

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09070

研究課題名(和文) オステオカルシンノックアウトマウスを用いた骨および糖代謝制御の解明

研究課題名(英文) A study of osteocalcin-deficient mice to clarify the bone phenotypes and extraskelatal functions

研究代表者

森石 武史 (MORIISHI, Takeshi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：20380983

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オステオカルシン(Ocn)は骨芽細胞により産生され、骨形成を抑制し、インスリン分泌、テストステロン産生、筋重量を調節するホルモンだと報告されている。本研究でBglap、Bglap2領域を欠損させたOcn KOマウスを作成し解析すると、骨量、骨質、糖代謝、テストステロン産生、筋量は正常であり、骨長軸方向に対するコラーゲン線維の配向、アパタイトの結晶サイズも正常であったが、コラーゲンに対するアパタイトの配向が乱れており、骨長軸方向のヤング率が低下していた。すなわち、Ocnはアパタイトのコラーゲン線維に沿った配向と長軸方向の骨強度維持に必須であり、ホルモンの機能は無いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでKarsentyらのOcn KOマウスの解析より、Ocnは骨形成を抑制し、ホルモンとして糖代謝やテストステロン産生、筋量を調節することが報告されているが、新たなOcn KOマウスによる再現は無く、多くの臨床研究で非Gla化Ocnと糖代謝との関係について意見が分かれている。本研究成果では、Ocnのホルモン作用の再現性は得られなかったが、Ocnはアパタイトのコラーゲン線維に沿った配向に必須で、長軸方向の骨強度に関与することが新たに明らかとなった。同時期に発表されたWilliamsらのOcn KOマウスも骨形成・糖代謝は正常であり、今後、再現性やアパタイト配向の解析が進むことに期待する。

研究成果の概要(英文)：Osteocalcin (Ocn) is the most abundant noncollagenous protein in bone and is produced by osteoblasts. It has been previously claimed that Ocn inhibits bone formation and also functions as a hormone to regulate insulin secretion in the pancreas, testosterone synthesis in the testes, and muscle mass. We generated Ocn-deficient (Ocn^{-/-}) mice by deleting Bglap and Bglap2. Analysis of Ocn^{-/-} mice revealed that Ocn is not involved in the regulation of bone quantity, glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass. The orientation degree of collagen fibrils and size of biological apatite (BAP) crystallites were normal in the Ocn^{-/-} bone. However, the crystallographic orientation of the BAP, which is normally parallel to collagen fibrils, was severely disrupted, resulting in reduced bone strength. These results show that Ocn is required for bone quality and strength by adjusting the alignment of BAP crystallites parallel to collagen fibrils; but it does not function as a hormone.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オステオカルシン 骨形成 ホルモン 糖代謝 テストステロン産生 筋量

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞は基質小胞とよばれる小胞構造物を骨基質に分泌している。基質小胞内でリン酸イオン(PO_4^{3-})やカルシウムイオン(Ca^{2+})の濃度が高まることによって、リン酸カルシウムの結晶が放射状に発達した石灰化球が形成され、その周囲のコラーゲン線維が石灰化していく(Dev. Biol. 34: 211-227, 1973)。非コラーゲン性蛋白であるオステオカルシン(osteocalcin: Ocn)・オステオポンチン・骨シアロ蛋白は、石灰化球を構成するリン酸カルシウム結晶周囲にある有機性の鞘に存在すると報告されている(Differentiation. 37: 123-136, 1988)。OcnはビタミンK存在下で、3つのグルタミン酸残基(Glu)が γ -カルボキシルグルタミン酸(Gla)に変換され、このGla残基を介してリン酸カルシウム結晶と結合し骨基質石灰化に関与すると考えられている。ラットにワーファリンを投与した実験では、OcnのGla化が抑制されリン酸カルシウムの結晶が球状にまとまらず石灰化球が形成されない(J Electron. Microsc. 58: 55-65, 2009)。一方、KarsentyグループのOcn KOマウスでは、野生型マウスと比較し、大腿骨海綿骨骨量は9ヶ月齢で増加、皮質骨厚は6ヶ月齢で増加、9ヶ月齢では2倍に達し(図1)骨強度は増加し、Ocnは骨形成を抑制すると報告された(Nature. 382: 448-452, 1996)。また、KarsentyグループのOcn KOマウスは体重増加、血糖値上昇、インスリンの分泌低下と感受性低下、脂肪組織の増加を示すとともに(Cell. 130: 456-459, 2007)、精巣は極めて小さく、テストステロン産生が低下し、生殖能が低下していた(Cell. 144: 796-809, 2011)。さらに、II型糖尿病患者で血中total Ocn(Gla-OcnとGlu-Ocn)と糖代謝の相関が報告されている(J Clin Endocrinol Metab. 94: 45-49, 2009)。これら一連の研究から、骨吸収に伴い血中に放出される低カルボキシル化Ocn(ucOcn)がホルモンとして働き、糖代謝やテストステロン産生を調節していると考えられている。

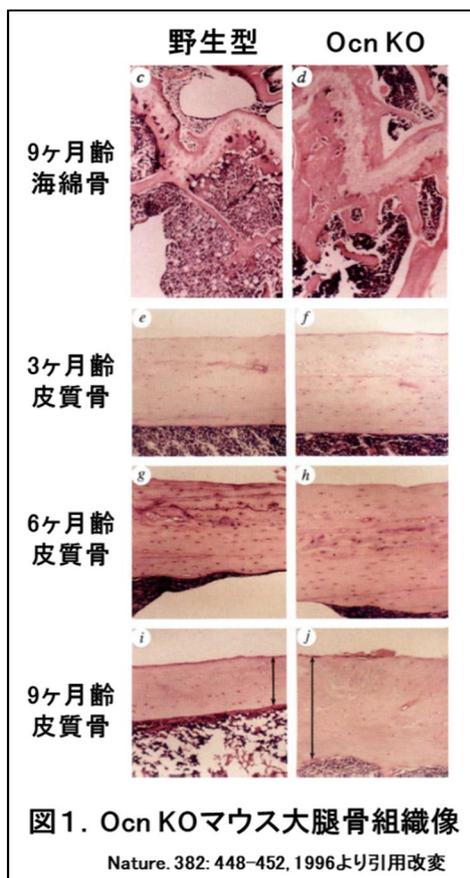


図1. Ocn KOマウス大腿骨組織像

Nature. 382: 448-452, 1996より引用改変

2. 研究の目的

1996年のOcn KOマウスの報告の後、新たなOcn KOマウスの報告は無く、その後報告されているOCの機能解析はすべて同マウスが用いられている。残念ながら、現時点でのOcnの機能に関するコンセンサスは、全てこのOcn KOマウスの報告をもとに形成されたものであり、その再現性を見るためには、新たにOcn KOマウスを作製・解析することが必要である。一方、2016年にCRISPR/Cas9のシステムを用いたOcn KOラットが報告され、海綿骨骨量は増加するが、皮質骨厚、体重、耐糖能は正常であった(Disease Models & Mechanisms. 9:1169-1179, 2016)。したがって、少なくともOcn KOラットでは再現性が得られていない。しかし、このOcn KOラットでは骨、糖代謝ともに詳細な解析が行われておらず、骨微細構造や骨力学的特性なども解析されていない。また多くの臨床研究で非Gla化Ocnと糖代謝との関係について意見が分かれている。

本研究では、新たにOcn KOマウスを作製し、骨形成、骨吸収、骨質、コラーゲン線維・アパタイト結晶(Bap)配向性、c軸結晶サイズ、骨強度等、骨について詳細な解析を行い、また、体重・血糖値・糖負荷試験・インスリン負荷試験・腹腔脂肪解析・精巣重量・血中テストステロン濃度・筋重量等の解析から、Ocnのホルモンとしての生理的機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

解析にあたって、作製したOcn KOマウスはC57BL/6Nマウスと8-10回の戻し交配を行い、対照の野生型マウスは同腹個体を使用した。

(1) 14, 24, 36 週齢の野生型マウス、Ocn KO マウスで血清 P1NP、CTX を測定、real-time RT-PCR で長管骨における骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現を検討した。大腿骨の海綿骨および皮質骨のマイクロ CT 解析・骨形態計測、3 点曲げ試験、AFM-ラマン顕微分光システム (Nanofinder HE) による骨質解析を行った。14, 36 週齢の非脱灰長管骨で微小領域 X 線回折装置 (R-axis BQ: Rigaku) による BAp-c 軸の配向性および c 軸方向の結晶サイズ解析を行い、骨幹部皮質骨の研磨標本でナノインデント (ENT-1100a: Elionix) による骨長軸方向のヤング率解析を行った。さらに、脱灰パラフィン切片で定量的複屈折測定システム (WPA-micro: Photonic lattice) によりコラーゲン線維の配向性を解析した。

(2) Ocn がインスリン分泌を制御しグルコース代謝を調節しているか検討するために、まず、11 週齢から 18 ヶ月齢までの様々な週齢で、体重、随時血糖値、HbA1c を測定し、マイクロ CT で腹部脂肪解析を行った。次に、通常食 (CE-2) や高脂肪食 (クレア: HFD-32) 下で飼育し、糖負荷試験・インスリン負荷試験を行った。

(3) Ocn KO マウスの精巣について、精巣重量、精子数、血清テストステロン濃度、テストステロン産生に関わる遺伝子発現、異常精子頻度、精上皮の TUNEL 陽性細胞頻度を解析し、筋肉については、大腿四頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋、長指伸筋の重量、大腿四頭筋の筋繊維断面積の解析を行った。

4. 研究成果

(1) Ocn KO マウスの骨量は正常であり、骨強度・骨質も野生型マウスと差を認めなかった。

14, 24, 36 週齢の野生型マウス、Ocn KO マウスを用い、マイクロ CT 解析 (図 2)、骨組織形態計測、血清マーカー測定、骨芽細胞マーカー遺伝子発現解析を行い、海綿骨骨量、皮質骨厚、骨密度、骨形成、骨吸収を調べたが、雄・雌共に両者に差を認めなかった。さらに、3 点曲げ試験で骨強度を、ラマン分光法により骨質解析を行ったが、両者に差を認めなかった。

Ocn KO マウスのコラーゲン線維の配向、BMD は正常であるが、BAp の配向性が乱れ骨長軸方向のヤング率が低下していた。

近年、材料学的観点による骨質指標として着目されている骨基質のコラーゲン線維・アパタイト結晶 (biological apatite:BAp) の配向性について、14, 36 週齢の長管骨を用い解析を行った。野生型マウスと同様に Ocn KO マウスのコラーゲン線維は骨長軸方向に配向し、BAp 結晶サイズも差を認めなかった。しかし、Ocn KO マウスの BAp はランダムに配向し、コラーゲン配向に対しての BAp 配向の追従性が野生型マウスより著明に低下し、骨長軸方向のヤング率も低下した。このヤング率低下と BAp の配向性の乱れは強い相関を示した。(図 3)

上記の、の結果より、当教室で作成した Ocn KO マウスは通常の解析では骨量・骨質・骨強度は野生型マウスと差を認めなかったが、コラーゲン線維に対する BAp の配向が乱れており、それに伴って骨長軸方向のヤング率が低下していた。

(2) Ocn KO マウスの体重、随時血糖値、HbA1c 値、内臓脂肪・皮下脂肪の体積割合において野生型マウスと差を認めなかった。

Ocn KO マウスは、雄・雌とも 11 週齢から 18 ヶ月齢まで経時的に体重、随時血糖値、HbA1c 値を解析し、14 週齢の雄、9 ヶ月齢の雌についてマイクロ CT を用い内臓脂肪・皮下脂肪の体積割合を解析したが、野生型マウスと差を認めなかった。

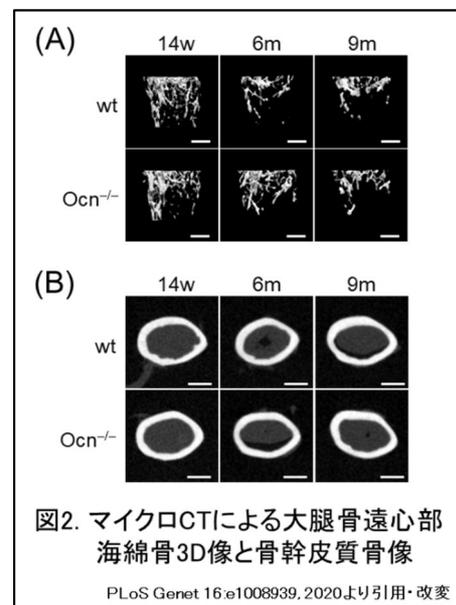


図2. マイクロCTによる大腿骨遠心部海綿骨3D像と骨幹皮質骨像

PLoS Genet 16:e1008939, 2020より引用・改変

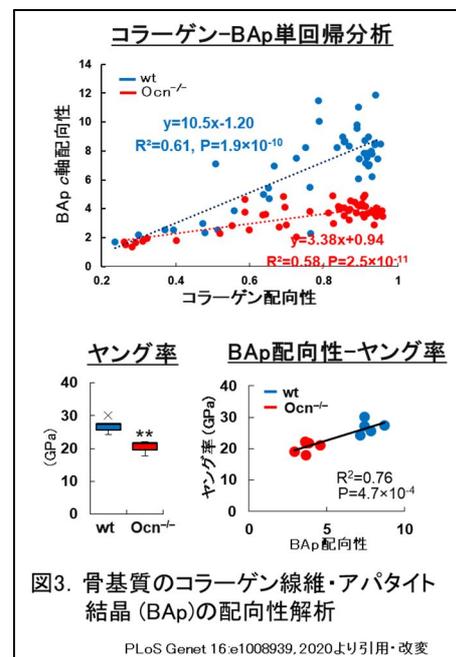


図3. 骨基質のコラーゲン線維・アパタイト結晶 (BAp) の配向性解析

PLoS Genet 16:e1008939, 2020より引用・改変

0cn K0 マウスの耐糖能・インスリン抵抗性は、野生型マウスと差を認めなかった。

通常食下において、5ヶ月齢・9ヶ月齢の0cn K0マウスおよび野生型マウスの雄で糖負荷試験を行い、4ヶ月齢の0cn K0および野生型の雄でインスリン負荷試験を行ったところ、0cn K0マウスは野生型マウスと差を認めず、高脂肪食下では0cn K0マウスは野生型マウスと同じレベルで耐糖能およびインスリン抵抗性が悪化した。上記の結果より、当教室で作成した0cn K0マウスはグルコース代謝に異常は無いことが判った。

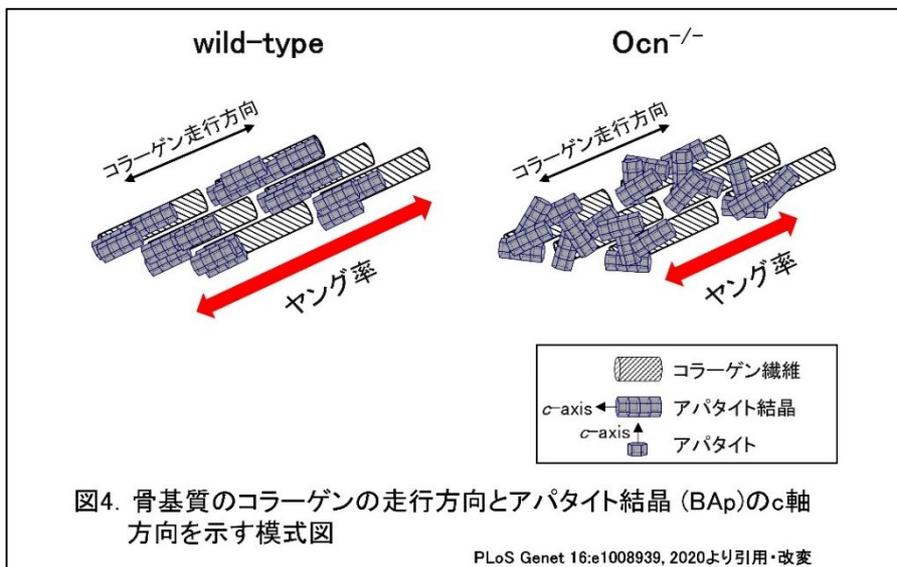
(3) 0cn K0 マウスのテストステロン産生は、野生型マウスと差を認めなかった。

11週齢・6ヶ月齢・8ヶ月齢の野生型雄マウス、0cn K0雄マウスについて、精巣重量、精子数/1mg精液、血清テストステロン濃度、テストステロン産生に関わる遺伝子発現(*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*, *Hsd3b2*)の解析を行ったが、0cn K0マウスは野生型マウスと差を認めなかった。また、精子をWright GiemsaやHoechst33342で染色し、先体が欠損した異常形態精子の頻度を算出した。また、精管精上皮におけるTUNEL陽性細胞の割合も算出した。その結果、0cn K0マウスは野生型マウスと先体欠損異常形態精子頻度も変わらず、精上皮におけるTUNEL陽性細胞の割合も変わらなかった。これらの結果から、当教室で作成した0cn K0マウスはテストステロン産生に異常は無いことが判った。

0cn K0 マウスの筋量は、野生型マウスと差を認めなかった。

4ヶ月齢・8ヶ月齢の野生型雄マウス、0cn K0雄マウスについて、体重を測定し、後肢から大腿四頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋、長指伸筋を摘出し重量を測定した。また、大腿四頭筋はHE染色像で筋繊維の断面積を算出した。その結果、0cn K0マウスは野生型マウスと大腿四頭筋、腓腹筋、ヒラメ筋、長指伸筋の重量、大腿四頭筋の筋繊維断面積も差を認めなかった。これらの結果から、当教室で作成した0cn K0マウスは筋量に異常は無いことが判った。

本研究における私達が作製した0cn K0マウスの解析から、0cnは骨形成を抑制せず、アパタイト結晶のコラーゲン線維に沿った配向に必須であり、長軸方向の骨強度を維持していることが明らかとなった。(図4)そして、これまで言われているような0cnが糖代謝・テストステロン産生・筋量を制御する作用は認めなかった。この研究成果は、PLoS Genet 16:e1008939, 2020として報告したが、私達の報告と同時に発表された、Williamsグループの0cn K0マウスでも糖代謝は正常であり(PLoS Genet 5:e1008361, 2020)、0cnは生理的なホルモンとしては機能していないと考えられる。



5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Moriishi T, Ozasa R, Ishimoto T, Nakano T, Hasegawa T, Miyazaki T, Liu W, Fukuyama R, Wang Y, Komori H, Qin X, Amizuka N, Komori T. | 4. 巻 28;16(5) |
| 2. 論文標題 Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLoS Genet. | 6. 最初と最後の頁 e1008586 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008586 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 森石 武史、小笹 良輔、中野 貴由、宮崎 敏博、小守 壽文 |
| 2. 発表標題 オステオカルシンはアパタイト結晶のコラーゲン線維に沿った配向に必須であり、長軸方向の骨強度を維持する |
| 3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 森石 武史、宮崎 敏博、大庭 伸介、小守 壽文 |
| 2. 発表標題 オステオカルシンはグルコース代謝・テストステロン産生・筋肉量を調節するホルモンとして機能しない |
| 3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会 |
| 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 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 宮崎 敏博 (MIYAZAKI Toshihiro) (10174161) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・准教授 (17301) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|