

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462380

研究課題名(和文)ロコモティブ症候群とメタボリック症候群のクロストークの分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Molecular insights of the crosstalk between locomotive and metabolic syndromes

研究代表者

松本 征仁 (Matsumoto, Masahito)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：90321819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ロコモティブ症候群とメタボリック症候群のクロストークの分子機序の解明は糖尿病患者の骨の脆弱性が明確であることから重要である。我々は膵内分泌細胞の分化に重要な転写因子Pax6が、破骨細胞分化を抑制すること、CRFが炎症性サイトカインによる膵細胞の細胞死に対する保護作用があること、Netrin-4が破骨細胞分化を抑制すること、骨芽細胞分化において細胞周期関連遺伝子上流のDNAメチルによる発現抑制が寄与することを見出した。従ってPax6の転写やエピジェネティクス機能性を調節することにより、骨代謝疾患と糖代謝疾患に必須な未知のクロストークを制御する新たな治療標的の探索や同定に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Elucidation of molecular insights underlying the crosstalk between metabolic and locomotive syndromes is important since it is clearly shown that most of diabetic patients accompanies with vulnerability of their bones, resulting from the bone destruction. Herein we found several evidence as below. First, a transcription factor Pax6, is critical for pancreatic endocrine cell differentiation, attenuates the differentiation of osteoclasts. Second, a neuropeptide CRF suppresses apoptosis of pancreatic beta cells treated with inflammatory cytokines. Third, endothelial cell-derived Netrin-4 inhibits osteoclastogenesis. Lastly, the gene expression of a limited sets of cell cycle regulators mediated by DNA methylation might contribute to osteoblast differentiation. Control of Pax6 transcription and epigenetic functionality therefore may lead to explore and identify novel therapeutic targets upon unknown crosstalk essential for metabolic syndromes both of bone and glucose.

研究分野：糖代謝、骨代謝、分子生物学

キーワード：骨代謝 糖代謝 エピジェネティック 転写因子

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の骨脆弱性が指摘されていることから、「メタボ」と「ロコモ」の相互作用の理解は、両疾患の予防法と治療法の開発の観点からも重要である。例えば、脂肪細胞から産生されるレプチンは中枢神経系を介してグルコース代謝を促進すると共に (Kamohara S, *Nature* 1997)、骨代謝においては骨形成を抑制している (Takeda S, *Cell* 2002)。また、骨芽細胞から分泌される骨形成因子のオステオカルシンは膵細胞の増殖・インスリン分泌・インスリン感受性にも必要であることが報告されている (Lee NK, *Cell* 2007)。脂肪細胞から分泌されるアディポネクチンは血液中に分泌され II 型糖尿病の主因であるインスリン抵抗性と肥満を改善すると共に (Yamauchi T, *Nature Med.* 2001; Iwabu M, *Nature* 2010)、骨代謝では細胞内リン酸化酵素である AKT1 を介して破骨細胞の分化を阻害することも報告されている (Tu Q, *J. Biol. Cell.* 2001)。近年、筋細胞から単離・同定されたイリシン (Irisin) は運動することによって筋肉から血中への産生・分泌が促され、肥満や耐糖能を改善し、糖尿病の新規治療薬として期待されている (Boström P, *Nature* 2012)。一方、イリシンが骨形成因子 Osterix の上昇を介して骨芽細胞の分化を促進すること、さらに破骨細胞分化誘導因子 RANKL による破骨細胞形成を抑制することもごく最近報告された (Zhang J, *ASBMR* 2012, abstract)。このことは、運動によって筋細胞から誘導されるイリシンが糖代謝の改善のみならず、骨粗鬆症などの「ロコモ」の改善にも寄与する可能性を示唆している。このように、糖代謝と骨代謝の両者を調節する因子は枚挙にいとまがない。これまで本研究代表者は、細胞内シグナル伝達経路 p38MAP キナーゼ (p38) が破骨細胞の分化に必須であることを見出している (Matsumoto M, *J. Biol. Chem.* 2000, 2004)。また p38 変異型ノックインマウスを用いた坐骨神経損傷モデルにおいて、歩行困難な運動器の回復に p38 を介した TNF- α など炎症性サイトカインの産生が必要であることを示している。一方で p38 が酸化ストレスによる膵細胞の生存に必要である (Kondo T, *Mol. Endocrinol.* 2009) ことから、神経系・骨代謝の運動器と糖代謝のネットワークの存在が示唆される。最近、本研究代表者らは、神経ペプチド・コルチコトロピン放出因子 (CRF) が、グルコース濃度依存的にヒトとマウス膵島からインスリンの分泌を促進することを見出した (Huising M, *PNAS* 2010, *Endocrinol.* 2011)。また、CRF ファミリーのウロコルチン (Ucn) が CRF 受容体 (CRFR2) を介して破骨細胞の分化を阻害することも明らか

かにしている (Defrance DJ, *Endocrinol.* 1992)。さらに、CRF ファミリーの Ucn が糖代謝の調節を行う膵内分泌細胞の分化に重要な転写因子 Pax6 の発現を上昇させること、レトロウイルスを用いて Pax6 を破骨細胞に過剰に発現させると、*in vitro* で破骨細胞の分化が顕著に抑制されることを見出した。

2. 研究の目的

CRF ファミリーが *in vivo* と *in vitro* において膵細胞からのインスリン分泌を促進し高血糖を改善して糖代謝の機能に寄与するのみならず、骨代謝では *in vitro* で破骨細胞の分化を抑制することが示された。これらの研究結果から、研究代表者らは、CRF ファミリーが *in vivo* において転写因子 Pax6 を介して骨吸収を抑制する神経ペプチドとして生体内で働いていると予測している。本研究は、神経ペプチド CRF ファミリーによって調節を受けている可能性のある Pax6 ならびに分泌因子や DNA メチル化による制御に着目し、糖代謝と骨代謝のクロストークによる相互作用の分子メカニズムを解明することを目的としている。

(1) 転写因子 Pax6 は膵臓や眼神経のさまざまな細胞分化に重要な働きをすることが遺伝子欠損マウスおよび Pax6 変異モデルで証明されている。これまでに我々は、Pax6 がマクロファージ・破骨細胞に発現し、破骨細胞マーカー遺伝子の発現を制御していることを新たに見出した。本研究では Pax6 による細胞内転写制御因子を介した破骨細胞に対する作用機序を明らかにすることを目的としている。

(2) 破骨細胞は様々な因子によって制御されており、微小環境における外部因子によって調節されている可能性が示唆されている。神経軸索因子である Netrin4 は血管内皮からも分泌されていることから、破骨細胞への作用の可能性が考えられた。近年 DNA メチル化などのエピジェネティクス制御が様々な細胞分化に寄与することが報告されている。このため、ロコモティブ症候群の予防・治療コンセプトに不可欠である骨形成に重要な骨芽細胞の新たな調節システムとして、我々は DNA メチル化に着目し、新たな標的因子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 8-12 週齢の C57B/6J マウス大腿骨より単核骨髄細胞を採取し M-CSF の存在下に 3 日間培養後 RANKL 処理を 5 日間行った後、破骨細胞の分化を誘導した。RANKL による分化誘導前および分化誘導した細胞から total RNA を回収した。Total RNA より cDNA 合成後、TRAP、カテプシン遺伝子などの破骨細胞マーカー遺伝子特異的プライマーによって PCR 反応を行った。TRAP 遺伝子プロモーター下流にルシ

フェラーゼ遺伝子をコードした TRAP-Luc レポーターベクターと Pax6 発現ベクターを用いて、HEK293 細胞へ遺伝子の導入を行い、24 または 48 時間後に細胞を回収し、レポーターアッセイを行い、Pax6 による TRAP 遺伝子の転写活性を測定した。

(2) レトロウイルスの調製

パッケージング細胞 Plat-E へ Lipofectamine2000 を用いて pMXs ベクター (pMXs-GFP, pMXs-Pax6, pMXs-変異型 Pax6) の遺伝子導入を行った。48-72 時間後、培養上清を回収し、0.45um フィルターメンブレンで濾過後、破骨細胞前駆細胞に培養上清を添加しレトロウイルスを感染させた。

(3) 間葉系幹細胞株 ST2 細胞を用いた骨芽細胞分化誘導 ST2 細胞に BMP4(50 または 100ng/ml)処理し、3 日から 7 日間培養を行った。分化誘導後、アルカリフォスファターゼ染色を行い、骨芽細胞分化の評価を行った。分化誘導前後の細胞より total RNA を抽出し、cDNA 合成後、定量 PCR 法によって、Runx2, オステリクス, オステオカルシンなどの骨芽細胞マーカー遺伝子の発現量を評価した。

4. 研究成果

(1) 瞬内分泌細胞の分化に重要な転写因子 Pax6 による破骨細胞の分化抑制の分子機序破骨細胞のマスター制御因子 NFATc1 の TRAP 遺伝子の転写活性が、PAX6 によって阻害される。しかしその機序は、興味深いことに Pax6 が直接 NFATc1 に結合するのではなく、Groucho 関連遺伝子 Grg6 が選択的に介在することが明らかとなった。PAX6 の転写機能領域欠失変異体には、NFATc1 の転写活性化能を阻害できないことから、Pax6 の C 末端ドメインに Grg6 が介在する可能性が示唆された。我々の Pax6 を回す破骨細胞の自己管理システムの仮説は、レトロウイルスによる Pax6 の過剰発現によって破骨細胞の分化が抑制される事実より支持された。従って、破骨細胞内因子である Pax6 は過剰な骨破壊が起こらないよう自身の細胞を監視し破骨細胞の自己管理システムに寄与し正常な骨代謝の平衡状態を調節していることが示唆され、破骨細胞が多く存在するマウス大腿骨切片の成長板近傍に Pax6 が局在することからも破骨細胞特異的 Pax6 欠損マウスを用いた in vivo における Pax6 の生理機能の検証が待たれる。

(2) その他の破骨細胞制御因子の可能性血管内皮細胞由来の軸索制御因子 Netrin-4 が破骨細胞を阻害することが明らかとなった。近年、他の神経軸索ガイダンス因子 Semaphorin3A が破骨細胞の分化を調節することが報告され、神経系と骨とのクロストーク

の存在を強く示唆する重要な知見である。

この他、DNA の塩基置換を伴わないメチル化修飾によるエピジェネティックな調節がさまざまな細胞分化に関与することが報告されているため、我々は間葉系幹細胞 ST2 細胞を用いて、骨芽細胞分化に DNA メチル化が着よする可能性を検討した。DNA メチル化阻害剤を前処理した ST2 細胞に BMP4 処理した結果、容量依存的に骨芽細胞の分化が抑制されることを見出した。骨芽細胞マーカー遺伝子であるオステオカルシン、Osterix, Runx2 などの遺伝子の発現が DNA メチル化阻害剤処理によって低下することが定量 PCR 法によって観察された。一方、ヒストンメチル化阻害剤では、BMP4 刺激による骨芽細胞分化に影響を受けなかったことより、DNA メチル化が選択的に骨芽細胞分化に寄与すると考えられた。DNA メチル化の標的遺伝子を同定するため、DNA マイクロアレイ解析を実施した結果、細胞周期を調節する興味深い遺伝子群を同定した。これらの候補遺伝子の中で、ヒト遺伝子において変異が起こると小頭症などの骨代謝疾患の病態を呈するものに着目した。レトロウイルスによる過剰発現させた ST2 細胞において、BMP4 処理による骨芽細胞分化が阻害されることを見出した。以上より、骨芽細胞分化の過程において、DNA メチル化が誘発される細胞周期調節関連因子の発現が抑制されることが、骨芽細胞分化を効率良く誘導できる必要条件であることが判明した。

これまでに我々は、破骨細胞分化に必須な p38MAP キナーゼ(p38)変異モデルマウスを用いて野生型に比較して骨吸収能が低下すること、神経損傷の回復による神経再生に p38 が必要であり、破骨細胞形成に必要な p38 を回すシグナル伝達と破骨細胞形成を抑制する転写因子 Pax6 との関係性について興味深いと考えている。

以上より、本研究成果によって破骨細胞分化の制御因子である Pax6 を介する自己管理システムによって、過剰な骨破壊による骨粗鬆症などの骨代謝疾患が発症しないよう破骨細胞を監視して正常な骨代謝の平衡関係の維持に寄与していると考えられる。一方、DNA メチル化による骨芽細胞分化の重要性は、細胞周期と骨形成との緊密な相互調節システムの存在を示唆しており、今後さまざまなエピジェネティクス制御を介する骨形成の分子機序の解明に繋がると予測される。さらに、Pax6 をはじめとする骨代謝と糖代謝の両側面の恒常性の維持に重要な役割を果たす因子の存在と、その均衡システムの破綻が病的な糖尿病などの糖代謝疾患(メタボリック症候群)や骨粗鬆症などの骨代謝疾患を含むロコモティブ症候群の発症原因となることが明らかとなり、これらの予防または創薬標的

の同定とその機能解明によって新たな分野の発展に繋がることが期待される。

<引用文献>

1. Komahara S, *Nature* 389, 374-7, 1997
2. Takeda S, *Cell* 111, 305-17, 2002
3. Lee NK, *Cell* 130, 456-69, 2007
4. Yamauchi T *Nat.Med.*7, 941-6, 2001
5. Iwabu M, *Nature* 464, 1313-9, 2010
6. Tu Q, *J.Biol.Chem.* 286, 12542-53, 2001
7. Bostrom P, *Nature* 481, 463-8, 2012
8. Matsumoto M, *J.Biol.Chem* 275, 3155-61, 2000
9. Matsumoto M, *J.Biol.Chem* 279, 45969-79, 2004
10. Kondo T, *Mol.Endocrinol.* 23, 1281-90, 2009
11. Huisling M, *PNAS* 107, 912-7, 2010
12. Huisling M, *J.Endocrinol.* 152, 138-50, 2010
13. Defranco DJ, *Endocrinol.* 131, 114-21, 1992

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Sato T, Enoki Y, Sakamoto Y, Yokota K, Okubo M, Matsumoto M, Hayashi N, Usui M, Kokabu S, Mimura T, Nakazato T, Araki N, Fukuda T, Okazaki Y, Suda T, Takeda S, Yoda T. Donepezil prevents RANK-induced bone loss via inhibition of osteoclast differentiation by downregulating acetylcholinesterase. *Helixyon* 1:1, e00013, 2015, 査読有

doi:10.1016/j.helixyon.2015.e00013
Sugiyama T, Torio T, Sato T, Matsumoto M, Kim YT, Oda H. Involvement of skeletal fragility by teriparatide in adult osteoporosis patients: a novel mechanostat-based hypothesis for bone quality. *Frontiers in Endocrinol.* 2015 Jan 30;6:6, 2015, 査読有

doi: 10.3389/fendo.2015.00006.
Blaabjerg L, Christensen GL, Matsumoto M, Huisling MO, van der Meulen T, Gillestrup N, Vale W. CRFR1 activation protects against cytokine-induced beta cell death. *J.Mol.Endocrinol.*, 53(3), 417-27, 2014, 査読有 doi: 10.1530/JME-14-0056.

Enoki Y, Sato T, Tanaka S, Iwata T, Usui M, Takeda S, Kokabu S, Matsumoto

M, Okubo M, Nakashima K, Yamato M, Okano T, Fukuda T, Chida D, Imai Y, Yasuda H, Nishihara T, Akita M, Oda H, Okazaki Y, Suda T, Yoda T. Netrin-4 derived from murine vascular endothelial cells inhibits osteoclast differentiation in vitro and prevents bone loss in vivo. *FEBS Lett.* 27;588(14), 2262-9, 2014, 査読有 doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.009.
Kogawa M, Hisatake K, Atkins GJ, Findlay DM, Enoki Y, Sato T, Gray PC, Wada S, Kato N, Fukuda A, Katayama S, Tsujimoto M, Yoda T, Suda T, Okazaki Y, Matsumoto M. The Paired-box Domain Transcription Factor Pax6 Binds to the Upstream Region of the TRAP Gene Promoter and Suppresses RANKL-induced Osteoclast Differentiation. *J.Biol.Chem.*, 288:43, 31299-312, 2013, 査読有

[学会発表](計 11 件)

Okubo M, Matsumoto M, Mizuno Y, Sato T, Yoda T, Okazaki Y. **Epigenetic control of osteoblast differentiation via DNA methylation** 第 38 回日本分子生物学会年会(BMB2015) 2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸国際会議場(兵庫県, 神戸市)

松本征仁 鈴木聡美 八塚由紀子 菅原泉 仲地豊 二階堂愛 笹川洋平 安波洋一 佐藤毅 Wylie Vale 岡崎康司 体細胞から胚細胞へのダイレクトリプログラミング 第 13 回 RCGM フロンティアシンポジウム 2015 年 10 月 30 日 31 日, 埼玉医科大学 30 周年記念講堂(埼玉県, 日高市)

菅原泉 松村瞭 佐藤達也 松谷智子 相澤絵美 岩長ゆずる 松本征仁 三谷幸之介 岡崎康司 Insulin promoter-Venus/NGN3 promoter-mCherry ダブルノックイン iPS 細胞を用いた細胞分化誘導の解析 第 13 回 RCGM フロンティアシンポジウム 2015 年 10 月 30 日 31 日, 埼玉医科大学 30 周年記念講堂(埼玉県, 日高市)

大久保正彦 松本征仁 榎木祐一郎 佐藤毅 須田立雄 岡崎康司 依田哲也 DNA のメチル化を介した骨芽細胞分化のエピジェネティクス制御 第 33 回日本骨代謝学会, 2015 年 7 月 23-25 日, 京王プラザホテル(都内, 新宿区)

佐藤毅 大久保正彦 榎木祐一郎 古株彰一郎 松本征仁 杉山聡宏 依田哲也 アセチルコリンエステラーゼ阻害剤であるドネペジルは、破骨細胞の形成と機能を強力に抑制し、RANKL 誘導性の急速な骨量減少を防止する第 33 回日本

骨代謝学会, 2015年7月23-25日, 京王プラザホテル(都内, 新宿区)
大久保正彦 松本征仁 甲川昌和 八塚由紀子 榎木祐一郎 佐藤毅 片山茂裕 須田立雄 岡崎康司 依田哲也 新たな破骨細胞分化抑制因子としてのPax6の機能解析 第69回日本口腔科学会学術集会 2015年5月13日-15日, 大阪国際会議場(大阪府, 大阪市) 優秀ポスター賞

Matsumoto M, Sugahara-Yamashita Y, Suzuki S, Kanasaki-Yatsuka Y, Yasunami Y, Vale W, Okazaki Y. Useful models of pancreatic endocrine progenitor cell line Tec-3p and dual-labeled Ngn3-eGFP/Ins-DsRed2 mice for the identification of the key driving regulators during pancreatic endocrine differentiation. 9th Metabolic Syndrome, Type 2 Diabetes and Atherosclerosis Congress, MSDA2014, Sept.12-14th, 2014, 京都国際会議場(京都府, 京都市)

Matsumoto M, SugaHara Y, Suzuki S, Yatsuka Y, Vale W, Okazaki Y. Possible involvement of reprogramming factors identified upon DNA microarray analysis in the efficient generation of pancreatic islet-like cluster 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25日-27日, パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)
Kogawa M, Hisatake K, Atkins GJ, Findlay DM, Enoki Y, Sato T, Gray PC, Wada S, Kato N, Fukuda A, Katayama S, Tsujimoto M, Yoda T, Suda T, Okazaki Y, Matsumoto M. The Paired-box Domain Transcription Factor Pax6 Binds to the Upstream Region of the TRAP Gene Promoter and Suppresses RANKL-induced Osteoclast Differentiation. ASBMR Oct. 3-8, 2013 USA(Maryland)

Enoki Y, Sato T, Kokabu S, Okubo M, Iwata T, Usui M, Fukuda T, Takeda S, Matsumoto M., Yoda T. Vascular endothelial cells inhibit osteoclastogenesis by netrin 4 through DSCAM receptor 2013 ASBMR annual meeting Oct.4th - 7th, USA(Maryland)

Matsumoto M, Kogawa M, Hisatake K, Atkins GJ, Findlay DM, Enoki Y, Sato T, Gray PC, Kanasaki-Yatsuka Y, Anderson PH, Wada S, Kato N, Fukuda A, Katayama S, Tsujimoto M, Yoda T, Suda T, Okazaki Y. Self-limiting system of osteoclast differentiation

by the Paired-box Domain Transcription factor Pax6 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3日-6日, 神戸国際会議場(兵庫県, 神戸市)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)
名称: 膵内分泌細胞及びその製造方法、並びに分化転換剤
発明者: 松本征仁、岡崎康司、菅原泉
権利者: 埼玉医科大学
種類: 特願
番号: 2014-137719
出願年月日: 2014年7月3日
国内外の別: 国内

名称: 膵内分泌細胞及びその製造方法、並びに分化転換剤
発明者: 松本征仁、岡崎康司、菅原泉
権利者: 埼玉医科大学
種類: PCT 出願
番号: PCT/JP2015/069296
出願年月日: 2015年7月3日
国内外の別: PCT

取得状況(計 1 件)

名称: METHODS FOR INCREASING INSULIN SECRETION BY CO-STIMULATION OF CORTICOTROPIN-RELEASING FACTOR RECEPTORS
発明者: Mark Huisling, Masahito Matsumoto, Wylie Vale
権利者: Salk Institute
種類: N/A
番号: US9,314,506 B2
取得年月日: 2016年4月19日
国内外の別: 米国

〔その他〕

ホームページ等
http://www.saitama-med.ac.jp/genome/Div05_FGSM/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
松本 征仁 (MATSUMOTO MASAHIITO)
埼玉医科大・医学部・講師
研究者番号: 90321819

(2) 研究分担者
仲地 豊 (NAKACHI YUTAKA)
埼玉医科大・医学部・助教
研究者番号: 10522097

須田 立雄 (SUDA TATSUO)
埼玉医科大・医学部・客員教授
研究者番号: 90014034

(3)連携研究者

菅原 泉 (SUGAHARA IZUMI)
埼玉医科大・医学部・研究員
研究者番号：10633000

岡崎 康司 (OKAZAKI YASUSHI)
埼玉医科大・医学部・教授
研究者番号：80280733

安波 洋一 (YASUNAMI YOICHI)
福岡大学・医学部・教授
研究者番号：00166521

佐藤 毅 (SATO TSUYOSHI)
福岡大学・医学部・准教授
研究者番号：60406494