

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11635

研究課題名(和文) 奇数鎖脂肪酸による骨代謝制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Odd chain fatty acids suppress RANKL-induced osteoclast differentiation via Keap1/Nrf2 pathway

研究代表者

伴野 勸 (Tomono, Susumu)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：60554011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：最近、大規模疫学調査により奇数鎖脂肪酸が糖尿病を含む慢性炎症疾患と逆相関する事が報告された。しかし、長鎖奇数鎖脂肪酸(ヘプタデカン酸やペンタデカン酸)の骨代謝との関連性についてはわかっていない。本研究では、ヘプタデカン酸、ペンタデカン酸の添加によって骨髄由来細胞およびマクロファージ様細胞RAW264.7においてRANKL誘導破骨細胞分化誘導を阻害することがわかった。さらにその分化誘導抑制メカニズムはKeap1/Nrf2経路の活性化によるものであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症はQOL(quality of life:生活の質)を低下させるだけではなく、高齢者の生命にも関わる重大な疾患である。また、我が国の医療費は2018年度には42.5兆円と国家予算の約半分となり、国民の生活を圧迫する大きな要因ともなっており、骨粗鬆症予防が喫緊の課題となっている。奇数鎖脂肪酸(C15:0, C17:0)の破骨細胞分化抑制効果と骨の代謝メカニズムとの関連性を明らかにすることは、生体内に存在する脂質バランスと骨粗鬆症発症機序との関連性の解明や脂質に着目した食と栄養学的な骨粗鬆症発症予防に有用な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recently, some large-scale epidemiological studies reported an inverse association between chronic inflammatory diseases risk and odd-chain saturated fatty acids (OCFAs). However, the molecular mechanism by which OCFAs suppress inflammation remains unclear. In this study, we found that the addition of heptadecanoic acid and pentadecanoic acid inhibited RANKL-induced osteoclast differentiation in bone marrow-derived cells and RAW264.7. Furthermore, the inhibitory mechanism of RANKL-induced osteoclast differentiation was suggested to be due to activation of the Keap1/Nrf2 pathway.

研究分野：生化学

キーワード：奇数鎖脂肪酸 機能性脂質 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

現在、急速な高齢化が進み、我が国では65歳以上の高齢者が人口の四分の一に増加している。それに伴い骨粗鬆症患者数はおよそ1300万人と年々右肩上がり増加している。骨の健康は破骨細胞と骨芽細胞による代謝バランスによって維持されているが、体内で破骨細胞の働きが強くなり過ぎると、骨量が減少し、骨粗鬆症の発症や進行の要因となる。

破骨細胞は、慢性炎症に深く関わる単球・マクロファージを由来としており、骨芽細胞や免疫細胞が産生するM-CSF (macrophage colony stimulating factor: マクロファージコロニー刺激因子) や破骨細胞分化因子RANKL (receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) ligand) によって分化が惹起される。さらに、最近、IL-6やIL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ など炎症性サイトカインや生体膜主成分であるリン脂質の分解物であるリゾリン脂質、炎症誘発性の飽和脂肪酸であるパルミチン酸(C16:0)が破骨細胞の分化を惹起することが分かってきている。しかし、破骨細胞の分化誘導と炎症性サイトカイン産生、そして生体内脂質バランスを繋げる研究はまだまだ少なく、生活習慣病に伴う骨粗鬆症リスク増加メカニズムの解明が待たれている。

最近、2型糖尿病のヨーロッパ多国間相互コホート研究により、長鎖奇数鎖脂肪酸(Odd Chain Fatty Acids: OCFAs) (ペンタデカン酸; C15:0、ヘプタデカン酸; C17:0) を構成成分に含むリン脂質やトリアシルグリセロールの血漿中濃度と肥満・糖尿病罹患患者数が逆相関を示すことが報告された(Lancet diabetes endocrinol., 2014, 2 810-818.)。また、他の疫学研究では肥満者において生体内の炎症の指標であり、2型糖尿病の有意な予測因子であると確認されている血清C反応性蛋白(CRP)値(JAMA, 2001, 286, 327-334.)や肥満や糖尿病で高値を示す15-ケト-ジヒドロプロスタグランジンF2aや8-イソ-プロスタグランジンF2aと長鎖奇数鎖脂肪酸を化学構造に有するリン脂質濃度は逆相関しているとの報告や血中長鎖奇数鎖脂肪酸濃度が高値であるほど、炎症性サイトカインで2型糖尿病の予測因子でもあるIL-6の値が有意に低かったとの疫学調査結果もある(Obesity, 2011, 19, 2404-2410.)。また、我々も自己免疫疾患モデルマウスや肥満・糖尿病モデルマウスの血中長鎖奇数鎖脂肪酸、それを化学構造に含むリン脂質濃度の変化が対照群と比較して顕著に変動することを確認した。

## 2. 研究の目的

OCFAsは疫学研究によって慢性炎症や肥満・糖尿病を抑える新たな機能性脂肪酸としての可能性が示唆されている。しかし、現在までにOCFAsの機能性研究はほとんど無く、生活習慣病との関わりについてはほとんどわかっていない。本研究では、奇数鎖脂肪酸の抗炎症作用が骨の健康寿命の延伸に寄与できるかどうかを明らかにすることを目的として、マウスより採取した骨髄細胞や培養細胞から分化誘導した破骨細胞を用いて、これらシグナル因子の発現や翻訳後修飾の有無を通じて奇数鎖脂肪酸の抗骨粗鬆症作用機序の解明を試みた。

## 3. 研究の方法

奇数鎖脂肪酸添加が破骨細胞分化誘導に及ぼす影響

C57BL/6Jマウス大腿骨髄より採取した骨髄細胞においてM-CSFおよびRANKLを添加し、分化誘導する際に、同時にC16:0、C17:0、オレイン酸(C18:1)、エイコサペンタエン酸(EPA, C20:5)の5種類の脂肪酸を血中と同等の濃度で添加を行い、3日間の培養後、破骨細胞分化誘導の進行や抑制効果を確認した。破骨細胞の分化は破骨細胞特異的に赤色に染色されるTRAP(酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ; Tartrate-Resistant Acid Phosphatase)染色で評価した。

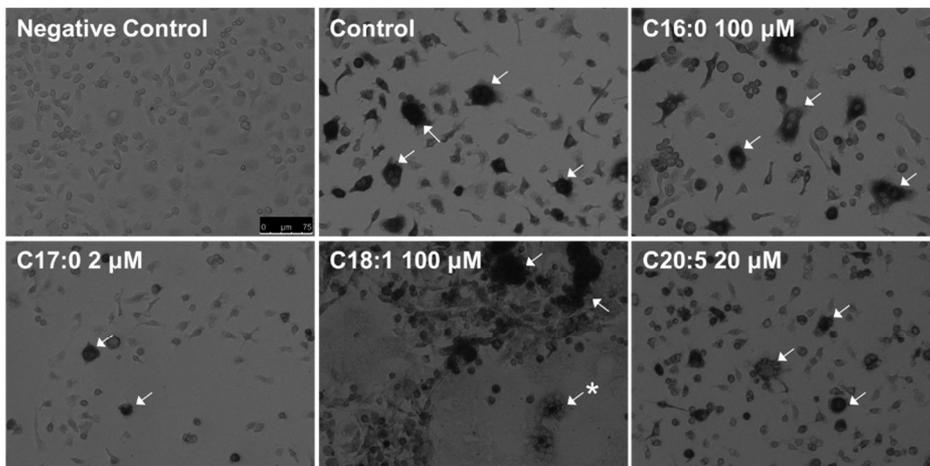
奇数鎖脂肪酸によるタンパク質発現変化の網羅的解析

RAW264.7やC57BL/6Jマウス大腿骨髄より採取した骨髄細胞からM-CSFおよびRANKLを添加する際に、同時に脂肪酸の添加を行い、破骨細胞分化誘導時のタンパク質の発現変動を高分解能LC/MS(TripleTOF5600, Sciex社)を用いて網羅的に解析を行った。

## 4. 研究成果

奇数鎖脂肪酸添加が破骨細胞分化誘導に及ぼす影響

図1より、ヘプタデカン酸(C17:0)の投与によって破骨細胞に分化がControlと比較して著しく抑制されていることがわかった。その抑制効果は抗炎症性脂肪酸であるEPAと比較しても著しく高い。また、オリーブ油に多く含有する機能性脂肪酸として知られているオレイン酸(C18:1)は単核破骨細胞からさらに多核成熟破骨細胞に分化誘導が促進されていた。また、C17:0の添加濃度による影響を確認した結果、添加濃度依存的に破骨細胞への分化誘導は抑制された。本結果より、奇数鎖脂肪酸は骨粗鬆症発症を抑制する可能性が示唆され、また、生体内に存在する遊離脂肪酸濃度の変化が破骨細胞の分化率に影響を及ぼし、骨粗鬆症リスクの増減に関与している可能性が考えられた。



\* 成熟破骨細胞

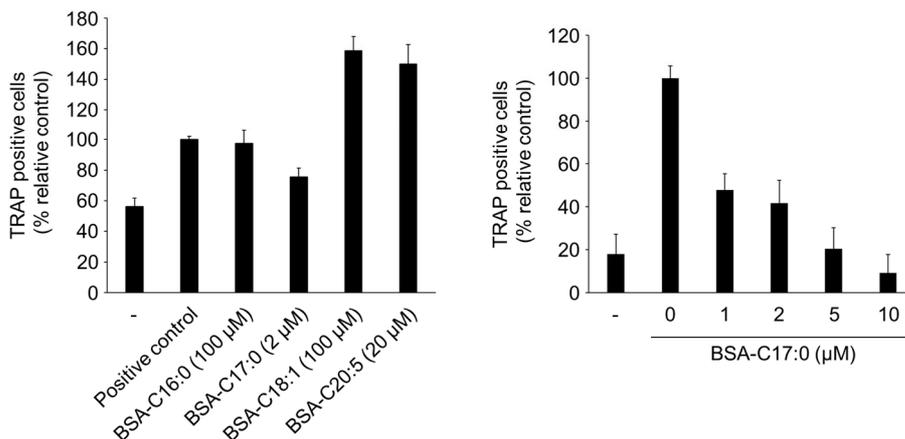


図1 マウス骨髄細胞における遊離脂肪酸添加が破骨細胞分化誘導に及ぼす影響

#### 奇数鎖脂肪酸によるタンパク質発現変化の網羅的解析

次に奇数鎖脂肪酸による破骨細胞分化誘導抑制機構について明らかとすることを目的として奇数鎖脂肪酸タンパク質発現変動を網羅的に解析することとした。

その結果、ヘプタデカン酸 (C17:0) を添加した群において対照群と比較して多くのタンパク質発現変動が確認された。変動の見られたタンパク質群を詳細に解析した結果、オートファジーと関連のあるタンパク質群が多く確認できた。オートファジー関連タンパク質群の中には Keap1/Nrf2 経路の活性化により発現が増加する HO-1 が含まれており、また、keap1 のタンパク質発現は減少していた。Keap1/Nrf2 経路は Keap1 が分解されることで、Nrf2 との結合が解除され、Nrf2 が核内移行することで活性化されることがわかっている。

そこで Keap1/Nrf2 経路の活性化を western blotting で確認した結果、C17:0 の添加によって keap1 の分解および Nrf2 の核内移行による活性化が確認できた。また、Nrf2 の発現量は C17:0 の添加により増加していた。

これまでに RANKL 刺激時に産生される活性酸素種 (ROS) による酸化ストレスに伴い、破骨細胞分化に重要な役割を担う NFAT1c の発現が増加することが知られている。この NFAT1c の発現増加を Keap1/Nrf2 経路の活性化は ROS 産生に伴う酸化ストレスを抑制することで阻害し、破骨細胞の分化誘導を顕著に抑制することがわかっている。本研究結果における奇数鎖脂肪酸の破骨細胞分化誘導阻害効果は、Keap1/Nrf2 経路の活性化によるものであることが示唆された。

今後、さらなる詳細なメカニズムの解明を試みるとともに炭素鎖 1 の違いが骨代謝に及ぼす影響について調べていく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mure Kanae, Tomono Susumu, Mure Minae, Horinaka Mano, Mutoh Michihiro, Sakai Toshiyuki, Ishikawa Hideki, Wakabayashi Keiji	4. 巻 22
2. 論文標題 The Combination of Cigarette Smoking and Alcohol Consumption Synergistically Increases Reactive Carbonyl Species in Human Male Plasma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9043 ~ 9043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22169043	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 Ariyoshi Tadashi, Hagihara Mao, Tomono Susumu, Eguchi Shuhei, Minemura Ayaka, Miura Daiki, Oka Kentaro, Takahashi Motomichi, Yamagishi Yuka, Mikamo Hiroshige	4. 巻 9
2. 論文標題 Clostridium butyricum MIYAIRI 588 Modifies Bacterial Composition under Antibiotic-Induced Dysbiosis for the Activation of Interactions via Lipid Metabolism between the Gut Microbiome and the Host	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1065 ~ 1065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9081065	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 Saleh Dina M., Luo S., Ahmed Omnia Hosny M., Alexander D.B., Alexander W. T., Gunasekaran S., El-Gazzar A. M., Abdelgied M., Numano T., Takase H., Ohnishi M., Tomono S., Hady Randa Hussein Abd el, Fukamachi K., Kanno J., Hirose A., Xu J., Suzuki S., Naiki-Ito A, Takahashi S., Tsuda H.	4. 巻 19
2. 論文標題 Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Particle and Fibre Toxicology	6. 最初と最後の頁 1~21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12989-022-00469-8	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 Yamazaki Tatsuya, Biswas Mrityunjoy, Kosugi Kouyu, Nagashima Maria, Inui Masanori, Tomono Susumu, Takagi Hidekazu, Ichimonji Isao, Nagaoka Fumiaki, Ainai Akira, Hasegawa Hideki, Chiba Joe, Akashi-Takamura Sachiko	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel Gene Delivery Vector of Agonistic Anti-Radioprotective 105 Expressed on Cell Membranes Shows Adjuvant Effect for DNA Immunization Against Influenza	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2020.606518	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 Mrityunjoy Biswas, Yamazaki Tatsuya, Tomono Susumu, Sivasundaram Karnan, Takagi Hidekazu, Ichimonji Isao, Inui Masanori, Nagaoka Fumiaki, Hosokawa Yoshitaka, Akashi-Takamura Sachiko.	4. 巻 596
2. 論文標題 Cell surface expression of human RP105 depends on N-glycosylation of MD-1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3211-3231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14452.	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 Sajid Iftekhar Chowdhury, Inui Masanori, Yamazaki Tatsuya, Tomono Susumu, Takagi Hidekazu, Mrityunjoy Biswas, Saitoh Shin-Ichiroh, Miyake Kensuke, Akashi-Takamura Sachiko.	4. 巻 597
2. 論文標題 The anti-TLR4 monoclonal antibody Sa15-21 enhances inflammatory cytokine production in LPS-stimulated macrophages	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 1246-1260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.14619.	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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