

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659149

研究課題名（和文）メタボリックシンドロームにおける破骨細胞の機能解析

研究課題名（英文） Role of osteoclasts in metabolic syndrome

研究代表者

篠原 正浩 (SHINOHARA MASAHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：60345733

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞の骨吸収能に異常があり大理石骨病を発症する破骨細胞特異的ノックアウトマウスを用いて、破骨細胞による肥満や2型糖尿病発症制御機構の存在を示し、その分子メカニズム解明を試みた。破骨細胞特異的ノックアウトマウスは加齢に伴う体重増加や高脂肪食負荷に伴う体重増加に抵抗性を示した。また、高脂肪食負荷時において正常な血糖値を示すほか、耐糖能に異常をきたすことはなかったことから、破骨細胞が肥満や糖代謝異常に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Osteoclasts have been believed to be bone-resorbing cells, which play an essential role in bone homeostasis. However, osteoclast-specific conditional knockout mice, which show a severe osteopetrotic phenotype due to a lack of bone-resorbing activity, were resistant to the development of obesity associated with ageing and high fat diet. These results clearly suggested that osteoclasts are involved in the pathogenesis of the obesity, and probably subsequent diabetes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般・生体分子医学

キーワード：破骨細胞、肥満、2型糖尿病、メタボリックシンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

骨は脊椎動物の生体における要であるが、運動器の一部としての効果器であり、ミネラルやリン酸の代謝の恒常性を保つ組織としても位置づけられてきた。また、免疫システムにも重要であり、中枢神経系を保護する組織として機能している。この骨組織は主に骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞、外界からの力学的圧力を感じ取る骨細胞から構成されている。

破骨細胞は骨基質を溶解・吸収するために酸やプロテアーゼを分泌する。実際、過剰な骨吸収が観察される骨粗鬆症や関節リウマ

チの骨破壊では、分泌因子を標的とした治療法が確立されている。一方、大理石骨病では破骨細胞から酸やプロテアーゼが正常に分泌されないことによる骨吸収異常が認められることから、この分泌メカニズムは破骨細胞において重要な機能を果たしている。しかし、大理石骨病では明らかに骨組織以外の臓器・組織の制御機構の破綻に伴う発育不全等の症状が認められ、これらの現象は単なる骨代謝の異常だけでは説明がつかない。従って、破骨細胞が何らかのメカニズムによって他臓器を制御している可能性は非常に高いと考えられた。

申請者が作成した骨吸収不全のため大理石骨病を呈する破骨細胞特異的ノックアウトマウスは、生後1年の時点でコントロールマウスと比較して体重増加の抑制されており、脂肪形成が顕著に抑制されていることを見出していたことから、破骨細胞が脂肪形成に関与する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

破骨細胞による脂肪形成メカニズムの存在について詳細な解析を通じて証明し、その分子メカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

生後10週の破骨細胞特異的ノックアウトマウスを用いて、体重変化や摂食量のほか、血液検査等を実施した。また、ノックアウトマウス由来の破骨細胞における様々な遺伝子発現を定量PCRにて発現解析を行った。また、生後4週より高脂肪食負荷を10週間に渡ってかけ、体重変化や血液検査等を実施した。

## 4. 研究成果

破骨細胞特異的ノックアウトマウスの経時的な体重推移について、1週ごとに生後25週まで計測を行った。野生型およびコントロールマウスは週齢を重ねるごとに体重増加する一方、破骨細胞特異的ノックアウトマウスの体重増加は、野生型およびコントロールマウスと比較して、顕著に体重の増加が抑制されることを確認した。また、高脂肪食負荷後10週で、野生型およびコントロールマウスは顕著な体重増加を示す一方、破骨細胞特異的ノックアウトマウスの体重増加は抑制されていることが判明した。これらの実験において全てのマウス群において摂食量の違いは認められなかった。さらに摂食後の血中レプチン量に違いは認められなかった。また、この時の全てのマウス群の空腹時血糖値に違いは認められなかったが、グルコース負荷後の血糖値低下は野生型およびコントロールマウスと比較して破骨細胞特異的ノックアウトマウスでは速やかに低下した。これらの結果は、破骨細胞特異的ノックアウトマウスにおいて、本来であれば糖代謝の破綻を来すような状況下においても、正常な糖代謝が行われていることを示唆しており、破骨細胞と糖代謝の関連性の存在を明確にした。

では、破骨細胞が如何なるメカニズムで生体における糖代謝を制御しているのだろうか。その分子メカニズムの解明を試みるため、破骨細胞の培養上清を生体内の糖代謝の中心を担う筋細胞、脂肪細胞、肝細胞、膵細胞等の分化培養系に添加し、その細胞分化・機能について解析を行ったが、明らかな変化

は認められなかった。しかし、遺伝子発現解析を行ったところ、筋分化に関わる因子の発現変動が認められ、筋分化にたいして何らかの影響を与える可能性が示唆された。興味深いことにこの発現変動は、ノックアウトマウス由来の培養上清を用いた際には、効果がキャンセルされたことから、筋分化に何らかの影響を及ぼす破骨細胞由来の因子の存在が示唆された。そこで、破骨細胞から産生される分泌タンパク質の発現について、網羅的な解析を実施した。分泌タンパク質として、タンパク質データベースよりシグナル配列を持ち、かつ膜貫通ドメインを持たない分子を抽出し、これらの分子の破骨細胞における発現が高い分子を解析候補とした。今回、破骨細胞が産生する分泌タンパク質として、約50の分子を解析候補とした。また、破骨細胞特異的ノックアウトマウス由来の破骨細胞における遺伝子発現情報を得て、野生型破骨細胞との発現比較をすることにより、破骨細胞による糖代謝制御を担う分子の同定を実施中である。

本研究成果は骨吸収を担う破骨細胞が何らかの臓器・組織を制御することにより、肥満に関与していることを明らかにした。予備的データではあるが、破骨細胞が筋分化と関連する知見も得られ、破骨細胞の機能いじょうが筋肉によるエネルギー代謝経路を促進する可能性もある。現在、破骨細胞から産生される分泌タンパク質に注目して解析を行っているが、今後、さらに詳細な解析を行うことで、そのメカニズムの解明に到ると考えられる。また、そのメカニズムに基づいて、例えば分泌因子の組換えタンパク質や、中和抗体などを用いることにより、将来的な肥満や糖尿病といったメタボリックシンドロームに対する治療薬の開発につながることを期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

原著論文

1, Al-Bari A, Shinohara M, Nagai Y, Takayanagi H, Inhibitory effect of chloroquine on bone resorption reveals the essential role of lysosomes in osteoclast differentiation and function, **Inflamma Regener**, 32, 222-231, 2012

2, Shinohara M, Nakamura M, Masuda H, Kadono Y, Iwasawa M, Nagase Y, Ueki K, Kadowaki T, Sasaki T, Kato S, Nakamura H, Nakamura K, Tanaka S, Takayanagi H,

Class IA Phosphatidylinositol 3-kinases regulates osteoclastic bone resorption through Akt-mediated vesicle transport in mice, **J Bone Miner Res**, 27, 2464-2475, 2012

3, Otero K#, Shinohara M#, Zhao H#, Cella M, Gilfillan S, Colucci A, Faccio R, Ross FP, Teitelbaum SL, Takayanagi H, Colonna M. TREM2 and  $\beta$ -Catenin Regulate Bone Homeostasis by Controlling the Rate of Osteoclastogenesis. **J Immunol**, 188, 2612-2621, 2012 (#equal contributors)

4, Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H, Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. **Nat Med**, 17, 1473-1480, 2011

〔学会発表〕(計 1 1 件)

招待講演

1, 「骨破壊抑制を目指す破骨細胞研究」、第 33 回日本炎症・再生医学会(シンポジウム)、博多、平成 24 年 7 月

一般発表

3, 永井裕介、篠原正浩、Al-Bari Md. Abdul Alim、高柳広、リソソームの酸性化は破骨細胞分化に必要である、第 30 回日本骨代謝学会、東京、平成 24 年 7 月

4, 永井裕介、篠原正浩、高柳広、クロロキンによる破骨細胞分化抑制、第 33 回日本炎症・再生医学会、博多、平成 24 年 7 月

5, 古賀貴子、篠原正浩、高柳広、Suppression of bone formation by an axon guidance protein, semaphorin4D、第 34 回日本分子生物学会、横浜、平成 23 年 12 月

6, Al-Bari MD. Abdul Alim、篠原正浩、高柳広、Lysosomal function associated with osteoclast differentiation、第 34 回日本分子生物学会、横浜、平成 23 年 12 月

7, Shinohara M, Tanaka S, Takayanagi H; The role of classIA PI3K in osteoclasts, 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, USA, September, 2011

8, Negishi-Koga T, Shinohara M, Takayanagi H, Protection of bone loss by

targeting semaphorin 4D expressed by osteoclasts, 33th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, San Diego, USA, September, 2011

9, 古賀貴子、篠原正浩、高柳広、セマフォリン 4D を介した破骨細胞による骨形成抑制制御、第 28 回日本骨代謝学会、大阪、平成 23 年 7 月

〔図書〕(計 3 件)

総説

1, 篠原正浩、高柳広、「骨免疫学の最前線」、腎と骨代謝、vol. 25、no. 2、99-106 (8 ページ)、2012

2, 篠原正浩、高柳広、「骨免疫学」、炎症と免疫、vol. 20、no. 2、105-108 (4 ページ)、2012

〔産業財産権〕

○出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠原 正浩 (SHINOHARA MASAHIRO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号: 60345733

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：