

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05646

研究課題名(和文)骨新生因子が仲介する骨-脂肪組織連関メカニズムの解明

研究課題名(英文)The role of HD01 in the relationship between bone and fat.

研究代表者

高野 晴子(Takano, Haruko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40532891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：運動誘導性に筋肉から分泌されるマイオカインが、骨格筋-脂肪組織連関を仲介することが明らかにされているが、骨-脂肪組織連携は明らかにされていない。そこで本研究では、申請者がゼブラフィッシュ心筋から同定したHD01が骨-脂肪組織の新規連関経路を仲介する可能性を検討した。しかし、遺伝的背景を統一したHD01のKOマウスでは、脂肪組織に異常を認めなかった。また、HD01のTgマウスは長管骨の伸長を認めたが、脂肪組織や高脂肪食負荷下でも、野生型との顕著な変化を認めなかった。一方で、HD01の上流と推測した運動刺激については、機械刺激がHD01の発現維持に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Exercise-induced myokines provide systemic benefits by controlling adipose tissues. However, the relationships between bones and adipose tissues remain to be elucidated. In this study, we analyzed whether periosteum-derived HD01 regulates adipose tissues. After backcrossing to C57BL/6 for 10 generations, we didn't find any abnormalities in adipose tissues of HD01-KO mice compared to wild-type mice. Furthermore, HD01-Tg mice were quite normal in their adipose tissues and showed no metabolic differences even under high-fat diet conditions. Although exercise didn't induce HD01 directly, mechanical stimulation was required to maintain the expression of HD01.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：脂肪組織 ナトリウム利尿ペプチド 骨形成

1. 研究開始当初の背景  
申請者の所属するグループは、ゼブラフィッシュ心筋から分泌される骨新生因子 (Heart-derived Osteogenesis Inducer, HD0I) を発見した。HD0I の遺伝子座に LacZ 遺伝子を組み込んだノックインマウスを用いた *in vivo* プロモーター解析から、HD0I は成体および成長中の骨組織、特に骨膜 (periosteum) に存在する骨膜細胞に著しく高発現していることを明らかにした。申請者らが作成したコンベンショナル KO マウスでは、骨組織に異常を認めないが、生殖腺 WAT (epididymal white adipose tissue, eWAT) における脂肪組織重量の増加と脂肪細胞の肥大化が観察された。つまり、HD0I-KO マウスでは脂肪組織が貯蓄型に偏る白色化 (ホワイトニング) が進んでいた。逆に、全身性に HD0I を発現するトランスジェニック (HD0I-Tg) マウスにおいても骨組織の形態異常は認めないが、鼠径部 WAT (inguinal WAT, iWAT) におけるベージュ細胞の増加が認められ、褐色脂肪組織 (Brown adipose tissue, BAT) においては脂肪滴の縮小が観察された。すなわち、HD0I-Tg マウスではブラウニングが亢進していると考えられた
2. 研究の目的  
HD0I の遺伝子改変マウスでは、脂肪組織に異常が見られることから、骨-脂肪組織の連関が示唆された。運動刺激誘導性に筋肉から分泌されるマイオカインが、骨格筋-脂肪組織連関を仲介することが明らかにされているのに対し、骨-脂肪組織間連携は全く明らかにされていない。そこで本研究では、HD0I が仲介する骨-脂肪組織の新規連関経路の分子機構を明らかにし、運動と肥満の関係解明の新たな切り口とすることを目的とした。
3. 研究の方法  
計画 1) 遺伝子改変マウスを用いた解析から HD0I が仲介する骨-脂肪組織連関の存在を明らかにする。  
これまでの解析では、申請者らが作成した HD0I コンベンショナル KO マウスの遺伝的背景が揃っていなかった。そこで HD0I-Tg、-KO マウスから BAT、eWAT、iWAT を採取し、脂肪組織重量体重比の測定、およびこれらの脂肪組織における BAT マーカーの発現量を定量 PCR により解析する。BAT マーカーであるミトコンドリア逆共役タンパク質 (UCP-1) の免疫染色や脂肪細胞サイズの計測から、HD0I 遺伝子改変マウスにおける脂肪組織の異常を定量的に評価し、骨-脂肪組織連関の存在を裏付ける。  
計画 2-A) *in vitro* 初代培養システムを用いたシグナル解析から、体液性調

節に基づく骨-脂肪組織の連関機構を明らかにする。

計画 1 により HD0I がベージュ細胞形成を促進する場合は、ベージュ細胞への分化誘導系を用いて、そのシグナル機構を明らかにする。

計画 2-B) HD0I 発現細胞の *in vivo* トレースとシグナル解析により前駆細胞の供給に基づく連関機構を検証する。

計画 2-A が予想と反する場合は、骨膜細胞が脂肪細胞の前駆細胞を供給する可能性を検討する。具体的には、HD0I プロモーター下で Cre-loxP システムを用いて、遺伝的に骨膜細胞をラベルし、この細胞を trace して明らかにする。

計画 3) 生化学的解析から運動負荷刺激による HD0I の発現誘導を明らかにする。

HD0I-HT マウスに運動刺激を与え、頸骨の LacZ 活性をモニターする。または野生型マウスを用いて、運動前後の HD0I 発現量を qPCR または ELISA により測定する。

計画 4) 高脂肪食モデルを用いた解析から HD0I による抗肥満作用について検証する。

高脂肪食はホワイトニングを促進して、白色脂肪細胞を肥大化させ、肥満を誘導する。そこで、生後 8 週齢の HD0I-Tg マウスに高脂肪食を 4 週間与え肥満を誘導する。これらのマウスにおける体重変化および脂肪組織量を測定、組織学的解析、マーカーの発現解析により、HD0I が肥満を改善できるかを明らかにする。この解析から HD0I が抗肥満作用を持つかを明らかにする。

#### 4. 研究成果

計画 1)

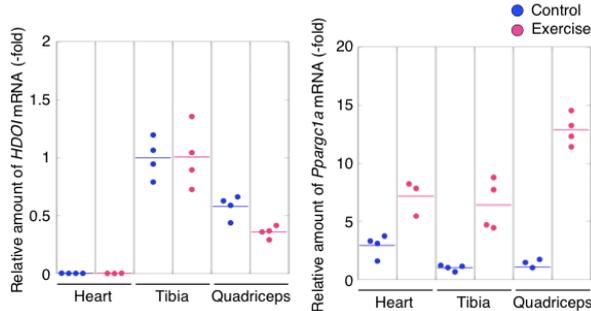
C57BL/6 マウスと戻し交配させ、遺伝的背景を 9 世代以上 B6 マウスに統一させた。その後、HD0I の KO および Tg の脂肪組織重量を測定したところ、BAT、eWAT、iWAT の組織重量比に有意な差は認められなかった。また、BAT マーカーの発現や脂肪細胞サイズにも影響が認められなかった。しかし、HD0I-KO マウスでは一部の長管骨の長さが短くなり、海綿骨量、皮質骨厚が減少していることがわかった。

計画 2)

HD0I は骨膜に発現していることを既に明らかにした。そこで、骨膜細胞が脂肪細胞にも分化することを応用して、HD0I の脂肪細胞分化に対する影響を検討した。HD0I-KO マウスから採取した、骨膜細胞は骨への分化能力が減少していたが、脂肪細胞への分化能力は野生型と同程度であった。従って、HD0I の脂肪細胞分化に対する内在的な抑制効果は、認められなかった。

### 計画 3)

運動の過剰負荷を実現するために、トレッドミルを用いて急性負荷刺激を行った。運動後の PGC-1 $\alpha$  遺伝子の発現は、心臓、頸骨、大腿四頭筋において非運動群に比較して上昇していたが、HDOI の発現は、運動群と非運動群間で差を認めなかった。従って HDOI は短期的運動負荷によっては発現誘導されないこと



が示された (図 1)。

図 1 運動負荷による HDOI と PGC-1 $\alpha$  の発現変化

しかし、HDOI が遠位骨の骨凸面に限定的に発現していたことから、伸展ストレスとの関係性が予想された。そこで、脛骨にかかる荷重を免除するために、マウスの片脚に大腿・坐骨神経切除手術を施し、HDOI の発現量を脛骨 LacZ 染色と qPCR によって検討した。HDOI の発現部位には顕著な変化を認めなかったが、HDOI の発現レベルの低下を認めた。qPCR による定量から、HDOI の発現量は術後 4 週から、対照群の半分程度にまで有意に低下した。一方で、卵巣摘出により骨量低下を引き起こしても、HDOI の発現量は低下しないことから、HDOI の発現は骨量には依存せず、荷重刺激が必要であることが明らかになった (図 2)。

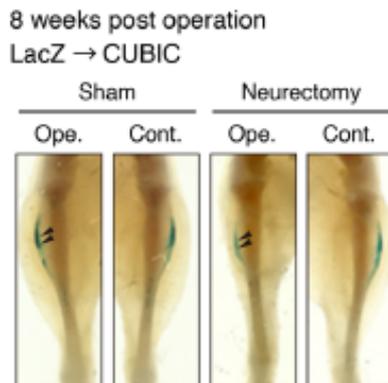


図 2 神経切除による HDOI の発現変化

### 計画 4)

運動刺激による内因性 HDOI の発現上昇を確認する事例はなかったが、外因性 HDOI が脂肪組織の増大を抑制する可能性は考えら

れる。そこで、HDOI-Tg マウスに高脂肪食を 3 ヶ月間与え、継時的体重変化と負荷後の各脂肪組織の重量と組織像、耐糖能およびインスリン抵抗性について解析した。しかし、HDOI-Tg と野生型マウスに有意な変化は認められなかった (図 3)。

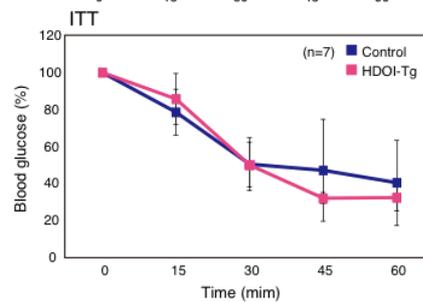
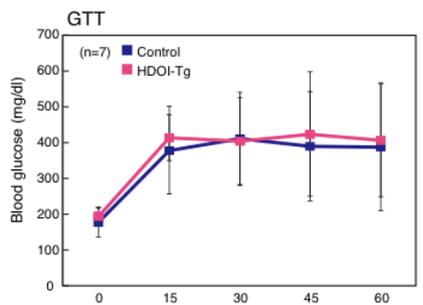
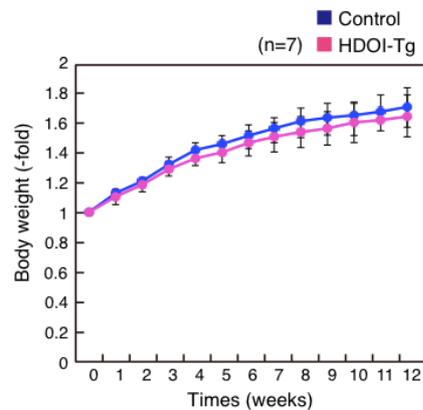


図 3 高脂肪食負荷後の体重変化とインスリン負荷試験およびグルコース負荷試験

## 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 8 件)

- 1) Allergic TH2 Response Governed by B-Cell Lymphoma 6 Function in Naturally Occurring Memory Phenotype CD4<sup>+</sup> T Cells. Ogasawara T, Kohashi Y, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hatano M, Hirata H, Fukushima Y, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M. Front Immunol. 2018 Apr 10;9:750. doi: 10.3389/fimmu.2018.00750. eCollection 2018. 査読有
- 2) A New Secretory Peptide of Natriuretic

- Peptide Family, Osteocrin, Suppresses the Progression of Congestive Heart Failure After Myocardial Infarction. Miyazaki T, Otani K, Chiba A, Nishimura H, Tokudome T, Takano-Watanabe H, Matsuo A, Ishikawa H, Shimamoto K, Fukui H, Kanai Y, Yasoda A, Ogata S, Nishimura K, Minamino N, Mochizuki N. *Circ Res.* 2018 Mar 2;122(5):742-751. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312624. Epub 2018 Jan 11. 査読有
- 3) Cardiomyokines from the heart. Chiba A, Watanabe-Takano H, Miyazaki T, Mochizuki N. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Apr;75(8):1349-1362. doi: 10.1007/s00018-017-2723-6. Epub 2017 Dec 13. 査読有
- 4) Circulating osteocrin stimulates bone growth by limiting C-type natriuretic peptide clearance. Kanai Y, Yasoda A, Mori KP, Watanabe-Takano H, Nagai-Okatani C, Yamashita Y, Hirota K, Ueda Y, Yamauchi I, Kondo E, Yamanaka S, Sakane Y, Nakao K, Fujii T, Yokoi H, Minamino N, Mukoyama M, Mochizuki N, Inagaki N. *J Clin Invest.* 2017 Nov 1;127(11):4136-4147. doi: 10.1172/JCI94912. Epub 2017 Oct 9. 査読有
- 5) Development of chronic allergic responses by dampening Bcl6-mediated suppressor activity in memory T helper 2 cells. Ogasawara T, Hatano M, Satake H, Ikari J, Taniguchi T, Tsuruoka N, Watanabe-Takano H, Fujimura L, Sakamoto A, Hirata H, Sugiyama K, Fukushima Y, Nakae S, Matsumoto K, Saito H, Fukuda T, Kurasawa K, Tatsumi K, Tokuhisa T, Arima M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Jan 31;114(5):E741-E750. doi: 10.1073/pnas.1613528114. Epub 2017 Jan 17. 査読有
- 6) Osteocrin, a peptide secreted from the heart and other tissues, contributes to cranial osteogenesis and chondrogenesis in zebrafish. Chiba A, Watanabe-Takano H, Terai K, Fukui H, Miyazaki T, Uemura M, Hashimoto H, Hibi M, Fukuhara S, Mochizuki N. *Development.* 2017 Jan 15;144(2):334-344. doi: 10.1242/dev.143354. Epub 2016 Dec 19. 査読有
- 7) Transcriptional repression of p27 is essential for murine embryonic development. Teratake Y, Kuga C, Hasegawa Y, Sato Y, Kitahashi M, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Sakamoto A, Arima M, Tokuhisa T, Hatano M. *Sci Rep.* 2016 May 19;6:26244. doi: 10.1038/srep26244. 査読有
- 8) DA-Raf-Mediated Suppression of the Ras-ERK Pathway Is Essential for TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Type 2 Cells. Watanabe-Takano H, Takano K, Hatano M, Tokuhisa T, Endo T. *PLoS One.* 2015 May 21;10(5):e0127888. doi: 10.1371/journal.pone.0127888. eCollection 2015. 査読有
- [図書] (計2件)
- 1) 遠藤剛, 高野晴子, 高野和儀 The LUNG perspective(2015) メディカルレビュー社
- 2) 高野晴子, 千葉彩乃, 宮崎敬大, 望月直樹 高野和儀 血管医学 (2015) メディカルレビュー社
- [学会発表] (計4件)
- 1) 2017年 第35回日本骨代謝学会学術集会(博多) 演題名: Osteocrinは骨形態形成を制御する骨膜ホルモンである 筆頭者(発表者): 高野 晴子 発表形式: 選抜一般口演
- 2) 2017年 第69回日本細胞生物学会大会(仙台) 演題名: Osteocrinは骨形態形成を制御する骨膜ホルモンである The periosteum-derived hormone Osteocrin regulates long bone growth 筆頭者(発表者): 高野 晴子 発表形式: 選抜一般口演
- 3) 2016年第39回日本分子生物学会(横浜) 演題名: Osteocrinは骨形態形成を制御する骨膜ホルモンである 筆頭者(発表者): 高野 晴子 発表形式: ポスター
- 4) 2015年 American Society of Cell Biology Annual Meeting (San diego) 演題名: DA-Raf-mediated suppression of the Ras-ERK pathway regulates TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial type 2 cells 筆頭者(発表者): 高野 晴子 発表形式: ポスター
- [その他]
- [http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/structural\\_analysis/staff.html](http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/structural_analysis/staff.html)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
高野晴子 (TAKANO HARUKO)  
国立循環器病研究センター・研究所  
・研究員  
研究者番号: 40532891
- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし
- (4) 研究協力者  
なし