

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659473

研究課題名（和文） 破骨細胞におけるカンナビノイドを介する脂肪酸伸長酵素の役割

研究課題名（英文） The role of the elongation of long chain fatty acids through the cannabinoid cascade in osteoclasts

研究代表者

石井 清朗 (Ishii Kiyooki)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：80419150

研究成果の概要（和文）：Elov16 KO の BMM において増殖と分化の促進、加えて成熟破骨細胞での骨吸収機能の活性化がみられた。この際、典型的な分化マーカーは大きな変化はなかったが、細胞周期に関連する遺伝子の発現が上昇していた。さらに骨芽細胞においても増殖および分化に亢進がみられ、特に分化後期で発現する遺伝子の発現が増加していた。したがって脂肪酸の組成変化がエネルギー代謝や細胞周期に影響を与え細胞の増殖や分化を調節すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In BMM of Elov16 KO, it is promotion of proliferation and differentiation. In addition, activation of the bone resorption function in mature osteoclasts was observed. At this time, there was no change with a typical differentiation marker, but expression of the gene relevant to a cell cycle was increasing. Furthermore, proliferation and differentiation were accelerating also in osteoblasts. Therefore, the composition change of fatty acid affects energy metabolism and a cell cycle, and is considered to adjust proliferation and differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：内分泌学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー代謝、骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病、高脂血症、動脈硬化、肥満といったメタボリックシンドロームの基礎疾患の背景にあるのはエネルギー代謝である。申請者の研究室ではこれまで特に未解明部分の多い脂肪酸・中性脂肪合成に関わる酵素群を中心に研究を行い、作成した脂肪酸伸長酵素 Elov16 KO マウスには脂肪酸組成の変化がエネルギー代謝遺伝子発現に重要な役割を持つことを示した (Matsuzaka T et al. Nat Med. 2007 Oct;13(10):1193-202)。また Elov16 ノックアウトマウスではパルミトレイン酸からオレイン酸への経路が遮断されるため、この下流にあるジアシルグリセロール (DG) と

内因性カンナビノイド受容体リガンド、2-アラキドノイルグリセロール (2-AG) の合成も阻害されてしまう。実際、Elov16 ノックアウトマウス肝臓での DG の減少が確認されているため 2-AG も減少すると考えられる。カンナビノイド受容体 (CB1) のノックアウトマウスでは破骨細胞の活性が抑制されるため骨量の増加がみられる Nature Medicine 11, 774 - 779 (2005) が、内因性カンナビノイド受容体リガンドがどのような影響をあたえるのかは分かっていない。これまでメタボリックシンドロームの基礎疾患で注目されてきたのはもっぱら脂肪酸の量の問題であった。しかし申請者の研究室で開発され

た Elov16 KO マウスの研究により、脂肪酸の種類もメタボリックシンドロームに大きな影響を与えていることが明らかとなった。さらに同マウスの表現系から脂肪酸組成の影響が内因性カンナビノイドの発現に係わる可能性が出てきた。今研究により、脂肪酸伸長酵素 Elov16 による骨吸収機能への役割が明らかになると共に脂肪酸種と骨の新たな関係を示すことが出来ると考えられる。

2. 研究の目的

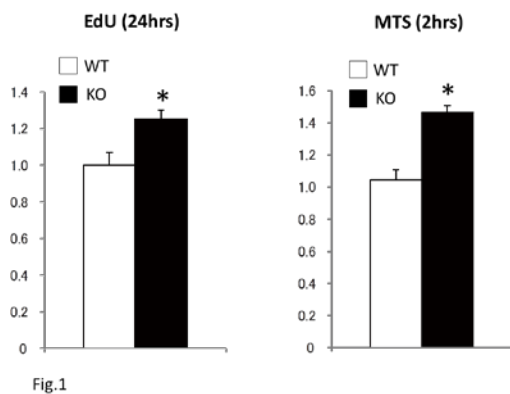
本研究の目的は、エネルギー代謝に重要な役割を持つ脂肪酸組成の変化が骨代謝においても重要な生理的役割を持つという仮説を証明し、これに基づいた新しい骨粗鬆症治療法開発の基盤を構築することである。具体的には破骨細胞特異的な Elov16 ノックアウトマウスの破骨細胞を用い、カンナビノイド受容体カスケードに注目して、どのようなシグナル伝達経路により脂肪酸組成の変化が骨へ影響を与えているのかを明確にする。

3. 研究の方法

破骨細胞は 10 週齢雄マウスの大腿骨および脛骨の骨髄細胞から分化させた。また、骨芽細胞は P1 マウスの calvaria から採取した。2-AG の測定は LC-MS/MS を用いた。

4. 研究成果

Elov16 KO マウスにおける破骨細胞のフェノタイプを観察した結果、Bone Marrow macrophage (BMM) において増殖 (BrdU および MTT アッセイ) の促進がみられ (Fig. 1)、



それに伴って成熟破骨細胞への分化 (TRAP アッセイ) も助長され、骨吸収という破骨細胞の機能の面 (Pit アッセイ) も活性化されていた (Fig. 2)。しかしこの際、典型的な分化マーカーおよびシグナル伝達経路に関わっている遺伝子発現をみても、mRNA レベルで顕著な違いはなかった。そこで、細胞周期に関連する遺伝子発現をみても、cyclin に関係する遺伝子のいくつかは上昇してい

ることが分かった。また骨芽細胞においても細胞の増殖および分化に亢進がみられた (Fig. 3)。

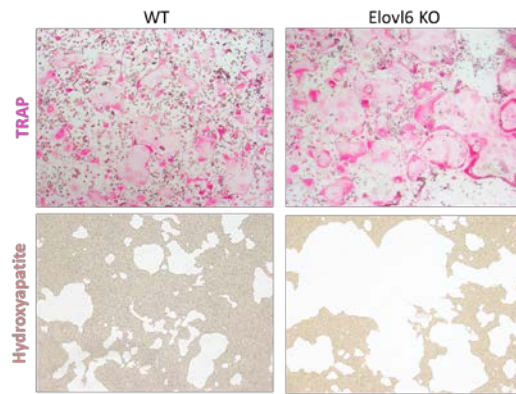


Fig.2

こちらでは分化マーカー、特に分化後期で発現する遺伝子の発現が増加していることが分かった。

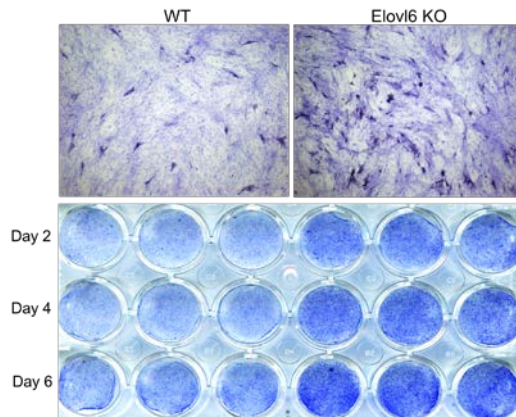


Fig.3

しかしながら発生過程での軟骨や骨化に大きな影響はみられなかった (Fig. 4)。

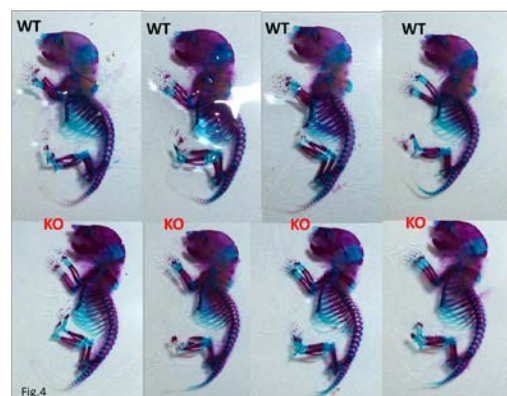


Fig.4

さらにマイクロアレイやメタボローム解析において、TCA 回路の活性化、ATP や GTP によるエネルギーチャージ量の増加、解糖系の

促進等がみられた。加えて、破骨細胞分化の過程で脂肪酸の伸長および不飽和化がみられること、2-AG量の増加がみられるところから、脂肪酸の組成変化がエネルギー代謝や細胞周期に影響を与え細胞の増殖を調節することが考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- (1) Indo Y, Takeshita S, Ishii KA, Hoshii T, Aburatani H, Hirao A, Ikeda K. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res*. 2013 in press. 査読あり doi: 10.1002/jbmr.1976.
- (2) Ikeda T, Ishii KA, Miura M, Saito Y, Otagiri A, Kawakami Y, Shimano H, Hara H, Takekoshi K. Inhibition of autophagy enhances sunitinib-induced cytotoxicity in rat pheochromocytoma PC12 cells. *J Pharmacol Sci*. 2013; 121(1): 67-73 査読あり
- (3) Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Iwasaki H, Takeuchi Y, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Yatoh S, Shimada M, Yahagi N, Suzuki H, Sone H, Yamada N, Shimano H. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 11; 430(2): 664-9 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.094.
- (4) Aita Y, Ishii KA, Saito Y, Ikeda T, Kawakami Y, Shimano H, Hara H, Takekoshi K. Sunitinib inhibits catecholamine synthesis and secretion in pheochromocytoma tumor cells by blocking VEGF receptor 2 via PLC- γ -related pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Oct;303(8):E1006-14. 査読あり doi: 10.1152/ajpendo.00156.2012.
- (5) Matsuzaka T, Atsumi A, Matsumori R, Nie T, Shinozaki H, Suzuki-Kemuriyama N, Kuba M, Nakagawa Y, Ishii K, Shimada M, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Takekoshi K, Sone H, Yahagi N, Suzuki H, Murata S, Nakamuta M, Yamada N, Shimano H. Elov16 promotes nonalcoholic steatohepatitis in mice and humans. *Hepatology*. 2012 Dec;56(6):2199-208. 査読あり doi: 10.1002/hep.25932.
- (6) Takeichi N, Midorikawa S, Watanabe A, Naing BT, Tamura H, Wakakuri-Kano T, Ishizaki A, Sugihara H, Nissato S, Saito Y, Aita Y, Ishii KA, Igarashi T, Kawakami Y, Hara H, Ikeda T, Shimizu K, Suzuki S, Shimano H, Kawamoto M, Shimada T, Watanabe T, Oikawa S, Takekoshi K. Identical germline mutations in the TMEM127 gene in two unrelated Japanese patients with bilateral pheochromocytoma. *Clin Endocrinol*. 2012 Nov;77(5):707-14. 査読あり doi: 10.1111/j.1365-2265.2012.04421.x.
- (7) Fujimoto Y, Nakagawa Y, Shingyouchi A, Tokushige N, Nakanishi N, Satoh A, Matsuzaka T, Ishii KA, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Suzuki H, Yahagi N, Urayama O, Yamada N, Shimano H. Dicer has a crucial role in the early stage of adipocyte differentiation, but not in lipid synthesis, in 3T3-L1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Apr 20;420(4):931-6. 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.110.
- (8) Iwasaki H, Naka A, Iida KT, Nakagawa Y, Matsuzaka T, Ishii KA, Kobayashi K, Takahashi A, Yatoh S, Yahagi N, Sone H, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. TFE3 regulates muscle metabolic gene expression, increases glycogen stores, and enhances insulin sensitivity in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Apr 1;302(7):E896-902. 査読あり doi: 10.1152/ajpendo.00204.2011.
- (9) Saito Y, Tanaka Y, Aita Y, Ishii KA, Ikeda T, Isobe K, Kawakami Y, Shimano H, Hara H, Takekoshi K. Sunitinib induces apoptosis in pheochromocytoma tumor cells by inhibiting VEGFR2/Akt/mTOR/S6K1 pathways through modulation of Bcl-2 and BAD. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Mar 15;302(6):E615-25. 査読あり doi: 10.1152/ajpendo.00035.2011.
- (10) Saito R, Matsuzaka T, Karasawa T, Sekiya M, Okada N, Igarashi M, Matsumori R, Ishii K, Nakagawa Y, Iwasaki H, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Sone H, Suzuki H, Yahagi N, Yamada N, Shimano H. Macrophage Elov16 deficiency ameliorates foam

cell formation and reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Sep;31(9):1973-9. 査読あり doi: 10.1161/ATVBAHA.110.221663.

- (11) Karasawa T, Takahashi A, Saito R, Sekiya M, Igarashi M, Iwasaki H, Miyahara S, Koyasu S, Nakagawa Y, Ishii K, Matsuzaka T, Kobayashi K, Yahagi N, Takekoshi K, Sone H, Yatoh S, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. Sterol regulatory element-binding protein-1 determines plasma remnant lipoproteins and accelerates atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Aug;31(8):1788-95. 査読あり doi: 10.1161/ATVBAHA.110.219659.

[学会発表] (計1件)

- (1) 石井清朗：小腸における新規転写因子 CREB313 の制御と生理的役割 第12回 TCカンファレンス (興和製薬株式会社：東京) 2012年7月7日

[図書] (計1件)

- (1) 石井清朗, 他、羊土社、糖尿病イラストレイテッド、2012、pp. 119-129

[その他]

ホームページ等

<http://www.u-tokyo-endocrinology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 清朗 (ISHII KIYOAKI)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号：80419150