

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893194

研究課題名(和文) 糖尿病誘発因子RBP4による骨破壊制御

研究課題名(英文) Control of bone destruction by RBP4, an inducible factor of diabetes

研究代表者

久本 由香里 (KYUMOTO, YUKARI)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40729026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、肥満症やそれに伴う糖尿病発症が骨折リスクの増加や骨吸収の亢進、また歯周病発症にも深く関与することが報告されている。脂肪組織から分泌される様々な生理活性物質(アディポカイン)の産生異常が一因とされ研究が進められているが、骨吸収を担う破骨細胞との関連については未だ不明な点が多い。そこでアディポカインの一つである糖尿病誘発因子RBP4に注目し解析した結果、RBP4が破骨細胞分化を制御する可能性が示唆された。よって、RBP4は骨破壊制御の新たなターゲットになり得ることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recently, it is reported that obesity or obesity-related development of diabetes are deeply involved in the increase of fracture risk, acceleration of bone resorption, and development of periodontal disease. Abnormal production of an adipokine, which is physiologically active substance secreted from adipose tissue, is a factor of these risk, however, the association of adipokines and osteoclasts specialized in bone resorption are poorly understood. We showed the possibility that RBP4, an adipokine which is a factor to induce diabetes, negatively regulates the osteoclast differentiation. Therefore, RBP4 could be a new target for the control of bone destruction.

研究分野：分子薬理学

キーワード：破骨細胞 骨吸収 RBP4

1. 研究開始当初の背景

近年、肥満症やそれに伴う糖尿病発症が骨折リスクの増加や骨吸収の亢進、また歯周病発症にも深く関与することが報告されている。脂肪組織から分泌される様々な生理活性物質（アディポカイン）の産生異常が一因とされ研究が進められているが、骨吸収を担う破骨細胞との関連については未だ不明な点が多い。

Retinol binding protein 4 (RBP4)はアディポカインの一つであり、インスリン感受性低下によるII型糖尿病発症の誘導因子とされている(Yang et al. *Nature*. 2005)。肥満やII型糖尿病患者の血中や尿中では、このRBP4濃度が有意に高い。RBP4は脂肪組織の他に肝臓でも合成され、ビタミンAの一種であるレチノールを特異的に結合して標的臓器（細胞）に輸送する働きをもつ標的細胞に達すると、RBP4は細胞膜に発現するRBP4受容体であるStimulated by retinoic acid gene 6 (STRA6)を介して細胞内のCellular retinol binding protein 1(CRBP1)にレチノールを受け渡す。STRA6は、眼や脳、筋肉、脂肪等様々な組織に発現しているとの報告があるのに対し(Alapatt et al. *J. Biol. Chem.* 2013)、骨におけるRBP4やSTRA6に関する知見は見受けられない。

肥満や糖尿病患者において骨吸収の亢進が認められることとRBP4血中濃度が高いこと(Yang et al. *Nature*. 2005)から、申請者は破骨細胞においてRBP4-STRA6シグナルが存在する可能性を検討した。その結果、破骨前駆細胞および成熟破骨細胞がSTRA6を高発現することを世界で初めて見出した。

以上のような経緯から、「糖尿病誘発因子RBP4が破骨細胞の分化または機能調節を介して骨破壊を制御する」という研究仮説を構築した。

2. 研究の目的

破骨細胞分化および機能発現における破

骨細胞分化および機能発現におけるRBP4-STRA6制御システムを同定することを第一の目的とする。さらに、モデル動物を用いた解析により病態時における血中RBP4濃度および骨組織におけるSTRA6の発現変動と骨破壊との関連性を明らかにし、最終的にRBP4-STRA6システムを介した骨破壊制御を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) マウス骨髄由来初代培養破骨細胞を用いた *in vitro* 解析

- ① 培養破骨細胞におけるSTRA6の発現を経時的に解析する。
- ② 培養破骨細胞にRANKLによる分化誘導と同時に合成RBP4タンパクまたはレチノールを曝露し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色および多核細胞数を計測する。
- ③ 破骨細胞分化に重要な転写因子であるNFκB、AP-1およびNFATc1に対するRBP4の効果について、ウエスタンブロッティング法により解析する。また、RBP4-STRA6下流シグナル活性化を結ぶ詳細なメカニズムをシグナル分子のリン酸化を指標にウエスタンブロッティング法により解析する。
- ④ siRNAによるSTRA6ノックダウン系においても上記(1)-②、③と同様の検討を行う。

(2) モデル動物を用いた *in vivo* 解析

- ① 高脂肪食負荷により作製した肥満モデルマウスについて、症状の重篤度と血中RBP4濃度との相関関係を解析し、さらに脛骨や大腿骨、脊柱、歯槽骨における骨量、骨構造の変化、骨破壊の程度をマイクロCTを用いて計測する。また、骨組織におけるSTRA6の発現についてSTRA6抗体による免疫染色を行い、通常食マウスと発現量を比較する。さらに、破骨細胞活性と

の相関についても各種破骨分化マーカーの免疫染色により評価する。

- ② 臼歯に糸を巻くことにより歯周病を誘発した骨破壊モデルマウスに、合成 RBP4 タンパク投与を行い、病変部位において、上記(2)-①と同様の解析を行い、骨吸収および骨破壊への影響を検討する。この時、経時的に採血および採尿を行い、ELISA 法により RBP4 濃度を測定する。これにより、病態の進行度と体内 RBP4 濃度との関連性を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) マウス骨髄細胞に RANKL による刺激を行うことで破骨細胞へ分化させ、以下の実験を行った。

- ① 培養 0~3 日目の破骨細胞からタンパクを回収し、STRA6 の発現を検討した結果、どの培養日数においてもその発現が認められ、培養後期に STRA6 の発現は増加した (図 1)。

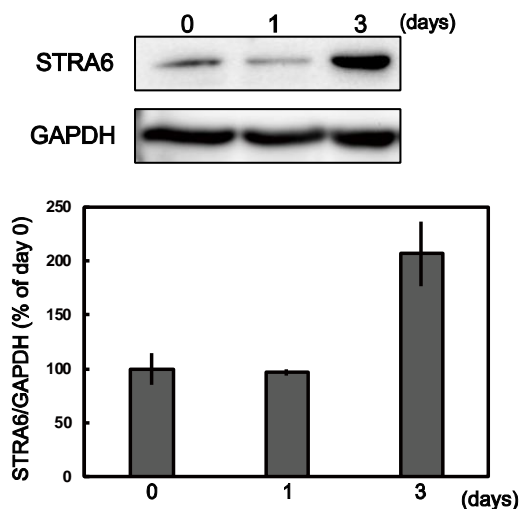


図 1. 培養破骨細胞における STRA6 の発現

- ② 培養破骨細胞に RANKL とともに Retinol または RBP4 を 100~500 nM の濃度で持続曝露し、培養 3 日目に TRAP 染色を行った。その結果、RANKL 単独刺激と比較して、Retinol または RBP4 を同時に曝露す

ることにより、ともに濃度依存的に TRAP 陽性多核細胞数は著明に減少した (図 2)。

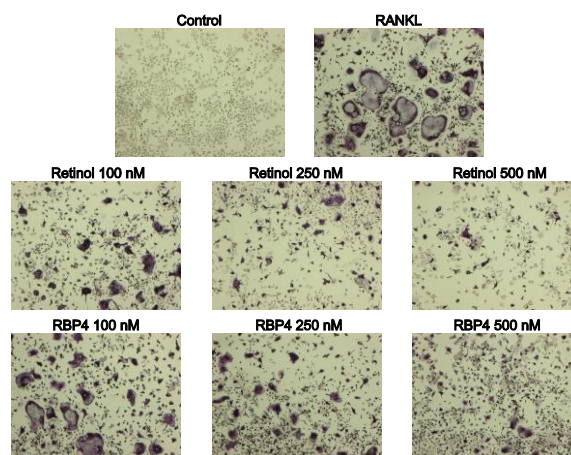


図 2. 破骨細胞分化に対する Retinol および RBP4 の影響

- ③ RANKL とともに 500 nM の Retinol または RBP4 刺激後 24 時間後において、破骨細胞分化に必須の転写因子の発現を検討した結果、Retinol 曝露ではそれらの発現に大きな変化は認められなかったのに対し、RBP4 を曝露した細胞では NFATc1 と c-Fos の発現に減少傾向が認められた (図 3)。この細胞において、STRA6 下流の JAK/STAT 経路を解析した結果、RANKL 単独、Retinol または RBP4 同時曝露すべての細胞で JAK2、STAT3、STAT5 のリン酸化亢進は観察されなかった。次に、Starvation を行った培養破骨細胞に 500 nM の RBP4 を短時間 (0、5、15、30 分) 曝露し、JAK/STAT 経路への影響を検討した。その結果、この実験においても JAK2、STAT3、STAT5 の活性に変化は認められなかった。

siRNA による STRA6 ノックダウン系における検討や in vivo 実験については現在進行中である。

以上の結果より、RBP4 は STRA6 を介したシグナルにより破骨細胞分化を制御するが、それは JAK/STAT 経路ではなく別の経路を介している可能性が示唆された。この結果は、

RBP4 が破骨細胞分化制御に関与する可能性を示した初めての知見である。しかしながら、詳細なメカニズムや *in vivo* における効果は不明であり、RBP4-STRA6 システムを介した骨破壊制御を確立するためには今後さらなる検討が必要である。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 久本 由香里、上原 範久、久木田 明子、久木田 敏夫

Galectin-9 による破骨細胞形成抑制機構：
MafB 制御系関与の可能性

第 57 回 歯科基礎医学会学術大会、2015 年 9 月、朱鷺メッセ (新潟県・新潟市)

- ② 久本 由香里、上原 範久、久木田 明子、久木田 敏夫

Galectin-9 による破骨細胞分化制御メカニズムの解明：NFATc1 の発現を抑制する転写因子 MafB 及び IRF-8 の関与

第 33 回 日本骨代謝学会学術集会、2015 年 7 月、京王プラザホテル (東京都・新宿)

- ③ 上原 範久、久木田 明子、久本 由香里、保田 尚孝、久木田 敏夫

ラミニン-332 による RANK 発現調節とマクロファージ破骨細胞分化転換の制御

第 33 回 日本骨代謝学会学術集会、2015 年 7 月、京王プラザホテル (東京都・新宿)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

久本 由香里 (KYUMOTO, Yukari)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号：40729026

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし