

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20421

研究課題名(和文) オステオカルシンによる膵細胞のグルカゴンからGLP-1への変換機構の解明

研究課題名(英文) Glucagon-GLP-1 conversion by osteocalcin in pancreatic alpha cells

研究代表者

溝上 顕子 (Mizokami, Akiko)

九州大学・歯学研究院・准教授

研究者番号：70722487

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：単離ラ氏島をオステオカルシン(OC)で刺激すると、GLP-1へのプロセシング酵素PC1/3の発現量が増加し、OCを長期間投与したマウスの膵臓組織切片ではGLP-1陽性細胞の増加がみられた。一方、GLP-1受容体欠損マウス(GLP-1R KO)ではこの現象が見られなかった。以上のことから、OCによってグルカゴン→GLP-1変換現象がおこるが、それにはGLP-1受容体が必須であることが示唆された。また、GLP-1R KOにOCを長期間投与しても野生型で見られた代謝改善は見られず、むしろ耐糖能が悪化したことから、OCの代謝改善効果にはGLP-1受容体が必須であることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Stimulation of isolated pancreatic islet with osteocalcin (OC) increased the expression of PC1/3, a processing enzyme that liberates GLP-1 from proglucagon. Moreover, GLP-1 positive cells were significantly increased in the pancreatic sections from mice treated with OC for 4 weeks. However, these phenotypes were not observed when GLP-1 receptor knockout mice (GLP-1R KO) were used. These results indicate that OC promotes GLP-1 production from alpha cells, and GLP-1 receptor signaling is required in the process. While long-term oral administration of OC improved glucose tolerance in female wild-type mice, it rather triggered glucose intolerance and adipocyte hypertrophy in GLP-1R KO mice. Thus, it is suggested that GLP-1 receptor signaling is required for an improvement of glucose tolerance by OC.

研究分野：生化学

キーワード：オステオカルシン GLP-1 GLP-1受容体欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病はインスリンの作用不足に基づく慢性の高血糖を主徴とする代謝疾患群である (日本糖尿病学会 2010 年「糖尿病の分類と診断基準に関する委員会報告」から)。近年上市された SGLT-2 阻害薬は腎尿細管におけるグルコースの再吸収を抑制して血糖値を下げることを目指した新規の糖尿病治療薬であるが、グルカゴンの分泌過剰という副作用 (むしろ高血糖になる) が顕在化し始め、懸念されていた。

2. 研究の目的

我々は、骨由来ホルモンであるオステオカルシン (GluOC) を長期経口投与すると、本来グルカゴンを産生・放出する膵α細胞が GLP-1 (glucagon-like protein-1、インクレチンの1種) を産生するようになることを示唆する結果を得た。本研究では、glucagon → GLP-1 変換現象を明確化し、その基盤メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 単離ラ氏島に対して培養液中に添加した GluOC によってグルカゴン → GLP-1 変換現象が起こるか、グルカゴン関連遺伝子およびプロセシング酵素の発現・局在を調べた。
- (2) マウス個体に長期間にわたって GluOC を投与し、マウス個体の膵臓においても GluOC によってグルカゴン → GLP-1 変換現象が起こるか、グルカゴン関連遺伝子およびプロセシング酵素の発現・局在を調べた。

4. 研究成果

<グルカゴン → GLP-1 変換現象の明確化>

OC を継続して投与したマウスでは非投与マウスに比べて、膵ランゲルハンス島面積の増大と抗 GLP-1 抗体陽性細胞数の増加と血中 GLP-1 濃度の上昇を認めた。また、マウスより単離したランゲルハンス島ならびにα細胞様細胞株 aTC1-6 細胞を OC 刺激したところ、プログルカゴンから GLP-1 へのプロセシング酵素である PC1/3 の遺伝子発現量が増加することを明らかにした。一方、GLP-1 受容体欠損マウス (GLP-1R KO) 由来のラ氏島を OC 刺激してもグルカゴン → GLP-1 変換現象は、起こらなかった。以上のことから、グルカゴン → GLP-1 変換現象には GLP-1 受容体を介したシグナルが必要であることが示唆された。

<GLP-1R KO マウスの解析>

野生型マウスに長期間にわたって GluOC を経口投与し続けると糖・脂質代謝が改善することを既に報告している (Mizokami et al., Bone 2014)。しかしながら GLP-1 KO に OC を長期間投与しても野生型で見られた OC に

よる代謝改善は認められず、むしろ耐糖能は悪化した。

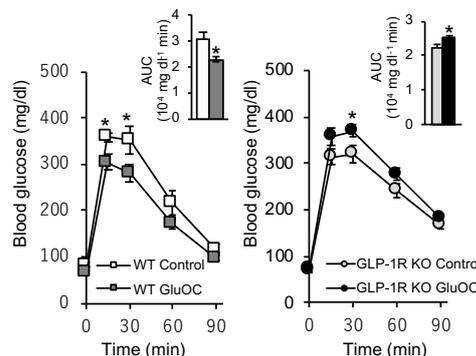


図1 野生型(左)および GLP-1 受容体欠損マウス(右)を用いて糖負荷試験を行った。それぞれ右上のグラフは血糖曲線下面積を示す。

・膵臓における作用

OC によって膵β細胞からのインスリン分泌が促進する。GLP-1 受容体欠損マウス (GLP-1R KO) では OC は無効であること、GLP-1R KO のラ氏島ではグルカゴン→GLP-1 変換現象が見られないことから、それは変換現象によって増加した GLP-1 の作用によるものではないかと考えた。そこで、野生型と GLP-1R KO 両遺伝子型の単離ラ氏島を OC 刺激し、培養上清中に分泌される GLP-1 およびインスリンを測定したところ、両者で有意な違いは認められなかった。以上のことから、OC によるグルカゴン→GLP-1 変換現象はわずかに見られるものの、全身のグルカゴン濃度に影響を与えるほどではないことが明らかになった。

・脂肪における作用

GluOC を長期間投与した野生型マウスでは脂肪細胞の縮小が見られたが、GLP-1R KO では GluOC 投与によって脂肪細胞の肥大と脂肪組織における炎症の亢進が見られた。野生型で見られた血中中性脂肪の減少は見られなかった。一方、野生型では GluOC によって血中遊離脂肪酸が増加しており、脂肪の分解亢進が示唆されたが、GLP-1R KO では逆に遊離脂肪酸が減少していた。

・肝臓における作用

GluOC を長期間投与した GLP-1R KO マウスの脂肪には、高脂肪高シヨ糖食で飼育した際により多くの脂肪蓄積が見られた (図2)。また、肝臓における糖新生関連酵素の発現上昇が見られたため、ピルビン酸負荷試験を行って糖新生を評価した。その結果、野生型マウスに GluOC を投与した群はの糖新生はコントロール群と差がなかったが、GLP-1R KO では GluOC 投与群でピルビン酸負荷による

血糖値の上昇が有意に高く、糖新生が亢進していることが明らかになった。

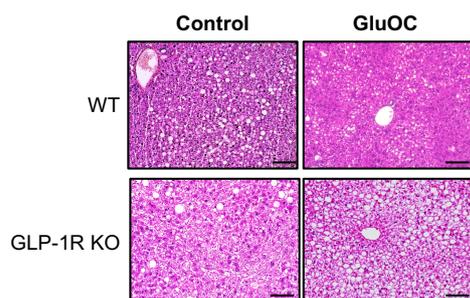


図2
高脂肪高シヨ糖食で飼育した野生型および GLP-1 受容体欠損マウスに4週間にわたって毎日 GluOC を経口投与し、肝臓の HE 染色を行った。
Scale bar, 50µm

以上のことから、GLP-1R KO における耐糖能悪化はグルコース刺激インスリン分泌の低下によるものではなく、肝臓における糖新生亢進によるものであることが明らかになった。GluOC による代謝改善効果には GLP-1 シグナルが正常に機能していることが必須であることが示唆される。

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 10 件)

1. Mizokami A., Kawakubo-Yasukochi T., Hirata M. (2017): Osteocalcin and its endocrine functions. *Biochem Pharmacol.* 132: 1-8. doi: 10.1016/j.bcp.2017.02.001 (査読あり)
2. Hayashi Y, Kawakubo-Yasukochi T, Mizokami A., Hazekawa M, Yakura T, Naito M, Takeuchi H, Nakamura S, Hirata M. (2017) Uncarboxylated osteocalcin induces antitumor immunity against mouse melanoma cell growth. *J Cancer* 8(13): 2478-2486 (doi:10.7150/jca.18648) (査読あり)
3. Oue K., Yamawaki Y., Asano S., Mizokami A., Hirata M., Irifune M., Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein-knockout mice display increased induction of uncoupling protein 1 in adipose tissues following chronic cold exposure. (2017) *Journal of Oral Biosciences* 59:108-112 (doi:10.1016/j.job.2017.04.001) (査読あり)
4. 安河内 (川久保) 友世、溝上顕子、平田雅人 「次世代肥満を制御する妊娠期オス

テオカルシンの有用性」*BIO Clinica* 6(4) 139-142, 2017 (査読なし)

5. 安河内 (川久保) 友世、溝上顕子、平田雅人：骨基質蛋白質による次世代生活習慣病の予防を目指してメディカル・サイエンス・ダイジェスト 43(6), 5-7, 2017 (査読なし)
6. 溝上顕子、川久保 (安河内) 友世、平田雅人 (2017) :オステオカルシンとエネルギー代謝. *骨粗鬆症治療* 16 : 33-38 (査読なし)
7. Kondo A., Kawakubo-Yasukochi T., Mizokami A., Chishaki S., Takeuchi H., Hirata M. Uncarboxylated osteocalcin increases serum nitric oxide levels and ameliorates hypercholesterolemia in mice fed an atherogenic diet. *Electronic J Biol*, 13:22-28, 2016 (査読あり)
8. Hayashi Y., Kawakubo-Yasukochi T., Mizokami A., Takeuchi H., Nakamura S., Hirata M. (2016) Differential Roles of Carboxylated and Uncarboxylated Osteocalcin in Prostate Cancer Growth. *J Cancer*. 2016 Jul 18;7(12):1605-1609. doi:10.7150/jca.15523. (査読あり)
9. Mizokami A., Wang DG., Tanaka M., Gao J., Takeuchi H., Matsui T., Hirata M. (2016) An extract from pork bones containing osteocalcin improves glucose metabolism in mice by oral administration. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80: 2176-2183 (doi:10.1080/09168451.2016.1214530). (査読あり)
10. Gao J., Hirata M., Mizokami A., Zhao J., Takahashi I., Takeuchi H., Hirata M. (2016): Differential role of SNAP-25 phosphorylation by protein kinases A and C in the regulation of SNARE complex formation and exocytosis in PC12 cells. *Cell Signal*. 28: 425-437 (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. Mizokami A., Kawakubo-Yasukochi T., Hirata M. Sex differences in the regulation of energy metabolism by osteocalcin. *International Congress on Obesity and Metabolic Syndrome*, Aug. 31-Sep. 2, 2017, Seoul, Korea
2. 溝上顕子、竹内弘、自見英治郎、平田雅人：脂肪細胞特異的 GPRC6A 欠損が全身代謝に与える影響 第5回歯科基礎医学会学術大会 2017年9月16日～18日、長野県松本市

3. 向井悟、溝上顕子、樗木さくら、自見英治郎、平田雅人：脂肪特異的 GPRC6A 欠損マウスの作製とその脂質代謝異常の解析 第 90 回日本生化学会大会 2017 年 12 月 6 日～9 日、神戸市
4. 東泉、溝上顕子、大住伴子、平田雅人、竹内弘：膵臓 α 細胞のホルモン分泌に対するオステオカルシンの効果 第 90 回日本薬理学会年会 2017 年 3 月 15-17 日 長崎市
5. 東泉、溝上顕子、大住伴子、平田雅人、竹内弘：オステオカルシンによる膵臓 α 細胞のホルモン分泌調節作用 第 69 回日本薬理学会西南部会 2016 年 11 月 26 日、松山市
6. 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.
7. 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 2016 年 10 月 7-8 日、東京
8. 溝上顕子、安河内（川久保）友世、竹内弘、平田雅人：オステオカルシンの代謝改善効果における GLP-1 の役割 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 2016 年 8 月 24-26 日、札幌市
9. Hirata M., Mizokami A. Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. International Congress on Obesity and Metabolic Syndrome, Sep. 1-4, 2016, Seoul, Korea
10. Sakura Chishaki, Akiko Mizokami, Masato Hirata: Sex difference in the effects of uncarboxylated osteocalcin on glucose homeostasis. The 9th Korea-Japan Conference on Cellular Signaling for Young Scientists July 21-22, 2016, Seoul, Korea

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

九州大学大学院歯学研究院口腔細胞工学
<http://www.mcb.dent.kyushu-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝上 顕子 (MIZOKAMI, Akiko)

九州大学・大学院歯学研究院・准教授

研究者番号：70722487