

研究報告書

「骨組織による糖・脂質代謝制御の分子メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 26 年 10 月～平成 30 年 3 月

研究者: 篠原 正浩

1. 研究のねらい

骨組織は運動器の要として身体運動を支え、体内のミネラル代謝を司る内分泌器官として働く。さらに、造血組織である骨髄を内包し、造血幹細胞を維持する重要な免疫器官でもある。骨組織の恒常性は、骨形成を担う骨芽細胞、骨吸収を担う破骨細胞、その両者を制御する骨細胞による直接的な制御を受け、これらの骨代謝細胞は免疫系、内分泌系、中枢神経系等による制御を受ける。加齢や閉経後の女性ホルモン低下、生活習慣の悪化といった要因により、骨形成低下および骨吸収促進を伴う骨組織の恒常性破綻をきたし骨粗鬆症の発症につながる。

骨組織の恒常性を破綻させる要因は、同時に糖・脂質代謝の恒常性破綻も招き、肥満や糖尿病の発症に繋がる。近年、骨代謝と糖・脂質代謝の相互作用を担う分子メカニズムの一端が明らかになりつつあり、レプチンやインスリン、アディポネクチンといった分子が骨代謝を制御する一方、骨芽細胞から産生されるオステオカルシンは糖・脂質代謝を制御することが報告されている。さらに、骨細胞による脂質代謝制御も報告され、その分子メカニズムの解明が期待されている。このように骨代謝と糖・脂質代謝には相互制御システムが存在し、一方の恒常性が破綻すると他方の恒常性も破綻することが予想される。

これまで研究者が行ってきた骨代謝研究の中で、骨粗鬆症や大理石骨病を発症するモデルマウスは加齢・高脂肪食負荷・卵巣摘出といった代謝異常が起こる疾患モデルにおいて肥満発症が顕著に抑制されることを見出したことから、本研究では骨組織とエネルギー代謝を制御する臓器・組織の相互作用や包括的な組織制御を担う分子の同定ならびにその機能解析を通じて、加齢等による骨組織を含めた代謝異常の病態理解や治療・予防に資する基礎研究の展開を狙いとしました。

要介護となる要因の一つである骨粗鬆症の克服は高齢化社会における健康寿命を延長し、要介護者数を抑制するために必須であり、疾患に対する新たな治療戦略の確立とともに発症を予防するもしくは早期に疾患を見つけ出すことが非常に重要である。本研究では数理科学的解析手法を駆使し、未来骨量変動予測を可能にする基盤技術の開発も実施した。特に、血液サンプルから計測できる骨代謝マーカーを利用して将来の骨量を予測し、骨粗鬆症発症の兆候が見られる段階で、健康指導など何らかの介入を図ることが可能にする技術開発の基盤確立をねらいとした。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では骨代謝細胞が発現し、かつ細胞外へ分泌する分子について、網羅的に解析を実施した。骨代謝を担う骨芽細胞や破骨細胞、骨細胞の網羅的遺伝子発現情報をもとに、骨代謝細胞の分化過程で発現が顕著に変動する遺伝子の抽出を行い、さらに抽出された遺伝

子のうち細胞外へ分泌される遺伝子を抽出した結果、13 遺伝子の抽出に成功した。この 13 遺伝子には膵臓からのインスリン分泌を制御する骨芽細胞が産生するオステオカルシン (Ferron, et al., Cell, 2010)のほか、機能未知の遺伝子などが含まれていた。すでに報告のあるオステオカルシンを除く 12 遺伝子の、エネルギー代謝を制御する細胞である筋細胞、脂肪細胞の前駆細胞株に過剰発現し、細胞分化に対する影響について機能的スクリーニングを実施したところ、セマフォリンファミリーの一つである Sema4D に脂肪細胞分化促進効果があることが判明し、以降 Sema4D の脂肪細胞分化における機能解析を中心に行った。高脂肪食を負荷したマウスの内臓脂肪では Sema4D の発現が誘導されること、Sema4D の発現抑制により脂肪細胞分化を抑制可能であることなど、Sema4D の脂肪細胞における新たな機能を明らかにした。これまでの研究者の成果により Sema4D は骨形成を担う骨芽細胞の分化を抑制するため、Sema4D の機能阻害は骨形成を促進することが明らかとなっている (Nat Med, 2011)。女性の更年期における代謝障害では骨量の低下とともにエネルギー代謝の変化から肥満を発症し、将来的な糖尿病や高脂血症といったメタボリックシンドロームにつながる。Sema4D の機能阻害は、骨形成を促進し、脂肪細胞の分化を抑制することから、更年期の女性における代謝異常の改善につながる可能性について検証を行ったところ、Sema4D の機能阻害により更年期の代謝障害モデルである卵巣摘出マウスにおける骨量低下と肥満発症の同時抑制が可能であることが明らかとなり、更年期代謝障害性疾患の新たな治療法確立の基盤を築いた。

骨量変動を予測する技術開発では、生後 4 週齢から 52 週齢までのマウス血液を用いた血中の骨代謝関連マーカー等の測定値をもとに、各マーカーについて時間を変数とする関数として記述し、各マーカーの相互関係を考慮した数理モデルの構築から時間的骨量変動を表す“骨量方程式”の構築に成功した。この“骨量方程式”の精度について検証を行ったところ、加齢とともに減少する骨量を的確に表現することが可能である事が実証され、骨量変動を予測する基盤技術の確立に成功した。

(2) 詳細

研究テーマ 1 「骨代謝-エネルギー代謝の連関の解明と代謝性疾患治療への応用」

骨代謝とエネルギー代謝の連関を担う分子を同定するため、骨代謝を担う細胞である破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞が産生する細胞外分泌因子の同定を実施した。各骨代謝細胞はマウス由来のプライマリー細胞を使用し、in vitro における分化培養系で得られた細胞から total RNA を抽出、RNA-seq 解析を実施した。得られたデータについてバイオインフォティクス解析を行い、細胞の分化過程で発現が誘導され、かつ RPKM 値が高値であった遺伝子のうち、細胞外分泌因子の特徴であるシグナルペプチドをコードする遺伝子の抽出を行った。さらに細胞膜ドメインを持たない遺伝子を抽出したところ、機能未知の遺伝子を含む 13 遺伝子の存在が明らかとなった。このうちの一つの遺伝子に免疫系や神経系の恒常性維持に重要な膜型リガンドである Sema4D が含まれていた。

Sema4D を脂肪細胞前駆細胞株 3T3L1 細胞にレトロウイルスを用いて過剰発現させ、脂肪細胞分化を誘導したところ、コントロールと比較して脂肪細胞分化が顕著に亢進した。この脂肪細胞分化は Sema4D の受容体である PlexinB1 や PlexinB2 の発現を shRNA により抑制す

るとキャンセルされたことから、Sema4D は PlexinB1/2 を介して脂肪細胞分化を制御している事が判明した。

Sema4D による脂肪細胞分化制御の生理的意義について高脂肪食負荷マウスを用い解析を行ったところ、高脂肪食負荷マウスの内臓脂肪組織では Sema4D ならびに PlexinB1/2 の発現が劇的に上昇する事が判明し、生体における脂肪形成と Sema4D の機能との関連性が示唆された。そこで Sema4D ノックアウトマウスの脂肪組織の解析を行ったところ、野生型マウスと比較して脂肪組織重量や糖・脂質代謝等には顕著な差はなく、生理的条件下における Sema4D の脂肪組織形成への関与は低い事と考えられ、高脂肪食負荷時の肥満のような病的条件化において機能的であると推察された。この点については、現在解析を実施しているところである。

ノックアウトマウスの解析と並行して、Sema4D の中和抗体を用いたマウス肥満モデルの治療・予防実験も実施した。マウスに対する高脂肪食負荷時に Sema4D 中和抗体を投与する予防実験、ならびに高脂肪食負荷後に肥満・糖尿病を発症したマウスへ Sema4D 中和抗体を投与する治療実験のいずれにおいても、抗体投与群で内臓脂肪の重量減少、糖・脂質代謝能悪化の抑制効果が認められた。また、更年期における障害モデルである卵巣摘出マウスに対しても同様の治療・予防実験を実施したところ、内臓脂肪重量の低下や糖・脂質代謝能悪化の抑制が認められるほか、閉経後骨粗鬆症も改善され Sema4D の機能阻害が更年期における代謝障害の予防や治療に有効であることを実証した(論文作成中)。

以上の Sema4D に関する研究のほか、破骨細胞による骨破壊において重要な役割を果たすキナーゼの阻害剤が、卵巣摘出マウスにおいて直接的に破骨細胞の骨破壊を抑制するとともに間接的に筋組織の恒常性を維持することで、更年期における代謝障害の予防や治療に有効であることも見いだした(論文準備中)。

研究テーマ 2「未来の骨量変動を予測する技術の開発」(九州大学・岩見慎吾先生との共同研究)

マウスの骨量は生後から10週齢程度まで増加し、その後緩やかに減少する。生後4週齢から52週齢までのマウス血液を用いた血中の骨代謝関連マーカー等7項目について測定を実施し、経時的な骨代謝マーカーの変動について解析を行ったところ、1)血中の骨代謝マーカーの変化は骨量減少に先立って起こることを見出し、2)複数の骨代謝マーカーの時系列変化を正確に予測できる数理モデルとシミュレーションの構築に成功した。これらの結果は、複数の骨代謝マーカーを測定することにより将来の骨量変動が予測できること、その予測は経時的な測定によりさらに精度が上がることを示唆しており、7種類の血中マーカーを定期的にモニターすることにより将来の骨量変動や骨粗鬆症の発症予測に繋がる技術基盤を確立した。

3. 今後の展開

Sema4D に関する研究では、Sema4D の機能阻害が更年期における代謝性障害の治療や予防に有効であることを実証したものの、免疫系における重要性を考慮すると免疫抑制・免疫不全といった副作用が懸念されることから、免疫系に対する影響を極力低減させ、骨や脂肪にのみ作

用する手段の確立が必要である。抗体工学技術や立体構造に基づく in silico 創薬技術、低分子化合物スクリーニングを利用することにより、免疫系に影響を及ぼさない更年期の代謝改善治療法・予防法の確立に取り組む。

「未来の骨量変動を予測する技術の開発」では、骨代謝マーカー測定時における骨量および7種類の骨代謝マーカーを経時的に測定することで未来の骨量変動予測を可能にする技術に対して特許を取得する予定である。加えて、骨粗鬆症患者に薬物治療を行った際の短期間での治療効果を判定する技術に対しても特許を取得する。将来的には、定期健康診断や臨床現場への現実的な導入に向けた研究を展開し、現在個々に ELISA 法により測定している7種類の骨代謝マーカーを、迅速・簡便・安価に測定することが可能な技術確立なども視野に入れている。最終的には骨代謝マーカーの測定に加えて、個人の食事内容や運動量の実測に基づき、栄養指導や運動指導プログラムを提供することで、骨粗鬆症の発症予防につながるシステムの社会実装に結びつける予定である。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

当初の目的の一つであった骨粗鬆症と糖・脂質代謝異常症を併発するような更年期代謝異常や肥満・糖尿病の合併症として発症する骨粗鬆症、骨粗鬆症発症時における糖・脂質異常症に対する新規治療法の確立に対する分子基盤の構築がおおむね達成できたものと思われる。研究途中でマウスの系統維持トラブルに見舞われたものの、追加予算等により支援して頂いたのも幸いし、当初の計画からの若干の遅れで進捗してきた。また、領域内の数理科学研究者との密な連携による共同研究を実施する事ができ、骨粗鬆症の発症予測システムの開発研究では当初の計画を超えたスピードで進捗した。特に、共同で社会実装に向けた研究を展開する事が可能となったことは大きな収穫であった。

さきがけ領域内・領域間のネットワークを活用して共同研究を実施する事で、新たな研究の展開に結びつき、将来的な研究の発展につながる地盤を築けたことも大きな成果といえる。研究者ネットワークの拡大により様々な場面での講演等の機会をいただき、他の研究者に対して研究内容の紹介する中でさらに新たなアイデアの発想が可能となったほか、異分野研究者との融合研究の展開、研究成果を社会実装するための企業との連携にもつながった。

今後、さきがけ研究で培った研究成果や人的ネットワークをさらに確固たるものにし、さらなる飛躍へと結びつける必要があると考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

近年、骨代謝と糖・脂質代謝の相互作用を担う分子メカニズムの一端が明らかになりつつあり、その分子メカニズムの解明が期待されている。本研究課題では骨代謝を担う骨芽細胞や破骨細胞、骨細胞の網羅的遺伝子発現情報をもとに、骨代謝を担う細胞の分化過程で発現が顕著に変動する遺伝子で細胞外へ分泌される遺伝子を探索した結果、13遺伝子を抽出した。現在、その内のひとつであるSema4Dに注目し、特に脂肪組織における役割について解

析している。また、研究領域内の共同研究として、骨量の変動予測が可能な骨量方程式の構築にも成功した。篠原正浩研究者の積極的な姿勢は高く評価され、今後、骨を中心とした臓器ネットワークによる恒常性維持機構の一端を解明するとともに、それが骨粗鬆症の発症予防に繋がることが期待される

5. 主な研究成果リスト

(1)論文(原著論文)発表

1. Ohmae S, Noma N, Toyomoto M, **Shinohara M**, Takeiri M, Fuji H, Takemoto K, Iwaisako K, Fujita T, Takeda N, Kawatani M, Aoyama M, Hagiwara M, Ishihama Y, Asagiri M. Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K. *Sci Rep*, 7, 41710, 2017
2. Koda N, Sato T, **Shinohara M**, Ichinose S, Ito Y, Nakamichi R, Kayama T, Kataoka K, Suzuki H, Moriyama K, Asahara H. Mohawk transcription factor regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Development*, 144, 313-320, 2017
3. Suzuki H, Ito Y, **Shinohara M**, Yamashita S, Ichinose S, Kishida A, Oyaizu T, Kayama T, Nakamichi R, Koda N, Yagishita K, Lotz MK, Okawa A, Asahara H. Gene targeting of the transcription factor Mohawk in rats causes heterotropic ossification of Achilles tendon via failed tenogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 113, 7840-7845, 2016.
4. Sumiya E, Negishi-Koga T, Nagai Y, Suematsu A, Suda T, **Shinohara M**, Sato K, Sanjo H, Akira S, Takayanagi H*. Phosphoproteomic analysis of kinase-deficient mice reveals multiple TAK1 targets in osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 463, 1284-1290, 2015

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- 1、篠原正浩、「骨ペディア 骨疾患・骨代謝キーワード事典」(羊土社)、「第2部 4章 破骨細胞の分化と機能 Keyword 4 ITAM シグナル」、p138-140、2015
- 2、篠原正浩、「骨免疫学総論」、炎症と免疫(先端医学社)、Vol. 22、p315-321、2015
- 3、篠原正浩、高柳広、「次世代の分子ターゲット Btk」、分子リウマチ治療(先端医学社)、Vol. 9、p26-30、2016
- 4、篠原正浩、「免疫複合体は FcR γ シグナルを介して骨代謝を制御する」、THE BONE(メディカルレビュー社)、Vol. 29、p430、2016
- 5、篠原正浩、「IgG 抗体の糖鎖修飾が破骨細胞分化と骨量減少を決定する」、THE BONE(メディカルレビュー社)、)、Vol. 29、p430、2016
- 6、篠原正浩、浅原弘嗣 「骨組織系の表現型解析」、実験医学別冊『マウス表現型解析パーフェクトガイド』(羊土社)、p159-168、2016

7、Okamoto K, Nakashima T, Shinohara M, Negishi-Koga T, Komatsu N, Terashima A, Sawa S, Nitta T, Takayanagi H. Osteoimmunology: the conceptual framework unifying the immune and skeletal systems. *Physiol Rev*, 94, 1295–1349, 2017