

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09521

研究課題名（和文）オステオカルシンによるサルコペニア肥満回避機構の解明

研究課題名（英文）Effect of osteocalcin on sarcopenic obesity

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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：骨基質タンパク質であるオステオカルシン（GluOC）は、全身の糖・エネルギー代謝を改善するだけでなく、筋肉量維持にも寄与する。骨格筋は脂肪細胞から動員された脂肪酸を取り込みエネルギー源とする。GluOCの脂肪分解への影響を検討するため、脂肪細胞特異的GPRC6A（GluOC受容体）欠損マウスを作製し、解析を行なった。GPRC6A欠損マウス由来脂肪組織では脂肪分解酵素群の発現が低下しており、脂肪分解が抑制されていた。そのため、エネルギー源としての脂肪酸の利用も低下していた。以上のことから、GluOCは脂肪の分解を促し、骨格筋のエネルギー源となる遊離脂肪酸の放出に寄与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サルコペニア肥満は、代謝異常と運動機能低下の悪循環によって、サルコペニアや肥満の単独事象よりも深刻な身体機能低下をもたらす、要介護・寝たきりのリスクが高まる。GluOCは、脂肪細胞におけるGPRC6Aシグナルを介して脂肪の分解を促進する。つまり、GluOCは食餌誘発性の肥満とそれに起因する代謝異常を抑制するのみならず、脂肪分解促進作用による遊離脂肪酸放出によって骨格筋にエネルギー源を供給し、骨格筋の機能向上にも寄与する。GluOCはサルコペニアと肥満の両方にアプローチすることでサルコペニア肥満の悪循環を断ち切る治療標的となり得る。

研究成果の概要（英文）：Uncarboxylated osteocalcin (GluOC) is a bone-derived hormone that plays an important role not only in glucose and energy metabolism but also in maintaining skeletal muscle mass. GPRC6A, a member of family C of G protein-coupled receptors, has been reported to serve as a GluOC receptor. We analyzed adipocyte-specific GPRC6A deficient mice and found that these animals manifested adipocyte hypertrophy under obesogenic environment. This was associated with reduced lipolytic activity due to down-regulation of lipolytic enzymes in adipose tissue of the knockout mice. Suppressed lipolysis resulted in reduced fatty acid release in the circulation compared with control mice. Our results suggest that the constitutive activation of GPRC6A signaling by GluOC in adipocytes plays a key role in lipolysis, providing fatty acid as an energy source to the skeletal muscle.

研究分野：基礎歯学

キーワード：オステオカルシン 脂肪分解 肥満

1. 研究開始当初の背景

かつてない高齢社会を迎えた日本の重要な課題の一つは増え続ける医療・介護費であり、健康寿命(日常生活に支障のない期間の平均)の延伸がその解決の鍵を握る。中でも加齢に伴う骨格筋量の減少と筋力の低下を特徴とするサルコペニア(加齢性筋肉減弱現象)は、歩行障害→転倒→骨折→寝たきり→要介護・認知症リスク増大といった悪循環を引き起こす可能性がある。口腔領域においてもサルコペニアと嚥下・咀嚼機能低下との関連が報告されている。口腔機能の低下は低栄養を招き、悪循環をさらに加速させる可能性がある。そのため、サルコペニアの予防および治療方法の確立は急務である。近年、サルコペニアと肥満を合併した「サルコペニア肥満」が問題となっている。サルコペニア肥満は高齢者に特徴的な肥満の形態である。これは単なる2つの病態の組み合わせではなく、代謝異常と運動機能低下の悪循環に陥ることによって相互に病態が進行することが知られている。したがってサルコペニアや肥満の単独事象よりも深刻な身体機能低下をもたらすため、発症予防や治療に関する新しい概念を生み出す必要がある。

2. 研究の目的

我々がこれまで研究を行ってきた骨基質タンパク質であるオステオカルシン(GluOC)は、サルコペニア肥満という病態に対し、サルコペニアと肥満の両方にアプローチできる可能性がある、魅力的な分子である。GluOCは、全身の糖・エネルギー代謝を改善するだけでなく、筋肉量維持にも寄与することが報告された。つまり、GluOCはサルコペニアと肥満の両方にアプローチできる可能性がある。本研究の目的は、サルコペニア肥満の治療標的としてのGluOCの可能性を探ることである。

3. 研究の方法

- (1) 骨格筋インスリン抵抗性モデル細胞として、筋細胞に分化させたラット由来筋細胞株 L6 細胞を高グルコース高インスリン培地で培養した。また、低濃度 H₂O₂ 存在下で 48 時間培養した同細胞を肥満による慢性的な酸化ストレスモデルとした。以上 2 つのモデルを組み合わせてインスリン抵抗性と酸化ストレスが相互に与える影響を検討した。続いて、それらのモデルで悪化したインスリン抵抗性あるいは酸化ストレスを GluOC が回復できるかを検証する。
- (2) 骨格筋は脂肪細胞から動員された脂肪酸を取り込みエネルギー源とする。GluOC の脂肪分解への影響を検討するため、脂肪細胞特異的 GPRC6A 欠損マウスを作製し、解析を行なった。

4. 研究成果

<骨格筋細胞における GluOC のインスリン抵抗性改善作用の検証>

骨格筋の、肥満による慢性的な酸化ストレスモデル細胞として、筋細胞に分化させた L6 細胞を高グルコース (15g/L) 培地、あるいは低濃度過酸化水素存在下で培養したものをを用いた。これらの条件下で培養した筋細胞は、インスリン刺激による Akt のリン酸化が抑えられており、肥満によるインスリン抵抗性モデル細胞として使用できることを確認した。

これらのモデル細胞に GluOC を1時間作用させたのちにインスリン刺激を行い、悪化したインスリン抵抗性を GluOC が回復できるかを検証した。その結果、予想に反して GluOC を添加した細胞でインスリン誘導性の Akt のリン酸化が抑制されることがわかった。また、酸化ストレスマーカーであるカルボニル化タンパク質も GluOC によって増加することがわかった。一方、通常培地で培養した L6 筋芽細胞に対して GluOC を作用させると、インスリン刺激時の糖取り込みに大きな違いはなかったものの、定常状態での糖取り込みが GluOC によって顕著に亢進していることが明らかになった。

<脂肪細胞における GluOC の作用>

G タンパク質共役型受容体である GPRC6A は GluOC の受容体として同定されているが、オルニチンやテストステロンなど、様々な物質をリガンドとする。

骨格筋は脂肪細胞から動員された脂肪酸を取り込みエネルギー源とする。そこで、GluOC の脂肪分解への影響を検討するため、3T3-L1 脂肪細胞を GluOC、あるいは GPRC6A のリガンドであるオルニチンで刺激すると、脂肪分解酵素律速酵素である Adipocyte triglyceride lipase (ATGL)とその転写因子 FoxO1 の発現が上昇した。GPRC6A をノックダウンした 3T3-L1 細胞を GluOC あるいはオルニチンで刺激しても ATGL の発現上昇は見られなかった。GPRC6A 刺激による遊離脂肪酸の放出を調べたところ、コントロール細胞では GluOC ならびにオルニチンによって遊離脂肪酸の放出が増加したが、GPRC6A ノックダウン細胞では遊離脂肪酸の放出量に違いは見られな

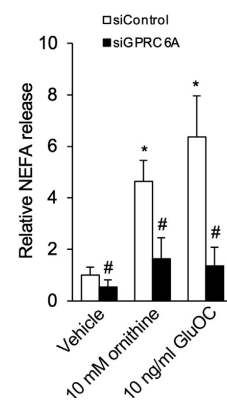


図 1. GPRC6A をノックダウンした 3T3-L1 細胞を GluOC あるいはオルニチンで刺激し、培養上清に放出された遊離脂肪酸を測定した。
*p<0.05 vs. siControl Vehicle, #p<0.05 vs. corresponding control.

かった(図1)。

<脂肪特異的 GPRC6A 欠損マウスの解析>

GPRC6A の exon2, 3 を含むゲノム領域を LoxP 配列で挟んだ flox マウスと成熟脂肪細胞特異的に Cre リコンビナーゼを発現する Fabp4-Cre マウスを交配し、脂肪細胞特異的 GPRC6A 欠損マウス (adG6AKO マウス) を作製して解析を行なった。

脂肪に adG6AKO および対照群のマウスを、離乳直後から高脂肪高ショ糖食で飼育し、食事誘発性肥満に対する感受性を比較したところ、高脂肪高ショ糖食開始初期は両遺伝子群で体重増加に違いは見られなかったが、14 週を過ぎた頃から adG6AKO マウスの体重が有意に大きくなった(図2A)。

それぞれのマウスの脂肪組織において、脂肪加水分解酵素である ATGL とホルモン感受性リパーゼ(Hormone sensitive lipase, HSL)、脂肪的表面結合タンパク質である Perilipin の発現が adG6AKO 群の脂肪組織で著しく低下していた(図 3A)。脂肪分解酵素群の発現低下によって実際に脂肪の分解が抑制されていることを確認するため、インプロテレンール刺激による脂肪分解を検討した。その結果、adG6AKO 群でインプロテレンール投与後の血中遊離脂肪酸が有意に低下していることが示された(図 3B)。酸素消費量と二酸化炭素排出量から呼吸交換比を算出すると、Day cycle における呼吸交換比が adG6AKO で上昇していた。このことは、GPRC6A を欠損したマウスでは脂肪酸をエネルギー源として使用しづらくなっていることを示している(図 3C)。

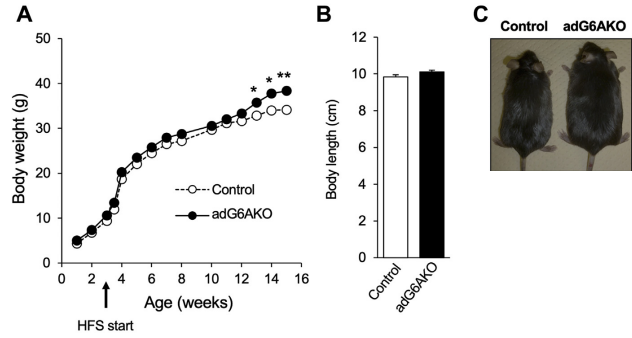


図 2. A. 雄性 adG6AKO マウスを 12 週間にわたって高脂肪高ショ糖食で飼育した際の体重増加。B. 15 週齢における体長。C. * $p < 0.05$ vs. siControl Vehicle. # $p < 0.05$ vs. corresponding control by Two-way ANOVA.

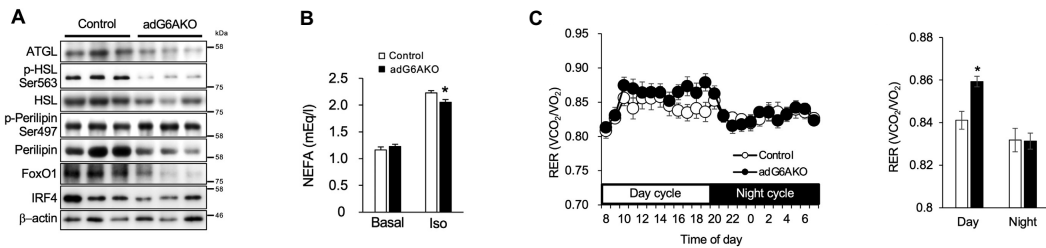


図 3. 脂肪組織における GPRC6A の欠損は脂肪分解酵素の発現抑制による脂肪分解の抑制を引き起こし、エネルギー源としての脂肪酸の放出を抑制する。A. コントロールおよび adG6AKO マウスを 15 週間にわたって高脂肪高ショ糖食で飼育したのちに性腺周囲脂肪組織における脂肪分解酵素とその転写印紙の発現量をリン酸化を Western blotting によって比較した。B. イソプロテレンール刺激後の血中遊離脂肪酸濃度。C. 酸素消費量と二酸化炭素排出量から算出した呼吸交換比 (Respiratory exchange ratio, RER)。* $p < 0.05$ vs. corresponding control by one-way ANOVA.

我々は以前、GluOC が 3T3-L1 細胞で cAMP-PKA 経路を活性化することを報告している。野生型の脂肪組織器官培養では、GluOC ならびにオルニチン刺激により ATGL の発現が上昇し、細胞透過性の cAMP アナログである db-cAMP でも同様に ATGL の発現が上昇した。一方、GPRC6A を欠損する脂肪組織培養では GluOC ならびにオルニチンによる ATGL の発現上昇は抑えられたが、db-cAMP の効果は抑えられないことを確認した(図 4A)。いずれの刺激による ATGL の上昇も、cAMP 依存性プロテインキナーゼ A(PKA)の阻害剤である PKI 14-22 を作用させることによって抑えられた(図 4B)。以上のことから、GluOC、オルニチンによって脂肪組織の GPRC6A が活性化し、cAMP-PKA シグナル伝達経路を経て ATGL の発現が上昇することが明らかになった。

以上のことから脂肪細胞において、GluOC による GPRC6A シグナルの活性化が脂肪の分解を促し、骨格筋のエネルギー源となる遊離脂肪酸の放出に寄与することが明らかになった。

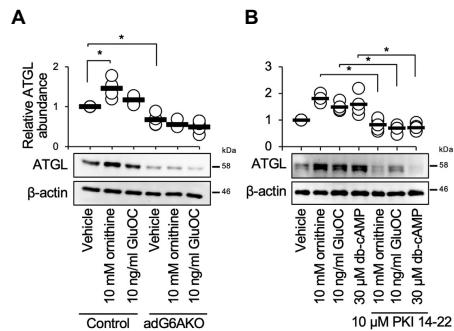


図 4. GPRC6A シグナルの活性化は ATGL の発現を上昇させる。A. 野生型および adG6AKO マウス由来脂肪組織を器官培養し、GPRC6A のリガンドで刺激した際の ATGL 発現量。B. 野生型マウス由来脂肪組織の器官培養の ATGL 発現量。C. * $p < 0.05$ vs. corresponding control by one-way ANOVA.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8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 Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Yano Ena, Kimura Soi, Nishinakagawa Takuya, Mizokami Akiko, Hayashi Yoshikazu, Hatakeyama Yuji, Ohe Kenji, Yasukochi Atsushi, Nakamura Seiji, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 54
2. 論文標題 Hepatic glycogenolysis is determined by maternal high-calorie diet via methylation of Pygl and it is modified by oteocalcin administration in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Metabolism	6. 最初と最後の頁 101360 ~ 101360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molmet.2021.101360	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 溝上顕子、安河内(川久保)友世、大谷崇仁、平田雅人	4. 巻 54
2. 論文標題 オステオカルシンのホルモン作用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 糖尿病・内分泌代謝科	6. 最初と最後の頁 259-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Gao Jing, Mizokami Akiko, Takeuchi Hiroshi, Li Aonan, Huang Fei, Nagano Haruki, Kanematsu Takashi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 135
2. 論文標題 Phospholipase C-related but catalytically inactive protein acts as a positive regulator of insulin signalling in adipocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258584
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.258584	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 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 Mukai Satoru, Mizokami Akiko, Otani Takahito, Sano Tomomi, Matsuda Miho, Chishaki Sakura, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Tang Ronghao, Kanematsu Takashi, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 296
2. 論文標題 Adipocyte-specific GPRC6A ablation promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100274 ~ 100274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100274	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 Takahito, Mizokami Akiko, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Takeuchi Hiroshi, Inai Tetsuichiro, Hirata Masato	4. 巻 78
2. 論文標題 The roles of osteocalcin in lipid metabolism in adipose tissue and liver	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Biological Regulation	6. 最初と最後の頁 100752 ~ 100752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbior.2020.100752	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 Akiko, Mukai Satoru, Gao Jing, Kawakubo-Yasukochi Tomoyo, Otani Takahito, Takeuchi Hiroshi, Jimi Eijiro, Hirata Masato	4. 巻 244
2. 論文標題 GLP-1 signaling is required for improvement of glucose tolerance by osteocalcin	5. 発行年 2020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 Yamawaki Yosuke, Shirawachi Satomi, Mizokami Akiko, Nozaki Kanako, Ito Hikaru, Asano Satoshi, Oue Kana, Aizawa Hidenori, Yamawaki Shigeto, Hirata Masato, Kanematsu Takashi	4. 巻 131
2. 論文標題 Phospholipase C-related catalytically inactive protein regulates lipopolysaccharide-induced hypothalamic inflammation-mediated anorexia in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 104563 ~ 104563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2019.104563	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 1.Otani T, Matsuda M, Mizokami A, Kitagawa N, Takeuchi H, Jimi E, Inai T, 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 Dis.	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 溝上 顕子, 大谷 崇仁, 兼松 隆, 自見 英治郎, 平田 雅人
2. 発表標題 脂肪細胞表面受容体GPC6Aによる脂質代謝制御
3. 学会等名 第63回 歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 溝上 顕子
2. 発表標題 Role of glucagon-like peptide-1 receptor signaling in osteocalcin-mediated improvement of whole-body metabolism
3. 学会等名 第62回 歯科基礎医学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝上 顕子, 大谷 崇仁, 松田 美穂, 安河内 友世, 竹内 弘, 自見英治郎, 平田 雅人
2. 発表標題 Adipose tissue-specific knockout of GPRC6A promotes diet-induced obesity by inhibiting lipolysis
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	Akiko Mizokami, Satoru Mukai, Takahito Otani, Hiroshi Takeuchi, Eijiro Jimi, and Masato Hirata
2. 発表標題	Adipocyte-specific GPRC6A ablation induces diet-induced obesity by inhibiting lipolysis.
3. 学会等名	2019 International Congress on Obesity and Metabolic Syndrome & Asia-Oceania Conference on Obesity (ICOMES & AOCO 2019) (国際学会)
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	溝上 顕子, 向井 悟, 竹内 弘, 自見英治郎, 平田 雅人
2. 発表標題	オステオカルシンの代謝改善効果における GLP-1 受容体シグナルの役割
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	溝上顕子、松田美穂、竹内弘、安河内友世、自見英治郎、平田雅人
2. 発表標題	脂肪細胞表面受容体GPRC6Aを介した脂肪蓄積機構
3. 学会等名	第60回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	溝上顕子、久保山奈緒、向井悟、高靖、自見英治郎、平田雅人
2. 発表標題	Protective effect by uncarboxylated osteocalcin against UVB-induced reactive oxygen species in HaCaT keratinocytes.
3. 学会等名	第91回日本生化学会大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 Otani T, Hirata M, Mizokami A, Kitagawa N, Jimi E. and Inai T.
2. 発表標題 Programmed necrosis of adipocytes induced by high-dose osteocalcin
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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