

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463202

研究課題名(和文) 骨組織による血糖値調節機構の解明 スフィンゴミエリンの重要性

研究課題名(英文) Sphingomyelin regulates blood glucose levels by bone tissue

研究代表者

吉川 美弘 (YOSHIKAWA, Yoshihiro)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70434793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では血糖値を調節する臓器として骨組織に着目し、特に骨芽細胞におけるスフィンゴミエリンの役割の解明をするために実験を行った。骨芽細胞からスフィンゴミエリン合成酵素1または2をノックダウンすると骨芽細胞分化や石灰化が抑制された。さらに骨芽細胞を介した破骨細胞分化も抑制した。これらの結果から、骨芽細胞の機能が抑制されたことが明らかになり、骨芽細胞による血糖値調節に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The skeleton has been shown recently to regulate glucose metabolism through an osteoblast-specific hormone. Here, we investigated the role of sphingomyelin in osteoblasts. Knockdown of sphingomyelin synthase 1 or 2 resulted in inhibited osteoblast differentiation and reduced osteoclast formation. We found that sphingomyelin synthase affected osteoblast function, and we suggested sphingomyelin synthase effects to regulate glucose metabolism by osteoblast.

研究分野：生化学

キーワード：骨代謝

1. 研究開始当初の背景

骨組織を中心とした多臓器間ネットワークによる血糖値調節機構については骨芽細胞がオステオカルシンを分泌し、膵臓のインスリン分泌、脂肪細胞でのアディポネクチン分泌を促進することにより糖代謝を制御することがわかっている。また、スフィンゴ脂質は生体膜の構造維持にかかわる脂質と考えられてきたが、近年の著しい科学技術の発展とともに、多くのスフィンゴ脂質および代謝酵素が生体および細胞機能を制御することがわかってきた。我々はスフィンゴミエリン欠失マウスリンパ球様細胞において、SMS1 の強制発現が形質膜スフィンゴミエリン量を増加させ、Fas1 リガンドに応答したセラミド生成およびセラミド依存的なアポトーシス誘導を増強し、歯周病などの炎症状態が悪化することを示した。さらに糖尿病の発症原因の1つとして細胞内のスフィンゴ脂質の恒常性維持に重要な役割を担っているスフィンゴミエリン合成酵素(SMS)が欠失することや酸化ストレスの上昇により、骨密度が減少することを見いだした。

2. 研究の目的

本研究は骨芽細胞の機能を明らかにし、骨組織を中心とした多臓器間ネットワークによる血糖値調節機構にどのようにSMSが関与しているかを明らかにし、スフィンゴミエリンをターゲットにした糖尿病患者の歯周病治療応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1)骨芽細胞は1,25(OH)₂D₃の刺激によりRANKLを発現し、破骨細胞の分化を促進する。そして、この作用はBMP-2との共刺激でさらに促進されることが報告されている。そこで、共刺激による骨芽細胞の破骨細胞分化因子発現のメカニズムをSmad1に着目し検討する。

(2)in vitroで骨芽細胞の機能発現におけるSMSsの役割を明らかにする。

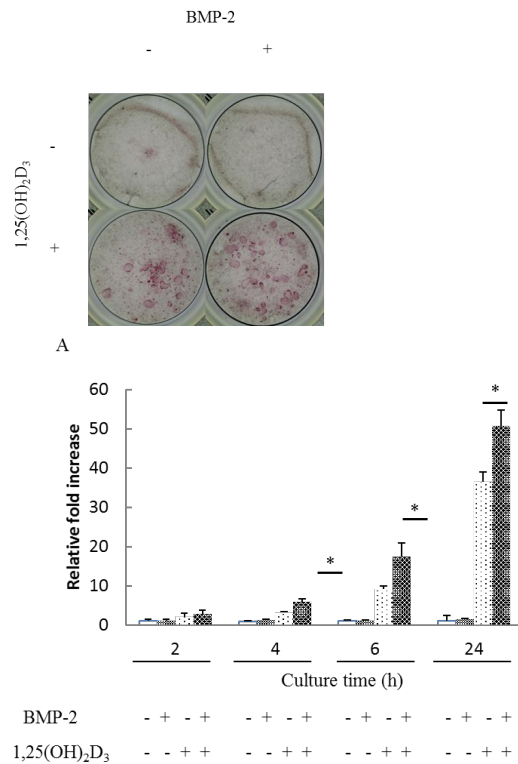
SMSsが骨芽細胞の機能発現に影響を及ぼしていることは予備実験により考えられる。そこで、SMSsが消失した骨芽細胞を単離し、この細胞の機能発現を確認し、骨芽細胞分化に影響を及ぼすか検討する。

(3)in vitroで破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化へのSMSsの役割を明らかにする。

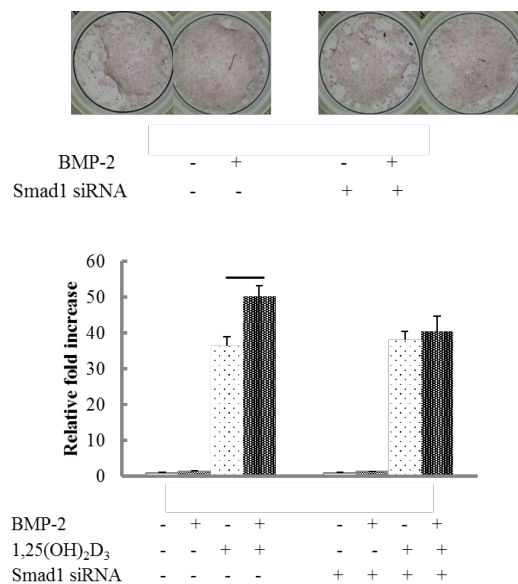
オステオカルシンは低カルボキシル化した分子がホルモンとしての働きを示す。低カルボキシル化は破骨細胞の活性化によって生じるので、SMSsが消失した骨芽細胞と骨髄細胞を共培養することにより、破骨細胞への分化を調べ、オステオカルシンの低カルボキシル化に影響を及ぼすか検討する。

4. 研究成果

1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁸M)やBMP-2 (100 ng/mL)の刺激により、破骨細胞分化は1,25(OH)₂D₃単独刺激に比べて促進した。さらにRANKL mRNA発現は有意に高値を示した。(Fig.1)

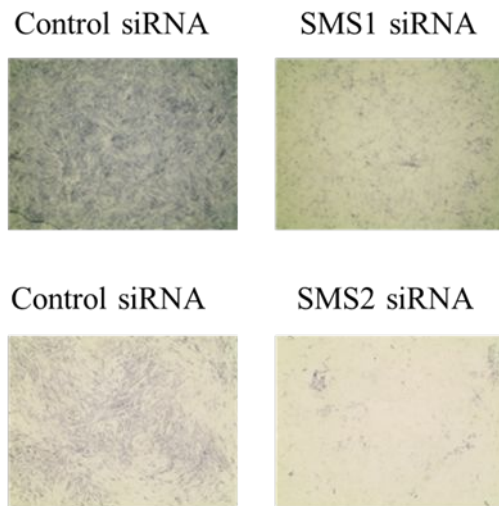


一方、Smad1をノックダウンした細胞では、コントロール群に比べて、破骨細胞分化、RANKL mRNA発現は減少した。(Fig.2)

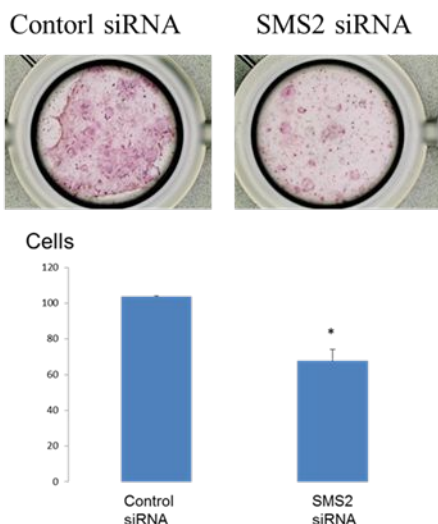


以上より、骨芽細胞の機能としてBMP-2がSmad1を活性化させることで、1,25(OH)₂D₃存在下でのRANKL mRNA発現を上昇させ、その結果、骨芽細胞による破骨細胞分化が促進すると考えられた。

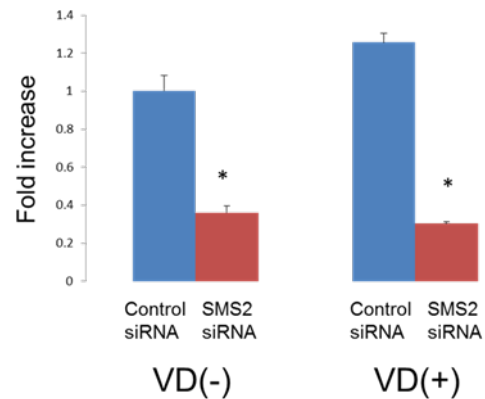
SMS1 ノックアウトマウスにおいて、骨量の変化を確認し、in vitro 実験において SMS1 をノックダウンした骨芽細胞は分化が抑制されていた。同様に SMS2 をノックダウンした骨芽細胞は骨芽細胞分化や石灰化が抑制されていた。(Fig.3)



次に SMS1 をノックダウンした骨芽細胞を介した破骨細胞分化について酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色法を用いて実験を行った。しかし、破骨細胞分化に関しては、コントロールと比べて、染色に明らかな差が見られなかった。SMS2 をノックダウンした骨芽細胞を介した破骨細胞分化では、抑制していることが確認された。(Fig.4)



また SMS2 をノックダウンした骨芽細胞において、破骨細胞分化因子である RANKL mRNA 発現が抑制されているのが確認された。(Fig.5)



これらの in vitro 実験の結果から、SMS1 が骨芽細胞分化に影響を与えることにより SMS1 ノックアウトマウスの骨量が増加する可能性が示唆され、SMS2 においてもノックアウトマウスでは骨量の差が見られなかったが、in vitro 実験では骨芽細胞の機能に影響があったので、何らかの影響を与えている可能性を示唆した。これらの内容は以下に示すように学会にて数回にわたり、発表し、国内外の研究者から一定の評価を得た。また、研究内容の一部をまとめた論文をそれぞれ国際誌に投稿して、いずれも掲載が確定した。

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)

Yoshikawa Y, Yoshizawa T, Domae E, Hieda Y, Takeyama A, Hirota S, Kawamoto A, Goda S, Tamura I, Kamada A, Komasa Y, Morita S, Yamagata K, Ikeo T. RNA interference-mediated knockdown of Smad1 inhibits receptor activator of nuclear factor B ligand expression induced by BMP-2 in primary osteoblasts. Arch Oral Biol. 査読有 2015 Sep;60(9):1319-26. doi: 10.1016/j.archoralbio.2015.06.001.

Taniguchi M, Tasaki T, Ninomiya H, Ueda Y, Kuremoto KI, Mitsutake S, Igarashi Y, Okazaki T, Takegami T. Sphingomyelin generated by sphingomyelin synthase 1 is involved in attachment and infection with Japanese encephalitis virus. Sci Rep. 査読有 2016 Nov 28; 6:37829.

Kitatani K, Taniguchi M, Okazaki T. Role of Sphingolipids and Metabolizing Enzymes in Hematological Malignancies. Mol Cells. 査読有 2015 Jun;38(6):482-95.

Taniguchi M, Okazaki T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to human disorders. Biochim Biophys Acta. 査読有 2014 May;1841(5):692-703. doi: 10.1016/j.bbaliip.2013.12.003.

〔学会発表〕(計5件)

Yoshikawa Y, Domae E, Kamada A, Ikeo T. Sphingomyelin Synthase 2 siRNA regulates osteoblast functions. 第58回歯科基礎医学学会学術大会.2016年8月26日.札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

吉川 美弘, 堂前 英資, 合田 征司, 田村 功, 鎌田 愛子, 池尾 隆. スフィンゴミエリン合成酵素(SMS)が骨に及ぼす影響. 第13回日本再生歯科医学学会学術大会・総会.2015年8月29日. 日本歯科大学新潟生命歯学部(新潟県・新潟市)

吉川 美弘, 池尾 隆. 骨芽細胞のスフィンゴミエリン合成酵素(SMS)2が破骨細胞分化に及ぼす影響. 第33回日本骨代謝学会学術集会.2015年7月23日. 京王プラザホテル(東京)

Yoshikawa Y, Domae E, Goda S, Tamura I, Kamada A, Ikeo T. Sphingomyelin synthase 2 promotes osteoclast differentiation by enhancing retinoid X receptor a expression. American Society for Bone and Mineral Research 2014 Annual Meeting.2014年9月14日.Houston(USA)

吉川 美弘, 廣田 秀逸, 渡辺 研, 岡崎 俊朗, 小正 裕, 池尾 隆. SMS1-KO マウスにおける骨代謝異常の解析. 第9回スフィンゴセラピー研究会.2014年7月18日. 山中温泉河鹿荘ロイヤルホテル(石川県・加賀市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉川 美弘 (YOSHIKAWA, Yoshihiro)
大阪歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 70434793

(2)研究分担者

池尾 隆 (IKEO, Takashi)
大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 40159603

岡崎 俊朗 (OKAZAKI, Toshiro)
金沢医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40233308

吉澤 達也 (YOSHIZAWA, Tatsuya)
熊本大学大学院・生命科学研究部・准教授
研究者番号: 40313530

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし