

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成27年度研究進捗評価用〕

平成24年度採択分
平成27年3月11日現在

骨・腸・代謝関連シグナルの解明と性差の明確化

Analysis of the functional interaction among bone, gut and energy metabolism with a special reference to gender difference

課題番号：24229009

平田 雅人 (HIRATA MASATO)
九州大学・大学院歯学研究院・教授



研究の概要：「骨・腸・代謝関連」において、以下の点を明らかにした。

- ① オステオカルシン (GluOC) は小腸からのインクレチン (GLP-1) 分泌を促す。
- ② 経口投与した GluOC は 24 時間にわたって小腸内腔から作用し続けるとともに、GluOC の血中濃度の維持にも寄与する。
- ③ GluOC を長期間経口投与するとメタボ状態が改善するが、その効果には性差がある。

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、インスリン、インクレチン、エネルギー代謝、骨

1. 研究開始当初の背景

肥満とそれに起因するメタボリックシンドロームは、QOL を著しく低下させるとともに、生命の危機にも繋がる合併症を併発する。代謝の活性化機構の解明は、メタボリックシンドロームの予防や治療に関する新しい概念を生み出す可能性を秘めている。最近、骨の状態(有り様)が膵臓の働きや代謝の活性化に関わる事が報告された。膵臓に加えて、小腸粘膜上皮細胞も関わっていると想定し、これを「骨・腸・代謝関連 (Bone-Gut-Metabolism) (BGM Flow)」と名付けた。

2. 研究の目的

本研究ではこの関連に関わる分子群の役割の解明を目指す。BGM Flow を解析することによって、代謝の活性化に関わる骨、特にオステオカルシン (GluOC) の役割に関わりに関して学術的成果を得る。加えてこれらの分子群の働きには雌雄差が大きいことが想定されるので雌雄差の原因を探る。

3. 研究の方法

雌雄両性を比較しながら、野生型加えて必要に応じて種々の関連遺伝子欠損マウスを得てマウスの *in vivo* 解析とそれらのマウスから得た細胞・組織の *in vitro* 解析、加えてクローン化細胞(骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、膵β細胞、腸上皮細胞)への対象遺伝子の発現やサイレンシング実験などを組み合わせて、「オステオカルシン→インクレチン・インスリンの分泌→エネルギー代謝」の関連について研究を進める。

4. これまでの成果

<GluOC の効果>

- インクレチンへの作用: 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つである 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、γ-カルボキシル化された GlaOC は無効であった。GluOC による血中インスリン濃度の上昇は、GLP-1 受容体アンタゴニスト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インクレチン (GLP-1) 作用を介していることを明確に示した。

- 脂肪細胞への作用: 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。加えて GluOC が GPRC6A を介して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。

- 血管内皮細胞への作用: 動脈硬化誘発モデルマウスに対して継続的に GluOC を週 5 回腹腔投与したところ、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。また、GluOC 投与後の血中 NO (nitric oxide) 濃度が上昇した。また、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 NO の上昇が認められた。GluOC は血管内皮細胞に作用し、NO 産生を介して動脈硬化発症抑制効果を発揮している可能性が示唆された。

<GluOC の経口投与と体内動態>

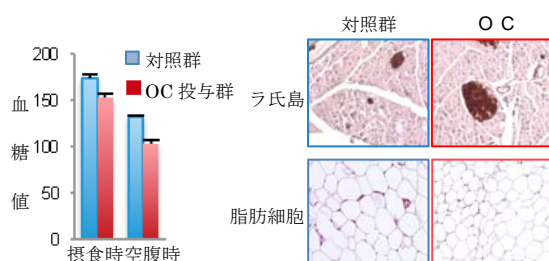
GluOC の動態を調べるために、GluOC を経口投与したところ、小腸内腔には 24 時間にわたって一部の GluOC が残っていた。これは小腸内腔から作用し続けることとともに吸収されて血中濃度を維持し続けることにも役立つ。また、投与後の血中 GluOC 濃度上昇は 24 時間経過し

でも維持されていた。経口投与された GluOC は小腸の内腔からも全身を循環する血液中からも作用を及ぼし、GluOC に応じて門脈内 GLP-1 濃度も上昇することが分かった。

<GluOC 投与によるマウスのメタボ状態の改善>

雌性マウスを用いて、3 週齢から 13 週間にわたり GluOC を週に 3 回経口投与して、グルコース負荷試験やインスリン負荷試験を行い、グルコース応答性インスリン分泌を観察した。GluOC を継続的に経口投与した結果、空腹時血糖が低下し耐糖能が改善された。インスリン負荷試験によるインスリン感受性に変化は見られなかったが、空腹時の血中インスリン濃度は GluOC 投与群で有意に高かった。膵臓の β 細胞(ラ氏島)の面積を計測すると、GluOC 経口投与によって増加することが分かった。さらに、GluOC 投与群では、白色脂肪細胞が小さかった。

マウス個体に対して GluOC が経口投与でも有効に作用することを明らかにした事は意義深い。



高脂肪高ショ糖食で飼育したマウスに OC を3ヶ月間、週3回経口投与したところ、血糖値の低下と膵臓ラ氏島の増大、脂肪細胞の縮小が見られた。

GluOC の治療的な応用に加えて、予防的な応用を考えた時には特にその意義は大きい。経口投与は受け手にとってはストレスが少なく、簡便かつ安全な薬物投与方法であるとともに医療従事者の手を煩わせない。

<GluOC 効果の性差とその理由>

一方、雄性マウスで同様の実験を行うと、耐糖能はやや改善傾向を示したもののインスリン感受性がむしろ悪化した。抗糖尿病性アディポカインであるアディポネクチンを測定すると、高脂肪高ショ糖食を摂取した雄では分泌が低下する傾向にあった。これらのことから、継続的な GluOC 経口投与は、エネルギー代謝の調節に関わるがその応答には雌雄差があることが明確になった。GluOC はテストステロンの合成・分泌を促進することが明らかにされている。実際、雄の血中テストステロン濃度を測定すると GluOC 投与群で増加していた。そこで、テストステロンの影響を排除するために、精巣摘出術(ORX)を行った雄性マウスを用いて GluOC 経口投与実験を行った。ORX を施したマウスでは雌性マウスと同様に、GluOC 投与によるメタボ改善が認められた。このように GluOC の効果における雌雄差にはテストステロンが関与していることが示唆された。

<妊娠母体への GluOC 投与とその成長した子供への影響(性差も含めた解析)>

妊娠マウスを4群に分け、正常食(ND)あるいは高脂肪高ショ糖食(HFS)で飼育しながら、GluOC あるいは生理的食塩水を経口投与した。21 日後に生まれたマウスは母体の素性に加えて雌雄差とともに ND 群と HFS 群に分けて、合わせて8群の子マウスのメタボ状態の経過を生後95日まで観察した。HFS 飼育群ではいくつかの差異が認められた。例えば HFS で飼育された母体から生まれた雌性マウスではいわばメタボ状態の悪化を示す指標が高かった。これに対して母体が 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。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メタボ状態の悪化を示す指標が高かった。

5. 今後の計画

<GluOC 作用のメカニズム説明>

GluOC によるメタボ改善のメカニズムを探る研究を継続する。GLP-1 受容体のノックアウトマウスや脂肪細胞特異的に GPRC6A のノックアウトマウスのマウス個体ならびに摘出臓器などを駆使して実験を重ねる。

<廃棄豚骨の有効利用: 廃棄豚骨からの OC の抽出とその作用>

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 として原料化することを目指す。

<GluOC による抗がん作用に関する研究>

GluOC には抗がん作用のある事が分かってきた。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、GluOC には促進的作用があることが分かってきた。このメカニズムを解明する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

・ Otani T, Mizokami A, Hayashi Y, Gao J, Mori Y, Nakamura S, Takeuchi H, and Hirata M: Signaling pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin. *Cell. Signal.* 27: 532-544, 2015.

・ 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.

・ 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: e57375, 2013

ホームページ等

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