂肪食負荷、運動負荷を行い、分泌される因子を同定することで、生理的意義の高い物質が検出される。この手法は、従来のプロテオーム解析に比べ、特定の組織から分泌された物質を高感度で同定することが可能になり、血中分泌因子を見つける手法としては、極めて有効であり他にはない優位性がある。骨と他臓器の間をつなぐ生理活性物質を同定することは、エネルギー代謝・糖代謝の恒常性維持に関わる新たな機能解明につながり、糖尿病、肥満等の生活習慣病、癌などの治療にも波及効果がある。

3. 研究の方法

ヒト iPS 細胞由来軟骨組織(2g) を SCID マウスに移植し、インスリン刺激、高脂肪食負荷をかけ、血液を採取する。血漿成分を LC-MS/MS 型質量分析装置にかけ、ヒトアミノ酸配列のデータベース上の遺伝子と一致するタンパク質を探索することで、新規分泌因子 X の同定を行う。

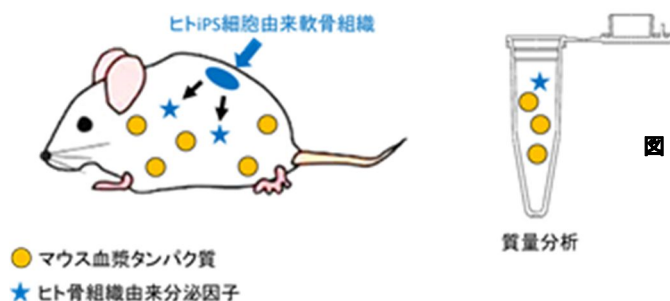


図1 異種組織を移植したマウスの血漿による質量分析

4. 研究成果

SCID マウスにヒト iPS 細胞由来軟骨組織(2g)を移植し、レントゲンによる骨分化をモニタリングした。移植後 3 か月で十分に骨に分化していることを確認した(図 2)。



図2 ヒト iPS 細胞由来軟骨組織移植マウス
レントゲン写真(移植後 3 ヶ月)

SCID マウスに移植した組織がヒト由来の細胞であることを調べるために、移植後 9 ヶ月の移植組織を HNA 染色したところ、移植組織はほとんどがヒト由来であることを確認した(図 3)。

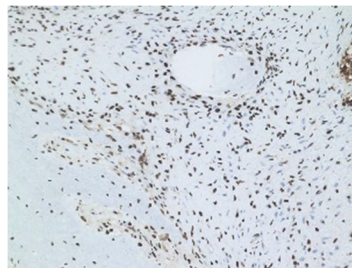


図3 移植組織のHNA染色

ヒト iPS 細胞由来軟骨組織を移植した SCID マウスの組織が十分に骨化したことをレントゲンで確認し、二か月間の高脂肪食負荷、インスリン刺激、PTHrP 製剤(テリパラチド)刺激を行い、マウスの血液を採取した。対象群として、移植していない SCID マウスの血液を採取した。血漿を LCMS/MS 型質量分析装置にかけ、ヒトアミノ酸配列のデータベース上の遺伝子と一致するタンパク質を探索した。その結果、移植していない SCID マウスの血液にはなく、移植した SCID マウスにのみみられたヒトのアミノ酸配列を持つタンパク質を 152 種類検出した。152 種類のヒトアミノ酸配列を持つタンパク質の中には、これまでに報告されている骨や軟骨から分泌される因子である 1 型、2 型、5 型、6 型、11 型コラーゲンや骨吸収マーカである COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein) 等が検出された。この結果から、確かに移植した軟骨組織から分化した組織から分泌された因子であることは明らかである。

さらに、WT マウスの全組織の RNA シーケンスと SignalP ソフトウェアで分析し、特に骨や軟骨に高い発現があり、軟骨基質ではないシグナルペプチドを有するタンパク質を抽出したところ、骨から分泌され生理機能をもつことが知られていない新規の 32 種類の分泌因子を同定した(表 1)。高脂肪食刺激、インスリン刺激等により分泌が誘導されることから、エネルギー代謝に関与する新規生理活性物質の候補となる可能性が高い。

分泌因子の分類	数
機能不明分泌因子	19
成長因子	5
サイトカイン・ホルモン	3
アポリポタンパク質	3
プロスタグランジン	1
神経伝達物質	1

表1 移植マウス血漿中の新規軟骨・骨由来分泌因子の内訳

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ○武井義明、小林与人、堀家なな緒、森岡美帆、高才東、釜谷崇志、山下晃弘、竹森 洋、妻木範行
2. 発表標題 塩誘導性キナーゼ 3(SIK3)は関節軟骨表層へのせん断力負荷により不活性化され、ルブリ シン発現を促進する
3. 学会等名 第 33 回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021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
---------	---------