

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26861553
研究課題名(和文) オステオカルシンの内分泌作用に関する研究

研究課題名(英文) Endocrine functions of osteocalcin

研究代表者

溝上 顕子 (Mizokami, Akiko)

九州大学・歯学研究院・講師

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)：オステオカルシン(GluOC)は糖・脂質代謝制御に重要な役割を果たしており、その作用には性差がある。GluOCの長期間経口投与は、雌マウスに対して耐糖能の改善、脂肪細胞の縮小をもたらしたが、雄に対してはインスリン抵抗性、耐糖能の低下、脂肪細胞の増大を引き起こした。また、精巣を摘出した雄マウスにおいてGluOCは糖代謝を改善したが、テストステロン(T)を持続投与した雌では耐糖能を悪化させた。雄のGluOC投与群および雌のT持続投与群では血中アディポネクチン濃度が減少しており、GluOC作用における性差の一部はGluOCによる血中T濃度上昇とそれに伴うアディポネクチンの減少によることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osteocalcin, in its uncarboxylated form (GluOC), regulates energy metabolism by stimulating insulin secretion, pancreatic β -cell proliferation, and adiponectin expression in the adipocytes. In this study, we showed that there is a sex difference in the effect of GluOC on glucose homeostasis in mouse models. Long-term oral administration of GluOC improved glucose tolerance and decreased adipocyte size in female mice. However, the same treatment caused glucose intolerance, insulin resistance, and adipocyte hypertrophy in male mice. In addition, such administrations of GluOC increased circulating testosterone (T) and decreased serum adiponectin level. These phenotypes disappeared when mice were orchidectomized, and restored again by T supplementation. Moreover, female mice supplemented with T exhibited similar responses to GluOC as male mice. These results suggest that deleterious effect of GluOC is mediated in part by increased circulating T level.

研究分野：生化学

キーワード：オステオカルシン 性差 アディポネクチン テストステロン 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

増加の一途をたどるメタボリックシンドロームであるが、その病態と骨とが密接に関連していることはあまり知られていなかった。しかし近年、骨がホルモンを分泌する内分泌器官であることが明らかにされ、俄かに注目されるようになった。中でも骨芽細胞が分泌するオステオカルシン(GluOC)は、血糖値や脂質代謝の制御に重要な役割を果たしている上、その作用に性差があることが明らかにされつつある。我々はGluOCが消化管ホルモンであるGLP-1の分泌を促す経路を明らかにし、「骨と代謝」に「腸」を加えて、これら3つのキーワードに関連があることを提唱した。

2. 研究の目的

- (1) GluOCによるGLP-1分泌機構、
 - (2) GluOCによる代謝改善効果におけるGLP-1の役割、
 - (3) 雌雄差が生じる原因の解明
- 以上3つの点を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 腸上皮由来培養細胞および膵β細胞由来細胞株に対してGluOC刺激を行い、GluOC受容体であるGPRC6Aの下流シグナルを解析した。
- (2) 雌雄両性のマウスにGluOCを長期間にわたって継続投与した際の全身エネルギー代謝における影響を検討する。GLP-1受容体欠損マウスも同時に解析することにより、全身代謝活性化におけるGLP-1の役割を明らかにする。必要に応じて精巣摘出術(ORX)や卵巣摘出術(OVX)を施したマウスを用いた解析も行った。

4. 研究成果

<GluOCによるGPRC6Aシグナリングの解析>

・GLP-1への作用

マウス小腸のパラフィン切片を抗GPRC6A抗体で免疫染色してその局在を見ると、小腸上皮細胞の内腔側、基底膜側いずれにもGPRC6Aが発現していた。また、抗GLP-1抗体とともに染色すると、GPRC6AとGLP-1が共局在している細胞も認められた。GLP-1を発現している細胞の約半分はGPRC6Aを発現しており、GPRC6Aを発現している細胞の約4%がGLP-1を発現していた。このことは、GluOCが小腸内分泌細胞のGPRC6Aを介してGLP-1の分泌を促進することを示唆している。

・脂肪細胞への作用

3T3-L1脂肪細胞に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。

GluOC受容体であるGPRC6Aをノックダウンした細胞、MEK及びPKAの阻害剤などを用いた実験でGluOCはGPRC6Aを介してPKA、Src、Rap1、MEKを順次活性化し、CREBに至りPPAR γ とアディポネクチンの発現を促進させていることを明らかにした。雌雄差を検討するため、培地にテストステロンを添加して同様の実験を行ったが、顕著な差は認められなかった。

<GluOCによる代謝改善効果>

・GluOC経口投与後の体内動態

GluOCを経口投与した後の腸管内容物に含まれるGluOCを定量したところ、小腸内腔には少なくとも24時間にわたってGluOCの一部が残っていることを明らかにした。これは、小腸内腔に存在する受容体から作用し続けるとともに、全身循環に吸収されてGluOCの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時間経過しても維持されていた。また、門脈血中GLP-1濃度もGluOCによって上昇することがわかった。

・雌マウスに対するGluOCの作用

野生型マウスに10週間継続的にGluOCを経口投与したところ、メスでは膵臓ランゲルハンス島の増大、耐糖能の改善、小型脂肪細胞の増加が認められた(図1)。この効果は普通食で飼育したマウスおよび高脂肪高ショ糖食で飼育したメタボリックシンドロームモデルマウスいずれにおいても認められた。

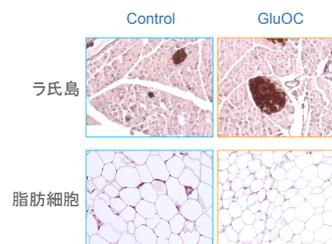


図1. 高脂肪高ショ糖食で飼育した雌性マウスにGluOCを3ヶ月間、週3回経口投与したところ、膵臓ラ氏島の増大および白色脂肪組織における脂肪細胞の縮小がみられた。

・GluOC効果の性差

雄性マウスで同様の実験を行い、雄性マウスに対するGluOCの長期間投与は耐糖能およびインスリン抵抗性の悪化を引き起こすことを明らかにした。また、GluOC投与群において脂肪細胞の肥大化(図2)と血中アディポネクチン濃度の低下(図3)が認められた。これらの所見は、高脂肪高ショ糖食で飼育したメタボリックシンドロームモデルマウスにおいてより顕著であった。

GluOCによって血中テストステロン濃度が上昇したことから、精巣摘出術を施したマウスで同様の実験を行うと、雌性マウス同様にGluOCによる糖代謝の改善が認められた。さ

らに、雌性マウスに浸透圧ポンプを用いてテストステロン持続投与しつつ同様の実験を行うと、GluOCによって耐糖能が悪化した。

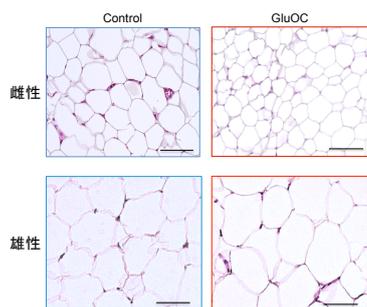


図 2. 高脂肪高ショ糖食で飼育した雌性および雄性マウスに GluOC を毎日 4 週間経口投与したところ、雌性マウスの白色脂肪細胞は縮小したが、雄性マウスでは白色脂肪細胞の肥大化が見られた。

テストステロンは脂肪細胞からのアディポネクチン分泌を抑えることが報告されている。実際、GluOC 投与群およびテストステロン持続投与群ではコントロールと比べて血中アディポネクチン濃度が減少していた (図 3)。以上のことから、GluOC のエネルギー代謝改善効果には雌雄差があり、それは GluOC による血中テストステロン濃度上昇とそれに伴うアディポネクチンの減少による可能性が高いことが示唆された。

GluOC の効果に性差があるという事実は、臨床応用を考えた際に重要であり、その原因の一端を明らかにした意義は大きい。

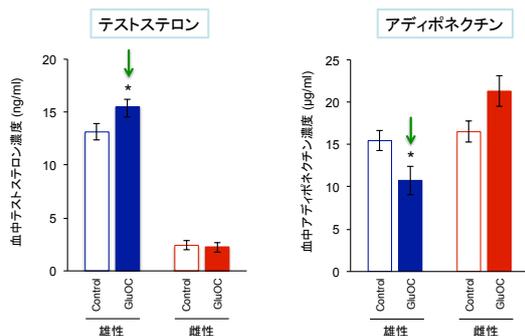


図 3. 高脂肪高ショ糖食で飼育した雌雄のマウスに GluOC を毎日 4 週間経口投与し、血中テストステロンおよびアディポネクチン濃度を測定した。雄性マウスでは GluOC 投与によって血中テストステロン濃度が増加し、アディポネクチン濃度が低下した。雌性マウスではそのような変化は見られなかった。

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 7 件)

- (1) 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.* (査読有) 13, 2016, 22-28. ISSN 1860-3122
- (2) Yasutake Y. *, Mizokami A. *, Kawakubo-Yasukochi T. et al.: Long-term oral administration of osteocalcin induces insulin resistance in male mice fed a high-fat, high-sucrose diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* (査読有) 310, 2016, E662-E975. DOI: 10.1152/ajpendo.00334.2015. *Equal contribution
- (3) Kawakubo-Yasukochi T., Kondo A., Mizokami A. et al.: Maternal oral administration of osteocalcin protects offspring from metabolic impairment in adulthood. *Obesity* (査読有) 24, 2016, 895-907. DOI: 10.1002/oby.21447
- (4) 溝上 颯子、川久保-安河内 友世、竹内 弘、平田 雅人: オステオカルシンとインスリン分泌 *日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.)* (査読有) 145, 2015, 201-205. DOI: 10.1254/fpj.145.201.
- (5) Otani T., Mizokami A., Hayashi Y., Gao J. et al.: Signaling pathway for adiponectin expression in adipocytes by osteocalcin. *Cellular Signaling* (査読有) 27, 2015, 532-544. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.12.018.
- (6) Tsuka S., Aonuma F., Higashi S., Ohsumi T., Nagano K., Mizokami A. et al.: Promotion of insulin-induced glucose uptake in C2C12 myotubes by osteocalcin. *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 459, 2015, 437-42. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.123.
- (7) Mizokami A. *, Yasutake Y. *, Higashi S., Kawakubo-Yasukochi T. et al. Oral administration of osteocalcin improves glucose utilization by stimulating glucagon-like peptide-1 secretion. *Bone* (査読有) 69, 2014, 68-79. DOI: 10.1016/j.bone.2014.09.006.

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 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, Barcelona, Spain
- (2) Hirata, M., Mizokami, A. and Kawakubo-Yasukochi, T.: Oral Administration of Osteocalcin Improves Glucose Utilization by Stimulating Glucagon-Like Peptide-1 Secretion. 2016 International Conference on Obesity and Metabolic Syndrome, September 1-4, 2016, Seoul, Korea
- (3) 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
- (4) 溝上顕子. Gendered Innovations が拓く明るい未来. Symposium for Diversity Initiatives and Gendered Innovations 多様性の推進と性差に着目した技術革新. 2016 年 3 月 18 日、福岡市
- (5) Mizokami A., Yasutake Y., Chishaki S., Kawakubo-Yasukochi T., Takeuchi H., Hirata M. The effect of uncarboxylated osteocalcin on glucose utilization in mice. The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologists (APFP) Meeting. 1-3 February, 2016, Bangkok, Thailand
- (6) Mizokami A., Yasutake Y., Hirata M.: Gender difference in the endocrine function of osteocalcin. The 63rd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 30-31 October, 2015, Fukuoka, Japan
- (7) 溝上顕子、安武雄、安河内友世、平田雅人: 長期的なオステオカルシンの経口投与による代謝の改善とその性差 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2015 年 9 月 11 日~13 日 新潟市
- (8) 溝上顕子、安武雄、東泉、安河内友世、高橋一郎、竹内弘、平田雅人: オステオカルシン経口投与時の体内動態と糖代謝への作用 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 2014 年 9 月 27 日 福岡市

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: メタボリックシンドロームの予防
または改善のための食用組成物
発明者: 平田雅人、溝上顕子、安河内友世、
山下康寿
権利者: 国立大学法人九州大学
株式会社クリーンエコバランス
種類: 特許
番号: 特願 2015-161239
出願年月日: 平成 27 年 8 月 18 日
国内外の別: 国内
2. 名称: メタボリックシンドロームの予防
または改善のための食用組成物
発明者: 平田雅人、溝上顕子、安河内友世、
山下康寿
権利者: 国立大学法人九州大学
株式会社クリーンエコバランス
種類: 特許
番号: PCT/JP2016/074077
出願年月日: 平成 28 年 8 月 18 日
国内外の別: 国外

[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>

九州大学プレスリリース 2014 年 10 月 6 日
オステオカルシン(骨のタンパク質)の経口
摂取で代謝を改善 -新たなメタボリックシ
ンドローム予防薬の開発に期待-
https://www.kyushu-u.ac.jp/f/1073/2014_10_06.pdf

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・講師
研究者番号: 70722487