

脱分化脂肪細胞形成及び骨芽細胞への再分化における

ビタミン D シグナルの影響

Vitamin D signaling in dedifferentiated fat cell formation and osteoblastic re-differentiation

石澤通康¹⁾, 風間智彦²⁾, 萩倉一博²⁾, 松本太郎²⁾, 槇島 誠¹⁾

Michiyasu ISHIZAWA¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Kazuhiro HAGIKURA²⁾, Taro MATSUMOTO²⁾, Makoto MAKISHIMA¹⁾

¹⁾日本大学医学部生体機能医学系生化学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

活性型ビタミン D₃ は、核内受容体であるビタミン D 受容体 (VDR) に作用することで、カルシウム代謝を調節するが、脂肪細胞の分化を含めた多彩な作用が報告されている。しかし、脱分化脂肪細胞 (DFAT) の形成過程や再分化における VDR シグナルの役割は明らかではないので、本研究で解析を実施した。天井培養によるマウス脂肪細胞の脱分化過程において、活性型ビタミン D₃ 添加は脂肪細胞のマーカー遺伝子の発現低下を減弱させたが、Fibronectin (*Fn1*) 等細胞骨格に関与する遺伝子の発現増加を促進した。VDR 欠損マウス由来の脂肪細胞の脱分化過程において、脂肪細胞マーカー遺伝子の発現低下と *Fn1* 遺伝子の発現増加を認めた。よって、ビタミン D シグナルは脱分化に関連する遺伝子発現に部分的に影響を与えることが明らかになった。一方、ヒト DFAT の骨芽細胞への再分化誘導実験において、活性型ビタミン D₃ 及び合成ビタミン D 誘導体は骨分化誘導を促進した。DFAT を局所に投与するタイプの骨損傷治療戦略において、ビタミン D 誘導体と併用することで治療効果の増強が期待できる。

【背景および目的】

活性型ビタミン D₃ は、核内受容体であるビタミン D 受容体 (Vitamin D receptor ; VDR) に作用することで、カルシウム代謝の調節を行う。また、活性型ビタミン D₃ やその誘導体には、骨芽細胞や破骨細胞を介する骨の恒常性維持、自然免疫の増強、自己免疫疾患や心血管病の改善効果、白血病細胞や大腸癌などの抗腫瘍作用が報告されている¹⁾。また、活性型ビタミン D₃ が前駆脂肪細胞の分化を促進すること²⁾、VDR 欠損マウスでは脂肪蓄積が少ないこと³⁾、脂肪組織特異的 VDR 強発現トランスジェニックマウスでは肥満になりやすいといった特徴が報告され⁴⁾、ビタミン D-VDR シグナルの脂肪分化促進作用が示されている。しかし、脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells; DFAT cells) の形成過程や再分化におけるビタミン D-VDR シグナルの影響はまだ明らかになっていない。

本研究では成熟脂肪細胞の脱分化過程及び DFAT の骨芽細胞への再分化におけるビタミン D シグナルの影響を検討した。

【方法】

実験①: 8 週齢から 10 週齢の C57BL6/J 系統 *Vdr*(+/+) (野生型) 又は *Vdr*(-/-) (VDR 欠損) オスマウス皮下脂肪組織より成熟脂肪細胞を単離後、全自動セルカウンターにてトリパンブルー

染色及び細胞数の測定を行い、生細胞 8,000 個/cm² を 25 cm² フラスコに播種した。天井培養に用いる細胞培養液中又は天井培養から 1 週間後の転地する際に用いる交換用培地中に 100 nM になるように活性型ビタミン D₃、或いは新規ビタミンD誘導体を混和し、それぞれ 1 週間後に細胞を回収して遺伝子発現解析を行った。

実験②: ヒト DFAT は 25,000 個/cm² にて細胞を 12 well plate 又は 24 well plate に播種し、StemMACS™ OsteoDiff Media (Miltenyi Biotec 社製) 又は分化誘導混合培地(100 nM dexamethasone, 50 μM L-ascorbic acid 2-phosphate, 10 mM β-glycerophosphate)にて骨芽細胞分化を誘導した⁵⁾。培地は 3 日ごとに交換し、7 日目にアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性染色又は RNA 抽出を行い、骨芽細胞マーカー分子の遺伝子発現解析を行った。

【結果】

実験①: 天井培養 1 週間後の成熟脂肪細胞において、脂肪細胞のマーカー分子である peroxisome proliferator activated receptor γ2 (*Pparg2*)、CCAAT-enhancer-binding protein α (*Cebpa*)、*Cebpb* の mRNA レベルが減少した。活性型ビタミン D₃ 添加培地ではこれら脂肪細胞マーカー分子の発現減少が軽減された。VDR 欠損マウスにおいても、天井培養 1 週間後で、野生型マウスと同様に脂肪分化マーカーの発現レベルが減少したが、脂肪分化マーカーの発現レベルは野生型よりも低かった。ブタの成熟脂肪細胞の脱分化過程で発現増加する Fibronectin 1 (*Fn1*) やその受容体である Integrin α5 (*Itga5*) は⁶⁾、マウス成熟脂肪細胞の脱分化過程でも発現増加するが、活性型ビタミン D₃ 添加により、更に発現が増加した。組織選択的 VDR 活性化能を有する新規ビタミン D 誘導体 ADRO1⁷⁾ と、ビタミン D 代謝酵素による影響を受けにくい安定型ビタミン D 誘導体 O2C3⁸⁾ は、いずれも活性型ビタミン D₃ と同程度に *Fn1* mRNA 誘導を促進した。VDR 欠損マウスの成熟脂肪細胞では、天井培養による *Fn1* mRNA 発現増加は認められたが、活性型ビタミン D₃ による発現増強は認められなかった。野生型マウスと VDR 欠損マウスより得られた DFAT を継代培養した際、各継代時に得られる細胞数の総数(accumulating cell number)に相違は認められなかった。

実験②: ヒト DFAT における骨分化誘導刺激を行う際、活性型ビタミン D₃ 或いは組織選択的ビタミン D 誘導体、代謝抵抗性誘導体、これらの類縁体を同時添加したところ、分化誘導から 7 日目に、骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性は増強された。更に、分化誘導 7 日目における Osteopontin (*Spp1*) mRNA 及び Osteocalcin (*Bglap*) mRNA の発現増加もこれら VDR アゴニストによって発現が増強した。

【考察】

実験①: マウス成熟脂肪細胞の脱分化過程において、活性型ビタミン D₃ は成熟脂肪細胞のマーカー遺伝子 *Pparg2*, *Cebpa* 及び *Cebpb* の発現低下を減弱し、脱分化関連遺伝子 *Fn1* 及び *Itga5* の発現は増強した。VDR 欠損マウスでは、成熟脂肪細胞のマーカー分子の発現低下、*Fn1* の発現増加が認められることから、VDR 欠損において脱分化が促進することが示唆される。VDR シグナルは、脂肪細胞分化の促進というこれまでの報告から考えると、脱分化に対しては抑制的に働くことが考えられ、*Pparg2*, *Cebpa* 及び *Cebpb* の発現変化は合致する。一方、*Fn1* と *Itga5* は VDR 標的遺伝子であるため^{9), 10)}、VDR シグナルと脱分化に伴う別の因子の両方の影響を受けることが考えられる。VDR 欠損マウスの脂肪細胞でも、DFAT 形成は可能であり、得られた DFAT 細胞数は野生型と差が見られなかった。遺伝子の変化は見られるが、VDR シグナルの DFAT 化における影響は限定的なものであろう。

実験②: 活性型ビタミン D₃ は骨芽細胞への分化を誘導することが他の幹細胞において報告されている¹¹⁾。本研究によって、ヒト DFAT を用いた骨分化誘導実験でも同様の結果を得た。また、組織選択的 VDR アゴニストや代謝抵抗性 VDR アゴニストでも同様の結果を得た。ビタミン D 製剤の過剰投与は高カルシウム血症を呈するため、臨床的な利用は骨粗しょう症と皮膚病乾癬に

限定されている。DFAT の局所投与治療法が現在臨床応用に向けて開発中であるが、組織選択的 VDR 活性化能を有する ADRO1 や代謝抵抗性を示す O2C3 を低容量用いることで、骨損傷に対する DFAT の骨再生治療効果(歯周組織再生能など¹²⁾)の増強が期待できる。

【結語】

- ① ビタミン D シグナルは、脱分化に関連する遺伝子変化を誘導する。
- ② 活性型ビタミン D₃ 及びビタミン D 誘導体は DFAT の骨芽細胞への再分化能を促進する。

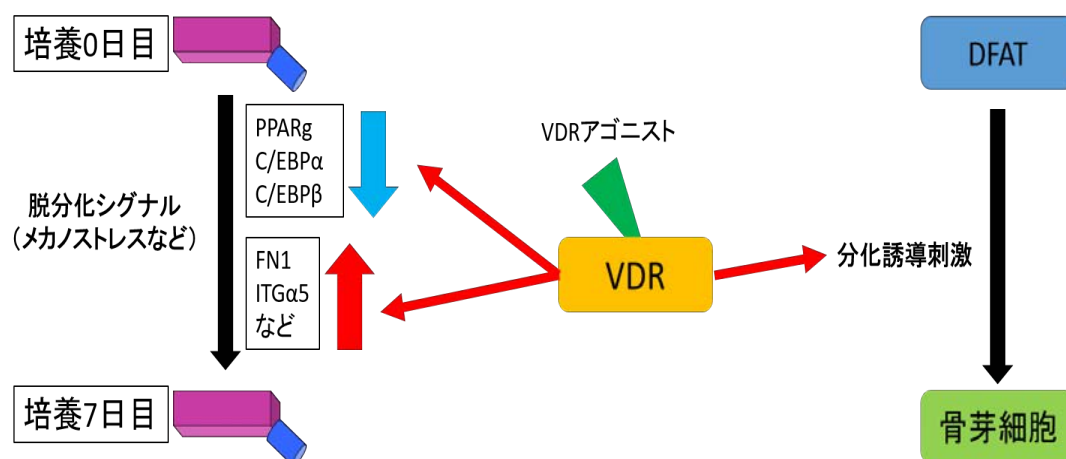


図1. 結果のまとめ

【参考文献】

- 1) Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, Black DM, Demay MB, Manson JE, Murad MH, Kovacs CS. The nonskeletal effects of vitamin D: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev.* 2012; **33**(3):456-92
- 2) Nimitphong H, Holick MF, Fried SK, Lee MJ. 25-hydroxyvitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ promote the differentiation of human subcutaneous preadipocytes. *PLoS One.* 2012; **7**(12):e52171.
- 3) Wong KE, Szeto FL, Zhang W, Ye H, Kong J, Zhang Z, Sun XJ, Li YC. Involvement of the vitamin D receptor in energy metabolism: regulation of uncoupling proteins. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009; **296**(4):E820-8.
- 4) Wong KE, Kong J, Zhang W, Szeto FL, Ye H, Deb DK, Brady MJ, Li YC. Targeted expression of human vitamin D receptor in adipocytes decreases energy expenditure and induces obesity in mice. *J Biol Chem.* 2011; **286**(39):33804-10
- 5) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, Fukuda N, Iribe Y, Tanaka N, Matsubara Y, Sakuma T, Satomi A, Otaki M, Ryu J, Mugishima H. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008; **215**(1):210-22.
- 6) Ono H, Oki Y, Bono H, Kano K. Gene expression profiling in multipotent DFAT cells derived from mature adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; **407**(3):562-7.
- 7) Otero R, Ishizawa M, Numoto N, Ikura T, Ito N, Tokiwa H, Mouriño A, Makishima M, Yamada S. 25 S- Adamantyl- 23- yne- 26,27- dinor- 1α,25- dihydroxyvitamin D₃: Synthesis, Tissue Selective Biological Activities, and X-ray Crystal Structural Analysis of Its Vitamin D Receptor

Complex. *J Med Chem.* 2018; **61(15)**:6658-6673.

- 8) Yasuda K, Ikushiro S, Kamakura M, Takano M, Saito N, Kittaka A, Chen TC, Ohta M, Sakaki T. Human cytochrome P450-dependent differential metabolism among three 2 α -substituted-1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2013; **133**:84-92.
- 9) Polly P, Carlberg C, Eisman JA, Morrison NA. Identification of a vitamin D3 response element in the fibronectin gene that is bound by a vitamin D3 receptor homodimer. *J Cell Biochem.* 1996; **60(3)**:322-33.
- 10) Medhora MM, Teitelbaum S, Chappel J, Alvarez J, Mimura H, Ross FP, Hruska K. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 up-regulates expression of the osteoclast integrin alpha v beta 3. *J Biol Chem.* 1993; **268(2)**:1456-61.
- 11) Kato H, Ochiai-Shino H, Onodera S, Saito A, Shibahara T, Azuma T. Promoting effect of 1,25(OH)₂ vitamin D3 in osteogenic differentiation from induced pluripotent stem cells to osteocyte-like cells. *Open Biol.* 2015; **5(2)**:140201.
- 12) 秋田大輔, 伊藤智加, 月村直樹, 松本太郎. 脱分化脂肪細胞の臨床応用化に向けた取り組み. *日歯医師会誌.* 2019; **71(10)**: 829-839