

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09510

研究課題名(和文)骨基质タンパク質オステオカルシンによる脳機能保護作用の分子基盤解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of the bone matrix protein osteocalcin in protecting brain function

研究代表者

東 泉(Higashi, Sen)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40228705

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)：骨タンパク質オステオカルシン(OC)は、受容体GPC6Aを介して全身の糖・エネルギー代謝を改善する。一方、OCはマウスを用いた実験から血液脳関門や胎盤を通過して脳内に移行して、認知機能の維持・抗うつ作用を示し、胎児の脳の発達と学習・記憶能力も支持することが報告された。しかし神経細胞に対するOCの直接作用は未解明であった。本研究で我々は、OCが受容体GPR158を介して神経細胞に直接作用し、細胞増殖と分化を促進すること、酸化ストレス誘導性のアポトーシスを抑制することを明らかにした。この成果は、OCやGPR158を標的とする認知障害・発達障害の新たな予防・治療戦略の開発に資すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨タンパク質オステオカルシン(OC)による認知機能の維持・抗うつ作用や、胎児の脳の発達と学習・記憶能力の支持する効果が報告されたが、神経細胞に対するOCの直接作用は不明であった。本研究でOCが受容体GPR158を介して神経細胞に直接作用し、脳機能保護につながる様々な効果を発揮することが示された。社会問題となっている認知障害や発達障害に対する新たな予防・治療戦略の開発に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The bone protein osteocalcin (OC) improves systemic sugar and energy metabolism via the receptor GPR6A. On the other hand, it was reported that OC passes through the blood-brain barrier and placenta followed by migrating into the brain, thus maintains cognitive function, exerts antidepressant action, and supports fetal brain development and learning / memory ability based on the experiments using mice. However, the direct action of OC on nerve cells has not been elucidated. In this study, we showed that OC acts directly on neurons via the receptor GPR158, promotes cell proliferation and differentiation, and suppresses oxidative stress-induced apoptotic cell death. This result is expected to contribute to the development of new preventive and therapeutic strategies for cognitive and developmental disorders targeting OC and GPR158.

研究分野：薬理学

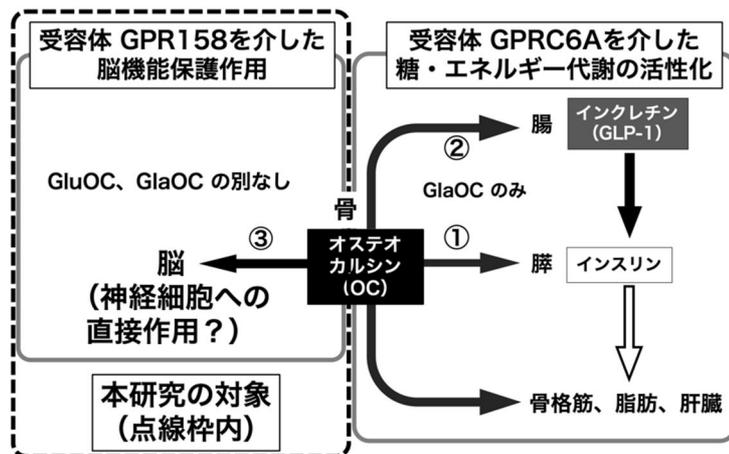
キーワード：神経細胞 骨 オステオカルシン

1. 研究開始当初の背景

近年、骨の細胞が産生する主要な骨基質タンパク質オステオカルシン(OC)が膵細胞からのインスリン分泌の促進や、脂肪細胞等のインスリン感受性向上に寄与し、肥満や糖尿病の改善効果が期待されることが報告された(右下図中) ⁽¹⁾。OCにはグルタミン酸残基がγ-カルボキシル化されたGla型(GlaOC)とされていないGlu型(GluOC)が存在する。ほとんどはGla型として骨基質中に取り込まれているが、一部が血中を循環する。上述の効果はGluOCのみに反応するOC受容体GPRC6Aを介して発揮される⁽²⁾。申請者らも独自の研究からGluOCが腸上皮細胞に作用してインクレチンの分泌を促進することを見出し、GluOCの膵臓からのインスリン分泌促進が、直接作用(右図中)のみならず、腸からのインクレチン分泌を介した間接的作用が大きな役割を果たすことを報告してきた(右図中) ^(3,4)。このように申請者らはOCが糖・エネルギー代謝調節の向上に寄与する機構を研究し、糖尿病の新たな治療・予防法の開発を目指している。

一方、OCは血液脳関門や胎盤を通過して脳内に移行し、認知機能の維持・抗うつ作用をもち、胎児の脳の発達と学習・記憶能力を支持することも報告された(右図中) ⁽⁵⁾。

しかし、糖尿病が高齢者の認知症やうつ病、出生児の自閉症スペクトラムの発症リスクを増加させることが明らかとなってきたことなどを考慮すると⁽⁶⁻⁸⁾、OCの脳への作用は神経細胞への直接的な作用だけでなく、全身の糖代謝異常を改善して糖尿病の関わる脳機能障害を間接的に予防・軽減する可能性がある。本研究開始当初、神経細胞に対するOCの直接作用についてはその受容体を始めほとんど未解明であった。興味深いことにOCの脳への作用は、Glu型やGla型に関係なく発揮されたことから、上述のGPRC6Aではなく、未同定の受容体が担うことが示唆されていた。本研究申請と前後して、新たなOC受容体としてGPR158が報告された⁽¹¹⁾。



2. 研究の目的

本研究の主な目的は、OCの脳機能保護作用に関して、糖・エネルギー代謝改善による間接的な作用ではなく、神経細胞への直接作用の有無とどのような効果があるのかを明らかにすることであった。その成果は、骨タンパク質オステオカルシンによる神経細胞機能の調節機構を解明し、認知症や胎児の脳機能低下・発達障害の予防・改善方法の開発に資することが期待される。

3. 研究の方法

(1)神経細胞様細胞培養モデル:ラット副腎褐色細胞腫由来細胞株PC12は神経成長因子(NGF)添加により神経突起の伸展を示し、交感神経様細胞に分化する^(9,10)。本研究では主に分化した神経細胞様細胞PC12を用いてOCの神経細胞への直接的な効果として検討した。

(2)神経細胞におけるOC受容体の発現解析:ラット脳組織、神経様細胞に分化誘導したPC12細胞、膵細胞株から調製した総RNAを用いてRT-PCR法によりOC受容体候補遺伝子の発現量を検討した。

(3)細胞内シグナルの解析:細胞内のタンパク質リン酸化シグナルについては、ウエスタンブロット法にてリン酸化タンパク質量の変化を指標に解析した。アポトーシスの誘導は関連タンパク質PARPの切断状況をウエスタンブロット法にて検出した。

(4)PC12細胞の生細胞数、神経突起伸長の解析:PC12細胞の細胞増殖や神経成長因子(NGF)刺激によって誘導される神経突起伸長は、それぞれWST-8法あるいは顕微鏡画像の画像解析ソフトによる形態解析により検討した。

4. 研究成果

(1) 神経細胞の増殖および形態に対するOCの影響

PC12細胞の増殖におけるOCの影響を検討した。0.5~500 ng/mLのGluOCまたはGlaOCを添加した培地で4日間培養し、OC無添加で培養した場合と細胞数を比較した。Glu型、Gla型のいずれのOCも培地に5および50 ng/mLの濃度で添加した場合に有意に細胞増殖を促進した。

本研究で用いたPC12細胞において、NGFの濃度依存的に神経突起有する細胞数および突起の長さが増加し、神経突起の伸長がNGF刺激の強さに依存することを確認した。そこで

PC12 の NGF 依存的な神経突起伸長に OC が影響を及ぼすかどうか検討した。GluOC および GlaOC はいずれも神経突起を有する細胞数には影響しなかったが、各細胞の神経突起の長さについては 5 および 50 ng/mL において促進的に作用した。

(2) 神経細胞における機能的 OC 受容体と細胞内シグナル

OC が PC12 の細胞増殖および神経突起伸長について直接的な促進効果を示したことから、PC12 細胞において OC を感知する受容体の検討をおこなった。ラット脳組織、PC12 細胞、およびラット膵臓由来の細胞株における OC 受容体候補遺伝子の発現を RT-PCR 法にて検討した。膵細胞株では GPRC6A の高レベルに発現に対して GPR158 の発現はわずかであった。一方、ラット脳組織および PC12 細胞では、いずれにおいても GPR158 が高レベルに発現を認めたと GPRC6A の発現はほとんど検出できなかった。この結果は、全身糖代謝修飾において OC の主な標的器官の 1 つである膵臓では、OC は Glu 型のみを感知する GPRC6A を介して作用するのに対し、脳組織や PC12 細胞では、GluOC と GlaOC の両者が同様に脳機能保護作用や⁽⁵⁾、細胞増殖および神経突起伸長を促進したことから GPRC6A 以外の受容体を介して作用するとの予想と一致した。

神経細胞の突起伸長では細胞内シグナルのうち、ERK リン酸化経路が促進的に作用することが報告されていることから、PC12 細胞において OC が直接的に ERK 経路を活性化しうるか確認した。PC12 細胞を 50 ng/mL の GluOC または GlaOC で刺激すると 15 分から 30 分後をピークとする ERK のリン酸化亢進を認めた。

これらの結果から PC12 細胞では OC が受容体 GPR158 を介して直接的に ERK リン酸化経路などの細胞内シグナルを惹起して効果を発揮することが示唆された。

(3) 神経細胞の生存能における OC 刺激の効果

OC による PC12 の細胞増殖促進や神経突起伸長は、個体レベルで観察された脳の発達や記憶力の維持における促進的な作用を支持するものと考えられる。細胞レベルでは OC がさまざまなストレスから細胞に保護的に作用する可能性があると考え、過酸化水素処理によって誘導される細胞死における OC の影響を検討した。本研究において、PC12 細胞を 0.1 mM H₂O₂ で処理すると細胞の生存率は約 70%低下したが、細胞を H₂O₂ 処理する前に GluOC または GlaOC で 24 時間の前処理を行うと、GluOC および GlaOC いずれにおいても 5 および 50 ng/mL 濃度において前処理により細胞の生存率が約 40%上昇した。このとき、H₂O₂ 処理によって細胞内のアポトーシス関連タンパク質 PARP の切断され、アポトーシスが誘導されていることが確認されたが、OC 処理は H₂O₂ 処理によって誘導される PARP の切断も阻害したことから、OC は神経細胞において酸化ストレス誘導性のアポトーシスを抑制することが示唆された。

本研究により骨タンパク質 OC は、受容体 GPR158 を介して神経細胞に直接作用して細胞増殖や突起伸長を促進し、ストレスによるアポトーシスを抑制しうることが明らかとなった。この成果は、認知障害や発達障害の予防や治療において、骨タンパク質 OC や受容体 GPR158 を標的とする新たな戦略開発に寄与することが期待される。

<引用文献>

- 1) Lee N.K. 他: Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell* 130, 456-469, 2007.
- 2) Oury, F. 他: Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *J. Clin. Invest.* 123, 2421-2433, 2013.
- 3) Mizokami, A., Takeuchi, H., Hirata, M. 他: Osteocalcin induces release of glucagon-like peptide-1 and thereby stimulates insulin secretion in mice. *PLOS ONE* 8, e57375, 2013.
- 4) Mizokami, A., Takeuchi, H. and Hirata, M. 他: Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone* 69, 68-79, 2014.
- 5) Oury, F. 他: Maternal and offspring pools of osteocalcin influence brain development and functions. *Cell* 155, 228-241, 2013.
- 6) Xiang, A.H. 他: Association of Maternal Diabetes With Autism in Offspring. *JAMA*. 313, 1425-1434, 2015.
- 7) Anderson, R.J. 他: The prevalence of comorbid depression in adults with diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 24, 1069-1078, 2001.
- 8) Ohara, T. 他: Glucose tolerance status and risk of dementia in the community. *Neurology* 77, 1126-1134, 2011.
- 9) Jacobs, J.R. 他: Dynamics of behaviour during neuronal morphogenesis in culture. *Cell Motil Cytoskeleton*. 8:250-60, 1987.
- 10) Greene, L.A. 他: Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73:2424-8, 1976.
- 11) Khirmanian, L. 他: Gpr158 mediates osteocalcin's regulation of cognition. *J Exp Med*. 214:2859-73, 2017

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 2件）

1. 著者名 Ando Eika, Higashi Sen, Mizokami Akiko, Watanabe Seiji, Hirata Masato, Takeuchi Hiroshi	4. 巻 557
2. 論文標題 Osteocalcin promotes proliferation, differentiation, and survival of PC12?cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 174 ~ 179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.03.146	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 Mizokami, A., Mukai, S., Gao, J., Kawakubo-Yasukochi, T., Otani, T., Takeuchi, H., Jimi, E., Hirata, M.	4. 巻 244
2. 論文標題 GLP-1 signaling is required for improvement of glucose tolerance by osteocalcin. J. Endocrinol.	5. 発行年 2019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 Nakagawa, F., Higashi, S., Ando, E., Ohsumi, T., Watanabe, S., Takeuchi, H.	4. 巻 6
2. 論文標題 Modification of TRPV4 activity by acetaminophen.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e03301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e03301	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 Otani, T., Matsuda, M., Mizokami, A., Kitagawa, N., Takeuchi, H., Jimi, E., Inai, T. and Hirata, M.	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安藤瑛香, 東泉, 溝上顕子, 渡邊誠之, 平田雅人, 竹内弘
2. 発表標題 PC12の細胞増殖と神経様分化に対する骨基質タンパク質オステオカルシンの影響
3. 学会等名 第73回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤瑛香, 東泉, 溝上顕子, 渡邊誠之, 平田雅人, 竹内弘
2. 発表標題 骨基質タンパク質オステオカルシンが PC12 細胞に及ぼす影響
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤瑛香, 東泉, 溝上顕子, 大住伴子, 渡邊誠之, 平田雅人, 竹内弘
2. 発表標題 Effect of bone matrix protein osteocalcin on proliferation and neuronal differentiation of PC12 cells
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中川文雄, 安藤瑛香, 東泉, 大住伴子, 渡邊誠之, 竹内弘
2. 発表標題 Effect of acetaminophen on TRPV4
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fukuda, H., Sato, S., Higashi, S., Habu, M., Tominaga, K., Takenaka, S., Takeuchi, H.
2. 発表標題 Anti-cancer effects of newly developed G-quadruplex binders
3. 学会等名 12th JKBT
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田晃、竹内弘
2. 発表標題 テロメアDNA構造を標的とする新規化合物の抗腫瘍効果と有害作用に関する検討
3. 学会等名 第56回 日本口腔組織培養学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田晃、東泉、大住伴子、竹内弘
2. 発表標題 テロメア構造結合性新規化合物の抗癌効果の検討
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田晃、土生学、笹栗正明、富永和宏、竹内弘
2. 発表標題 テロメアDNA構造結合性化合物の癌細胞特異的増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 第73回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東泉、溝上顕子、大住伴子、平田雅人、竹内弘
2. 発表標題 骨基質オステオカルシンによる膵 細胞の性状変化.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤崇裕、臼井通彦、東泉、大住伴子、中島啓介、竹内弘
2. 発表標題 細胞外糖濃度によるマクロファージ極性化の調節.
3. 学会等名 第71回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤崇裕、臼井通彦、東泉、大住伴子、竹内弘
2. 発表標題 培地グルコース濃度はAMPKを介してマクロファージ極性化に影響する.
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 工藤崇裕、臼井通彦、東泉、大住伴子、中島啓介、竹内弘
2. 発表標題 培地グルコース濃度がマクロファージの性質に与える影響について.
3. 学会等名 第78回九州歯科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kudo, T., Usui, M., Higashi, S., Ohsumi, T., Nakashima, K., Takeuchi, H.
2. 発表標題 Effect of extracellular glucose concentration on macrophage polarization.
3. 学会等名 Asia-pacific Conference in Fukuoka 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州歯科大学 口腔応用薬理学分野 Web ページ https://www.kyu-dent.ac.jp/research/lecture/oral_pharmacological 九州歯科大学 口腔応用薬理学分野 Web ページ https://www.kyu-dent.ac.jp/research/lecture/oral_pharmacological
--

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	竹内 弘 (Takeuchi Hiroshi) (70304813)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	

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
---------	---------