

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791985

研究課題名(和文) 糖尿病性骨粗鬆症におけるモノカルボン酸トランスポーターの役割の解明

研究課題名(英文) A role of monocarboxylate transporters in osteoporosis caused by diabetics

研究代表者

吉村 健太郎 (Yoshimura, Kentaro)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10585699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：MCT1はユビキタスに発現する膜輸送タンパク質で、解糖系の最終産物であるピルビン酸をミトコンドリアに取り込みATPを産生する。マウス初代培養骨芽細胞および筋芽細胞株C2C12細胞をBMP2で刺激する骨芽細胞分化誘導系において、siRNAによるMCT1発現抑制は骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼの発現を低下させた。また、C2C12細胞においてBMPシグナル伝達経路であるSmadの活性化がMCT1 siRNAによって抑制された。以上の結果から、MCT1には膜輸送のみならず遺伝子発現調節とそれに基づく細胞分化の制御という、新しい機能があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：MCT1 is a ubiquitously expressed transmembrane transporter. It transports pyruvate, the terminal product of glycolysis, into mitochondria, resulting in the production of ATP. Introduction of siRNAs for MCT1 strongly suppressed the expression of alkaline phosphatase, an osteoblast differentiation marker, in mouse primary osteoblasts and C2C12 cells exposed to BMP-2. Furthermore, MCT-1 siRNAs suppressed phosphorylation/activation of Smad, a major signaling event after stimulation by BMP-2. In conclusion, MCT-1 not only transports its substrates but also up-regulates osteoblast differentiation by enhanced expression of the genes ruled BMP-2.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯学

キーワード：骨芽細胞 遺伝子発現 BMP-2

1. 研究開始当初の背景

(1)糖尿病は血糖値を低下させるホルモンであるインスリンの分泌低下もしくは感受性の低下により糖代謝異常を生じる疾患である。3大合併症として神経障害・網膜症・腎症が知られているが、近年、新たな合併症として骨粗鬆症が注目されている。糖尿病はインスリン分泌が枯渇する1型と主にインスリン抵抗性を示す2型に分類され、1型糖尿病に続発する骨粗鬆症は骨芽細胞のインスリンシグナルの減少による骨形成の低下が原因と考えられている。しかし、2型糖尿病では骨折リスクは上昇することが報告されているがインスリンシグナルに依存しない骨芽細胞の糖代謝異常が骨代謝調節に及ぼす影響は不明である。

(2)糖尿病の本態は細胞のグルコース代謝障害である。通常、グルコーストランスポーター(GLUT)によって細胞内に取り込まれたグルコースは解糖系を経てピルビン酸となり、さらにモノカルボン酸トランスポーター-1(MCT-1)を介してミトコンドリアに取り込まれエネルギー産生に利用される。2型糖尿病ではミトコンドリア内のピルビン酸脱水素酵素の活性が低下しエネルギー産生が低下する。また、糖尿病患者では骨格筋のMCT-1の発現が低下することが報告されている。しかし、糖尿病続発性骨粗鬆症を骨芽細胞のエネルギー代謝異常という点から解析した報告は無い。一方、申請者は軟骨細胞においてMCT-1がミトコンドリアのエネルギー代謝を介して遺伝子発現を調節することを発見し、報告した。この現象を骨芽細胞に応用し、骨芽細胞におけるMCT-1の発現を抑制し糖尿病におけるエネルギー代謝と近い状態を作ること、糖尿病続発性骨粗鬆症をエネルギー代謝の点から解析する、今までに無い新しい研究が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病等の糖代謝異常疾患に続発して生じる二次性骨粗鬆症の病態形成におけるモノカルボン酸トランスポーター(MCT)の役割を明らかにし、MCTを標的とした新たな骨粗鬆症の予防・治療方法の開発の可能性を探ることにある。

3. 研究の方法

申請者はMCTが骨芽細胞分化を制御する分子メカニズムを解明し、糖尿病続発性骨粗鬆症に対するMCTを標的とした代謝改善法の有効性を明らかにするために、培養骨芽細胞を用いて以下の項目について2年間にわたり解析した。

(1)骨芽細胞において発現するMCTサブタイプの同定:MCTは細胞膜およびミトコンドリア内膜に存在するプロトン依存性トランスポーターで14種類のサブタイプが報告されている。しかし、骨芽細胞におけるMCTサブタイプの発現については報告が無い。そこ

で初代培養マウス骨芽細胞および骨形成タンパク(BMP-2)で骨芽細胞分化を誘導できるマウス筋芽細胞株C2C12細胞におけるMCTのmRNA発現をRT-PCRによって比較し、骨芽細胞におけるMCTサブタイプを同定した。

(2)MCTに依存した骨芽細胞分化制御機序の解明:初代培養骨芽細胞およびC2C12細胞に発現するMCTサブタイプの発現をsiRNAによって抑制し、BMP-2で骨芽細胞分化を誘導した。MCTを介したエネルギー代謝の変化ならびにMCTの発現抑制が骨芽細胞分化に及ぼす影響をアルカリホスファターゼ(ALP)活性染色、骨芽細胞分化マーカーの発現をRT-PCRで解析することにより評価した。

4. 研究成果

MCTファミリータンパクは14種類のサブタイプが報告されているが、その中でも糖代謝に深く関連していると考えられる乳酸およびピルビン酸などの単カルボン酸を輸送するのはMCT1からMCT4の4種類であるという報告に基づき、初代培養骨芽細胞ならびにC2C12細胞におけるMCTサブタイプのmRNA発現をRT-PCRで解析した。その結果、初代培養骨芽細胞はMCT1、MCT2、MCT3を発現しており、MCT4は他のサブタイプに比べて弱く発現していた。C2C12細胞はMCT1を強く発現しており、MCT3は弱く、MCT2はわずかに発現しており、MCT4の発現はほとんど見られなかった。この結果から、初代培養骨芽細胞およびC2C12細胞で豊富に発現していると考えられるMCT1に着目し、そのsiRNAを用いてMCT1のmRNA発現を抑制し、骨芽細胞分化に及ぼす影響について解析を行った。

初代培養骨芽細胞をリコンビナントヒトBMP-2で骨芽細胞分化を誘導し、72時間後にALP活性染色を行った結果、MCT1 siRNAを導入した細胞ではALP陽性細胞数が有意に減少していた。C2C12細胞においても同様に、BMP-2刺激後のALP陽性細胞数はMCT1 siRNAを導入した細胞で減少していた。骨芽細胞分化の指標となるALP活性がMCT1の発現抑制によって低下したことから、MCT1はALP活性の上昇に必要であると考えられた。

次に、骨芽細胞分化マーカーの発現をRT-PCRで解析した。MCT1 siRNAを導入した初代培養骨芽細胞でALPのmRNA発現が低下していた。C2C12細胞ではALPのみならず、オステオカルシン、Osterixの発現もMCT1 siRNAによって低下した。これらの結果から、MCT1はALPの発現に必要であり、C2C12細胞においては骨芽細胞分化を正に制御する可能性が示唆された。

MCT1 siRNAの導入による細胞内シグナル伝達への影響を調べるために、BMP-2刺激後のC2C12細胞のタンパク抽出物を経時的に採取し、Westernblotting法を用いて主要なBMP経路であるSmad経路およびMAPK経路についてその活性化を解析した。その結果、MCT1

siRNAを導入した細胞では、対照と比べ BMP-2 刺激直後の特異的 Smad である Smad1/5/8 のリン酸化が抑制されていた。一方、MAPK 経路の転写因子である P38MAPK、JNK のリン酸化については MCT1 siRNA の導入による有意な差を認めなかった。このことから、MCT1 は BMP2 刺激後の Smad 経路の活性化に必要なと考えられた。

MCT1 siRNA は BMP 誘導性の骨芽細胞分化を抑制する傾向が認められたため、MCT1 の基質である乳酸を培養系に添加した。C2C12 細胞の培養系に乳酸を添加したところ、乳酸の濃度依存的に ALP 活性は上昇した。また、ALP の mRNA 発現も同様に乳酸の濃度依存的に上昇した。以上より、MCT1 を介した乳酸の膜輸送は BMP2 依存的な骨芽細胞分化を正に制御すると考えられた。

これまで、MCT1 は細胞における乳酸の膜輸送を担うタンパク質であると認識されてきたが、本研究により、MCT1 には、乳酸の膜輸送のみならず、遺伝子発現の調節とそれに基づく細胞分化の制御という、まったく新しい機能があることが明らかとなった。

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1件)

Shibuya I, Yoshimura K, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Suzuki D, Ikumi N, Hiura F, Anada T, Suzuki O, Kamijo R: Octacalcium phosphate suppresses chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. Cell Tissue Res 352 (2): 401-412, 2013

[学会発表](計6件)

吉村健太郎 (第25回歯科基礎医学会賞受賞講演) Monocarboxylate transporter-1 is required for cell death in mouse chondrocytic ATDC5 cells exposed to interleukin-1 via late phase activation of nuclear factor B and expression of phagocyte-type NADPH oxidase. 第55回歯科基礎医学会学術大会. 岡山, 2013年9月20-22日

吉村健太郎, 宮本洋一, 星野真理江, 宮本尚, 斎藤章大, 船登咲映, 泉田恵理, 榎宏太郎, 山本松男, 馬場一美, 上條竜太郎: Monocarboxylate transporter-1 は骨芽細胞におけるアルカリホスファターゼの発現に必要なである. 日本口腔組織培養学会設立50周年記念学術大会. 東京, 2013年11月23, 24日

吉村健太郎, 宮本洋一, 星野真理江, 秋山智人, 塚崎雅之, 山田篤, 高見正道, 須澤徹夫, 馬場一美, 上條竜太郎: Monocarboxylate transporter-1 は BMP-2

刺激後の Smad1 のリン酸化に關与することで骨芽細胞分化を正に制御する. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 東京, 2012年7月19-21日

秋山智人, 宮本洋一, 山田篤, 高見正道, 吉村健太郎, 星野真理江, 宮本尚, 榎宏太郎, 馬場一美, 上條竜太郎: 歯周病原菌由来リシン特異的ジンジパインはオステオプロテゲリンを優先的に分解し TNF- α および IL-1 による破骨細胞分化を促進する. 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 郡山, 平成24年9月14-16日

Akiyama T, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Yasuhara R, Yoshimura K, Hoshino M, Maruyama T, Mishima K, Baba K, Kamijo R: Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine-specific gingipain in periodontal osteoclastogenesis. ASBMR 2012 Annual Meeting, October 12-15, 2012, Minneapolis, MN, USA

Akiyama T, Miyamoto Y, Yamada A, Takami M, Yoshimura K, Hoshino M, Imamura T, Kamijo R, Baba K: Roles of lysine-specific gingipain in osteoclast differentiation induced by inflammatory cytokines. University of Toronto Research Day, 2013年2月, Toronto, Canada

[図書](計1件)

吉村健太郎, 宮本洋一, 上條竜太郎: アンチエイジングシリーズ3 骨研究最前線~代謝・疾病のメカニズムから再生医療・創薬・リハビリ機器・機能性食品開発まで~, 第3編 第5章 第3節「骨代謝疾患から歯科治療へのアプローチ」(株)エヌ・ティー・エス出版, 257-171, 2013

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 健太郎 (Yoshimura, Kentaro)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10585699

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：