

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：37114
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2017～2020
課題番号：17K19766
研究課題名（和文）副作用のない脂質異常症の併用薬剤の開発

研究課題名（英文）Novel drug discovery for dislipidemia

研究代表者

平田 雅人（Hirata, Masato）

福岡歯科大学・口腔歯学部・客員教授

研究者番号：60136471

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：オステオカルシン(OC)の受容体であるGPCR6Aの発現を抑制させた培養肝細胞および脂肪細胞において、オルガネラ局在性脂質代謝酵素さらには膜タンパク質までも著明に減少することが認められた。これらの知見は、GPCR6Aがオルガネラのホメオスタシスを調節しているという新規の生理機能に関わることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞機能の発現は、その細胞内に存在するオルガネラに依存するところが大きい。今回、GPCR6Aがエネルギー代謝で最も重要なオルガネラであるミトコンドリアのホメオスタシスに関与していることを細胞レベルで見出した。この点は、細胞生物学的な観点からはもちろんのこと、メタボリックシンドロームの改善という医学的な観点からも非常に重要な知見である。すなわち、本研究成果はGPCR6Aを標的としてミトコンドリア増殖の亢進（エネルギー代謝促進、白色脂肪細胞の褐色脂肪細胞化など）やがん細胞におけるワールブルク効果を消滅させ、アポトーシスの惹起を実現させる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Deletion of GPCR6A resulted in the reduction of some metabolic enzymes located in mitochondria and peroxisomes in vitro. Furthermore, the fact that membrane proteins on mitochondria and peroxisomes are also decreased, implying GPCR6A plays pivotal roles in energy metabolism via the regulation of organelle homeostasis.

研究分野：生化学

キーワード：オステオカルシン 脂肪酸ベータ酸化 脂質異常症 フィブラート製剤

1. 研究開始当初の背景

僅かな量の骨オステオカルシン(OC)が循環して糖代謝調節を担うホルモンとして作用するという発見以来、世界レベルでその作用機序解明が精力的に進められている⁽¹⁾。我々は OC によるインスリン分泌亢進(糖代謝改善効果)が、glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の分泌促進によることを示した。次いで、OC による脂肪組織からのアディポネクチンの分泌亢進作用、さらには抗がん作用を見出していた。また、OC が様々な細胞・臓器において小胞体ストレスを軽減させることや抗酸化酵素の転写を促進し、細胞内環境を正常化させる結果として代謝異常が改善されるというモデルも提唱もされ、また人を対象とした疫学調査により、糖代謝指標に加えて、血清中性脂肪ならびに LDL-コレステロール値と OC 量には負の相関がみられるという報告がある⁽²⁾。

脂質異常症治療薬として汎用されているフィブラート系薬剤は、PPAR- α の合成リガンドである。PPAR 群には α 、 β 、 γ の3タイプがあり、それぞれが組織別に多様な発現パターンを示す。興味深いことに、これまでに報告されている OC の生理活性がベザフィブラート(BF)のそれらとほぼ一致する⁽³⁾。それに併せて、1) OC、BF とともに比較的類似の組織に作用する点は PPAR 群の組織分布の広さと併せて注目できる。2) 肝臓の PPAR- α はインスリン刺激によってリン酸化されリガンドとの親和性が高まる。3) OC、BF とともに脂肪組織からのアディポネクチン分泌亢進作用が認められる。4) OC と BF は PPAR 群に向けて初期のシグナリング経路が異なるので相加あるいは相乗効果が期待出来る。5) 実際にマウス培養肝細胞を BF 存在下で培養した時、ペルオキシソーム脂肪酸代謝酵素 (acyl-CoA oxidase 1: ACOX1) の増加および OC との併用による相乗効果も観察された。一方で、これまで脂質異常症の治療戦略としてフィブラート系薬剤とスタチン系薬剤を併用されているが、副作用が強いことが知られていた。

2. 研究の目的

この背景のもと、スタチン系薬に代わり、OC を BF との併用薬として用いることが脂質異常症治療戦略における副作用の軽減につながる手法として有効であるかを検討するとともに、培養肝細胞レベルで OC 受容体である GPRC6A の細胞機能発現における生理的重要性をオルガネラ(ミトコンドリアおよびペルオキシソーム)に着目して解析することを目的とした。

3. 研究の方法

雄性マウスを高脂肪高ショ糖食飼育し、脂質異常症モデルマウスとした。そのマウスに生理食塩水(対照群)、BF、BF と OC 併用、BF とスタチン併用群に分けて、4週間毎日経口投与した。それらのマウスの血清中の中性脂肪、コレステロール測定、並びに肝臓に含まれる中性脂肪を測定した。一方で、培養肝細胞において siRNA 法によって GPRC6A の発現を抑制し、オルガネラ局在性酵素および膜タンパク質の動態を検出した。

4. 研究成果

BF と OC を併用した群では、BF 単独ならびに BF とスタチン併用群に比べ血中中性脂肪の濃度低減を認めることはできず、また肝臓に含まれる中性脂肪濃度低下も改善が認められなかった。すなわち、OC をフィブラート系薬剤と併用することが、スタチン系薬剤に代わる脂質異常症改善物質として適していないと結論した。ただし、少なくとも培養肝細胞レベルで OC が脂肪酸酸化系酵素を誘導するというフィブラート系薬剤と類似の作用、すなわち転写因子 PPAR を介した脂肪酸酸化系酵素 ACOX1 の誘導する作用を有することを確認できていることから(Fig.1)、その作用機序などを解明することを目的として引き続き解析を進めた。

初めに、OC 刺激による脂肪酸酸化系酵素の誘導効果は OC 受容体として知られている GPRC6A であるかを検証した。培養肝細胞 Hepa1-6 細胞において siRNA 法による GPRC6A 発現抑制した上で、OC 存在下で培養し、脂肪酸酸化系酵素のタンパク質レベルを検出したところ、対照群では見られた脂肪酸酸化系酵素の誘導が認められなかった。つまり、Hepa1-6 細胞においても OC の作用は GPRC6A を介していることが分かった。次いで、OC によって脂肪酸酸化系酵素が誘導される現象はフィブラート系薬剤と類似した効果であり、いわゆる peroxisome proliferation が誘導されていることが想定され

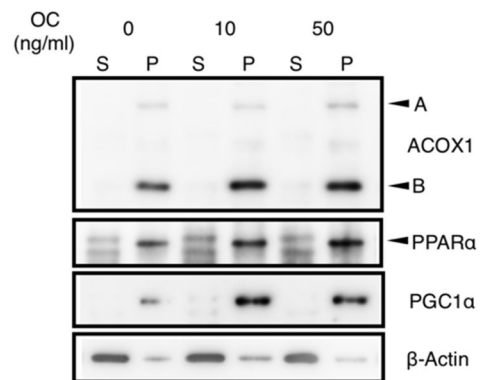


Fig. 1
OC induces peroxisomal β -oxidation enzyme

る。では逆に GPRC6A が発現抑制されている条件下ではペルオキシソームやミトコンドリアはどのような状態であるかを検討した。その結果、GPRC6A 発現抑制した Hepa1-6 細胞において脂肪酸酸化系酵素 medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD, Fig.2, A 左パネル) および ACOX1 (Fig.2A, 右パネル) のタンパク質レベルが著明に減少していた。これに加えてミトコンドリア局在性膜タンパク質 (TOM20, TIM40)、呼吸鎖構成タンパク質 COX4、およびペルオキシソーム局在性膜タンパク質 Pex14p の著減も認められた。さらにそれらのオルガネラの生合成に関わる転写因子のタンパク質レベルを検出したところ、Peroxisome-proliferator activated receptor coactivator 1 (PGC1) 並びに PPAR の著減までも確認された。

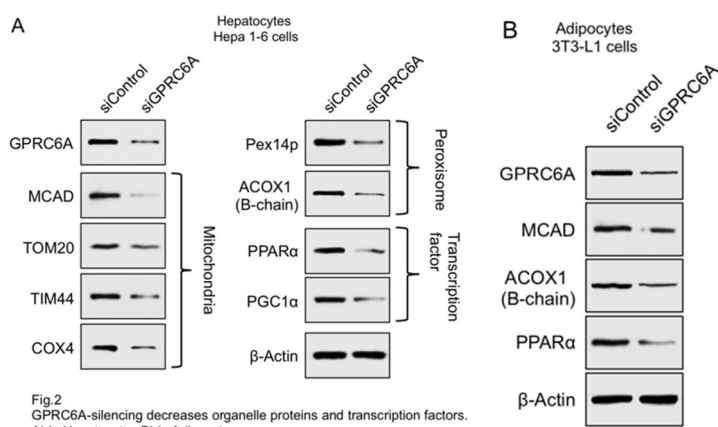


Fig.2 GPRC6A-silencing decreases organelle proteins and transcription factors. A) in Hepatocytes B) in Adipocytes

以上の結果は、GPRC6A シグナリングがオルガネラのホメオスタシスに深く関わっていることを示唆する重要な知見である。ちなみに、同様の現象が培養脂肪細胞 (3T3-L1) においても認められた (Fig.2, B)。GPRC6A はほぼ全身の組織に発現していることを併せて、肝臓、脂肪組織だけでなく臓器普遍的に GPRC6A シグナリングが細胞内代謝の中樞を担う、特にミトコンドリアの機能、生合成、分解を調節していることが想定されることから、エネルギー代謝を調節する上で非常に重要な生命現象を見いだすことができた。

ちなみに、最近報告された肝臓特異的 GPRC6A ノックアウトマウス由来の肝臓では MCAD mRNA レベルが対照群に比べて有意に低下していることが報告されており⁽⁴⁾、本研究で得られた細胞レベルにおける GPRC6A の重要な新規の生理的機能の知見と合致する表現型である。

ちなみに、最近報告された肝臓特異的 GPRC6A ノックアウトマウス由来の肝臓では MCAD mRNA レベルが対照群に比べて有意に低下していることが報告されており⁽⁴⁾、本研究で得られた細胞レベルにおける GPRC6A の重要な新規の生理的機能の知見と合致する表現型である。

References:

- (1) Lee et al., Cell, 130: 456–469, 2007.
- (2) Ferron et al., Arch. Biochem. Biophys., 561: 137-146, 2014.
- (3) Kouroumichakis et al., E. J. Int. Medicine, 23, 309–316, 2012.
- (4) Pi et al., Scientific Report, 10(1): 7216, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayashi Yoshikazu, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Mizokami Akiko, Hazekawa Mai, Yakura Tomiko, Naito Muneakazu, Takeuchi Hiroshi, Nakamura Seiji, Hirata Masato	4. 巻 8
2. 論文標題 Uncarboxylated Osteocalcin Induces Antitumor Immunity against Mouse Melanoma Cell Growth	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2478 ~ 2486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/jca.18648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otani Takahito, Matsuda Miho, Mizokami Akiko, Kitagawa Norio, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Inai Tetsuichiro, Hirata Masato	4. 巻 9
2. 論文標題 Osteocalcin triggers Fas/FasL-mediated necroptosis in adipocytes via activation of p300	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 1194
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-018-1257-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mizokami Akiko, Mukai Satoru, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Otani Takahito, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 244
2. 論文標題 GLP-1 signaling is required for improvement of glucose tolerance by osteocalcin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 285 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Otani Takahito, Mizokami Akiko, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Takeuchi Hiroshi, Inai Tetsuichiro, Hirata Masato	4. 巻 78
2. 論文標題 The roles of osteocalcin in lipid metabolism in adipose tissue and liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Biological Regulation	6. 最初と最後の頁 100752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2020.100752	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T. and Hirata, M.
2. 発表標題 Sex differences in the regulation of energy metabolism by osteocalcin
3. 学会等名 2017 International Conference on Obesity and Metabolic Syndrome (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 溝上 顕子、松田 美穂、竹内 弘、安河内友世、自見英治郎、平田 雅人
2. 発表標題 脂肪細胞表面受容体GPC6Aを介した脂肪蓄積機構
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田雅人
2. 発表標題 骨は内分泌器官
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizokami, A. and Hirata, M.
2. 発表標題 Glucagon-like peptide-1 receptor signaling is required for an osteocalcin-mediated improvement of glucose tolerance
3. 学会等名 American Diabetes Association (ADA) 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizokami, A., Mukai, S., Otani, T., Takeuchi, H., Jimi, E. and Hirata, M.
2. 発表標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation induces diet-induced obesity by inhibiting lipolysis
3. 学会等名 2019 International Conference on Obesity and Metabolic Syndrome (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷崇仁、松田美穂、溝上顕子、北河憲雄、自見英治郎、稲井哲一朗、平田雅人
2. 発表標題 脂肪細胞を細胞死へと導く骨基質タンパク質 Osteocalcin
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田雅人
2. 発表標題 Serendipity を求めて
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田雅人
2. 発表標題 歯学研究の多様性
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------