

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：32419

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15484

研究課題名（和文）パルミチン酸による骨粗鬆症発症機構の解析と予防・防御法の開発

研究課題名（英文）Analysis of mechanism of palmitic acid induced osteoporosis onset and development of prevention / defense method

研究代表者

岩崎 有希 (Iwasaki, Yuki)

人間総合科学大学・人間科学部・助教

研究者番号：60762078

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）：今回の研究では、PAがAPN受容体AdipoR1 mRNA発現を抑制すること、さらにTLR2アゴニストによってAdipoR1 mRNA発現は阻害されることを明らかにした。PA及びTLR2アゴニストによる阻害はTLR2阻害剤で解除された。このことは、PAがTLR2を介して、TLR4と異なる情報伝達機構を駆動し、APNの作用を減弱し骨粗鬆症の症状を亢進することが考えられる。これらの結果から骨粗鬆症発症の予防・防御に脂質代謝研究が重要な役割を果たす可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症患者数は約1,300万人おり、その80%が女性である。女性は閉経期後に発症することが多く、さらにNASH、肥満などの疾病に伴って発症することも多い。発症時に脂質代謝系の変動を、引き起こすことが報告されている。高齢者では簡単に骨折を起こし、寝たきりになりQOLを低下させる。骨形成は骨芽細胞と破骨細胞のバランスが重要であるが、破骨細胞分化を促す要因は現在までに解明されていない。本研究ではPAがAPN受容体AdipoR1の発現を阻害し、APNの破骨細胞分化の抑制作用を減弱することを見出した。このことは摂取する脂質の質的検討が骨粗鬆症の治療に学術的にも社会的にも重要であることを示した。

研究成果の概要（英文）：The present study revealed that palmitic acid suppresses the adiponectin receptor AdipoR1 mRNA expression, and that TLR2 agonists also inhibit AdipoR1 mRNA expression. Inhibition by palmitic acid and TLR2 agonists was reversed by TLR2 inhibitors. This suggests that PA drives a signaling mechanism different from that of TLR4 via TLR2, attenuates the action of APN, and exacerbates the symptoms of osteoporosis. These results suggest that lipid metabolism research may make a significant contribution to the prevention and protection of osteoporosis.

研究分野：脂質

キーワード：Adiponectin AdipoRn Palmitic acid AdipoR1 破骨細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本における骨粗鬆症患者数は現在、約 1,300 万人と推定されており、その 80%を女性が占める。体の骨格をなす骨は変化がないように見えても、新たに骨を作り出す骨形成と溶かして壊す骨吸収を繰り返している。骨粗鬆症は、このバランスが崩れることで骨が非常に脆くなった状態になる。骨粗鬆症は圧倒的に女性、特に閉経後の女性に多くみられ、女性ホルモンの減少や老化と関わりが深いと考えられている。閉経期を迎えた女性については、エストロゲン分泌量の急激な減少、血中遊離脂肪酸やアディポネクチン、レプチンなど生理活性物質の量的変動が報告されているが、それぞれの物質について破骨細胞分化への作用について解析した報告は多くはない。レプチンに関しては閉経時に増加することが報告されており、RAW264.7 や 3T3-L1、その他いくつかの細胞で TNF- $\alpha$  を含む炎症性サイトカインを発現させることが示されている。アディポネクチンはサイトカインの中でも最も豊富に血中に存在している。骨芽細胞と破骨細胞において APN 受容体を発現しているが、閉経期の破骨細胞分化に対するアディポネクチンの影響については血中量、炎症性に関して相反する報告があり、培養細胞を用いた詳細な実験はなされていない。またパルミチン酸については閉経時だけではなく NASH、肥満などで引き起こされる骨粗鬆症に伴い増加することが示されている。

### 2. 研究の目的

我々が RAW264.7 細胞で LPS により誘導され、破骨細胞分化の指標とされる MCP-1 発現に対するアディポネクチンの作用を解析したところ、アディポネクチンが LPS による MCP-1 発現を強く抑制することが分かった。しかしながらいくつかの疾患に伴う骨粗鬆症発症時にアディポネクチンが減少しているという報告は少なく、ほとんど大きな変化は認められていない。細胞レベルでは破骨細胞分化を抑制することが分かったが、アディポネクチンの量的変動が骨粗鬆症発症あるいは症状の増悪に関わっているなら血中濃度の低下が認められないのは奇妙である。また骨粗鬆症を引き起こす疾病で血中濃度の増加が認められるパルミチン酸がどのような役割を果たしているのか解明されていない。そこで本研究では RAW264.7 細胞を用いてアディポネクチンの LPS 誘導性 MCP-1 発現抑制作用に対するパルミチン酸作用の解析を目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

今回の実験では、LPS 刺激により破骨細胞分化を誘導することが知られているマウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞を用いた。細胞は低エンドトキシン含有 10%FBS を加えた DMEM で 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。細胞の処理は、LPS で 3 時間、APN あるいは AdipoRon で 2 時間、PA で 1 時間のプレインキュベーションを行い、24 時間後に mRNA を抽出し、作成した cDNA を用いてリアルタイム PCR 法で解析した。アディポネクチンは

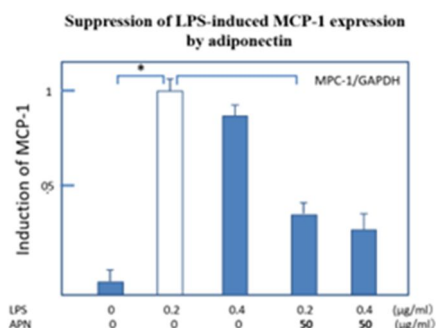
多数の重合体の存在が知られており数少ないが添加により炎症性サイトカインの発現が報告されているものもある。今回の研究ではアディポネクチン受容体 AdipoR1、AdipoR2 と結合することが報告されている AdipoRon を用いた。LPS は E.coli 由来、アディポネクチンはマウス由来のものをそれぞれ使用した。

#### 4. 研究成果

今回の研究では最初に APN が破骨細胞分化のマーカーである MCP-1 の発現にどのような影響があるかを解析した。

アディポネクチンは LPS に誘導される MCP-1 mRNA 発現を抑制した (図 1)。LPS で誘導された MCP-1 発現はアディポネクチンの添加で抑制されることが示された。

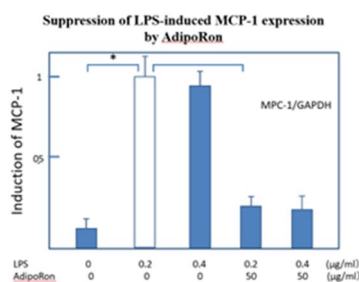
図 1



アディポネクチンは単量体といくつかの重合体の存在が報告されており、活性の程度も異なることが知られている。またコロナ感染症のために重合体の入手が困難になったこともあり、アディポネクチン受容体のアゴニストである AdhipoRon を用いた実験が可能かどうか検証した。AdhipoRon を用いた実験で、LPS による MCP-1 mRNA 発現をアディポネクチンと同様

AdhipoRon が抑制することが確認された (図 2)。

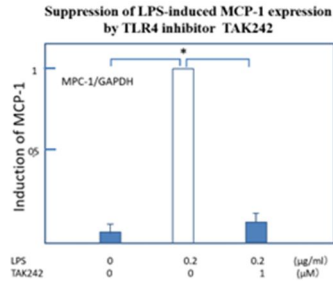
図 2



この結果 AdipoRon はアディポネクチンと同様 MCP-1 mRNA の発現を抑制することが分かった。そこで AdipoRon による MCP-1 mRNA 発現の抑制に対してパルミチン酸がどのような作用をするのかを確認するため AdipoRon 添加後パルミチン酸を添加し、MCP-1 mRNA の発現を解析した。その結果パルミチン酸は LPS 誘導性

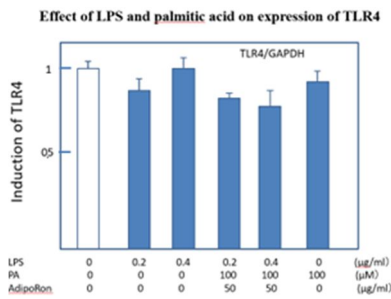
MCP-1 mRNA の発現に対するアディポネクチンの抑制作用を解除することが明らかとなった。パルミチン酸は TLR4 と TLR2 を介して作用するとされているが、AdhipoRon による TLR4 発現量の抑制が MCP-1 mRNA 発現の抑制を誘導していることも考えられる。そこでまず MCP-1 mRNA の発現が TLR4 を介していることを確認した (図 3)。

図 3



LPS による MCP-1 mRNA の発現は TLR4 の特異的阻害剤として汎用される TAK242 で阻害されることが示された。このことからパルミチン酸によるアディポネクチンの MCP-1 mRNA の発現抑制が TLR4 の量的変動による可能性が考えられる。そこでパルミチン酸に処理により TLR4 の量的変動の有無を調べた (図 4)。

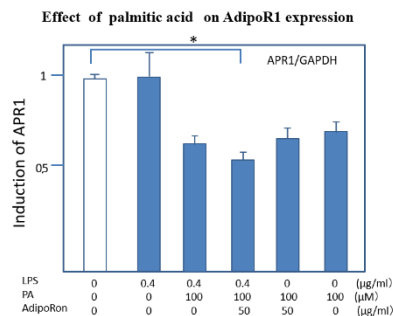
図 4



パルミチン酸添加により TLR4 の発現量の変化を検証したところ図 4 に見られるようにアディポネクチンによる MCP-1 mRNA の発現抑制を起こすような変化は認められなかった。このことはパルミチン酸によるアディポネクチンの作用の減弱が TLR4 を介したものではないことを示していると思われる。

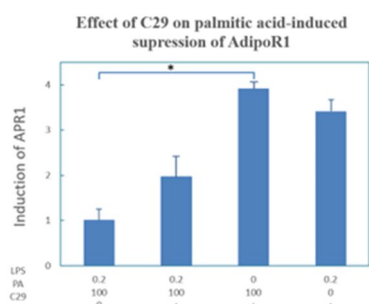
AdipoRon はアディポネクチンと同様にアディポネクチン受容体 AdipoR1, AdipoR2 を介して細胞内に情報が伝えられること、また RAW264.7 細胞はこれらの受容体を発現していることが報告されている。これらのことを考え、我々はパルミチン酸処理によりアディポネクチン受容体の量的変動を検証した (図 5)。

図 5



AdipoR1 mRNA 発現はパルミチン酸により有意に阻害された。しかしながらこの結果だけではパルミチン酸がどのような経路を介して AdipoR1 mRNA 発現を阻害しているのかは不明である。AdipoR1 mRNA 発現抑制がどのような経路を経るのかをいくつかの TLR の阻害剤を用いて検証した。

図 6



その結果 TLR2 の特異的阻害剤 TLR-IN-C29 で阻害された (図 6)。

これらの実験結果は PA が TLR2 を介して AdipoR1 発現を阻害し、APN の作用を減弱することにより骨粗鬆症の増悪に関与している可能性を示していると考えられる。閉経時だけではなく NASH、肥満による骨粗鬆症の発症

に PA が APN 受容体の発現を抑制し、症状の増悪に関わっている可能性を示すと考えられた。パルミチン酸が TLR4 の情報伝達経路とは全く異なり、TLR2 を介した別の情報伝達経路を駆動していることは初めての報告である。

ここまでの研究では APN が MCP-1mRNA 発現を抑制する機構については解明に至っていない。また TLR2 は TLR 1 あるいは TLR6 と共同で情報伝達を行うと考えられており、現在その作用機序の解析についても阻害剤を用いた解析を行っている。しかしながら今回 PA の作用機構について解析が進んだことは、骨粗鬆症発症時の脂質代謝の解析、TLR の阻害剤の作用機序の解明により、骨粗鬆症の予防、軽減方法の開発が可能であることを示唆するものであると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎有希、横山嘉子、久保宏隆、白石明美
2. 発表標題 破骨細胞分化に対するアディポネクチンの抑制作用
3. 学会等名 日本脂質栄養学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎 有希 , 横山 嘉子 , 久保 宏隆 , 加納 和孝 , 白石 弘美
2. 発表標題 破骨細胞分化に対するパルミチン酸の作用の解析
3. 学会等名 日本栄養・食糧学会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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