

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09875

研究課題名（和文）骨芽細胞が産生する新規SLRPを介した脂肪細胞分化・脂質代謝の制御機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of adipogenic differentiation and lipid metabolism by osteoblasts produced novel small leucine rich proteoglycan (SLRP)

研究代表者

田村 正人（Masato, Tamura）

北海道大学・歯学研究院・特任教授

研究者番号：30236757

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）：組換えオステオアデヘリンタンパク質を作製し、このオステオアデヘリンを3T3-L1細胞に加えて培養したところ、Oil RedO陽性の脂肪滴の増加が観察され、PPAR α 、LPLおよびUCPのmRNA発現量が増加した。欠失変異型組換えオステオアデヘリンを作製し、検討した。ロイシンリッチリピートドメインを欠失させたものでは、脂肪滴形成の増加が抑制され、PPAR α などのmRNA発現の増加が抑えられた。骨芽細胞が産生する分子であるSLRPの一つであるオステオアデヘリンのロイシンリッチリピートドメインを介する結合による、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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨芽細胞が産生するSLRPの一つであるオステオアデヘリンに注目し、この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、そして異種組織間における機能的クロストークとこれらのメカニズムの詳細を明らかにすることを目的とした研究である。オステオアデヘリンは脂肪細胞分化と脂質代謝を正に制御することを見出した。代謝調節臓器としての骨の役割を解明した本研究の成果は、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、いわゆる生活習慣病である肥満や糖尿病といった疾患に対する対策の一端となると考えられ、その意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We created a recombinant osteoadherin protein and then 3T3-L1 cells were cultured. By adding recombinant osteoadherin protein, an increase in Oil RedO-positive lipid droplets and an increase in the mRNA expression levels of PPAR α , LPL, and UCP were observed. A deletion mutant recombinant osteoadherin was constructed and then investigated. When the leucine-rich repeat domain was deleted, the increase in lipid droplet formation was suppressed, and the increase in mRNA expression such as PPAR α was also suppressed. A new molecular mechanism has been revealed in which osteoadherin, a SLRP produced by osteoblasts, regulates adipocyte differentiation and lipid metabolism through binding with the leucine-rich repeat domain.

研究分野：口腔生化学

キーワード：骨芽細胞 脂肪細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨は、運動系器官の一つであるが、近年、さまざまな臓器間ネットワークを介する代謝の臓器と考えられるようになり、骨代謝と糖代謝の関連性が注目されてきた。すなわち、骨芽細胞と破骨細胞との相互作用の調節を介してインスリンシグナルはオステオカルシン合成を促進し、このオステオカルシンが骨髄におけるインスリン分泌を促進することで糖代謝を制御するという仕組みの提唱である。さらに、骨と他の全身の臓器との相関を示す新たな研究成果が続々と報告されてきた。これまで研究代表者は、骨量の調節に大きな機能を果たす Wnt シグナルに関して、骨芽細胞分化における役割および造血系との関連性を見出し報告してきた。また、骨細胞が産生し血中に放出される sclerostin (Sost 遺伝子産物) が脂肪細胞の分化を誘導することを報告した。骨で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、脂質代謝異常が報告されている。これらは、骨細胞が産生するタンパク質が他臓器である脂肪組織の脂肪細胞分化を制御し、脂質代謝を制御するメカニズムの存在を示している。

脂肪組織は中性脂肪の蓄積のみならず、レプチンなどのアディポカインと総称される様々な生理活性物質を産生し分泌する。脂肪細胞分化を誘導する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として標的遺伝子の応答配列に結合し、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターとして知られている。応答配列を持つ遺伝子としては、LPL (lipoprotein lipase)、FAT (fatty acid transporter)、UCP (uncoupling protein) など脂肪酸の取り込み、輸送、酸化など代謝に関わるものが多く知られている。加齢やチアゾリジン投与によって骨形成から脂肪形成へのスイッチが起こるが、Runx2 と PPAR のバランスが重要との報告もある。

近年、研究代表者らは、骨芽細胞が産生する small leucine rich proteoglycan (SLRP) の一つであるオステオアドヘリンが脂肪細胞分化に影響を与える可能性を見出した。しかしながら、これまでオステオアドヘリンが脂肪組織や脂質代謝を制御する詳細な分子機構については、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、骨芽細胞が産生する SLRP の一つであるオステオアドヘリンに注目し、この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、そして異種組織間における機能的クロストークとこれらのメカニズムの詳細を明らかにすることを目的とした。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、いわゆる生活習慣病である肥満や糖尿病といった疾患に対する対策の一端となると考えられる。また、これまで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学問領域の創造となりうるものである。

3. 研究の方法

(1) オステオアドヘリン (可溶性) 組換えタンパク質の作製

オステオアドヘリンの cDNA を RT-PCR 法を用いて MLO-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 HEK293 細胞にトランスフェクションし、翻訳後修飾されたオステオアドヘリンを培地中から得て、部分精製を行った。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用いて確認した。

(2) オステオアドヘリン組換えタンパク質の脂肪細胞分化に及ぼす作用の検討

組換えオステオアドヘリンを 3T3-L1 細胞に加えて培養し、Oil RedO 染色により脂肪細胞分化の評価を行った。このとき、同時に sclerostin を加えた場合についても検討を行った。この培養系で全 RNA、タンパク質を採取し、PPAR、C/EBP-、LPL (lipoprotein lipase)、FAT (fatty acid transporter)、ACS (acyl-CoA synthetase)、UCP (uncoupling protein) など白色脂肪細胞分化、脂肪酸の取り込み・輸送・酸化など脂質代謝に関わる分子、脂肪 (白色、褐色) 細胞マーカーの発現をリアルタイム PCR や Western ブロットング法を用いて測定した。

(3) オステオアドヘリンの欠失変異型組換えタンパク質の作成

オステオアドヘリンのコアプロテインの N 末端部分、ロイシンリッチリピートドメイン、硫酸化チロシンドメイン、C 末端部分をそれぞれ欠失させた変異体をコードするフラグメントを作成し、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。得られた各種変異発現ベクターを HEK293 細胞にトランスフェクションし、発現したタンパク質を培地中から回収した。得られたタンパク質は SDS-PAGE 後、タグを用いたウエスタンブロットを用いて確認した。

(4) 欠失変異型組換えオステオアドヘリンの脂肪細胞分化に及ぼす作用の検討

種々の欠失変異型組換えオステオアドヘリンを 3T3-L1 細胞に加えて培養し、脂肪細胞への分

化の程度を測定した。同時に sclerostin を加え比較検討した。全 RNA、タンパクを採取し、PPAR、C/EBP β 、LPL などの発現量をリアルタイム PCR や Western プロットング法を用い測定した。

(5) オステオアダヘリンと LRP との分子間相互作用の解析

IP-Western 法を用いオステオアダヘリンと LRP の分子間相互作用を調べた。それぞれの cDNA フラグメントを FLAG、myc タグを付加するためのベクターに挿入し、細胞にトランスフェクトした。細胞抽出物をタグに対する抗体で免疫沈降したのち、他方のタグ抗体でウエスタンブロットを行った。さらに、オステオアダヘリンの種々の欠失変異体を作成して、それぞれの分子の相互作用部位を検討した。

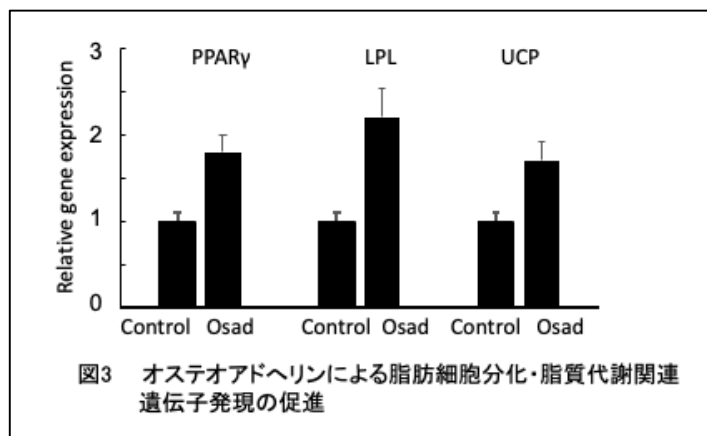
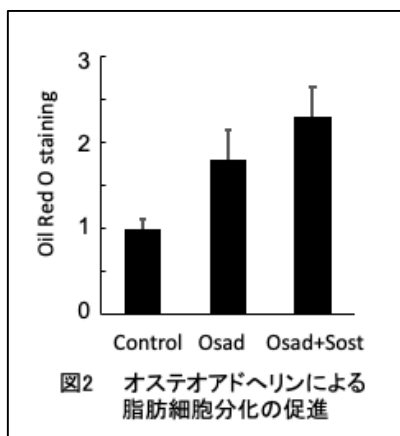
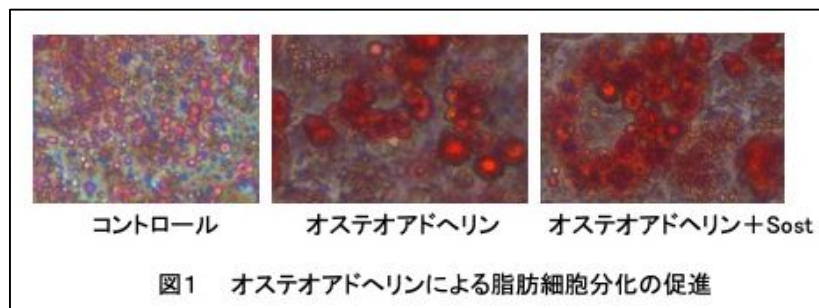
(5) オステオアダヘリンによる骨と脂質代謝の相互作用の解析

オステオアダヘリン発現ベクター pOsad を培養細胞にトランスフェクションし、オステオアダヘリンを過剰発現させた。また、オステオアダヘリンの siRNA をトランスフェクトしノックダウンした。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。アディポサイトカインや bDFP など種々のシグナル分子の発現量の変化を Real time PCR 法で調べた。細胞数については Cell counting kit-8 を用い、アポトーシス活性については Caspase-Glo/7 Assay を用い caspase3/7 活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 組換えオステオアダヘリンタンパク質を作製した。HEK293 細胞に作成した発現プラスミドを、リポフェクタミン 2000 を用いてトランスフェクトした。この細胞の培養上清を回収し濃縮・部分精製を行い組換えオステオアダヘリンフラクションを得た。

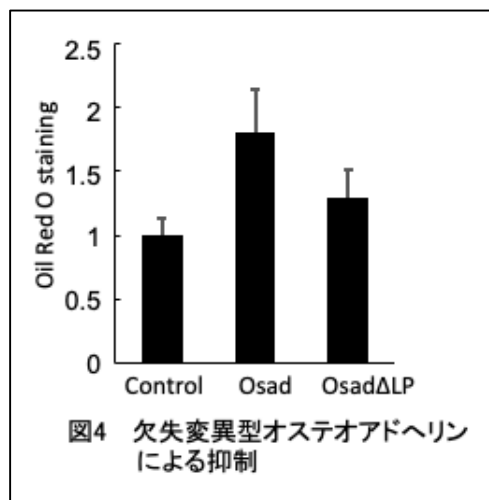
(2) 得られた組換えオステオアダヘリンを 3T3-L1 細胞に加えて培養し、Oil Red O 染色により脂肪細胞分化の評価を行った。オステオアダヘリンを加え Oil Red O 染色を行い脂肪細胞の脂肪滴を調べたところ、脂肪滴数の増加が観察された。



Sclerostin を加えるとさらに陽性細胞数の増加が認められた (図 1、2)。この培養系において全 RNA を採取し、脂肪細胞分化、脂肪酸の取り込み・輸送・酸化など脂質代謝に関わる PPAR、LPL および UCP の mRNA 発現量を調べたところ、いずれも発現量が増加した。このとき、同時に sclerostin を加えたところ、さらに増加が認められた (図 3)。抽出タンパク質を用いたウエスタンブロットでも同様な結果が得られた。すなわち、骨芽細胞が産生するオステオアダヘリンが脂肪組織の脂肪細胞分化のみならず、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えることが明らかとなった。

(3) オステオアダヘリンの種々の欠失変異型組換えタンパク質を作製した。HEK293 細胞に種々の欠失させた発現プラスミドを、リポフェクタミン 2000 を用いてトランスフェクトした。この細胞の培養上清を回収し濃縮・部分精製を行い組換えオステオアダヘリンフラクションを得た。

(4)得られた欠失変異型組換えオステオアデリンを 3T3-L1 細胞に加えて培養し、Oil RedO 染色により脂肪細胞分化の評価を行った。オステオアデリンのコアプロテインの N 末端部分、硫酸化チロシンドメイン、C 末端部分をそれぞれ欠失させた変異体では、欠失させていないオステオアデリンとほぼ同程度の脂肪滴の形成が見られたが、ロイシンリッチリピートドメインを欠失させたもの (Osad LP) では、脂肪滴形成の増加が抑制された (図 4)。全 RNA を抽出し、PPAR、LPL および UCP の mRNA 発現についてリアルタイム PCR 法を用いて調べたところ、ロイシンリッチリピートドメインを欠失させたオステオアデリンでは、それらの発現量の増加が抑えられた。これらより、オステオアデリンのロイシンリッチリピートドメインが脂肪細胞分化の誘導に重要であることが明らかになった。



(4)オステオアデリンのロイシンリッチリピートドメインと LRP との相互作用について IP-Western 法を用いた解析を行った。LRP はロイシンリッチリピートドメインと結合しうることが示された。一方、硫酸化チロシンドメインおよび N 末端ドメインでは LRP との結合が観察されず、ロイシンリッチリピートドメインとの結合が特異的であることが示唆された。

(5)オステオアデリン過剰発現とノックダウンによる細胞増殖、アポトーシス誘導に対する効果を調べた。オステオアデリンを ML0-Y4 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。一方、オステオアデリン siRNA のトランスフェクションによるオステオアデ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。

(6)本研究によって得られた以上の結果より、骨芽細胞が産生する SLRP の一つであるオステオアデリンがロイシンリッチリピートドメインを介した LRP との結合を介して、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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村-辻 潔美、田村 正人
2. 発表標題 ミオシン軽鎖のリン酸化を介した血管新生の薬剤によるコントロール
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田村-辻 潔美, 田村正人
2. 発表標題 bFGF は静止期の血管平滑筋細胞を特異的に刺激し増殖と脱分化を誘導する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田村-辻 潔美, 佐藤 真理, 田村正人
2. 発表標題 血管発生におけるグリシン二相性効果に関与するシグナル伝達経路
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021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・准教授 (10101)	

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
---------	---------