

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：31602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K09642

研究課題名(和文) -ヒドロキシ酪酸とその代謝産物を用いた細胞分化誘導

研究課題名(英文) Induction of cell differentiation using α -hydroxybutyrate and metabolites

研究代表者

前田 豊信 (MAEDA, TOYONOBU)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：10382756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：-ヒドロキシ酪酸の培地中への添加は、間葉系細胞の培養において、幹細胞を骨芽細胞様の表現形を示す細胞へと、強く分化誘導した。この分化誘導は、GPR81リガンドである乳酸やプロピオン酸の添加でも、観察された。GRP81のshRNAを導入した細胞に、-ヒドロキシ酪酸を添加すると、分化誘導反応が消失した。MCT-1の強制発現を行ったが、分化誘導に変化がなかった。予想に反して、GPR81リガンドは、脂肪前駆細胞の分化を強く促進し、有意な脂肪滴蓄積を増加させた。GPR81リガンドはリプログラミング因子として、直接作用するのではなく、分化のアクセラレーターとしての役割を演じている可能性が分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の組織工学技術の進歩により、in vitroで生体組織を構築し、それを体内に移植する治療が可能になりつつある。しかし、骨組織の再生はその石灰化が必要であるため、軟組織の再生よりも時間がかかる。短時間で骨芽細胞が石灰化するように誘導させる技術の開発は、非常に重要な問題である。本研究では-ヒドロキシ酪酸や乳酸、その他のGPR81リガンドが、GPCR81を直接刺激して、間葉系細胞の分化アクセラレーターとして、機能していることを突き止めた。これらの知見は、将来の細胞工学において、有意義なものとなると考える。

研究成果の概要(英文)：Addition of α -hydroxybutyrate to the culture medium strongly induced differentiation of stem cells into cells exhibiting osteoblast-like phenotypes in mesenchymal cell cultures. This differentiation induction was also observed when lactate or propionate, which are GPR81 ligands, were added to the culture media. To confirm this stimulation pathway, α -hydroxybutyrate was added to cells transfected with GRP81 shRNA, and the differentiation induction response disappeared. Considering the possibility that a reaction mediated by monocarboxylate transporter was occurring, MCT-1 was forced to be expressed, but there was no change in the differentiation induction. Contrary to expectations, GPR81 ligand strongly promoted differentiation of adipose precursor cells and significantly increased lipid droplet accumulation. It was found that GPR81 ligand may play a role as an accelerator of differentiation rather than acting directly as a reprogramming factor.

研究分野：口腔生化学

キーワード：GPR81 -ヒドロキシ酪酸 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞の技術と組織工学技術の進歩により、*in vitro* で生体組織を構築し、それを体内に移植することで、治療を行う事が可能になりつつある。しかし、骨組織の再生はその石灰化が必要であるため、軟組織の再生よりも時間がかかる。骨芽細胞をを短時間で石灰化させることが可能になれば、最終目的の形態に準ずる可溶性スキャフォールドを用意しておき、そこに骨芽細胞を播種し、石灰化促進剤を添加することで、短時間に骨形成が行える可能性がある。私たちの従前の研究で、動物組織に挿入した、低重合度ポリ L 乳酸や、細胞培養液中の高濃度乳酸が、骨芽細胞の石灰化を、強く促進し、短時間で石灰化させていることが分かった。乳酸は Monocarboxylate transporter によって細胞内輸送されるが、同時に GPR81 のリガンドである。本研究では、乳酸と同じく GPR81 リガンドに分類される γ -ヒドロキシ酪酸にも、乳酸と同様もしくは、それ以上の能力があるのではないのかと考え、研究を行った。

2. 研究の目的

複数種類の GPR81 リガンドのうち、 γ -ヒドロキシ酪酸とその他のリガンドについて、石灰化誘導能の有無を確認する。このうち、効果があったものに関して、GPR81 経路でその効果が現れているのか、Monocarboxylate transporter 経路で、細胞内からその効果が現れているのかを確認する。その上で、未分化間葉細胞への影響(分化の振り分け、もしくはダイレクトリプログラミングが可能なのか)に関して、調査する目的で、脂肪に分化するコンポーネントの培地で培養した未分化間葉細胞、前駆脂肪細胞、分化した脂肪細胞に、 γ -ヒドロキシ酪酸とその他の GPR81 リガンド適応し影響を評価する。さらに、これらのシグナル伝達経路の解明を試みると同時に、既知の骨形成促進剤との併用について考える。

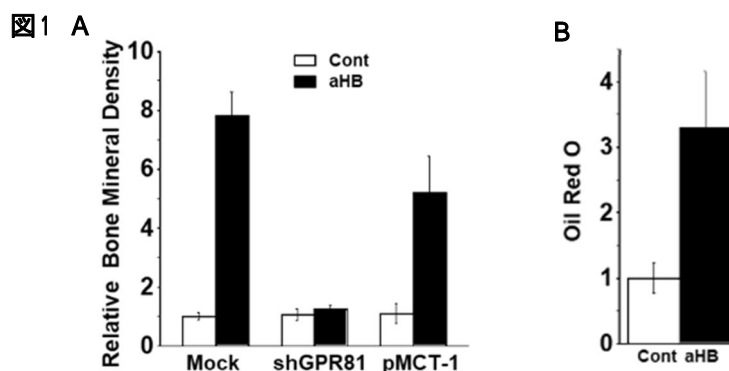
3. 研究の方法

in vitro の実験は、MC3T3-E1 細胞、ST2 細胞、3T3-L1細胞を主に用いた。培地は通法に従い、10%FBS 添加下で行った。ここに、高濃度乳酸、 γ -ヒドロキシ酪酸、 β -ヒドロキシ酪酸、グリコール酸、D-カルニチン酒石酸、L-カルニチン酒石酸、プロピオン酸、マレイン酸を加えた。骨芽細胞の石灰化粒は Alizarin red-S 染色で、脂肪細胞の脂肪滴蓄積は Oil Red O 染色で評価した。遺伝子発現量は、RT-qPCR にて評価し、タンパク質量はウエスタンブロット法と ELISA により評価した。AP-1 活性、NF- κ B 活性、ISRE 活性は、ルシフェラーゼアッセイによって調査した。*in vitro* の実験は、SD ラットの頭蓋冠に人為的に孔を開け、高分子化合物の混合物を適用し、3週間後に屠殺して、マイクロ CT にて骨形成を評価した。

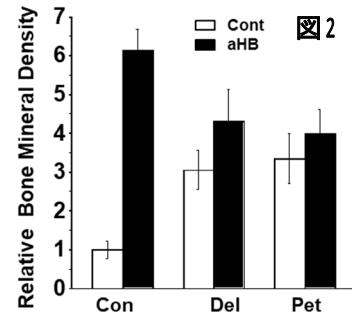
4. 研究成果

(1) γ -ヒドロキシ酪酸の分化誘導能を検討した結果、間葉系細胞において、骨芽細胞への強い誘導能を有していた。これは、GPR81 リガンドである乳酸やプロピオン酸でも同様であった。GPR81 経路をより明確にするために、GPR81 の shRNA を導入すると、この反応は消失した。また、Monocarboxylate transporter の強制発現を行ったが、対照と明確な差が観察出来なかった(図1A)。これは、MCT-1 を介して、 γ -ヒドロキシ酪酸が細胞内に侵入し、その反応を起こしている訳ではないことを意味している。 γ -ヒドロキシ酪酸と同様の反応は、グリコール酸、L-カルニチン酒石酸、マレイン酸で確認出来た。

しかし、予想に反して、これらの GPR81 リガンドは、前駆脂肪細胞にまで分化した細胞に適用しても、骨芽細胞の表現形を提示させることは出来なかった。加えて、分化した脂肪細胞の脂肪滴蓄積も誘導した(図1B)。これらのことは、少なくとも、GPR81 リガンド単独では、ダイレクトリプログラミングを行う能力が無いと考えられる。

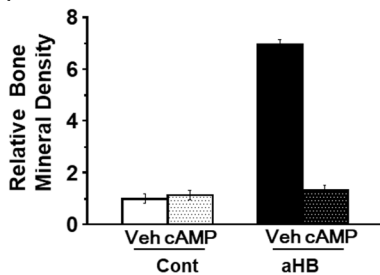


(2) -ヒドロキシ酪酸単体、と混合物質 delphinidin 配糖体高含有植物抽出物、 petunidin、 Platelet-rich Fibrin の効果を検討した。 ~ は、 in vivo, invitro において単独で、骨芽細胞において骨形成誘導能を示した (Antioxidants (Basel).、 Int J Mol Sci. 2019.、 Exp Ther Med. 2019.)。加えて、破骨細胞の活性化を抑制した。これらと、 -ヒドロキシ酪酸との併用で石灰化促進能力を評価したが、期待していた相乗効果は確認することが出来なかった (図2)。

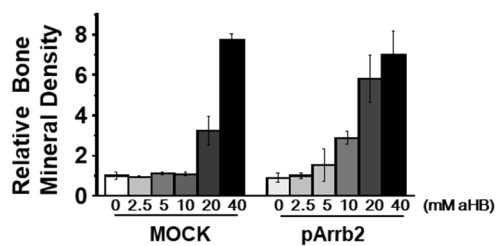


(3) -ヒドロキシ酪酸の骨形成促進作用は、細胞膜貫通型の cAMP である 3',5'-cyclic monophosphate (CPT-cAMP) によって消失した (図3A)。これは、グリコール酸、L-カルニチン酒石酸、マレイン酸でも同様であった。このことから、シグナル伝達は、GPR81 アダプタータンパク質である ARRB2 が関与している可能性が浮上した。ARRB2 の強制発現を行うと、低濃度 -ヒドロキシ酪酸の作用を一部強調させた (図3B)。

図3 A



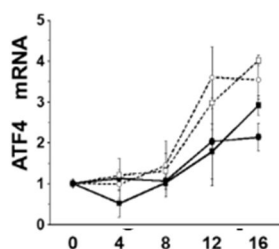
B



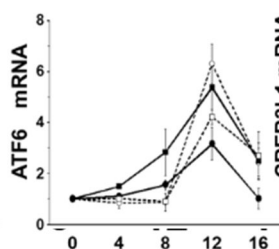
(4) -ヒドロキシ酪酸による骨形成促進作用が、あたかも急性肝障害や急性膵炎のように、Toll-like receptor を介して活性化されるインフラマソームの作用に関与しているのではないかと仮説を立てた。AP-1 活性、NF- B 活性、ISRE 活性について調査を行った。その結果、AP-1 活性と NF- B 活性には変化が観察されなかった。ISRE 活性についてのみ、変化が認められた。ここから、GPR81 リガンドの刺激による骨形成促進経路の一部に、細胞外の鉄イオンの存在が影響している可能性が示唆された。

(5) 並列して行った研究から、膜貫通型ムチンである MUC4 の下流シグナルに、GPR81 が関与する可能性が考えられたため、これを検証した。この結果、幾つかの遺伝子発現の解析を行ったが、予想した結果が得られなかった (図4A~C) ため、MUC4 との関連の可能性を排除した。

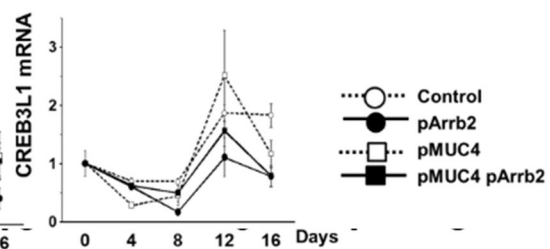
図4 A



B



C



Legend for Figure 4:
 Control: Dotted line with open circles
 pArrb2: Solid line with filled circles
 pMUC4: Dotted line with open squares
 pMUC4 pArrb2: Solid line with filled squares

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hatori Tomoya, Maeda Toyonobu, Suzuki Atsuko, Takahashi Keiso, Kato Yasumasa	4. 巻 27
2. 論文標題 SPARC is a decoy counterpart for c?Fos and is associated with osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells by inhibiting adipogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 KOJIMA Tsuyoshi, MAEDA Toyonobu, SUZUKI Atsuko, YAMAMORI Tetsuo, KATO Yasumasa	4. 巻 41
2. 論文標題 Intracellular zinc-dependent TAS2R8 gene expression through CTCF activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 217 ~ 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.41.217	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 Kobayashi-Sakamoto Michiyo, Maeda Toyonobu, Yusa Junko, Kato Yasumasa, Kiyoura Yusuke	4. 巻 149
2. 論文標題 RANK-RANKL signaling upregulates Il-10 mRNA expression in mucosal Candida infection in vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 104285 ~ 104285
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.micpath.2020.104285	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagaoka Masahiro, Maeda Toyonobu, Chatani Masahiro, Handa Kazuaki, Yamakawa Tomoyuki, Kiyohara Shuichi, Negishi-Koga Takako, Kato Yasumasa, Takami Masamichi, Niida Shumpei, Lang Stefanie, Kruger Marlana, Suzuki Keiko	4. 巻 8
2. 論文標題 A Delphinidin-Enriched Maqui Berry Extract Improves Bone Metabolism and Protects against Bone Loss in Osteopenic Mouse Models	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 386 ~ 386
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox8090386	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 該当する

1. 著者名 Nagaoka Masahiro, Maeda Toyonobu, Moriwaki Sawako, Nomura Atsushi, Kato Yasumasa, Niida Shumpei, Kruger Marlana C., Suzuki Keiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Petunidin, a B-ring 5 -O-Methylated Derivative of Delphinidin, Stimulates Osteoblastogenesis and Reduces sRANKL-Induced Bone Loss	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2795 ~ 2795
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20112795	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 該当する

1. 著者名 Sumida Ryuta, Maeda Toyonobu, Kawahara Ichiro, Yusa Junko, Kato Yasumasa	4. 巻 18
2. 論文標題 Platelet-rich fibrin increases the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B ligand ratio in osteoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 358-365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2019.7560	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 Sutoo Shusaku, Maeda Toyonobu, Suzuki Atsuko, Kato Yasumasa	4. 巻 37
2. 論文標題 Adaptation to chronic acidic extracellular pH elicits a sustained increase in lung cancer cell invasion and metastasis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Metastasis	6. 最初と最後の頁 133 ~ 144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10585-019-09990-1	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12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 内山梨夏、前田豊信、鈴木厚子、松本知生、加藤靖正、山森徹雄
2. 発表標題 ムチン4 強制発現が及ぼす影響の解析
3. 学会等名 第70回奥羽大学歯学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金子良平、森山徹雄、前田豊信、鈴木厚子、内山梨夏、加藤靖正
2. 発表標題 ヒスタチンがマトリックスメタロプロテア - ゼ分泌に及ぼす影響
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤靖正、鈴木厚子、前田豊信
2. 発表標題 酸性細胞外pHへの馴化はマウス口腔扁平上皮癌細胞のstemnessを誘導する
3. 学会等名 第29回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島剛志、金子良平、前田豊信、鈴木厚子、森山徹雄、加藤靖正
2. 発表標題 TAS2R8発現における亜鉛の役割
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 靖正, 鈴木 厚子, 前田 豊信
2. 発表標題 Adaptation to acidic extracellular pH induces cancer stem cell like phenotype
3. 学会等名 第78回 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 須藤 周作, 前田 豊信, 鈴木 厚子, 加藤 靖正
2. 発表標題 酸性細胞外pH馴化と癌細胞の転移能獲得について
3. 学会等名 第61回 歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 靖正, 鈴木 厚子, 前田 豊信, 小笠原 康悦
2. 発表標題 酸性細胞外pH馴化は造腫瘍性を促進する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川嶋雅之, 前田豊信, 鈴木厚子, 加藤靖正
2. 発表標題 Pak6/7はマウス B16メラノーマにおいて酸性細胞外pHによって誘導される MMP-9レベルを調節する.
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川嶋 雅之, 前田 豊信, 鈴木 厚子, 加藤 靖正
2. 発表標題 マウスB16メラノーマにおける酸性細胞外pHによるMMP-9発現誘導へのPak6/7の関与
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato Y, Sudo S, Suzuki A, Maeda T
2. 発表標題 Adaptation to extracellular acidification induces metastatic phenotype which sustains within several passage generation at physiological pH in Lewis lung carcinoma
3. 学会等名 17th Biennial Congress of the Metastasis Research Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤靖正, 鈴木厚子, 前田豊信
2. 発表標題 酸性pHe による転移性細胞の選択と維持
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kato Y, Suzuki A, Maeda T
2. 発表標題 Metastatic phenotype and acidic microenvironment
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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	岡田 英俊 (Okada Hidetoshi) (40275623)	奥羽大学・歯学部・教授 (31602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	加藤 靖正 (Kato Yasumasa) (50214408)	奥羽大学・歯学部・教授 (31602)	
研究分担者	阿部 匡聡 (Abe Masatoshi) (10254872)	奥羽大学・歯学部・講師 (31602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関