

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11637

研究課題名(和文)骨細胞が産生・分泌する分子による脂肪組織・脂質代謝制御の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of regulation for lipid metabolism by osteocyte producing molecules

研究代表者

田村 正人(Tamura, Masato)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：30236757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨細胞が産生し放出される分子が脂肪組織や肝臓などの遠隔臓器の脂質代謝にどのような影響を及ぼすか、異種組織間における機能的クロストークとこれを介する分子の役割を調べた。スクレロスチンが脂肪組織の脂肪細胞のみならず、肝臓における脂肪酸合成やコレステロール代謝といった生体にとって重要な脂質代謝系に対しても影響を及ぼした。またNeuropeptide YやSLRP (small leucine rich proteoglycan)であるオステオアドヘリンの発現が骨代謝のみならず脂質代謝を調節していることを明らかにした。また、オステオアドヘリンは細胞のアポトーシスを制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨組織において骨細胞が産生・分泌するスクレロスチンとneuropeptide Yの脂質代謝を制御するメカニズムを解明し、代謝調節臓器としての骨の役割を明らかにしたものである。骨代謝と脂質・エネルギー代謝が相互に影響しあうという全く新しい概念の分子機構を解明した点が大きな特色である。代謝調節臓器としての骨の役割を解明することは、これらの機構を応用した効果的な組織再生法の開発のみならず、肥満や糖尿病といった生活習慣病に対する対策への基盤となる。また、つながりの薄かった骨代謝学と脂質代謝学を一つの次元で関連付けた新たな研究ジャンルの確立の端緒となりうるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of molecules produced and released by osteocytes on lipid metabolism in distant organs such as adipose tissue and liver. Sclerostin affected not only fat cells in adipose tissue but also lipid metabolism, which is important for the living body, such as fatty acid synthesis and cholesterol metabolism in the liver. We also showed that the expression of neuropeptide Y and osteoadherin, a small leucine rich proteoglycan (SLRP), could regulate not only bone metabolism in osteoblasts but also lipid metabolism. We also demonstrated that Osteoadherin has been shown to regulate cell apoptosis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨細胞 骨組織 脂質代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨は、運動系器官の一つでありカルシウム代謝に重要な臓器である。近年、骨は単なる運動器官のみならず、さまざまな臓器間ネットワークを介する代謝の臓器の一つと考えられるようになり、骨代謝と糖代謝の関連性がクローズアップされている。すなわち、骨芽細胞のインスリンシグナルは骨芽細胞と破骨細胞との相互作用の調節を介してオステオカルシン合成を促進し、このオステオカルシンはすい臓でインスリンの合成・分泌を促進することで糖代謝を制御するという新概念の提唱である。この報告は大きなインパクトを与え、骨と他の臓器・器官との関連に関する新たな研究成果が続々と報告されてきた。例えば、骨細胞のないマウスでは肝臓における脂質代謝異常が見いだされた。また、脂肪細胞分化のモデルとして確立しているマウス 3T3-L1 細胞培養系において、骨細胞が産生する sclerostin (Sost 遺伝子産物) が脂肪細胞分化を正に調節すること、sclerostin は TAZ の活性を調節することが研究代表者らによって報告され、骨細胞が産生する sclerostin が他臓器である脂肪組織の脂肪細胞分化を制御し脂質代謝に影響を及ぼす可能性が示された。骨において産生される神経ペプチド neuropeptide Y 受容体 (Y1R) 欠失マウスにおいても、オステオカルシン非依存的な脂質代謝異常が報告されている。

脂肪組織は単に中性脂肪を蓄積するだけでなく、レプチンなどの adipocytokine と呼ばれる様々な生理活性物質を分泌する。また、核内受容体型転写因子である PPAR (peroxisomeproliferators - activated receptors) はインスリン抵抗性改善薬であるチアゾリジン誘導体の標的であり、標的遺伝子の応答配列に結合し、発現を制御し脂肪細胞分化のマスタレギュレータとして知られている。PPARs 応答配列を持つ遺伝子には、LPL (lipoprotein lipase) ,FAT (fattyacid transporter) ,ACS (acyl-CoA synthetase) ,UCP (uncoupling protein) など脂肪酸の取り込み、輸送、酸化など、脂質代謝に関わるものが多い。脂肪細胞分化の過程では Wnt が受容体に結合すると TCF7-L2 と  $\beta$ -catenin の複合体が核内受容体 COUP-TFII の転写を活性化し、これが PPAR 遺伝子の転写調節領域に結合しヒストン脱アセチル化酵素である SMRT などをリクルートし転写を抑制する機構が報告されている。加齢やチアゾリジン投与では、骨形成から脂肪形成へのスイッチが起こるが、転写因子 Maf2 による Runx2 と PPAR のバランス制御が重要との報告もある。また、糖代謝・骨代謝に関与する Foxo1 と同じファミリーの Foxo2 は肝臓において脂肪酸酸化、ケトン体合成などの脂質代謝に機能していることも報告されている。しかしながら、これまで骨細胞が産生・分泌される分子が脂肪組織や脂質代謝を制御する分子機構の詳細は明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、骨細胞が産生し放出される分子が脂肪組織の脂肪細胞分化や肝臓などの遠隔臓器における脂質代謝にどのような影響を及ぼすか、異種組織間における機能的クロストークとこれを介する分子の役割を明らかにすることを目的とした。これにより、代謝調節臓器としての骨の役割を解明することは、これらの機構を応用した効果的な組織再生法の開発のみならず、肥満や糖尿病といった生活習慣病に対する対策の端著となると考えられる。また、つながりの薄かった骨代謝学と脂質代謝学を一つの次元で関連付けた新たな研究ジャンルの確立の端緒となりうるものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) sclerostin (Sost) 組換えタンパク質の作製

Sost の cDNA をベクターに挿入し、タンパク質の精製を行った。精製タンパク質は SDS-PAGE 後、タグを用いたウエスタンブロットを行い確認した。

#### (2) Sost ノックダウンによる骨と脂質代謝の相互作用の解析

骨細胞である MLO-YO 細胞、骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞の培養系に siRNA もしくは TRUE gene silencing 法を用い Sost の発現をノックダウンさせた。これらの細胞から RNA を抽出し mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。また、(1) で作製した Sost 組換えタンパク質を加え培養した。マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞は、isobutyl-methylxanthine (IBMX)、dexamethasone、insulin の添加により脂肪細胞に分化するので、これらの細胞培養系を用い評価した。Oil Red O 染色によって脂肪滴を染色し脂肪細胞分化を調べた。これらの細胞もしくは肝臓の細胞から RNA を抽出し、LPL、FAT、ACS、UCP など脂肪酸の取り込み、輸送、酸化など脂質代謝関連酵素の発現についてリアルタイム PCR 法を用いて調べた。抗体を用いウエスタンブロットを行い、タンパク質の量を検討した。

### (3) 脂肪組織からのシグナル分子による sclerostin の産生調節の解析

アディポサイトカインなど脂肪組織からのシグナルによって sclerostin の産生が増減するかについて、ML0-Y4 細胞などの培養系を用いリアルタイム PCR 法もしくはウエスタンブロットを用い、アディポサイトカインなど脂肪細胞が産生する種々の因子の添加による発現量の変化を調べた。

### (4) 骨細胞が産生する神経ペプチドの作用機構の解析

neuropeptide Y Y1 受容体 (Y1R) 遺伝子の siRNA を MC3T3-E1 細胞にリポフェクタミン 2000 を用いてトランスフェクトし、Y1R の発現をノックダウンさせ、SLRP (small leucine rich proteoglycan) class II に分類されるオステオアドヘリンの発現について検討した。

### (5) オステオアドヘリンの発現とその調節の解析

オステオアドヘリンの各種培養細胞における発現を調べた。MC3T3-E1 細胞、ML0-Y4 細胞、C2C12 細胞 (筋芽細胞)、3T3-L1 細胞、ST2 細胞 (骨髄間質細胞) および bEnd.3 細胞 (血管内皮細胞) を培養後、全 RNA を抽出し、各種 SLRP の発現を RT-PCR 法を用いて調べた。また、MC3T3-E1 細胞を骨分化培地で培養しオステオアドヘリン mRNA の発現を調べた。Bone morphogenetic protein (BMP)2 は C2C12 細胞の骨芽細胞への分化を誘導することが知られているので、C2C12 細胞における BMP2 添加によるオステオアドヘリンの発現レベルを調べた。オステオアドヘリンの BMP2 による発現調節について明らかにするために、マウスオステオアドヘリン遺伝子のプロモーター領域 1.7kb をクローニングしルシフェラーゼレポーター pOmd-Luc を作成した。このレポータープラスミドを C2C12 細胞にリポフェクタミン 2000 を用いてトランスフェクトし、ルシフェラーゼアッセイにより転写の活性化の解析を行った。

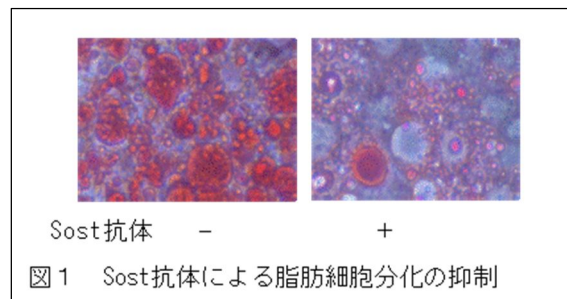
### (6) オステオアドヘリンによる骨と脂質代謝の相互作用の解析

オステオアドヘリンの cDNA を RT-PCR 法を用いて ML0-Y4 細胞からクローニングした。この cDNA を pcDNA3 ベクターへ In-Fusion クローニング法を用いてサブクローニングした。得られた発現ベクター pOmd を培養細胞にトランスフェクションし、オステオアドヘリンを過剰発現させた。また、オステオアドヘリンの siRNA を培養細胞にトランスフェクトしノックダウンを行った。ウエスタンブロットを用い過剰発現もしくはノックダウンを確認した。細胞数については Cell counting kit-8 を用いて測定した。アポトーシス活性については Caspase-Glo/7 Assay を用いて caspase3/7 活性を測定した。Sost の発現をリアルタイム PCR 法もしくはウエスタンブロットを用い調べた。

## 4. 研究成果

(1) Sost 組換えタンパク質を作製した。この Sost 組換えタンパク質を 3T3-L1 細胞の培養系に加え培養した。これらの細胞から RNA を抽出し RT-PCR 法を用いて PPAR $\alpha$ 、LPL、FAT、ACS、UCP など脂肪酸の取り込み、輸送、酸化など脂質代謝関連酵素の発現についてリアルタイム PCR 法を用いて調べたところ、それらの発現量が増加した。

(2) 3T3-L1 細胞の培養系に Sost siRNA をトランスフェクションさせた細胞や抗体を投与したマウスの脂肪組織量および脂肪細胞の活性の指標となるアディポネクチンを測定したところ、いずれも減少した。Oil RedO 染色を行い脂肪細胞の脂肪滴を調べたところ、脂肪滴の減少が観察された (図 1)。脂肪組織における PPAR $\alpha$ 、LPL および UCP の mRNA 発現量は減少した。脂肪細胞分化に関与するヒストン



メチル化酵素 Setdb1 の mRNA 発現量も低下した。肝臓組織から mRNA を抽出し、acyl-CoA carboxylase などの脂肪酸合成系や HMG-CoA reductase などのコレステロール代謝酵素の mRNA についてリアルタイム PCR 法を用いて測定したところ、これらの発現量は低下した。すなわち、骨細胞の産生する sclerostin が脂肪組織の脂肪細胞のみならず、肝臓における脂肪酸合成やコレステロール代謝といった生体にとって重要な脂質代謝系に対しても影響を及ぼすことが明ら

かとなった。

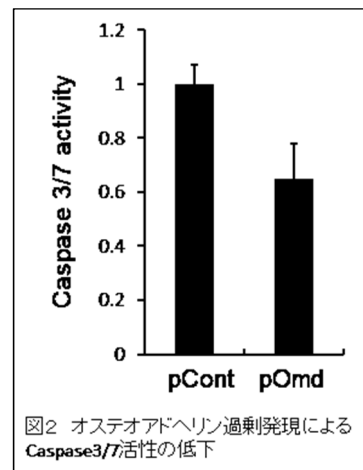
(3) MLO-Y4 細胞に種々の濃度のアディポネクチンを添加し培養した。全 RNA を抽出し、Sost の発現についてリアルタイム PCR 法を用いて調べたところ、発現量が増大した。脂肪細胞が産生するアディポサイトカインが sclerostin の産生を制御することが明らかになった。

(4) Neuropeptide Y は 36 アミノ酸残基よりなるペプチドで中枢神経系に広く存在し、食欲、エネルギー消費などに関与する。Neuropeptide Y の G タンパク質共役型受容体の一つである Y1R の骨芽細胞特異的遺伝子欠失マウスでは骨量の増大が報告されている。そこで、Y1R とオステオアドヘリンの機能関連を探るため、MC3T3-E1 細胞において Y1R の発現をノックダウンさせ、リアルタイム PCR 法を用いてオステオアドヘリンの mRNA 発現を調べた。オステオアドヘリン発現は Y1R の siRNA のトランスフェクションによって増加した。

(5) MLO-Y4 細胞、MC3T3-E1 細胞や 3T3-L1 細胞などを培養後、全 RNA を抽出し、各種 SLRP の発現を RT-PCR 法を用いて調べたところ、ビグリカンはいずれの細胞でも発現し、オステオアドヘリンは MLO-Y4 細胞および MC3T3-E1 細胞のみに発現していた。MC3T3-E1 細胞を骨分化培地にて培養しオステオアドヘリンの発現を調べた。オステオアドヘリン発現レベルは 1 週間培養後から増加し 3 週間後には更に増加した。

C2C12 細胞における BMP2 を添加し培養したところ、添加した BMP2 の濃度依存的にオステオアドヘリンの mRNA 発現レベルは増加し、また添加後の時間に依存してオステオアドヘリンの発現レベルは増加した。オステオアドヘリンの BMP2 による発現調節について明らかにするために、マウスオステオアドヘリン遺伝子のプロモーター領域 1.7kb をクローニングし、ルシフェラーゼレポーター-pOmd-Luc を作成した。このレポータープラスミドを C2C12 細胞にトランスフェクトし、ルシフェラーゼアッセイを行い転写活性について解析した。BMP2 の添加および Smad1/4 発現プラスミドの導入によって、ルシフェラーゼ活性が増加した。これらより、Smad シグナルがオステオアドヘリン遺伝子の転写活性を制御していること、オステオアドヘリン遺伝子の転写開始点上流に Smad1/4 応答領域の存在が考えられた。

(6) オステオアドヘリン過剰発現とノックダウンによる細胞増殖、アポトーシス誘導および Sost 発現に対する効果を調べた。オステオアドヘリンを MC3T3-E1 細胞において過剰発現させたところ、Cell counting kit-8 を用いた測定で生細胞数が増加し、Caspase-Glo 3/7 Assay を用いた測定で caspase3/7 活性が低下した(図 2)。一方、オステオアドヘリン siRNA のトランスフェクションによるオステオアドヘリンのノックダウンを行ったところ、caspase3/7 活性が増加し、アポトーシスが誘導された。また、オステオアドヘリン過剰発現により Sost の発現が増加し、一方オステオアドヘリン siRNA により Sost の産生が減少した。



(7) 本研究によって得られた以上の結果より、骨組織が産生する分子であるオステオアドヘリンが Sost を介して脂肪細胞分化および脂質代謝を調節する新たな分子機構の存在が明らかになった。今後、マウス個体を用いた研究により、骨組織と脂肪組織の組織間のクロストーク機構の詳細を解析する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hamaya Eri, Fujisawa Toshiaki, Tamura Masato	4. 巻 44
2. 論文標題 Osteoadherin plays roles in the regulation of apoptosis and growth in MC3T3-E1 osteoblast cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 2336-2344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijmm.2019.4376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yahara Motoki, Tei Kanchu, Tamura Masato	4. 巻 16
2. 論文標題 Inhibition of neuropeptide Y Y1 receptor induces osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 2779 ~ 2784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mmr.2017.6866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hamaya Eri, Fujisawa Toshiaki, Tamura Masato
2. 発表標題 Osteoadherin plays roles in the regulation of apoptosis and growth in MC3T3-E1 osteoblast cells.
3. 学会等名 30th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	田村 潔美  (Tamura Kiyomi)  (90399973)	北海道大学・歯学研究院・助教    (10101)	