



Title	Sclerostin enhances adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	浮田, 万由美
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12141号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61892
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Mayumi_Ukita_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 浮田 万由美

学 位 論 文 題 名

Sclerostin enhances adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells
(Sclerostin は 3T3-L1 細胞における脂肪細胞分化を促進する)

【背景と目的】

Sost は、骨量の増加を呈する硬結性骨化症および van Buchem 病の原因遺伝子として同定された遺伝子である。この *Sost* 遺伝子がコードする sclerostin は、骨細胞が特異的に産生する分泌タンパク質である。*Sost* ノックアウトマウスにおいて骨量が増加することや *Sost* 過剰発現マウスにおける骨量の増加から、sclerostin は骨形成を負に制御する因子として知られている。また、sclerostin は標的細胞における古典的 Wnt 経路のシグナル伝達を抑制することが知られている。

近年、マウスにおいて骨基質タンパク質であるオステオカルシンが血中を介して膵臓のインスリン分泌を制御するといった報告などから、これまで身体の支持、運動、臓器の保護やカルシウムの貯蔵の機能を有すると考えられてきた骨は、全身の他臓器と協調し糖代謝の調節といった機能を有する可能性が示唆され、注目されている。一方、エネルギーバランスの維持に重要な役割を果たす脂肪細胞が産生する adiponectin が骨を標的としうることも、近年報告されている。しかし、骨組織が産生する分子の脂肪細胞・組織に対する作用に関してこれまで報告がない。

最近、いくつかの臨床研究からヒト血清中の sclerostin 濃度と脂質代謝との相関が報告されている。これらより、この骨細胞が産生する分子が脂肪細胞に作用する可能性が考えられる。しかし、その詳細は明らかではない。そこで、本研究では、脂肪細胞分化のモデルとして確立しているマウス 3T3-L1 細胞培養系を用いて、sclerostin の脂肪細胞分化に及ぼす効果とその機構を解明することを目的とした。

【材料および方法】

3T3-L1 細胞を培養し、コンフルエント後インスリン、デキサメサゾンおよびイソブチルメチルキサンチン（分化培地）を加えて培養し、その後インスリンのみ加えた培地で培養を続けて脂肪細胞に分化させた。この系にマウス組み換え sclerostin もしくは Wnt3a タンパクを加えて培養を行った。脂肪細胞分化について、細胞内に蓄積した脂肪滴を oil Red O を用いた染色および脂肪細胞分化のマーカーである adiponectin, peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ , lipoprotein lipase (LPL) および fatty acid binding protein 4 (Fabp4) の mRNA 量を定量 RT-PCR 法で測定し、評価した。LRP4/5/6 の発現は RT-PCR を用いて調べた。Western blot 法を用い、脂肪分化初期における c/EBP β タンパクの発現を検討した。細胞増殖およびアポトーシス活性は、ELISA 法による bromodeoxyuridin の DNA への取り込み量および Caspase-Glo 3/7 Assay System による caspase3/7 活性の測定を行った。

また, transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) の関与を検討するために, TAZ 応答レポーター8XGIIIC-Lux をトランスフェクトし, ルシフェラーゼ活性はルミノメータを用いて測定した. さらに, TAZ の siRNA もしくは TAZ 発現プラスミドをトランスフェクションし, TAZ をノックダウンもしくは過剰発現させ, sclerostin の作用における TAZ の関与を検討した.

【結果】

3T3-L1 細胞に sclerostin を加え分化培地で培養 5 日後には, 加えた sclerostin の用量依存的に oil Red O で染色される細胞内の脂肪滴が増加し, adiponectin, PPAR γ , LPL および Fabp4 の mRNA 発現が誘導された. Sclerostin 添加 1 日後には, 3T3-L1 細胞の C/EBP β タンパク量が増加した. また, sclerostin は古典的 Wnt シグナルを活性化させる Wnt3a による脂肪滴の減少を抑制した. 一方, sclerostin は 3T3-L1 細胞の DNA 合成や caspase3/7 活性は変化させなかった. 3T3-L1 細胞では LRP5/6 mRNA 発現が認められたが LRP4 mRNA の発現は認められなかった. Wnt3a は 3T3-L1 細胞において, 8XGIIIC-Lux の転写活性を増加させたが, sclerostin はこの活性を減少させた. siRNA のトランスフェクションにより TAZ をノックダウンさせた 3T3-L1 細胞に sclerostin を添加したところ, 脂肪滴や adiponectin mRNA の発現は sclerostin 単独と比べて増加した. 他方, TAZ 発現プラスミドを導入し TAZ を過剰発現させた 3T3-L1 細胞では, sclerostin を加えても脂肪滴や adiponectin mRNA 発現の増加は認められなかった.

【考察】

sclerostin は 3T3-L1 細胞において, 細胞増殖やアポトーシスの制御によるのではなく, 分化初期の C/EBP β の発現増加に伴って, 脂肪細胞分化を促進することが考えられた. この sclerostin の作用には, 細胞表面の LRP5/6 が関与している可能性が考えられた. 転写のコアキチベータである TAZ は, Hippo シグナル伝達経路のみならず, 古典的 Wnt 経路によっても活性化させることが最近報告された. TAZ のノックダウンおよび過剰発現による検討から, sclerostin は TAZ 活性の抑制を介して, 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を調節していると考えられた.

【結論】

sclerostin は 3T3-L1 細胞において脂肪細胞分化を正に調節することが明らかになった. また, sclerostin は, 脂肪細胞の分化過程において TAZ の活性を調節する機構が考えられた. これらの結果より, 骨細胞が産生する sclerostin は, 他臓器である脂肪組織において脂肪細胞分化を制御し脂質代謝に影響を及ぼし得る可能性が示された. 本研究により, これまで明らかではなかった骨組織から脂肪組織への組織間連携に関与する分子として sclerostin の新たな役割が示唆された.