

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 30 日現在

機関番号：32707

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560393

研究課題名(和文)生活習慣病関連遺伝子、Elovl6が骨軟骨発達異常を来すメカニズムの解明

研究課題名(英文)Crucial role for Elovl6 during bone development in mice

研究代表者

嶋田 昌子(Shimada, Masako)

相模女子大学・栄養科学部・教授

研究者番号：30637369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Elovl6は炭素数12-16の飽和・一価不飽和脂肪酸の伸長を司る脂肪酸伸長酵素である。本研究では、Elovl6の骨の発達における役割とそのメカニズムについて検討した。Elovl6欠損新生児は、対照群と比較して小柄な骨格を示し、脛骨成長板は、Collagen10¹を発現する肥大層が厚かった。初代Elovl6欠損細胞ではCollagen10¹とその関連遺伝子の発現増加を認め、それらを制御するタンパク質の細胞内分布も変化していた。すなわち、Elovl6欠損による脂肪酸組成の変化は、少なくとも生直後までの成長板の発達に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Elongation of very long chain fatty acids (Elovl6) is a microsomal enzyme, which regulates the elongation of C12-16 saturated and monounsaturated fatty acids. To investigate a role of Elovl6 during bone development, we examined a skeletal phenotype of Elovl6 knockout (KO) mice. The Elovl6KO skeleton was smaller in size. Histological analysis showed an elongated length of hypertrophic chondrocyte layer expressing Collagen10a1 in Elovl6KO mice compared with controls. These results were presumably due to an accelerated differentiation of cells of the chondrocyte lineage. Furthermore, this elevated expression of Collagen10a1 of Elovl6-null chondrocytes was likely associated with increased levels of Foxa2/a3 and Mef2c mRNA expression. Relative increases in protein levels of nuclear Foxa2 and cytoplasmic HDAC4/5/7 were also observed in Elovl6 knockdown chondrocytes. Thus, our data are suggestive of a critical role of Elovl6 for proper development of embryonic growth plate.

研究分野：代謝学

キーワード：生活習慣病 骨・軟骨代謝

1、研究開始当初の背景: 日本社会の高齢化に伴い、高齢者の骨折、関節痛による活動性の低下、寝たきりなど要介護状態への移行に伴う医療・介護上の問題、関連する医療費の国家負担の増大に伴う経済的問題が深刻化している。近年、生活習慣病、特に、耐糖能異常と骨・軟骨組織代謝疾患（骨粗鬆症、変形性関節症など）の関連性が臨床および基礎研究において指摘されるようになってきた(BBA 2000; Dev Cell 2012; JBC 2012, JCI 2012; Cell 2007&2010; PNAS 2008)。研究代表者は、これまでに骨芽細胞特異的にカルパインを欠損しているマウスが骨吸収障害をともなう骨粗鬆症をきたし、普通食下で痩せていても、高脂肪食投与で、活性型オステオカルシンの低下によると考えられる体脂肪の増加と耐糖能異常をきたす事を明らかにした。しかし、脂質代謝異常・脂肪酸プロファイルの変化の骨・軟骨細胞の増殖・分化への影響に関しては未だほとんどわかっていない。本研究は、組織や血清中の脂肪酸組成の変化、軟骨から骨へ置換していく過程、破骨細胞が骨を破壊する過程においてどのような役割を果たしているのかを解明する事を目的としている点で、「脂質代謝の変化による骨・軟骨細胞の増殖・分化の制御」というアイデアにチャレンジする。具体的には、臨床的に生活習慣病の関連遺伝子であると指摘されている *Elovl6* に注目し、その遺伝子を欠損するマウスを用いて、組織および血清中の脂肪酸組成の変化が骨・軟骨代謝に及ぼす影響を胎生期から生後2週間までの時期で解析する。この欠損マウスは一部が胎生致死(Matsuzaka et al, Nat. Med, 2007)であり、また、生まれた仔も生涯を通じて体格が小さく、体重も有意に減少しており、*Elovl6* の胎生期の骨格を含めた発達における重要性が以前より指摘されていた。

2、研究の目的: 生活習慣病と有意の相関がみられる遺伝子、脂肪酸伸長酵素 “*Elovl6*” を欠損したマウスにおいて胎生期の成長板・骨の発達

に異常がみられる、という我々の最近の知見に基づき、詳細な表現型の検討と、作用メカニズムの解明を行うことを研究目的とする。

3、研究の方法:

1) *Elovl6* 欠損マウスの胎生期の骨・成長板の各発達段階での表現型を明らかにする。

【*Elovl6* 欠損胎児の成長板・骨の表現型の体系的解析】*Elovl6* 欠損胎児の成長板・骨の発育を体系的に解析する。

成長過程のモニター: E13.5 から E18.5 までの胎児の成長、patterning の異常を体重の変移、Alcian blue と Alizarin red による whole skeletal 染色により解析する。

軟骨細胞の増殖とアポトーシスの評価: 骨、軟骨細胞の増殖に関しては、BrdU を母親あるいは新生マウスに腹腔内注射し、2時間後に殺戮。E15.5, E18.5, 生直後の脛骨の連続パラフィン切片を作成し、BrdU のとりこみで細胞の増殖を評価する。また、TUNEL 染色でアポトーシスを評価する。

軟骨細胞の肥大の促進、遅延の評価: 軟骨細胞の肥大の始まる E14.5 および、軟骨から骨への置換がほぼ完了する生直後の脛骨の組織標本において、ISH の手法を用いておこなう。増殖から前期肥大軟骨細胞への移行は、副甲状腺ホルモン受容体、Indian Hedgehog の発現で判断する。肥大軟骨細胞は *Collagen Xα1*(*Col 10α1*) の発現で、骨芽細胞は、*Collagen Iα1*(*Col Iα1*) の発現により評価する。

【*Elovl6* 欠損の破骨細胞の数と機能異常に関する検討】

破骨細胞の数を TRAP 遺伝子の発現と染色で確認する。また、機能の検査として、骨髄から分離した mesenchymal 細胞の培養を行い、TRAP 染色により osteoclastogenesis を観察する。

2) *Elovl6* 欠損マウスの胎生期の骨・成長板の発達の表現型を来す機序の解析

マイクロアレイやメタボローム解析による網

羅的解析により、成長板の表現型をきたすメカニズムを解明し、検証する。

【*Elov16*の転写標的遺伝子の同定】

生後、3日目の新生マウスの肋軟骨から初代軟骨細胞を単離し、RNAを精製して、マイクロアレイ解析を行い、データから主要な遺伝子やパスウェーを抽出する。アレイの解析から選定した標的遺伝子の成長板での遺伝子発現、タンパク質発現をISH, Immunocytochemistryにより解析し、確認する。

【初代軟骨細胞による細胞増殖、分化の解析】

前項目同様に、初代軟骨細胞を対照群と *Elov16* 欠損マウスから採取し、細胞培養系で増殖・分化を解析する。確定した標的遺伝子のシグナル発現を real-time RT-qPCR で確認後、関連のシグナル伝達系などの背景となるメカニズムについて検索をおこなう。

4、研究成果：

正常のマウスでは、間葉系幹細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞で *Elov16* が発現している。

正常マウスの骨関連組織における *Elov16* 発現量を real-time PCR にて半定量化したところ、*Elov16* は骨形成に重要な軟骨細胞や骨芽細胞、そして、骨吸収を司る破骨細胞において、対照とした肝臓の約2~4倍の発現がみられた。

*Elov16*KO 新生マウスは骨格が小さく、体重や脛骨長も対照群に比べて有意に減少している。

全身の骨格形成を評価するために、whole skeletal 解析を行った。*Elov16*KO 新生マウスは、対照群に比べ全体的に骨格が小柄だった。

(Fig.1A)。また、体重、体長、脛骨長が、*Elov16*KO 新生マウスでいずれも有意に減少しており

(Fig.1B) *Elov16*KO 新生マウスは、対照群と比較して、小柄な体格を示した。

*Elov16*KO 新生マウスの成長板は、対照群に比較して有意に増殖軟骨細胞層が薄く、肥大軟骨細胞層が厚い。

近位脛骨組織の hematoxylin eosin(HE) 染色の

結果より、*Elov16*KO 新生マウスでは、成長板において、増殖軟骨細胞層 (C) が薄く、肥大軟骨細胞層 (H) が厚い傾向が観察された (Fig. 1C)。これらの層の厚みを、半定量化をしたところ、*Elov16*KO 新生マウスは対照群に比較して、有意に増殖軟骨細胞層が薄く、その一方で肥大軟骨細胞層が厚いことが明らかとなった (Fig. 1C~1D)。これらより、軟骨細胞の増殖、分化、吸収に異常があることが考えられた。

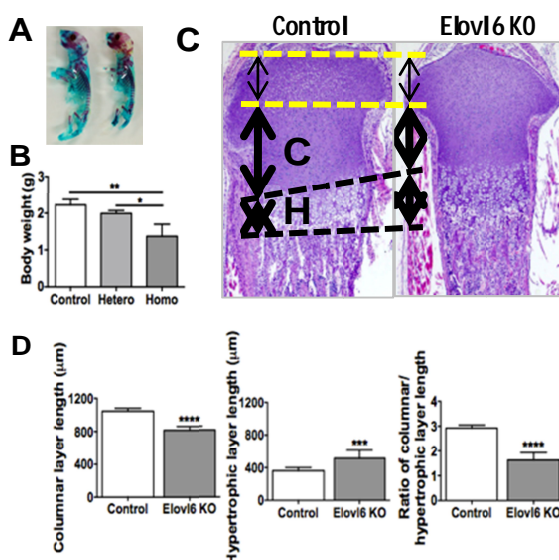


Fig.1. *Elov16*KO 新生マウスは骨格が小さく、体重や脛骨長も対照群に比較して有意に減少した。

*Elov16*KO 新生マウスは、*Col10* 1の発現が増加し、*Col1* 1の発現は減少している。

近位脛骨組織において *In situ* hybridization 解析にて、*Col10* 1、*Col1* 1の発現を検討した。*Elov16*KO 新生マウスは対照群に比較して、肥大軟骨細胞マーカーである *Col10* 1の発現が成長板で増加した。次に、*Elov16*KO 新生マウスでは、海綿骨において、骨芽細胞マーカーである *Col1* 1の発現が減少していた。さらに、*Elov16*KO 新生マウスは対照群に比較して、破骨細胞マーカーである、TRAP 遺伝子の発現と TRAP 染色で染まる破骨細胞様細胞が primary spongiosa において増加していた。以上より、成長板の発達、骨形成・吸収を司る、軟骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞系に *Elov16* が少なくとも何らかの役割を担っている可能性が示唆された。以降、軟骨細胞における *Elov16*

の役割の解明に焦点をあてて解析した。

Elov16KO マウスの成長板増殖軟骨細胞層では細胞増殖が減少する。

Elov16KO マウスの脛骨では、対照群に比較して成長板の増殖軟骨細胞層の厚さが薄いことから、軟骨細胞の増殖における Elov16 の役割を E18.5 マウスの脛骨骨端部における細胞増殖を BrdU の uptake で評価した。静止軟骨細胞層における細胞増殖には対照群と Elov16KO の間で差を認めなかったが、成長板の増殖軟骨細胞層における BrdU 陽性細胞は Elov16KO マウスで有意に減少し、細胞増殖の減少を認めた。また、*in vitro* で初代軟骨細胞の細胞増殖を評価した結果、対照群と Elov16KO 間に有意な差は認められず、軟骨細胞の増殖における Elov16 の役割に *in vivo* の環境が重要であることが示唆された。

Elov16KO マウスは、肥大軟骨細胞のアポトーシスおよび軟骨基質の産生に異常を認めない。

Elov16KO マウスの脛骨では、対照群に比較して肥大軟骨細胞層が肥厚していたことから、新生マウスの脛骨を TUNEL 染色し、Elov16KO マウスの肥大軟骨細胞でアポトーシスが減少しているか検討した。対照群と Elov16KO マウスの間で肥大軟骨細胞のアポトーシスに差は認められなかった。次に、Elov16KO マウスで認められた成長板異常が軟骨基質の産生障害によって引き起こされる可能性を検討するため、Safranin O 染色にてグルコサミノグリカンを染め、軟骨基質の産生を、評価した。その結果、Elov16KO マウスの軟骨基質の産生に異常は認めなかった。

Elov16KO-初代軟骨細胞では、肥大軟骨細胞マーカーおよび転写因子の発現が上昇する。

Elov16 の欠損による成長板の表現型の異常の分子機序を解明するため、対照群および Elov16KO マウスの初代軟骨細胞のマイクロアレイ解析を行った。対照群に比較して Elov16KO で最も発現が増加した遺伝子は *Col10 1*、発現が低下した遺伝子は Elov16 に次いで *Wnt10* や *Igf1* 遺伝子等が含まれていた。次に、*Col10 1* に関与する遺伝

子を中心に Real-time PCR 法にて解析したところ、Elov16KO マウスの初代軟骨細胞では、軟骨細胞の分化マーカーである *Col2 1*、*Col10a1* 等の発現増加を認めた。また、*Col10 1* のプロモーターおよびエンハンサー領域に結合し、その転写を制御する *Runt-related transcription factor 2* は Elov16KO にて有意な差を認めなかったが、*Col10a1* のエンハンサー領域に結合し転写を制御する *forkhead box protein A2 (Foxa2)* は Elov16KO にて発現が有意に上昇し、*forkhead box protein A3 (Foxa3)* も上昇傾向であった。さらに、これら 2 つの転写因子と同様に *Col10 1* の転写を直接制御する *myocyte-specific enhancer factor 2C (Mef2c)* の発現も Elov16KO で上昇していた。

Elov16 ノックダウンにより脂肪酸組成が変化し、軟骨細胞マーカーの発現が上昇する。

軟骨前駆細胞株である ATDC5 細胞を用いて、軟骨細胞における Elov16 の役割を検討した。Elov16 shRNA 発現レンチウイルスを作製し、ATDC5 細胞に感染させたところ、control shRNA 発現レンチウイルスを感染させた ATDC5 細胞に比較して Elov16 の発現が有意に減少した。Elov16 を stable にノックダウン (KD) した ATDC5 細胞系では、脂肪酸組成の検討においてパルミチン酸 (C16:0) の増加およびオレイン酸 (C18:1n-9) の減少を認め、Elov16 の活性指標である C18 脂肪酸 [ステアリン酸 (C18:0) + オレイン酸 (C18:1n-9)] と C16 脂肪酸 [パルミチン酸 (C16:0) + パルミトオレイン酸 (C16:1n-7)] の比は減少傾向であった (Fig.2A)。また、予想外なことに、ステアリン酸 (C18:0) は Elov16KD した ATDC5 細胞でやや増加していた。不飽和化酵素 SCD の発現量を Real-time PCR 法にて検討したところ、Elov16KD 細胞では、*Scd-1/2* の発現が有意に減少していた (Fig.2B)。したがって、Elov16KD-ATDC5 細胞では *Scd* の発現減少のためにステアリン酸 (C18:0) からオレイン酸 (C18:1n-9) への不飽和化が抑制され、その結果、ステアリン酸 (C18:0) が増加傾向を示し

た可能性が示唆された。

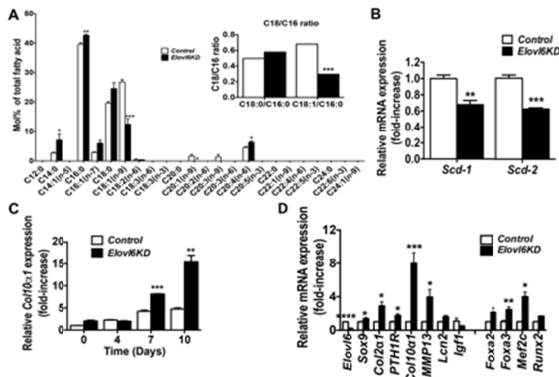


Fig.2A. *Elov16KD* 細胞の脂肪酸組成。 B. *Scd-1, 2* の発現。

C. *Elov16KD* 軟骨細胞の継続的分化誘導と *Col10* の発現。

D. 軟骨細胞の分化マーカーの発現の検討。

Elov16 のノックダウンは ATDC5 細胞の肥大軟骨細胞への分化を亢進する。

軟骨細胞の分化における *Elov16* の役割を検討するため、前項で確立した stable cell lines をそれぞれ、ITS を添加して分化誘導し、その際の *Col10* 1 およびその関連転写因子の遺伝子発現を Real-time PCR にて評価した。 *Elov16KD* 細胞では、ITS 投与開始前から 7 日目にかけて、肥大軟骨細胞マーカー *Col10* 1 の発現を制御する転写因子である *Foxa3* および *Mef2c* の発現が上昇しており、ITS 投与後 7 日目以降、 *Col10* 1 の有意な発現上昇を認めた (Fig.2C, 2D)。

Foxa2 と HDAC4/5/7 タンパク質の細胞内分布の変化が *Elov16KD* における *Foxa2* および *Mef2c* の発現の上昇をもたらす。

次に、 *Elov16KD* 細胞における *Foxa2/3* および *Mef2c* の発現の上昇の機序の検討を行なった。まず、 *Elov16KD* 細胞における *Foxa2* の発現の増加のメカニズムを理解するために、 *Elov16KD* と対照細胞での *Foxa2* タンパク質の細胞内分布を検討した。 *Elov16KD* 細胞では、 *Foxa2* の核内分布が細胞質に比べて有意に増加していた。次いで、 *Elov16KD* 細胞における *Mef2c* の発現の増加のメカニズムを理解するために、 *Mef2c* の発現の制御タンパク質である HDAC4/5/7 の細胞内分布を検討した。 *Elov16KD* 細胞では、 HDAC4/5/7 の細胞質分布が核内に比べて有意に増加していた。このことから、

Foxa2 と HDAC4/5/7 タンパク質の細胞内分布の変化がそれぞれ *Foxa2/3* および *Mef2c* の発現の上昇をきたし、さらに *Col10* 1 の発現を上昇させた可能性が考えられた。

Elov16KD による *Foxa3* や *Mef2c* の発現上昇は、ステアリン酸、オレイン酸の培養液への添加により抑えられる。

Elov16KD による細胞外液の脂肪酸組成の変化が ATDC5 細胞の分化に影響をおよぼすのか検討するため、 *Elov16KD* マウスの肋軟骨および *Elov16KD*-ATDC5 細胞で組成が変化していたパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸を *Elov16KD*-ATDC5 細胞に各 50 μ M 添加し、ITS による分化誘導を 4 日間行った。遺伝子発現解析の結果、 *Elov16* の KD により発現が上昇した *Foxa3* は、ステアリン酸およびオレイン酸の添加により、その発現上昇がキャンセルされた。同様に、 *Elov16* の KD により上昇した *Mef2c* の発現は、ステアリン酸、オレイン酸の添加によって有意に低下したが、中でもオレイン酸による減少が最も顕著であった。肥大軟骨細胞マーカーである *Col10* 1 の発現は、ITS 投与後 4 日目の時点では、 *Elov16KD* による差を認めないが、パルミチン酸の添加によってその発現は有意に上昇し、逆にステアリン酸、オレイン酸の添加によって、その発現は有意に減少した。これらの結果から、成長板は血管に乏しい組織ではあるが、 *Mef2c* や *Foxa2/3* の発現は少なくとも一部は細胞外液の脂肪酸組成によって制御され、これらの転写因子の発現減少が間接的に *Col10* 1 の発現減少を導いた可能性が示唆された。

近年、脂肪酸が軟骨細胞や骨芽細胞、破骨細胞等の機能に影響をおよぼし、骨成長や骨リモデリングを制御することが、多価不飽和脂肪酸の解析を中心に少しずつ明らかとなってきた。しかしながら、その詳細な分子メカニズムや飽和および一価不飽和脂肪酸の骨・軟骨における役割は未解明な点が多く残されている。そこで、本研究では、骨および軟骨における *Elov16* の役割を、胎生期

から出生直後の時期に着目して解析した。その結果、本研究では以下のことが明らかとなった。1) *Elovl6* は骨および軟骨細胞において高発現しており、*Elovl6KO* マウスは成長が遅延した。2) *Elovl6KO* マウスの軟骨細胞および *Elovl6KO*-ATDC5 細胞では、C16 脂肪酸であるパルミチン酸の増加や、C18 脂肪酸であるオレイン酸の減少といった脂肪酸組成の変化を認めた。3) 胎生期から出生直後の *Elovl6KO* マウスは、軟骨内骨化の遅延や成長板異常、海綿骨の減少傾向を認めた。4) *Elovl6KO* マウスは破骨細胞の形成が増加し、骨吸収の増加が示唆された。5) 新生児の *Elovl6KO* マウスで観察された成長板異常の原因として、成長板増殖軟骨細胞層における細胞増殖の減少および肥大軟骨細胞への分化亢進を認めた。6) *Elovl6* の KD による肥大軟骨細胞への分化亢進には、転写因子 *Mef2c* や *Foxa3* の関与が示唆された。7) *Mef2c* や *Foxa3* の発現量は培養液にオレイン酸を添加することで程度対照群のレベルに回復した。以上の結果から、*Elovl6* の欠損による脂肪酸組成の変化が、軟骨細胞の増殖や分化を制御する転写因子の発現に影響を与え、それにより引き起こされる成長板の発達異常により、骨の成長遅延を招く可能性が示唆された。

5、主な発表論文等：

[雑誌論文] (計 1 件)

1) Crucial role of *Elovl6* in chondrocyte growth and differentiation during growth plate development in mice. Kikuchi M, Shimada M, Matsuzaka T, Ishii K, Nakagawa Y, Takayanagi M, Yamada N, Shimano H. *PLoS One* 11(7) e0159375, 2016. (査読付)

[学会発表] (計 6 件)

2) 脂肪酸伸長酵素 *Elovl6* の骨・軟骨細胞における役割の検討。菊地愛美、嶋田昌子、松坂賢、石井清明、中川嘉、島野仁。2015/5/22. 第58回日本糖尿病学会年次学術集会、下関。(口演)

3) Kikuchi M, Shimada M, Matsuzaka T, Ishii K, Nakagawa Y, Shimano H. Role of *Elovl6* in Bone and Cartilage. *Tsukuba Global Science Week*. Tsukuba,

JAPAN. 2015/9/30. (Poster Award)

4) 脂肪酸伸長酵素 *Elovl6* の骨・成長板発達異常の背景となる分子機序の検討。菊地愛美、嶋田昌子、松坂賢、中川嘉、島野仁。2016/5/21. 第59回日本糖尿病学会年次学術集会、京都。(口演)

5) Crucial role of *Elovl6* in chondrocyte growth and differentiation during growth plate development in mice. Shimada M, Kikuchi M, Matsuzaka T, Nakagawa Y, and Shimano H. *ASBMR Annual Meeting*. 2016/9/16-19. Atlanta GA, USA. (Late-breaking Poster)

6) 脂肪酸伸長酵素 *Elovl6* の成長板の発達における役割の検討。嶋田昌子。2016/10/7. 第38回日本臨床栄養学会総会、大阪。(口演)

7) 脂肪酸伸長酵素 *Elovl6* の成長板の発達における役割の検討。嶋田昌子、菊地愛美、松坂賢、中川嘉、島野仁。2017/1/13. 第20回日本病態栄養学会年次学術集会、京都。(口演)

[その他] (計 1 件)

8) 脂肪酸伸長酵素 *Elovl6* は、マウスの成長板発達において軟骨細胞の増殖、分化に重要な役割を担っている。菊地愛美、嶋田昌子。2017/4/1. 1st Author ~ "change the future" 日本骨代謝学会 http://www.jsbmr.jp/1st_author/226_kikuchi_shimada.html

6、研究組織

(1) 研究代表者

嶋田 昌子 (SHIMADA, MASAKO)
相模女子大学・栄養科学部・教授
研究者番号：30637369

(2) 研究分担者

島野 仁 (SHIMANO, HITOSHI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：20251241

松坂 賢 (MATSUZAKA, TAKASHI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：70400679

(3) 連携研究者 なし