

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870449

研究課題名(和文)骨・脂肪・筋肉の相互関連性におけるオステオカルシンの役割を解明する

研究課題名(英文)The roles of osteocalcin in the relationships among bone, adipose tissue, and muscle.

研究代表者

金沢 一平 (Kanazawa, Ippei)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50452553

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)：脂肪細胞においてもオステオカルシン(OC)とその受容体であるGPRC6Aの発現を認めた。OCは脂肪細胞分化とともに低下するのに対して、GPRC6Aは上昇を認めた。一方、cOC、ucOCは共にはC/EBPとPPARの発現を有意に抑制したが、アディポネクチン発現や脂肪細胞サイズなどには影響を認めなかった。一方、cOC、ucOCは脂肪細胞増殖能を有意に抑制することから、脂肪蓄積を抑制する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expressions of osteocalcin and its receptor, GPRC6A, were found in preadipocytic 3T3-L1 cells. Osteocalcin expression was decreased during the differentiation of 3T3-L1 cells, while GPRC6A expression was increased. Although osteocalcin decreased the expression of C/EBP and PPAR, carboxylated and uncarboxylated osteocalcin did not affect the size of adipocytes by Oil red O staining. On the other hand, both osteocalcin inhibited the proliferation of 3T3-L1 cells, suggesting that osteocalcin may suppress the accumulation of fat mass.

研究分野：内分泌代謝

キーワード：オステオカルシン 脂肪細胞

1. 研究開始当初の背景

わが国では、内臓脂肪蓄積を主体とするメタボリック症候群(メタボ)患者は約 6,200 万人いると推定されている。一方、ロコモティブ症候群(運動器不安定症、ロコモ)患者も推定 4,700 万人存在するといわれている。種々の代謝異常を合併するメタボと運動器障害によるロコモを合併する患者も少なからず存在するが、現時点では別々の疾患群として認識されている。

近年、内臓脂肪から分泌されるアディポサイトカインや消化管ホルモンであるインクレチンを代表とし、臓器間ホルモンネットワーク機構が存在することが明らかとなってきた。骨芽細胞から分泌されるオステオカルシン(OC)、特に低カルボキシル化オステオカルシン(ucOC)にも膵細胞におけるインスリン分泌促進作用があることが明らかとなり¹⁾、OC のホルモン作用に注目が集まっている。OC は膵細胞にある G protein-coupled receptor family C group 6 member A (GPRC6A) を介してインスリン分泌を促進し、さらにインスリンは骨芽細胞に作用して OC、ucOC 産生を増強する^{2,3)}。我々は 2 型糖尿病患者を用いた臨床研究において、OC と糖代謝・内臓脂肪量に関連性があることを報告している⁴⁾。

OC の受容体とされる GPRC6A の欠損マウスでは骨粗鬆症や耐糖能異常が出現する⁵⁾。GPRC6A は膵臓以外にも脂肪、筋肉、脳、腎臓、唾液腺など幅広い組織に発現が認められている。したがって、OC のホルモン作用は多臓器にわたる可能性が考えられる。以上のことから、我々は OC がメタボとロコモを関連づける液性因子としての役割を担っている可能性を考えた。

2. 研究の目的

オステオカルシンの脂肪細胞に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

マウス脂肪細胞前駆細胞である 3T3-L1 細胞を用いた。細胞は 5% CO₂、37 °C の条件下で 10%FBS と 1% penicillin-streptomycin を含んだ DMEM にて培養した。メディアムは週 2 回交換し、分化誘導を行う際には 1 µg/mL insulin、0.25 µM dexamethasone、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine を添加して培養を行った。

mRNA 発現を検討するために、reverse transcription PCR (RT-PCR) を行った。また、real-time PCR により RNA 発現の定量を行った。PCR primer はこれまでに報告されているものを作成し、使用した。

細胞の増殖能を検討するために、Brd U アッセイと WST-8 アッセイを行った。

脂肪細胞の分化を検討するために Oil red O 染色を行った。

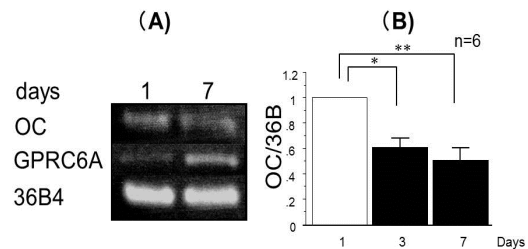
各群間の比較を one-way ANOVA、Fisher の

PLSD 法にて統計解析を行った。

4. 研究成果

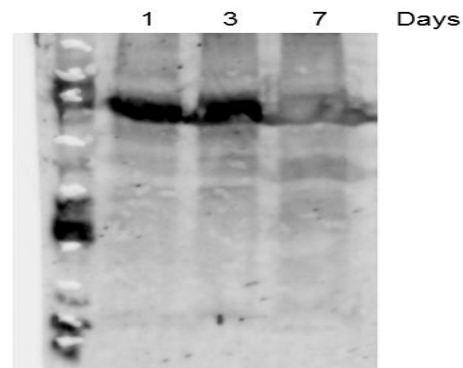
1) 脂肪細胞前駆細胞 3T3-L1 における OC と GPRC6A 発現

3T3-L1 細胞を培養し、コンフルエントになってから 1 日目、7 日目に RNA を採取し、OC と GPRC6A の mRNA 発現を RT-PCR にて検討した。また、コンフルエント後 1 日目、3 日目、7 日目に RNA を採取し、real-time PCR にて発現量の変化を検討した。



OC は分化初期から発現を認め、徐々に低下した。一方、GPRC6A は分化に伴い増加した。

OC 蛋白の発現を検討するために、3T3-L1 細胞を培養し、コンフルエントになってから 1 日目、7 日目に RNA を採取し、ウェスタン

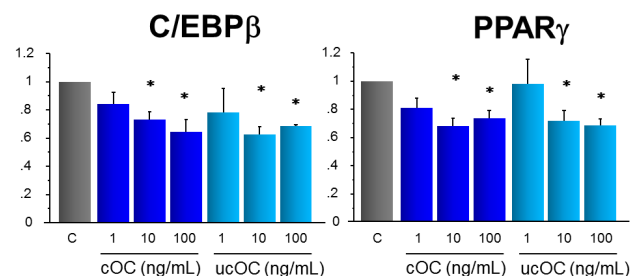


プロット法を行った。

PCR の結果と同様に、OC の発現は培養初期から発現を認めるが、徐々に発現が低下した。

2) OC の脂肪細胞分化制御因子である C/EBP と PPAR 発現に及ぼす影響

3T3-L1 細胞がコンフルエントになった後、カルボキシル化 OC(cOC)を最終濃度 1, 10, 100 ng/mL、非カルボキシル化 OC(ucOC)を 1, 10, 100 ng/mL になるように添加して培養 7 日目に RNA を採取し、real-time PCR にて検討した。

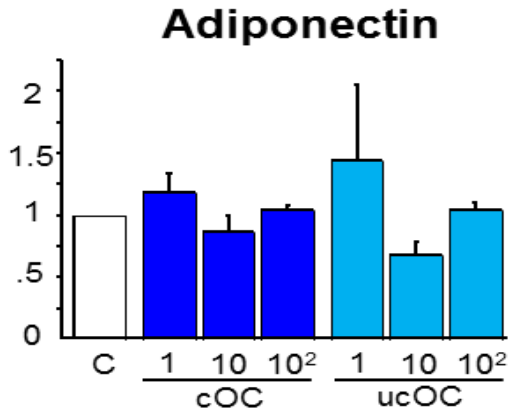


cOC と ucOC は共に濃度依存的に C/EBP と PPAR の発現を有意に抑制した。

3) OC のアディポネクチン発現に与える影響

3T3-L1 細胞がコンフルエントになった後、cOC あるいは ucOC を添加して、3 日後に RNA を採取し、アディポネクチンの発現を real-time PCR にて検討した。

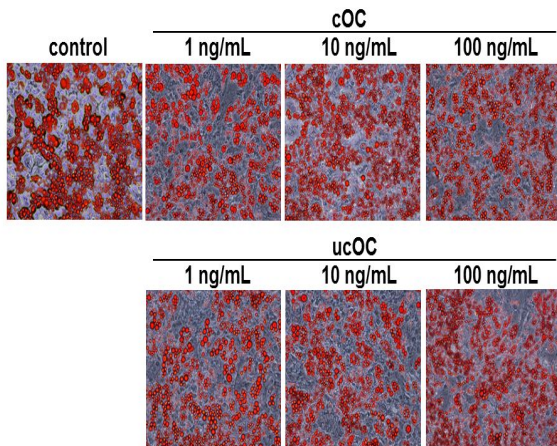
cOC、ucOC は共にアディポネクチンの発現に



有意な変化は与えなかった。

4) OC の脂肪細胞分化に与える影響

3T3-L1 細胞がコンフルエントになった後、



(x20)

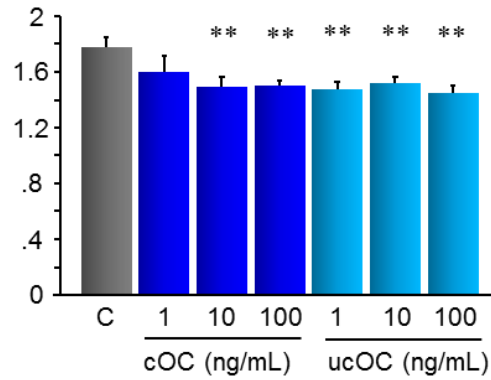
cOC あるいは ucOC を添加して、10 日後に Oil red O 染色を行い、脂肪細胞分化を検討した。

cOC、ucOC は共に Oil red O 染色で評価した脂肪細胞分化あるいは脂肪滴サイズに明らかな変化は与えなかった。

5) OC の脂肪細胞増殖能に与える影響

3T3-L1 細胞の培養を開始した翌日から cOC あるいは ucOC を添加し、BrdU アッセイにより細胞増殖能を検討した。

cOC、ucOC は共に脂肪細胞増殖能を有意に抑制した。また、この結果は WST-8 アッセイにおいても同様の結果を認めた。



< 結語 >

脂肪細胞においても OC と OC 受容体である GPRC6A の発現を認めた。OC は脂肪細胞分化とともに低下するのに対して、GPRC6A は上昇を認めた。このことから、脂肪分化が進んだ細胞において OC はより影響を与える可能性が示唆される。一方、OC は C/EBP と PPAR

の発現を有意に抑制したが、アディポネクチン発現や脂肪細胞サイズなどには影響を認めなかった。本検討では細胞がコンフルエントになった後から cOC、ucOC を添加していることから、OC の作用が限定的となった可能性が考えられる。一方、cOC、ucOC は脂肪細胞増殖能を有意に抑制することから、脂肪蓄積を抑制する可能性が考えられた。このことは、我々のオステオカルシンと脂肪量に有意な負の相関を認めた報告と一致する結果と考えられた。

< 引用文献 >

- 1) Lee NK, et al. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. Cell 130: 456-69, 2007.
- 2) Ferron M, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. Cell 142: 296-308, 2010.
- 3) Pi M, et al. GPRC6A mediates responses to osteocalcin in α -cells in vitro and pancreas in vivo. J Bone Miner Res 26: 1680-3, 2011.
- 4) Kanazawa I, et al. Serum undercarboxylated osteocalcin was inversely associated with plasma glucose level and fat mass in type 2 diabetes mellitus. Osteoporos Int 22: 187-94, 2011.
- 5) Pi M, et al. Multiligand specificity and wide tissue expression of GPRC6A reveals new endocrine networks. Endocrinology 153: 2062-9, 2012.

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〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

金沢 一平 (KANAZAWA Ippei)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：50452553