

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2012～2016

課題番号：24229009

研究課題名(和文)骨・腸・代謝関連シグナルの解明と性差の明確化

研究課題名(英文) Analysis of the functional interaction among bone, gut and energy metabolism with a special reference to gender difference

研究代表者

平田 雅人(Hirata, Masato)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：60136471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 167,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨が分泌するオステオカルシン(OC)がインスリン分泌を促して全身の代謝を活性化することが報告され、骨のホルモン作用として注目を集めている。

本研究では、OCは腸管から作用して、GLP-1(インクレチンの1種)の分泌を促してインスリン分泌に至ることを明らかにした。したがって、経口投与でも有効であった。また、OCは脂肪細胞に作用して善玉のアディポネクチンの産生・分泌を促進することも明らかにした。これらの有効作用には性差があり、雌で顕著であった。また、妊娠中のみOCを経口投与すると、仔の良好な代謝状態が保たれることを示した。これらの結果は、OCがメタボの予防・治療に応用できることを示している。

研究成果の概要(英文)：Bone has traditionally been regarded as a static structural organ that supports movement of the body and protects the internal organs. However, evidence has been accumulated in the past decade showing that bone also functions as an endocrine organ that regulates systemic glucose and energy metabolism. Osteocalcin (OC), an osteoblast-specific secreted protein, acts as a hormone by stimulating insulin production and increasing energy expenditure and insulin sensitivity in target organs. In the present study, we clarified that OC stimulated the secretion of glucagon-like peptide 1 from enteroendocrine cells, leading to insulin secretion. OC also stimulated adiponectin release from adipocytes. Thus, animal studies have shown that an oral application of OC ameliorates glucose intolerance, reducing blood glucose level. Therefore, it has been suggested that OC could be a feasible preventive or therapeutic agent for metabolic disorders.

研究分野：歯科基礎医学 生化学 薬理学

キーワード：オステオカルシン インクレチン インスリン エネルギー代謝 メタボリックシンドローム 骨

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞シグナリング研究から新規タンパク質を見だし、その構造的・機能的特徴から PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein) と名付けて機能解明をすすめてきた。当時までに Ca^{2+} シグナリングや $GABA_A$ 受容体機能に関わる役割に関する研究で成果を発表してきた。

PRIP 遺伝子欠損 (KO) マウスを作製し、ラ氏島からのインスリン分泌の亢進を観察した。下垂体からのゴナドトロピン分泌の亢進も確認した。これらの結果から、PRIP が開口分泌の抑制に関わっているのではないかと想起し、PRIP が開口分泌の抑制に関わる分子基盤の解明研究ならびに開口分泌のリン酸化制御に関する研究を行ってきた。

一方、KO マウス飼育中にメスに起因する生殖機能不全に気付いた。生殖を統御する HPG axis (視床下部・下垂体・性腺軸) でゴナドトロピンが高値の割にエストロゲンが低値であった。このアンバランスから骨粗鬆症様ではないかと想定し、骨に着目して解析したところ予想に反して骨量の増加、骨から分泌されるオステオカルシン (OC) の血中濃度の増加、骨芽細胞の分化促進、破骨細胞の活性低下などを観察した。

2. 研究の目的

上記の研究を継続する中で、骨研究とメタボリックシンドローム (メタボ) を繋ぐ報告が相次いだ; 骨芽細胞が合成・分泌するオステオカルシン (OC) がインスリン分泌を亢進する。OC には GlaOC と GluOC の2種類があり、GluOC がインスリン分泌を促す。上記の PRIP 欠損マウスは高い骨密度 (高 GluOC 血漿)、高インスリン血漿、瘠せ体型を呈することから、関連性を探るために OC 研究に着手した。

メタボの中でも糖尿病の研究・臨床で注目されている分子はインクレチン (GLP-1 や GIP) である。小腸上皮細胞が分泌する消化管ホルモンで、インスリン分泌を促すが、糖尿病患者が最も恐れる低血糖を惹起しない上に多くの内蔵臓器の保護作用を有する。これが注目を集めている所以であろう。

そこで本研究は (目標1) GluOC によるインスリン分泌におけるインクレチンの関わり; (目標2) 雌雄差の解明という2つの目標の達成とこれらにおける PRIP の役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

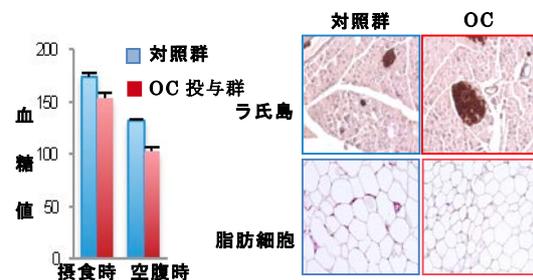
小腸内分泌細胞株や脂肪細胞株、マウス個体を用いて GluOC 添加・静脈内、腹腔内、経口投与による GLP-1 やアディポネクチンの分泌アッセイ、血糖値に加えて血中ホルモン (GLP-1 やインスリン、アディポネクチン) の定量、耐糖能試験、インスリン感受性試験、膵臓、肝臓、脂肪の組織化学的検査などを行った。

4. 研究成果

(1) GluOC 作用

遺伝子増幅および免疫染色により、マウス小腸に GluOC 受容体 GPRC6A が発現していることを確認した。マウス小腸由来 STC-1 細胞に GluOC を添加すると濃度依存的にインクレチンの1種である GLP-1 が分泌されたが、高濃度ではその効果は減弱した。また、GlaOC は無効であった。マウス個体の静脈や腹腔内に GluOC を注射すると、濃度依存的に血中 GLP-1 およびインスリン濃度が増加したが、一定量を越えると効果は減弱した。経口投与でも同様の効果が認められたが、この場合には高濃度投与による効果の減弱化は認められなかった。GlaOC の腹腔内あるいは静脈内投与は無効であったが、経口投与では GluOC 同様に血中 GLP-1 やインスリン濃度が上昇した。これは、胃内を通過することによって胃内腔の酸性環境が GlaOC を脱カルボキシル化したためと考えられる。実際に GlaOC の経口投与によって血中 GluOC が上昇するのを確認した。

野生型マウスに対して GluOC (3ng/g 体重) を週に3回、10週間あるいは週に5回、4週間にわたって経口投与したところ、メスで空腹時血糖の低下、膵臓ラ氏島の面積の増加に伴うインスリン分泌量増加、耐糖能の改善、脂肪細胞の小型化などが観察された (下図)。しかし、体重、骨の



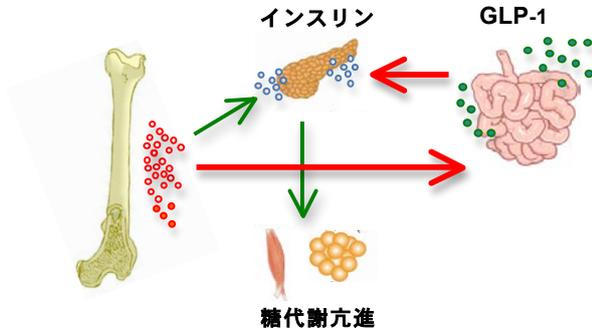
状態、インスリン抵抗性に変化はなかった。

経口投与された GluOC の消化管内での動態も明らかにした。GluOC の大部分は胃液や腸液のタンパク質分解酵素によって消化されるが、わずかな量が24時間以内で消化管内腔に残留することが分かったが、48 時間経過すると検出限界以下にまで下がった。しかし、毎日投与すると一定量が消化管内腔に維持される事を確認した。また、血中 GluOC 濃度もそれに応じて高値を維持した。

(2) GLP-1 の関与

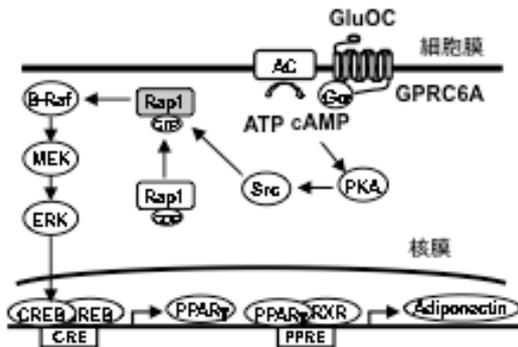
上述の様に、GluOC の経口投与によって血中 GLP-1 濃度と共にインスリン濃度の上昇が認められたが、GLP-1 受容体アンタゴニスト Exendin(9-39) の前投与によって抑えられたことから GluOC によるインスリン分泌作用の一部は GLP-1 作用を介していることが示唆された。また、GLP-1 受容体遺伝子欠損マウスに GluOC を投与したところ、代謝改善効果は認められなかった。

小腸組織切片の免疫染色により、GluOC の受容体である GPRC6A が小腸内腔の細胞に apical 側のみならず basolateral 側にも存在することを確認した。そのうちのいくつかは GLP-1 と共局在していることも明らかにした。つまり、GluOC は全身の血流及び消化管内腔側の両方から作用し、GLP-1 の分泌を促し得ることが示唆された(下図)。



(3) GluOC の脂肪細胞に対する作用

前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を脂肪細胞に分化させ、GluOC を添加すると PPAR γ の発現が亢進し、アディポネクチンの分泌が促進されることを明らかにした。GPRC6A をノックダウンした細胞、MEK 及び PKA の阻害剤などを用いた実験で GluOC は GPRC6A を介して PKA、MEK を活性化し、アディポネクチンの発現に至るシグナリング経路を明らかにした(下図)。

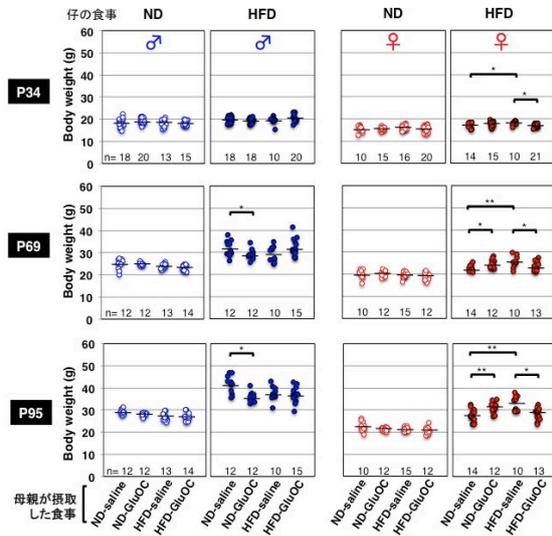


(4) GluOC の世代を超えた作用

妊娠母体に GluOC を投与すると、投与期間が妊娠期間中のみであるに関わらず、GluOC により生まれた子供が成獣になった時まで代謝状態を正常化させる作用があることを明確にした。

妊娠中に高脂肪食 (HFD) を摂取した母親の産仔は、通常食 (ND) を摂取していた母親から生まれた産仔より体重が有意に重く、また、膵発生や β 細胞増殖に寄与する Pdx-1 の膵臓での発現が増強していた。これらの傾向は、仔が成獣となった後も引き続き観察されたが、妊娠母体過栄養による仔に対する影響は、妊娠母体が GluOC を摂取することで回避された。離乳後にこれらの仔の食餌状態 (HFD/ND) を区別して追跡した際、ND 飼育群の仔マウスでは雌雄いづれにおいても著明な差異は認めなかったが、

HFD 飼育群ではいくつかの差異が認められた。例えば HFD で飼育された母体から生まれた雌性マウスでは代謝状態の悪化を示す指標が高かったが、母体が GluOC を投与されていた雌性マウスではこのような影響は認められなかった(下図)。



一方、雄性マウスでは逆に、ND で飼育された母体から生まれた方に代謝状態の悪化を示す指標が高かった。この場合も母体が GluOC を投与されていた場合は正常であった。GLP-1 受容体欠損マウスではこのような結果は認められなかったことから、この効果も GLP-1 を介したものであると考えられる(上図)。

(5) GluOC 作用の性差

GluOC の長期間にわたる経口投与による糖・脂質代謝改善効果が雌に限定したものであることを明確にした。

雄性マウスに GluOC を長期間投与すると、耐糖能およびインスリン抵抗性がやや悪化した。また、脂肪細胞の肥大化と血中アディポネクチン濃度の低下が認められた。これらの所見は、高脂肪食で飼育したメタボマウスにおいてより顕著であった。GluOC によって血中テストステロン濃度が上昇したことから、精巣摘出術を施すと、雌性マウス同様に GluOC による糖代謝の改善が認められた。さらに、雌性マウスに浸透圧ポンプを用いてテストステロン持続投与しつつ同様の実験を行うと、GluOC によって耐糖能が悪化した。テストステロンは脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を抑えることが報告されている。実際、GluOC 投与群およびテストステロン持続投与群ではコントロールと比べて血中アディポネクチン濃度が減少していた。以上のことから、GluOC のエネルギー代謝改善効果には雌雄差があり、それは GluOC による血中テストステロン濃度上昇とそれに伴うアディポネクチン低下による可能性が高いことが示唆された。GluOC の効果に性差があるという事実は、人への適用を考えた際に重要であり、その原因の一端を明らかにした。

(6) 廃棄豚骨ガラからの GluOC の抽出と作用

我々の居住する福岡地区は豚骨ラーメンをはじめ、豚骨の食文化が根付いており、年間 4,000 トンもの豚骨ガラが廃棄されているという。我々の報文を受けて公益財団法人福岡県リサイクル総合研究事業化センターの仲介で回収を担っている株式会社クリーン・エコバランス (CEB) 社の知己を得た。CEB 社では廃棄豚骨ガラを何とか原料化して利用する事は出来ないかと考えていた。そこで、急遽本研究の中で、食品素材として商工業的に使用された後の廃棄豚骨から OC の抽出とその生理活性の解析を行い、廃棄豚骨を OC の原料化することを目指した。豚骨ガラに含まれる OC の大部分は代謝活性化作用を持たない GlaOC であるが、経口投与により胃の酸性環境を通過することによって一部が GluOC に変わることを既に確認した。



現時点では、廃棄豚骨ガラから OC の抽出、抽出物のマウスへの経口投与、投与マウスのメタボ解析を行い、組換え GluOC と同様の効果を得ている。

(7) 当初は予期しなかった GluOC の作用

① GluOC による抗がん作用に関する研究

平成25年5月から本予算で雇用した学術研究員は大学院時代から留学時代にかけてが生物学を専門としてきた。そこで、GluOC の多彩な作用をがん生物学の観点から探り始めた。

GluOC には抗がん作用のある事が分かってきた。ヒト前立腺がん細胞株を用いて細胞増殖試験を行うと GluOC には抑制的作用が、GlaOC には促進的な作用があることが分かってきた。正常前立腺上皮細胞では両 OC ともに増殖亢進が認められた。GluOC により BrdU 取り込みの抑制、活性型 capapase3/7 の増加を観察した。また、GluOC によって受容体型チロシン酸化レベルが低下することが分かった。マウス個体を用いた実験のために、異種であるので免疫不全 nude mouse を用いてヒト前立腺がん細胞株の移入実験を行ったが、著明な GluOC 効果は認められなかった。そこで、同種のマウス melanoma 細胞株を用いて同様の実験を行ったところ、試験管内実験で同じ結果が得られた。次いで、野生型マウスに melanoma 移植実験を行ない、がん塊の肥大化を観察したが、浸透圧ポンプによって GluOC を継続的に投与すると肥大化の抑制が認められた。この結果は GluOC による直接的ながん細胞の増殖抑制に加えて細胞性免疫の賦活作用が GluOC にはあることが示唆された。

② マウスに GluOC を腹腔内投与すると、その直後の血中 NO (nitric oxide) 濃度が上昇した。また、動脈硬化誘発モデルマウスに GluOC を週 5 回、4週間にわたって腹腔内投与すると大動脈内膜の肥厚、血中総コレステロール値および LDL 値が抑制された。正常大動脈血管内皮細胞株に GluOC を添加すると eNOS (endothelial nitric oxide synthase) の発現上昇と培養上清中 NO の上昇が認められたことから、その効果は血管内皮細胞における NO 産生を介することが示唆された。

(8) PRIP の関与

PRIP 欠損マウスは高 OC 血漿、高インスリン血漿ならびに痩せ体型を示し、一義的な原因が骨量の増加、すなわち高 OC にあるのではないかと想起したが、個々の形質は相互に関連しないことが分かった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (全て査読あり・合計 35 件、うち代表的なものを記載)

(1) Mizokami, A., Wang, DG, Tanaka, M., Gao, J., Takeuchi, H., Matsui, T. and Hirata, M.: An extract from pork bones containing osteocalcin improves glucose metabolism in mice by oral administration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80: 2176-2183, 2016. (DOI:10.1080/09168451.2016.1214530)

(2) Hayashi, Y., Kawakubo-Yasukochi, T., Mizokami, A., Takeuchi, H., Nakamura, S. and Hirata, M.: Differential roles of carboxylated and uncarboxylated osteocalcin in prostate cancer growth. *J. Cancer* 7: 1605-1609, 2016. (DOI:10.7150/jca.15523)

(3) Yasutake, Y., Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T., Chishaki, S., Takahashi, I., Takeuchi, H. and Hirata, M.: Long-term oral administration of osteocalcin induces insulin resistance in male mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol Metab* 310: E662-675, 2016. (DOI:10.1152/ajpendo.00334.2015)

(4) Kawakubo-Yasukochi, T., Kondo, A., Mizokami, A., Hayashi, Y., Chishaki, S., Nakamura, S., Takeuchi, H. and Hirata, M.: Maternal oral administration of osteocalcin protects offspring from metabolic impairment in adulthood. *Obesity* 24: 895-907, 2016. (DOI: 10.1002/oby.21447)

(5) Oue, K., Zhang, J., Harada-Hada, K., Asano, S., Yamawaki, Y., Hayashiuchi, M., Takata, T., Irifune, M., Hirata, M. and Kanematsu, T.: Phospholipase C-related catalytically inactive protein is a new modulator of thermogenesis promoted by β -adrenergic receptor in brown adipocytes. *J.*

Biol. Chem. 291: 4185-4196, 2016. (DOI: 10.1074/jbc.M115.705723)

(6) Tsuka, S., Aonuma, F., Higashi, S., Ohsumi, T., Nagano, K., Mizokami, A., Yasukochi-Kawakubo, T., Masaki, C., Hosokawa, R., Hirata, M. and Takeuchi, H.: Promotion of insulin-induced glucose uptake in C2C12 myotubes by osteocalcin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 459: 437-442, 2015. (DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.123)

(7) Otani, T., Mizokami, A., Hayashi, Y., Gao, J., Mori, Y., Nakamura, S., Takeuchi, H. and Hirata, M.: Signalling pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin. *Cell. Signal.* 27: 532-544, 2015. (DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.12.018)

(8) Mizokami, A., Yasutake, Y., Higashi, S., Kawakubo-Yasukochi, T., Chishaki, S., Takahashi, I., Takeuchi, H. and Hirata, M.: Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone*, 69: 68-79, 2014. (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2014.09.006>)

(9) Okumura T., Harada K., Oue K., Zhang J., Asano S., Hayashiuchi M., Mizokami A., Tanaka H., Irifune M., Kamata N., Hirata M. and Kanematsu T.: Phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) regulates adipose tissue lipolysis by modulating the phosphorylation of hormone-sensitive lipase. *PLoS ONE*, 9(6): e100559, 2014. (DOI: 10.1371/journal.pone.0100559)

(10) Mizokami, A., Yasutake, Y., Gao, J., Matsuda, M., Takahashi, I., Takeuchi, H. and Hirata, M.: Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. *PLoS ONE* 8(2): e57375, 2013. (DOI: 10.1371/journal.pone.0057375)

(11) Zhang, Z., Takeuchi, H., Gao, J., Wang, D.G., James, D.J., Martin, T.F.J. and Hirata, M.: PRIP (phospholipase C-related but catalytically inactive protein) inhibits exocytosis by direct interactions with syntaxin 1 and SNAP-25 through its C2 domain. *J. Biol. Chem.* 288: 7769-7780, 2013. (DOI: 10.1074/jbc.M112.419317)

(12) Gao, J., Takeuchi, H., Zhang, Z., Fukuda, M. and Hirata, M.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein (PRIP) modulates synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) phosphorylation and exocytosis. *J. Biol. Chem.* 287: 10565-10578, 2012.

(13) Sugiyama, G., Takeuchi, H., Nagano, K., Gao, J., Ohyama, Y., Mori, Y. and Hirata, M.: Regulated interaction of protein phosphatase 1 and protein phosphatase 2A with

phospholipase C-related, but catalytically inactive protein. *Biochemistry* 51: 3394-3403, 2012.

[学会発表] (合計125件、うち招待講演・シンポジウム講演のみ記載)

(1) Mizokami, A. and Hirata, M.: An extract from pork bones containing osteocalcin improves glucose metabolism in mice by oral administration. The Food Factor I Barcelona Conference, November 1-4, 2016, Barcelona, Spain

(2) 安河内(川久保)友世、近藤皓彦、溝上顕子、竹内弘、平田雅人: オステオカルシンを用いた次世代生活習慣病改善へのアプローチ 第37回日本肥満学会 シンポジウム 平成28年10月7-8日 東京都

(3) Hirata, M., Mizokami, A. and Kawakubo-Yasukochi, T.: Oral Administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. 2016 International Conference on Obesity and Metabolic Syndrome, September 1-4, 2016, Seoul, Korea

(4) 平田雅人: 歯科基礎医学分野からパラダイムシフトをおこすような人材を育成するために第57回歯科基礎医学会学術大会 平成27年9月11-13日 新潟市

(5) Hirata, M., Sugiyama, G., Gao, J. and Takeuchi, H.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP as a scaffolding protein for phospho-regulation. The 39th European Symposium on Hormones and Cell Regulation, Mont Sainte-Odile, 9-12 October, 2014, Alsace, France

(6) 平田雅人、溝上顕子、川久保-安河内友世、竹内弘: 超高齢化社会における歯科基礎医学の役割: 骨-腸-代謝関連シグナルの解明による全身の健康維持への情報発信 日本学術会議シンポジウム 第56回歯科基礎医学会学術大会 平成26年9月25-27日 福岡市

(7) Hirata, M., Mizokami, A., Kawakubo-Yasukochi, T., Otani, T. and Yasutake, Y.: BGM flow. The 55th International Symposium on Biological Regulation and Enzyme Activity in Normal and Neoplastic Tissues, September 14-16, 2014, Bologna, Italy

(8) Hirata, M., Sugiyama, G., Gao, J. and Takeuchi, H.: Phospholipase C-related but catalytically inactive protein, PRIP as a scaffolding protein for phospho-regulation. International Symposium on PI-PLC Activity and Signaling, July 18-19, 2013, UNIST, Ulsan, Korea

(9) 平田雅人: イノシトール1,4,5-三リン酸結合性タンパク質として発見した分子の機能解明 第54回脂質生化学会 シンポジウム 平成24年6月7-8日 福岡市

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称:非または低カルボキシル化オステオルシンの製造方法およびその利用

発明者:平田雅人・溝上顕子・安河内友世

権利者:国立大学法人九州大学

種類:特許

番号:特許願 2015-161238

出願年月日:(平成 27 年 8 月 18 日)

国内外の別: 国内

名称:メタボリックシンドロームの予防または改善のための食用組成物

発明者:平田雅人・溝上顕子・安河内友世・山下泰寿

権利者:国立大学法人九州大学・株式会社クワンエコバランス

種類:特許

番号:特許願 2015-161239

出願年月日:(平成 27 年 8 月 18 日)

国内外の別: 国内

名称:メタボリックシンドロームの予防または改善のための食用組成物

発明者:平田雅人・溝上顕子・安河内友世・山下泰寿

権利者:国立大学法人九州大学・株式会社クワンエコバランス

種類:特許

番号:PCT/JP2016/074077

出願年月日:(平成 28 年 8 月 18 日)

国内外の別: 国際

○取得状況（計0件）

〔その他〕

<報道関連情報>

- 1 Nature Japan 2013 年 4 月 25 日「研究者訪問」に掲載
- 2 Livedoor NEWS、マイナビニュース、WEB ジャーナル OPTRONICS、QLifePro 医療ニュース、財経新聞、日本歯科新聞に掲載
- 3 JST サイエンスポータルに掲載(2014 年 10 月 10 日)
- 4 科学新聞に掲載(2014 年 10 月 31 日)
- 5 USJI (U.S.-Japan Research Institute) Reports に掲載
- 6 NHK テレビ「熱烈発信!福岡NOW」「ニュース845」「情報まるごと」2014 年 10 月 17 日福岡市ほか那覇市、山形市、東京都などで放映
- 7 NHK テレビ「ガッテン」2017 年 2 月 15 日放映

<ホームページ>

研究分野のホームページ:

<http://www.mcb.dent.kyushu-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 雅人 (HIRATA, Masato)

九州大学・大学院歯学研究院・教授

研究者番号:60136471

(2) 研究分担者

溝上 顕子 (MIZOKAMI, Akiko)

九州大学・大学院歯学研究院・講師

研究者番号:70722487

(平成26年度より)

竹内 弘 (TAKEUCHI, Hiroshi)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号:70304813

松田 美穂 (MATSUDA, Miho)

九州大学・大学院歯学研究院・講師

研究者番号:40291520