

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 5 日現在

機関番号：37114

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06484

研究課題名(和文)高濃度オステオカルシンによるアディポネクチン発現抑制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of inhibition of adiponectin expression in adipocytes induced by high-dose osteocalcin

研究代表者

大谷 崇仁 (OTANI, Takahito)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：80759738

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)：骨は身体を支える骨格としての働きのみならず、ホルモンを分泌する内分泌器官としても重要な働きを担っていることが最近の研究で明らかとなった。中でも骨芽細胞が分泌するオステオカルシン(OC)は、糖・エネルギー代謝の制御に重要な役割を担っており、このOCが脂肪細胞に作用すると、糖・脂質代謝活性化ホルモンであるアディポネクチンの発現を亢進させることと、そこに至るシグナル伝達経路を解明した。その過程において我々は、高濃度のOCは逆に脂肪細胞におけるアディポネクチンの発現を著しく抑制することを確認し、その原因が脂肪細胞への細胞死誘導であることを明らかにし、その分子メカニズムの一端を解明した。

研究成果の概要(英文)： In addition to providing skeletal support, it was recently revealed that the bone is an endocrine organ that produces osteocalcin. Osteocalcin produced in osteoblasts plays an important role in glucose and energy metabolism. We elucidate that osteocalcin promotes the expression of adiponectin facilitating glucose and lipid metabolism and the signaling pathway by which osteocalcin induces adiponectin expression in adipocytes. In the process, we identified that high-dose osteocalcin inversely abolished the expression of adiponectin, and revealed that high-dose osteocalcin allowed adipocytes to lead to death and a part of the signaling pathway.

研究分野：生化学

キーワード：オステオカルシン 脂肪細胞 ネクロトーシス

1. 研究開始当初の背景

骨基質タンパク質として知られるオステオカルシン(OC)は骨芽細胞で合成されたのち、カルボキシル化され、大部分は骨に埋め込まれるが、一部は血中に放出される。血中のOCは、3つのグルタミン酸残基がカルボキシル化されたGluOCと、低(無)カルボキシル化状態のGluOCの2つの形態で存在している。そのうち、ホルモン様作用を持ち、全身の糖・エネルギー代謝活性化に与するのはGluOCのみである。我々はGluOCが脂肪細胞に作用するとアディポネクチンの発現を促すことを明らかにした。しかし、3T3-L1脂肪細胞におけるその作用は、ある一定濃度(5~10 ng/ml)まではGluOCの濃度依存的にアディポネクチンの発現量を亢進させるが、20 ng/mlを超えるような高濃度になるとアディポネクチンの発現およびその分泌を著しく抑制することを確認し、マウスを用いた実験でも同様のことが観察された。

2. 研究の目的

骨は身体を支える支持器官であると共に自ら分泌する内分泌器官としても重要な働きを担っていることが最近の研究で明らかとなった。中でも、骨芽細胞が分泌するOCは、糖・エネルギー代謝の制御に重要な役割を担っている。その機構の中で、我々はこのOCが脂肪細胞に作用し、糖・脂質代謝活性化ホルモンであるアディポネクチンの発現を亢進させることと、そこに至るシグナル伝達経路を解明した。

その過程において我々は、高濃度のOCは逆に脂肪細胞におけるアディポネクチンの発現を著しく抑制することを確認した。このことはOCの臨床応用を考える際に重要なポイントとなる。そこで、本研究では高濃度OCによってアディポネクチンの発現抑制が起こるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3T3-L1脂肪細胞を用いて、高濃度GluOCによる脂肪細胞への影響を解析した。高濃度GluOCの濃度は40 ng/mlとして脂肪細胞の形態学的変化を位相差顕微鏡や蛍光顕微鏡で観察した。細胞内シグナル伝達経路についてはウェスタンブロット法を用いてタンパクのリン酸化や発現量の変化等を確認した。また、タンパクの細胞膜局在などはウェスタンブロット法と併用して、共焦点レーザー顕微鏡を用いてその局在を確認した。

4. 研究成果

高濃度のGluOCは脂肪細胞におけるアディポネクチンの発現を著しく抑制することを確認し、その原因が脂肪細胞への細胞死(ネクروتーシス)誘導であることを明らかにした。このことはGluOCの臨床応用を考える際に重要なポイントとなる。したがって、本研究では高濃度GluOCによって脂肪細胞にネクروتーシスが誘導される分子メカニズムについて検討し、以下の点を明らかにした。

1. 高濃度GluOC刺激によって3T3-L1脂肪細胞におけるFoxO1の発現量と、その標的遺伝子であるFasLの発現量が亢進した(図1)。また、そのFasLの局在は高濃度GluOCによって細胞膜上へと変化した(図2)。

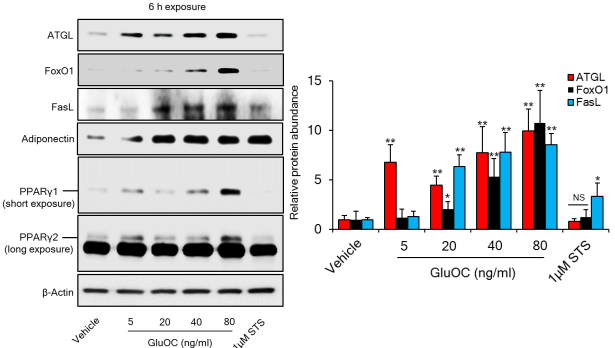


図1. 高濃度GluOCによるFoxO1発現量の亢進

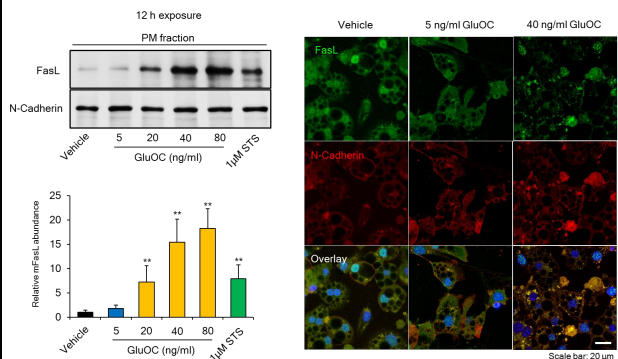


図2. 高濃度GluOCによるFasLの局在変化

2. 高濃度GluOC刺激によるFoxO1の発現量の亢進はGluOCの受容体と考えられているGPCR6Aの発現抑制によって抑制されたため、高濃度GluOCによる3T3-L1脂肪細胞へのネクروتーシス誘導シグナルはGPCR6Aを介した現象であることがGPCR6A siRNAを用いたサイレンシング実験によって明らかとなった(図3)。

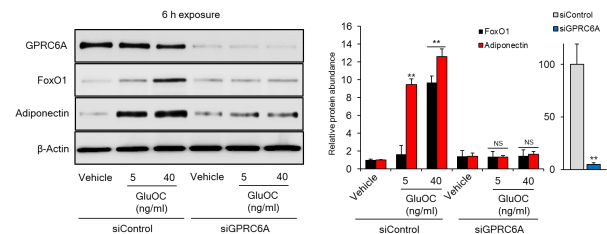


図3. GPCR6A siRNAを用いたサイレンシング実験

3. 高濃度 GluOC によりネクロトーシスのエフェクタータンパクである mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) の T357/S358 がリン酸化され、ホモ三量体が形成された(図 4)。

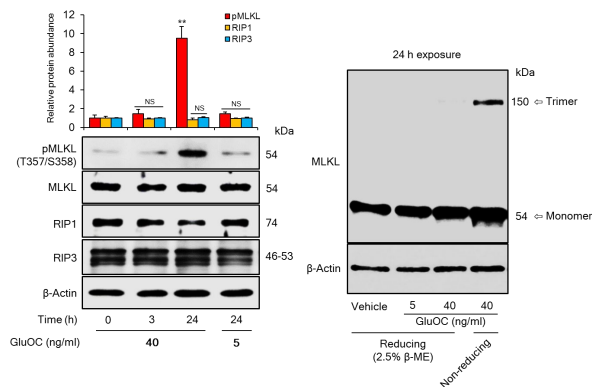


図 4. 高濃度 GluOC による MLKL のリン酸化と三量体化

4. 高濃度 GluOC による MLKL のリン酸化は FasL 中和抗体によって抑制されたが、FoxO1 の発現量の亢進に対する変化は認められなかった。(図 5)。このことから、高濃度 GluOC によるネクロトーシスシグナリングにおいて MLKL は FasL の下流に存在することが示唆された。

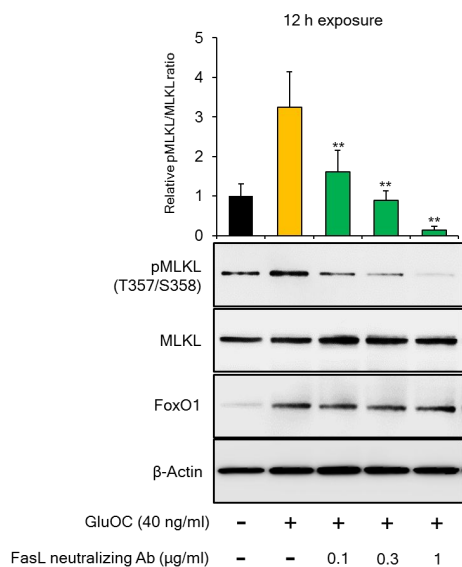


図 5. FasL 中和抗体による MLKL のリン酸化抑制

5. 高濃度 GluOC により 3T3-L1 脂肪細胞内へのカルシウム流入および ROS の産生が亢進し、その効果は FasL 中和抗体によって抑制された(図 6)。このことから、高濃度 GluOC による 3T3-L1 脂肪細胞内へのカルシウム流入および ROS 産生も FasL の下流で起こっていることが明らかとなった。

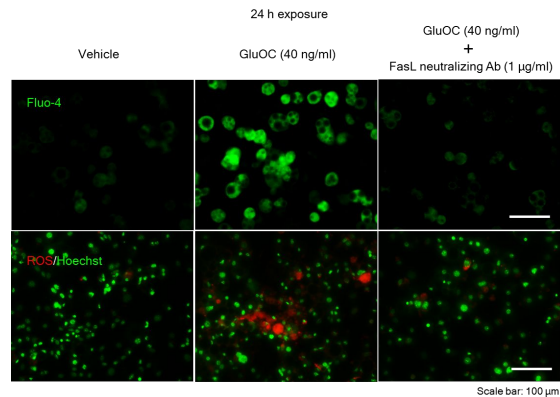


図 6. 高濃度 GluOC による脂肪細胞内へのカルシウム流入と ROS 産生の亢進

6. ミトコンドリアダイナミクス制御に重要な働きを示す dynamin-related protein 1(DRP1) の S637 の脱リン酸化が高濃度 GluOC によって亢進した(図 7)。DRP1 は S637 がリン酸化されることで inactive となることから、高濃度 GluOC 刺激によって DRP1 の活性が亢進し、ミトコンドリアの分裂が亢進することが示唆される。

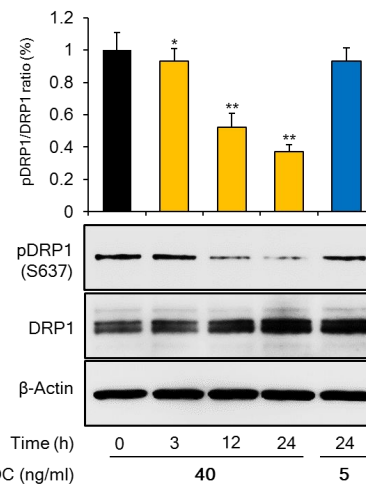


図 7. 高濃度 GluOC による DRP1 の脱リン酸化亢進

## 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 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大谷 崇仁 (OTANI, Takahito)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教  
研究者番号：80759738

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )