

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461377

研究課題名(和文) 肝臓から分泌されるサイトカインの骨粗鬆症への影響

研究課題名(英文) Cytokines secreted from the liver affect bone mass.

研究代表者

石井 清朗 (Ishii, Kiyooki)

金沢大学・医学系・特任准教授

研究者番号：80419150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Lect2ノックアウトマウスにおける骨形態計測を行い、野生型マウスよりも骨量が減少していることが分かった。血清中の骨代謝マーカーを調べると、破骨細胞活性化マーカーTRAP5bの上昇がLect2 KOマウスでみられた。細胞レベルでも破骨細胞では、Lect2添加によってマクロファージから成熟破骨細胞への分化が抑制されることが分かった。骨芽細胞では分化段階には大きな影響がみられなかった。しかしながら、卵巣を摘出した閉経後骨粗鬆症モデルでは、野生型とLect2 KOマウスの骨量減少の程度に差は無かった。2年間飼育した老化マウスでは骨量と共にLect2が減少していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We measured the bone morphology in Lect 2 knockout mice and found that the bone mass decreased as compared with the wild type mouse. Examination of bone metabolism markers in serum showed an increase in osteoclast activation marker TRAP 5b in Lect 2 KO mice. Even at the cellular level, osteoclasts were found to inhibit the differentiation of macrophages into mature osteoclasts by addition of Lect 2. In osteoblasts, there was no significant effect on the differentiation stage. However, in the postmenopausal osteoporosis model from which the ovaries were removed, there was no difference in the extent of bone loss in wild type and Lect 2 KO mice.

研究分野：代謝学

キーワード：骨粗鬆症 糖尿病 老化 内分泌

1. 研究開始当初の背景

糖尿病と骨粗鬆症については長い間、関連性が指摘されており、1型糖尿病については若年期においてすでに骨量の増加抑制が見られ、骨折リスクも高いことが知られていた (Quattrin T, et al, *Diabetes Care* 26: 2365, 2003)。しかし近年、1型に加え2型糖尿病においても骨粗鬆症のリスクが高まるというデータが国内外で報告され (Yamamoto et al, *J Bone Miner Res* 24: 702, 2009、Janghorbani M, et al, *Diabetes Care* 29: 1573, 2006)、糖尿病が骨粗鬆症のリスクファクターであることが認められるようになってきた。糖尿病における骨粗鬆症の要因の一つとして挙げられているのがインスリンの欠乏である。インスリン欠乏による影響は高血糖が要因で尿からのカルシウム排出、コラーゲンの糖化による骨の劣化、腸でカルシウムを取り込むために必要な、活性型ビタミン D が腎臓で生産抑制されていることなどが挙げられているが、詳しいメカニズムは解明されていない。またインスリンの骨芽細胞への直接作用が阻害されると、増殖や分化が抑制されることも知られている。インスリン作用の阻害 (インスリン抵抗性) は2型糖尿病の最も重要な機序の一つであり、筋肉などの他の臓器や心血管系の疾患にも関わっている。このインスリン作用阻害の分子メカニズムも完全には明らかにされていないが、これまで内分泌臓器として認知されてこなかった臓器から分泌される液性因子が、インスリン作用に影響することが知られるようになってきた。脂肪組織からはアディポネクチン等のアディポサイトカインが分泌され、他の臓器でのインスリン作用に影響を与えていることが分かってきた。また、肝臓も多くの分泌タンパク質を産生している臓器であり、申請者の研究室では2型糖尿病患者の肝臓で特異的に分泌されるタンパク質を報告し (Misu H, et al, *Diabetologia* 50: 268, 2007)、肝臓由来の分泌タンパク質をヘパトカインとして研究してきた。その中で実際にセレン輸送タンパク質、Selenoprotein P が2型糖尿病時に肝臓から分泌され、肝臓や筋肉にインスリン抵抗性をもたらすことを示した (Misu H, et al, *Cell Metabolism* 12: 483, 2010)。さらに申請者の研究室では Lect2 (leukocyte cell-derived chemotoxin 2) という肝臓特異的な分泌タンパク質もインスリン抵抗性をもたらすことを見つけている (Lan F et al. *Diabetes* 63: 1649, 2014)。Lect2 という分泌タンパク質は、好中球の活性化に関わるタンパク質として発見され (Yamagoe S, et al, *Immunol Lett* 52: 9, 1996)、肝再生の際にも発現が上昇することが知られている。加えて、骨芽細胞においても作用が報告されており、培養系においても分化の抑制が見られる (Mori Y, et al, *FEBS Lett* 406: 310, 1997) が、Lect2 に対する受

容体は見つかっていなかった。しかし最近、Lect2 が肝細胞成長因子 HGF の受容体、c-MET 受容体において HGF 作用を阻害する antagonist として報告された (Chen CK, et al, *Hepatology* 59: 974, 2014)。この c-MET 受容体は骨芽細胞にも発現しており、HGF を結合すると分化が亢進する (Grano M, et al, *PNAS*: 93, 7644, 1998)。また、MET 受容体は肝臓でインスリン受容体と複合体を作り、インスリン抵抗性を制御しているとの報告もある (Fafalios A, et al, *Nature Medicine*: 17, 1577, 2011)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病時に肝臓から分泌されるサイトカイン Lect2 タンパク質が、骨代謝に影響を与えている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。具体的には肥満状態にした、遺伝子組み換え Lect2 マウスにおいて、骨にどのような表現型がもたらされるか検証し、また破骨細胞および、骨芽細胞での機序を明らかにする。他の臓器から分泌されるタンパク質によって、骨代謝に影響を受けることが最近知られるようになってきたが、肝臓からの分泌タンパク質が作用しているという報告はまだない。加えて近年認知され始めてきた、糖尿病時における骨粗鬆症のリスクに Lect2 が関係することが分かれば、肝臓からの分泌タンパク質全体が新たな骨粗鬆症治療へのターゲットの候補となるだけでなく、インスリン感受性と相まって、糖尿病治療にも役立つ可能性を定義できる。また、分泌タンパクという特性上、採血によって測定できるという有用性により検査も簡便であり予防にも貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では高脂肪食を与え、肥満状態となった Lect2 過剰発現マウス (Lect2 Tg) および Lect2 ノックアウトマウス (Lect2 KO) の骨を解析することにより、個体に対しての Lect2 の作用を検証する。

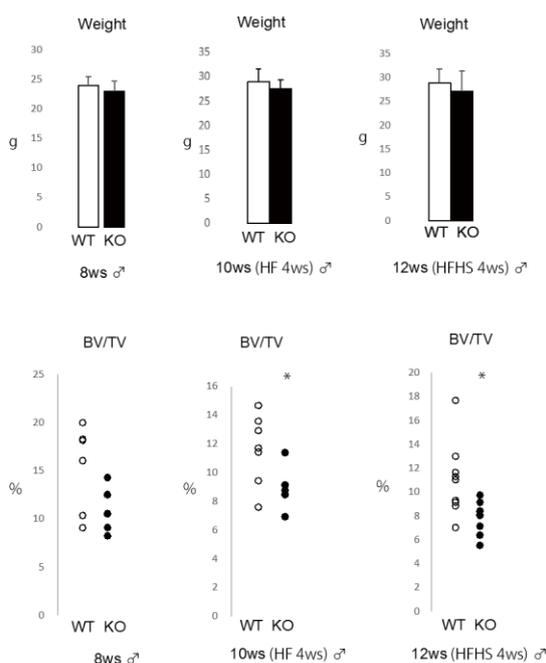
細胞レベルでは破骨細胞および骨芽細胞のプライマリーカルチャーをベースとした薬理学的作用および、マイクロアレイにより遺伝子発現の網羅的に解析を行う。その後、定量的 PCR で確認し、タンパク質レベルにおいてもウエスタンブロッティングによってタンパク質量やリン酸化等の修飾も解析し、骨芽細胞の増殖、分化への影響およびそのメカニズムを検討する。さらに破骨細胞とのカップリングも確認するため、骨芽細胞と破骨細胞の共培養も行い、ボーンマローマクロファージ (BMM) から成熟破骨細胞分化への影響、dentin を使った破骨細胞の骨吸収活性、アクチンリングの形成、MAPK のリン酸化を測

定することにより、骨芽細胞への Lect2 作用が、破骨細胞の分化および機能にどのような影響があるのかを検討する。加えて、Lect2 の破骨細胞への直接作用も調べる。

Lect2 の遺伝子改変マウスの、骨形態計測、マイクロ CT による 3 次元の骨微細構造を解析し、病態の評価だけでなく力学的な評価も行う。骨代謝マーカーを用いた生化学的解析および免疫染色、定量的 PCR による遺伝子発現解析、またマイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析を行う。また、卵巣を摘出し (OVX)、閉経後骨粗鬆症で問題となる、エストロゲン欠乏による骨の破壊防止についても検証する。

4. 研究成果

Lect2 ノックアウトマウスにおける骨形態計測を行い、野生型マウスよりも骨量が減少していることが分かった。また高脂肪食 (HF) や高脂肪高シヨ糖食 (HFHS) を 4 週間与え、肥満状態にすると、野生型マウスの血液中における Lect2 濃度が上昇し、結果としてノックアウトマウスとの骨量の差がより大きくなることも分かった。血清中の骨代謝マーカー



ーを調べると、破骨細胞活性化マーカー TRAP5b の上昇が Lect2 KO マウスでみられた。Type I collagen (骨芽細胞マーカー) および Type I collagen (軟骨細胞マーカー) に大きな違いはなかった。また、Lect2 Tg マウスでは骨量に変化はみられなかった。細胞レベルでも破骨細胞では、Lect2 添加によってマクロファージから成熟破骨細胞への分化が抑制されること、その過程でのシグナル、転写因子 NFATc1、c-fos、転写補因子 PGC-1 β の発現抑制、ERK のリン酸化の抑制がみられることが分かった。分化の段階としてはマクロファージから前破骨細胞という分化初期に影響が大きく、成熟破骨細胞のアポトーシスには影響がなかった。骨芽細胞では Lect2

により初期の間葉系幹細胞の増殖は緩やかに抑制するものの、分化段階には大きな影響がみられなかった。破骨細胞へ Lect2 を添加した際の遺伝子発現を網羅的に解析するためにマイクロアレイを行った。その結果、IL1a、IL1b、TNF といった炎症に伴う遺伝子、M1 マクロファージマーカー遺伝子、Marco、Socs3、IL12b、Ptgs2、Ido1、さらに樹状細胞様マーカー遺伝子、Irf7、GM-CSF、IFN β の mRNA 発現が増えていることが分かった。実際、骨髄マクロファージに Lect2 を添加し、2、3 日培養後には突起状の形態 (樹状細胞様) がみられた。

しかしながら、卵巣を摘出した閉経後骨粗鬆症モデルでは、野生型と Lect2 KO マウスの骨量減少の程度に差は無かった。

加えて、2 年間飼育した老化マウスでは骨量と共に Lect2 が減少していることが分かった。このことはヒトの健診結果においても同様で、骨量と血中 Lect2 濃度には正の相関があり、年齢と血中 Lect2 濃度には負の相関があった。

これらのことから、血中 Lect2 を増やすことで骨量増加に導くことができる可能性が示唆された。そして骨粗鬆症の治療および予測マーカーのターゲットタンパク質として有用であることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Chikamoto K, Misu H, Takayama H, Kikuchi A, Ishii KA, Lan F, Takata N, Tajima-Shirasaki N, Takeshita Y, Tsugane H, Kaneko S, Matsugo S, Takamura T. Rapid response of the steatosis-sensing hepatokine LECT2 during diet-induced weight cycling in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Sep 23;478(3):1310-6. 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.117.

2. Kikuchi M, Shimada M, Matsuzaka T, Ishii K, Nakagawa Y, Takayanagi M, Yamada N, Shimano H. Crucial Role of Elov16 in Chondrocyte Growth and Differentiation during Growth Plate Development in Mice. *PLoS One.* 2016 Jul 28;11(7):e0159375. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0159375

3. Saito Y, Ishii KA, Aita Y, Ikeda T, Kawakami Y, Shimano H, Hara H, Takekoshi K. Loss of SDHB Elevates Catecholamine Synthesis and Secretion Depending on ROS Production and HIF Stabilization. *Neurochem Res.* 2016 Apr; 41(4):696-706. 査読あり doi:

10.1007/s11064-015-1738-3.

4. 石井 清朗, 篁 俊成 : 非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) / 非アルコール性脂質性炎 (NASH) と栄養 CLINICAL CALCIUM 医薬ジャーナル社 26-3 312-316 2016 年 査読無し <https://goo.gl/D6TJny>

5. 石井 清朗, 篁 俊成 : インスリン抵抗性 ~メカニズムに基づく新しい治療法の探求 ~ 肝臓による全身のインスリン感受性制御 Diabetes Frontier メディカルレビュー社 26-3 363-367 2015 査読無し <https://goo.gl/VyQZwn>

6. Nakagawa Y, Satoh A, Yabe S, Furusawa M, Tokushige N, Tezuka H, Mikami M, Iwata W, Shingyouchi A, Matsuzaka T, Kiwata S, Fujimoto Y, Shimizu H, Danno H, Yamamoto T, Ishii K, Karasawa T, Takeuchi Y, Iwasaki H, Shimada M, Kawakami Y, Urayama O, Sone H, Takekoshi K, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Yahagi N, Suzuki H, Yamada N, Shimano H. Hepatic CREB3L3 controls whole-body energy homeostasis and improves obesity and diabetes. *Endocrinology*. 2014 Dec;155(12):4706-19. 査読あり doi: 10.1210/en.2014-1113.

7. Fumoto T, Ishii KA, Ito M, Berger S, Schütz G, Ikeda K. Mineralocorticoid receptor function in bone metabolism and its role in glucocorticoid-induced osteopenia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 May 9;447(3):407-12. 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.149.

6. 研究代表者

石井 清朗 (ISHII, Kiyooki)
金沢大学・医学系・特任准教授
研究者番号・80419150