

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21762

研究課題名（和文）生体恒常性維持における新たな骨組織の役割

研究課題名（英文）New roles of bone tissue in the maintenance of homeostasis.

研究代表者

吉澤 達也（Yoshizawa, Tatsuya）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・准教授

研究者番号：40313530

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、骨を作る骨芽細胞に発現しているSIRT7（老化・様々な代謝・がんの調節因子として重要な役割を担っているサーチュインの一つ）が、肝細胞がんの発育進展、糖代謝、腸内細菌叢を調節できることを発見した。また、骨組織で優位に発現する分泌タンパク質の遺伝子を見つけた。現在この遺伝子の骨芽細胞特異的ノックアウトマウスを作成しており、今後これらのマウスを用いた新規骨ホルモンの発見・確立が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、骨組織がホルモンを分泌し、様々な生体機能を調節していることが徐々に明らかとなってきた。我々は骨組織による新たな生体機能調節能の発見、およびその分子機構の解明を目指している。我々が挑戦している新たな骨ホルモンの発見は、生命現象の根幹に関わる研究であり生物学的に非常に大きな意義を持つばかりか、今後、骨組織が他臓器の疾患の治療標的となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We discovered that the osteoblastic SIRT7, which is the member of Sirtuins (SIRT1-7 in mammals) regulating a wide variety of biological process, can modulate the progression of hepatic tumor, glucose metabolism, and gut microbiota. Furthermore, we found the candidate gene of new bone-derived hormone which is predominately expressed in bone, and are now generating the osteoblast-specific knockout mice for this gene. These mice will be valuable to establish the new bone-derived hormone.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨組織 ホルモン 臓器連関

1. 研究開始当初の背景

運動器(骨、筋肉、神経など)の障害により要介護になるリスクの高い状態になることをロコモティブシンドローム(ロコモ)と呼び、国際的にも健康寿命を阻害する大きな問題の一つである。寝たきりなどの身体活動の低下により、生活習慣病、認知症、がんの発症リスクが増加することから、運動は全身臓器の恒常性維持に必須であることは言を俟たない。しかし、その分子機構は極めて複雑であり、不明な点が多い。

骨粗鬆症などの骨疾患は、糖尿病・動脈硬化・脂質異常症・慢性腎臓病・認知症・免疫力低下・寿命などに関連することが疫学的に示されているため、以前から骨組織が生体恒常性維持に影響する可能性が指摘されていた。実際近年では、骨を作る細胞系(間葉系幹細胞や骨芽細胞)がニッチとして働き、造血幹細胞の維持・増殖・分化を制御していることが報告された。さらに、骨組織がホルモンを分泌し、様々な生体機能を調節していることが徐々に明らかとなってきた(図1)。しかし、今までに発見された骨ホルモンは FGF23、オステオカルシン(OCN)、リポカリン2 の三つしかなく、示唆されている骨組織による生体恒常性維持をすべて説明することはできていない(図1)。したがって、高齢社会における健康寿命の延伸を考える上では、「骨組織の量と質を保つ機構の解明」と同様に「骨組織による生体恒常性維持機構の解明」を考慮した研究が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

我々は、骨を作る細胞系特異的に様々な転写制御因子を欠損させ、骨組織自身と他臓器の機能異常を解析している。そして最近、エピゲノム因子である SIRT7 の解析から、これまでに報告された骨ホルモンでは説明できない分子機構により、骨組織が糖代謝・腫瘍・腸管免疫を調節している可能性を見出した(未発表: 図1)。

そこで本研究では、骨芽細胞/骨細胞特異的 *Sirt7* 欠損(KO)マウスを足がかりに、骨組織による新たな生体機能調節の発見、およびその分子機構の解明を目的に研究を進める。

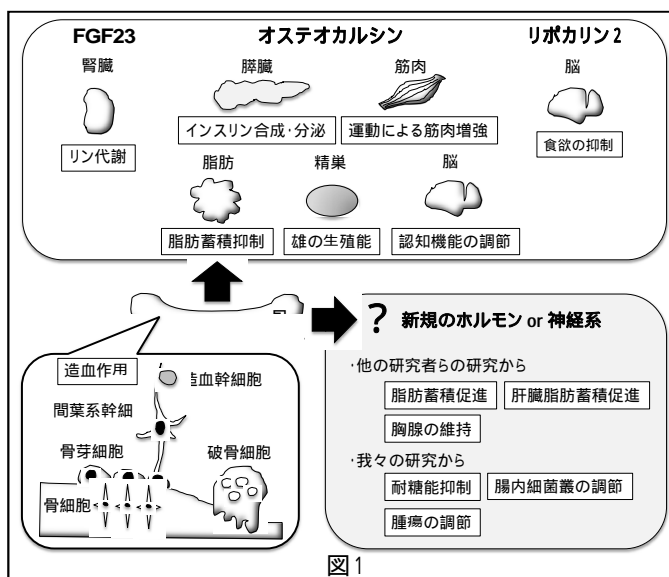


図1

3. 研究の方法

我々が作成した骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスでは、a)耐糖能が良好、b)老齢マウスにおける自然発生 B リンパ腫が少ない、c)腸内細菌叢がコントロールマウスと大幅に異なることから(全て未発表)、当初はこれら3点の分子メカニズムの解明と新たな骨ホルモンの発見を試みる予定であったが、様々な制限下により実際には b)の腫瘍に関する解析と新規ホルモンの発見に集中した。

(1) 骨組織による新たな腫瘍調節機構の解明

近年、白血病モデルマウスで骨芽細胞を減らすと白血病細胞の増殖と生着が低下することが報告されたが、詳細な分子機構は不明である。我々が2年齢のマウスを解析したところ、コントロールマウスでは脾臓に自然発生の B リンパ腫が見られたが(3/14匹)、骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスでは全く認められなかった(0/13匹)(未発表)。そこで我々は、骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスを用いて腫瘍細胞移植や化学発がん剤による様々なタイプの腫瘍発症モデルを解析し、骨組織が血液がん以外のがんの発生や進行も調節するのか否かについて解析した。

(2) 新たな骨ホルモンの発見

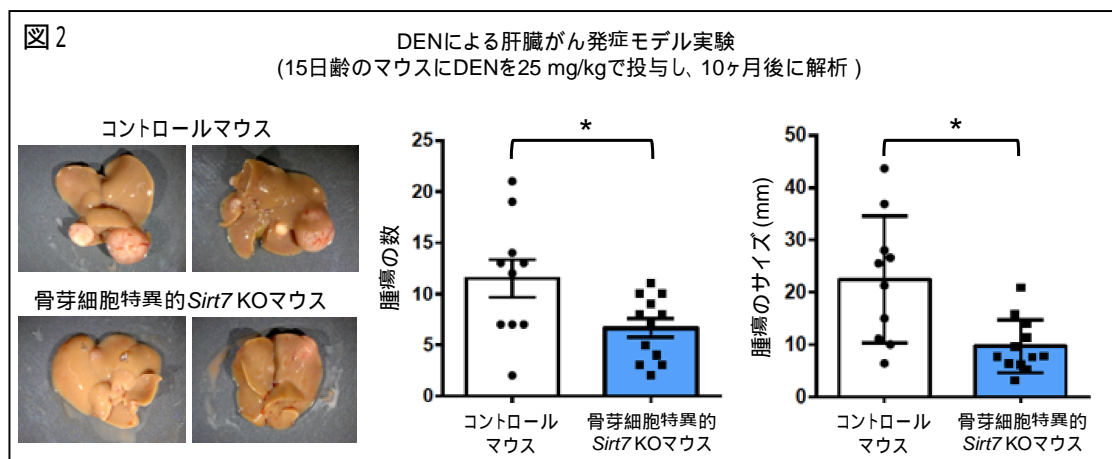
他の研究者らは、骨芽細胞や骨細胞を除去したマウス(標的細胞特異的な細胞死誘導マウス)を用いて、インスリン感受性促進・脂肪蓄積促進・肝臓脂肪蓄積促進・胸腺の維持・食欲抑制は、

OCN では説明できない骨組織による作用であることを示唆している。細胞自体を除去したマウスでは発現している遺伝子と分泌因子が全て消失しているため、新たな骨ホルモンをスクリーニングするソースとしての有用性はほとんどない。一方、我々が用いている転写制御因子の KO マウスでは、ある程度限定された標的遺伝子群の変化しか起こらないため、表現型を説明できる新たな因子のスクリーニングソースとして大きなアドバンテージを持つ。

そこで我々は、コントロールマウスと骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスの骨組織を用いて、網羅的遺伝子発現解析 RNA-Seq を行なった。発現に差が認められた遺伝子群は、qPCR 法にて臓器別、年齢別に発現を解析した。さらに、候補遺伝子群のコンディショナル KO マウスの作成に着手した。

4. 研究成果

(1) 化学発がん剤 (diethylnitrosamine : DEN) による肝臓がん発症モデル実験において、骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスではコントロールマウスに比較して、有意に肝臓がんの数と大きさが抑制されていた (図 2)。



一方、メラノーマ細胞株 B16 を骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスとコントロールマウスの皮下に移植した場合は、骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスで若干腫瘍の大きさが小さい傾向があったが、有意差は認められなかった。

(2) 6ヶ月齢の骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスとコントロールマウスの骨組織を用いて RNA-Seq を行なった。骨芽細胞特異的 *Sirt7* KO マウスにおいて 1.5 倍以上の差で減少した遺伝子 101 個、増加した遺伝子 84 個を調べたところ、いくつかの分泌タンパク質を見出した。そこで、これらの遺伝子発現を各臓器別に検討したところ、ある遺伝子の発現が主要臓器に比べて骨組織で 400 倍程度高発現していることが明らかとなった。また、この遺伝子は加齢とともに増加することも明らかにした。今のところ、この分泌タンパク質の個体での機能はほとんど分かっていない。この遺伝子のファミリーはそれぞれ異なる組織で発現が高く、今回新たにそのうちの 2 つの遺伝子が骨組織で高く発現していることを発見した。

現在、CRISPR-Cas9 システムを用いて、この二つの遺伝子のコンディショナル KO マウスを作成している。

(3) まとめ

当大学マウス施設の一年近くに渡る大規模改修のため、飼育できるマウスの数が 1 / 3 に減らされ、新たなマウスの繁殖ができなかった。そのため、計画した動物実験がほとんどできず、研究計画を縮小せざるを得なかった。それでも、骨組織による新たな腫瘍調節作用については、化学発がん剤による肝臓がん発症モデル実験によって、骨組織が血液がん以外のがんの進行も調節することが証明された。今後は、糖代謝・腸管免疫についても解析を進め、これらの作用が同じメカニズムで調節されているのか、相互作用があるのか、もしくは全く別のメカニズムであるのかについて解明していく予定である。

OCN は骨ホルモンとしての機能の発見から 14 年で著しく研究が発展し、多くの新たな作用が Cell 紙などに発表され、膨大な数の臨床研究も報告され、NHK スペシャルで一般者向けの特集が組まれるなど、一つの研究分野を作り上げたと言っても過言ではない。このように、新たな

ホルモンの発見は生命現象の根幹に関わる研究であり非常に大きな意義を持つ。国内外で新たな骨ホルモンを取得する試みはよく聞かれるが、これらの試みは培養細胞上清から質量分析で網羅的に取得する方法がほとんどであり、未だに成功には至っていない。培養骨芽細胞は *in vivo* の環境を反映していないこと、機能解析を併用しない網羅的解析では候補因子の絞り込みが非常に困難なことは明白である。今後は、我々が骨ホルモンの候補として発見した2つの遺伝子についてコンディショナル KO マウスなどを用いて解析し、新たな骨ホルモンの確立を行なっていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	福田 真嗣 (Fukuda Shinji) (80435677)		
研究協力者	荒木 喜美 (Araki Kimi) (90211705)		

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