

総説

オステオカルシンとインスリン分泌

溝上 顕子¹⁾, 川久保(安河内)友世¹⁾, 竹内 弘²⁾, 平田 雅人¹⁾

要約: 骨は能動的な内分泌器官であることが明らかとなった。中でも、骨基質タンパクであるオステオカルシンは、糖・エネルギー代謝をはじめ雄の生殖機能調節、脳の発育・発達の調節等に重要な役割を果たしていることが最近の研究で明らかにされた。このような骨による生体恒常性維持の様々な局面が明らかになりつつある。オステオカルシン作用の個々のシグナリング経路は十分に解明されていないが、エネルギー代謝に限定すると、受容体として機能する分子の1つとして同定されたGPCR6Aを介して膵臓β細胞に作用して、あるいは消化管に作用してインクレチンの分泌を促し、次いでインスリンの分泌を促す。そのインスリンは骨にも作用して骨代謝を活性化し、さらなるオステオカルシンの分泌を促すというポジティブサイクルが明らかにされている。極論すると、骨代謝が活発になるとインスリン分泌・糖代謝が亢進する。さらに骨代謝が活発化して丈夫な骨になり、かつ肥満・糖尿病になり難いという魅力的なストーリーである。一方で、オステオカルシンが及ぼす効果には性差があることが示唆されている。本稿では、オステオカルシンの特に糖・エネルギー代謝を調節するホルモンとしての役割について、最近の知見を踏まえて紹介する。

1. はじめに

骨は体重の約15%を占める体内で最も大きな臓器のひとつである。従来骨は身体の維持・運動を支え、保護する静的な臓器であると考えられてきたが、近年、線維芽細胞成長因子23 (FGF23) (1) とオステオカルシン (2) の少なくとも2つのホルモンを分泌し、全身の代謝を調節する動的な臓器であることが明らかにされた (1, 2)。中でもオステオカルシンは、糖・エネルギー代謝の調節、雄の生殖機能、脳の発育・発達の調節等に大きく関わるということが報告されて、注目を集めている (2-6)。

オステオカルシンは、骨中の非コラーゲン性タンパク質の中ではオステオネクチンに次いで大量に存在し、ヒトでは49個のアミノ酸からなる分子量約5,500のタンパク質である (図1)。骨芽細胞で合成されたのち、分子中に含まれる3つのグルタミン酸残基がビタミンK依存的にγ-カルボキシル化される。それによりCa²⁺に対する親和性が大きく亢進してヒドロキシアパタイトと強固に結合し骨に埋め込まれるが (骨基質タンパク質)、わずかな量は血中を循環している (7)。血中オステオカルシンは、非あるいは低カルボキシル化状態のオステオカルシン (GluOC) と3つのグルタミン酸残基すべてがカルボキシル化されたGlaOCの2つの形態で存在しており、ホルモンとしての活性をもつのはGluOCである (2-4) (図2)。本稿では、糖・エネルギー代謝の調節、雄の生殖機能、脳の発育・発達の調節等に大きく関わるということが報告されて、注目を集めている (2-6)。

オステオカルシンは、骨中の非コラーゲン性タンパク質の中ではオステオネクチンに次いで大量に存在し、ヒトでは49個のアミノ酸からなる分子量約5,500のタンパク質である (図1)。骨芽細胞で合成されたのち、分子中に含まれる3つのグルタミン酸残基がビタミンK依存的にγ-カルボキシル化される。それによりCa²⁺に対する親和性が大きく亢進してヒドロキシアパタイトと強固に結合し骨に埋め込まれるが (骨基質タンパク質)、わずかな量は血中を循環している (7)。血中オステオカルシンは、非あるいは低カルボキシル化状態のオステオカルシン (GluOC) と3つのグルタミン酸残基すべてがカルボキシル化されたGlaOCの2つの形態で存在しており、ホルモンとしての活性をもつのはGluOCである (2-4) (図2)。本稿では、糖・エネルギー代謝の調節、雄の生殖機能、脳の発育・発達の調節等に大きく関わるということが報告されて、注目を集めている (2-6)。

骨の成分 (1, 000g)

700g: ヒドロキシアパタイト



80g: 水

220g: タンパク質

194g コラーゲン

26g 非コラーゲン性タンパク

4g オステオカルシン 他にオステオネクチン オステオポンチン マトリックス Gla タンパク など

図1 骨の成分

キーワード: オステオカルシン, インスリン, インクレチン, 脂肪細胞

¹⁾九州大学大学院 歯学研究院口腔細胞工学分野 (〒812-8582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1)

²⁾九州歯科大学 応用薬理学分野 (〒803-8580 福岡県北九州市小倉北区真鶴 2-6-1)

E-mail: hirata1@dent.kyushu-u.ac.jp 原稿受領日: 2015年1月17日, 依頼原稿

Title: Organ network for preventing metabolic syndromes with a reference to the roles of osteocalcin

Author: Akiko Mizokami, Tomoyo Kawakubo-Yasuchochi, Hiroshi Takeuchi, Masato Hirata

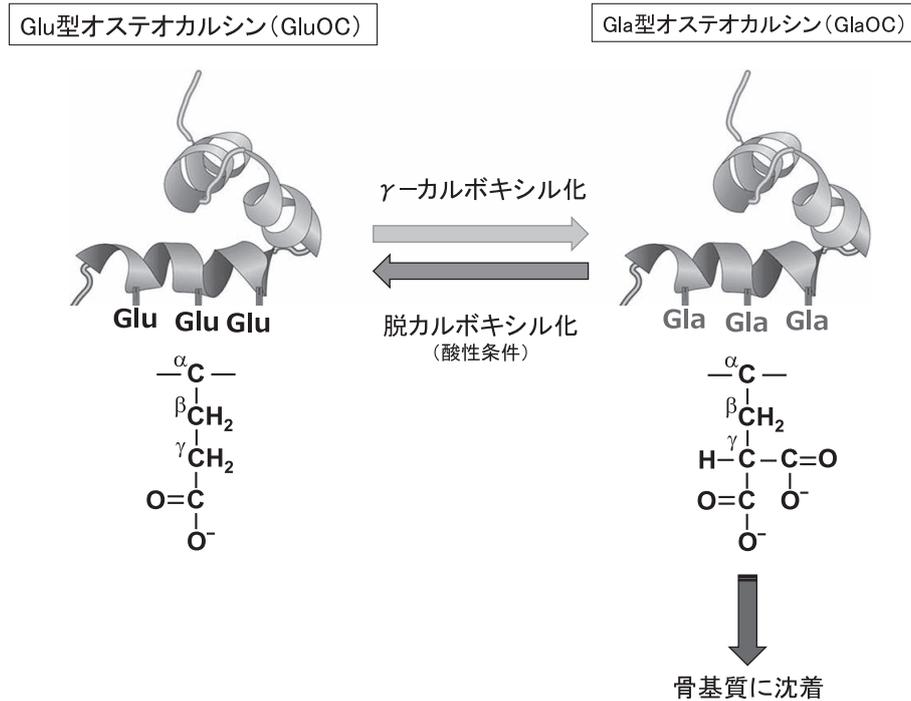


図2 オステオカルシンの翻訳後修飾 (γ -カルボキシル化)

ギー代謝を調節するホルモンとしてのオステオカルシンの役割について我々の最近の研究成果も織り交ぜて概説する。

2. オステオカルシンによるインスリン分泌作用

GluOCに糖・脂肪代謝を指向した内分泌作用があることは、2007年にKarsentyらのグループによって初めて報告された(2)。オステオカルシン欠損マウスは1996年に作成された(8)。同変異マウスは骨形成が亢進しており、野生型に比し高い骨密度を示したが、骨形成におけるオステオカルシンの機能は明らかにされないまま放置されていたようである。後になって変異マウスは内臓脂肪が著しく多かったと記載されている。改めてターゲットを見直して解析し、インスリン分泌量の減少およびインスリン感受性が低下し、そのために糖代謝異常を呈することが示された(2)。また、ラット β 細胞由来細胞株INS-1やマウス単離ラ氏島、あるいは脂肪細胞をGluOCで刺激するとインスリン、あるいはアディポネクチンの発現が誘導されることも示され、GluOCによる直接作用であることも分かった。一方、GlaOCにそのような効果は認められないことから、糖代謝調節に関してはGluOCが活性型であると考えられる(2)。次いで2010年になって、骨芽細胞特異的インスリン受容体ノックアウトマウスの解析から、以下の2点が明らかにされた。骨芽細胞におけるインスリンシグナリングは、①骨芽細胞の分化を阻害する

転写因子twist2の発現を抑制する。これによって骨芽細胞の分化が促進し、その結果オステオカルシンの合成が促進される(3)。②転写因子FoxO1の活性を抑えることによって破骨細胞の分化を抑制するオステオプロテジェリン(OPG)の発現を抑える。その結果、破骨細胞が活性化して骨吸収が亢進する。骨吸収窩の酸性環境(pH 4.5程度)はGlaOCを脱カルボキシル化し、ホルモン活性をもつGluOCへと変化させる(4)。すなわち、インスリンは骨に作用して骨形成・骨吸収の両面からGluOCの産生を促し、そのGluOCは膵臓に働きかけてさらにインスリンの合成・分泌を促進するという正のフィードフォワードループを形成している。その一方でGluOCは脂肪細胞のインスリン感受性を高め、エネルギー源の利用効率を亢進するため、「骨の代謝回転→インスリンシグナリングの活性化→エネルギー代謝活性化→骨代謝活性化」というポジティブサイクルが成立する(図3)。

3. オステオカルシンの受容体

このような機構が提唱された当時、オステオカルシンの受容体とそのシグナル伝達経路は不明であったが、2011年にPiら(9)およびKarsentyら(5)によって三量体Gタンパク質共役型受容体(GPCR)のclass C/group 6/subtype AのGPCRC6AがGluOCの受容体の候補として同定された。GPCRC6Aは Ca^{2+} 感知受容体や代謝型グルタミン酸受容体と同じクラスに分類されることか

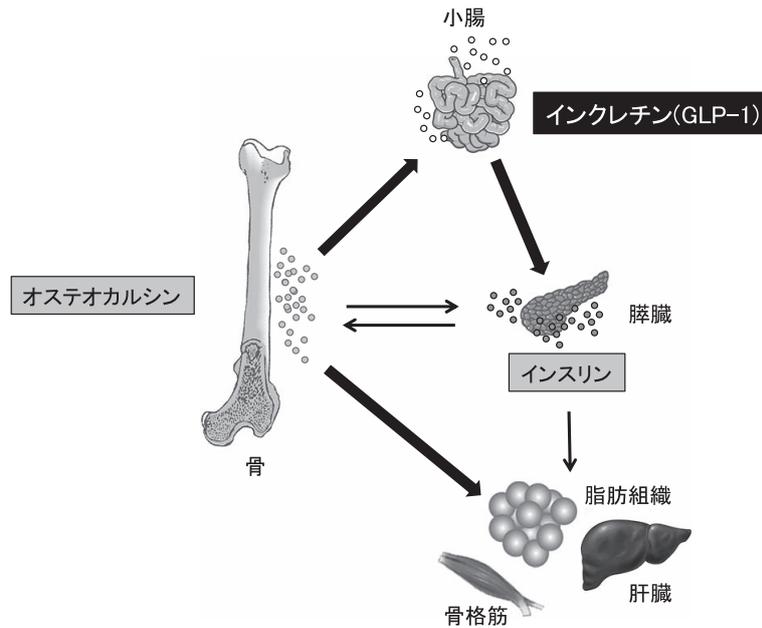


図3 オステオカルシンによる多臓器作用（一部）

ら、細胞外の Ca^{2+} やアミノ酸（L-オルニチン、L-アルギニンなど）の受容体として研究されてきた(10-12)。その後テストステロン、GluOC などの多様な分子をリガンドとして認識することが明らかとなった(5, 9, 13)。

GPRC6A は膵臓ランゲルハンス島をはじめ、消化管、精巣、脳など全身に広く発現し、そのノックアウトマウスの解析から、エネルギー代謝や骨代謝、雄の生殖機能など様々な生体機能の恒常性維持に関与していることが明らかにされている(14)。膵臓特異的 GPRC6A 欠損マウスではグルコース負荷時のインスリン分泌が著しく障害されること、GPRC6A 欠損マウス由来のラ氏島を GluOC 刺激してもインスリンの発現が誘導されないことなどから、特に膵 β 細胞においては主に GPRC6A が GluOC の受容体として機能していると考えられている(15)。しかし、GluOC と GPRC6A の直接的な結合は未だ示されておらず、また、Gla 型が無効であることの機序も不明である。加えて GluOC の GPRC6A を介した具体的なシグナル伝達経路も未だ十分に明らかにされていない。GPRC6A が真に GluOC の受容体であるのか、さらなる検証が必要である。

4. オステオカルシンによるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) 分泌作用

骨と代謝との相互関連機構の中で、我々は GluOC がインクレチンホルモンのひとつである GLP-1 の分泌を促すという経路を明らかにした(16)。GLP-1 は、摂食刺激に反応して小腸の腸管内分泌 L 細胞から全身循環に分泌され、膵臓に発現する GLP-1 受容体を介して

血糖値依存的にインスリン分泌を促進するほか、 β 細胞の分化促進/アポトーシス抑制などの効果も有する(17, 18)。GLP-1 受容体は膵臓以外にも中枢神経系をはじめ様々な組織に発現しており、摂食抑制や心血管疾患の予防など多面的な GLP-1 の作用を仲介する。そのため、GLP-1 分解酵素（ジペプチジルペプチダーゼ IV : DPP-IV）の阻害薬に加えて GLP-1 受容体作動薬も 2 型糖尿病の治療薬として用いられている(19)。

マウス小腸上皮細胞由来細胞株 STC-1 では、GluOC が 100pg/ml から 10 ng/ml（ ~ 20 pM から ~ 2 nM）の範囲で濃度依存的に GLP-1 の分泌を増加させたが、30 ng/ml 以上の高濃度では効果が得られなかった(16)。この高濃度における効果の消失は、膵臓由来細胞株 MIN6 でも観察される。MIN6 では、GluOC が 0.03 ng/ml から 1 ng/ml の範囲でインスリンの発現を上昇させたが、1 ng/ml 以上の濃度では効果が見られなかった(20)。濃度範囲は異なるものの作用パターンは同じである。C57BL/6J マウス個体でも同様に、7 ng/g の GluOC を腹腔内投与すると血中の GLP-1 濃度が上昇したが、10 ng/g 以上の高用量では効果が認められなかった(16)。高濃度の GluOC が無効である機序は不明であるが、高濃度では β 細胞や小腸上皮細胞の分化に必要なサイクリン D2 と cdk4 の発現を抑制することが原因の 1 つと推察される(20, 21)。一方、GluOC を経口投与すると、用量依存的に血中 GLP-1 濃度は上昇するが、高用量による効果の抑制は認められなかった(16)。

STC-1 およびマウス小腸上皮細胞には GPRC6A が発現している(16)。また、免疫染色により GPRC6A が小

腸粘膜上皮細胞の内腔側および基底側に発現していることを確認した。さらに, GPRC6A 陽性細胞の 3.8% に GLP-1 が共に発現しており, GLP-1 陽性細胞の 51% が GPRC6A を発現していることも確認した(22)。これらのことは, GluOC による GLP-1 分泌作用が GPRC6A を介することを示唆している。

マウスに GluOC を投与した際の血中インスリン濃度の上昇は DPP-IV の阻害薬の併用によって増強され, GLP-1 受容体拮抗薬 exendin(9-39) の前投与によって抑制された(16)。この結果は GluOC によるインスリン分泌亢進は GLP-1 を介する間接作用であることを示唆している。一方, GluOC によるインスリン分泌作用は膵臓への直接的な作用であるとも報告されている(2-4, 9, 15)。直接作用と間接作用の共存というのが最も分かり易いが, 結論を得るには試験管内実験と動物個体を用いた実験を区別しながら解析し直す必要がある。

5. オステオカルシン長期投与による糖代謝への影響

血中 GluOC が高値になるような遺伝子変異マウスでは, 肥満や糖代謝異常が改善されることが明らかにされた(2-4, 23)。ヒトでも血中オステオカルシン濃度と血中アディポネクチン濃度, 内蔵脂肪, インスリン感受性等との間に正の相関があるという報告が相次いでいる。先に記載した 2007 年の初めての報告から今日までの 7 年の間に 80 編を超える報告がある。一部の代表的論文を掲載しておく(24-26)。

予防的あるいは治療的な観点からマウスに GluOC を長期間にわたって継続的に投与することによって全身の糖代謝はどのように変化するだろうか。野生型および種々の肥満モデルマウスに対して浸透圧ポンプを用いて持続的に GluOC を 4 週間に渡って投与すると, インスリンの発現・分泌上昇, 膵臓 β 細胞の増殖, 耐糖能およびインスリン抵抗性の改善等が認められた(20)。また, GluOC を毎日腹腔内に注射すると 4 週間で肥満および各種糖代謝指標の改善が見られ, 14 週間で高脂肪食による脂肪肝が劇的に改善された(27)。

前述のように, GluOC は経口投与でも GLP-1 やインスリンの分泌を促進する(16)。普通食で飼育した野生型マウス(健康マウス)に週 3 回, 3 ヶ月にわたって GluOC を経口投与したところ, 空腹時血糖の低下, 耐糖能の改善, 膵臓 β 細胞の増殖とそれに伴うインスリン分泌の増加, 性腺脂肪の減少, 脂肪細胞の小型化が認められた(28)。高脂肪高シヨ糖食で飼育した肥満モデルマウスでも同様の結果(改善効果)が得られた。

GLP-1 受容体拮抗薬 exendin(9-39) を前投与して同様の実験を行うと, 上記の改善効果は見られなかった。したがって, GluOC 長期経口投与による糖代謝改善効果の大部分は, 小腸から分泌される GLP-1 を介したものであると考えられる(22)。

6. 経口投与された GluOC の動態

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。しかし, 通常 GluOC のようなペプチド製剤は消化管で大部分が分解されることに加えて消化管を通過しながら血中に取り込まれなければならないことから, 十分な血中濃度が得られにくいという欠点がある。しかし, GluOC は経口投与後, 一部が有効な形で小腸へと到達し, 少なくとも 24 時間程度は留まって GLP-1 の分泌を促進し続ける可能性が明らかになった(22)。

GluOC (200 ng, およそ 10 ng/g 体重に相当) を経口投与し, 3, 6, 24 時間後の小腸内容物に含まれる GluOC 濃度を測定したところ, 投与後 3 時間後から小腸内容物中に約 0.07 ng の GluOC が検出され, その量は 24 時間後も概ね維持されていた(22)。このことは, 投与した GluOC の 99.9% 以上は, そのまま排泄されたり, 胃や小腸の消化酵素によって加水分解されたり, あるいは血中に取り込まれた(後述)後に尿中に排泄されるのであろうが, わずかな一部は消化管内に残留して内腔側から腸管内分泌細胞を刺激し得ることを示唆している。GluOC を腹腔内投与すると, 血中濃度は 30 分以内に一挙に上述の抑制的な濃度にまで上がる。次いで排泄等によって 60 分程度でほぼ元のレベルにまで下がる(未発表)。経口投与でも, 小腸上皮を介するのであろうが一部は吸収されて全身を循環し, 急激な血中濃度上昇は示さないが 3 時間後でも血清 GluOC 濃度は高い状態を維持していた(22)。GluOC を 4 週間継続して毎日投与したマウスでは, 血中 GluOC 濃度が対照群に対して約 2 倍になっていたことから, GluOC が消化管から全身の循環へ長時間にわたって供給され続け, 内腔側と基底膜側の両側から腸管内分泌細胞を刺激し続けることが可能であることが示唆された。

経口投与した GluOC の動態をさらに詳しく調べるために, 100 倍量の GluOC (20 μ g) を投与して分析したところ, 小腸内腔には 24 時間にわたって 10~15 ng の GluOC が存在し続けていた。また, 投与後の血中 GluOC 濃度は 3 時間で 1 ng 程度上昇し 24 時間経過してもこれが維持されていた(22)。この増加量は 100 倍少ない量の GluOC を投与したときと同程度であり, 消

化管からの吸収には上限があることが示唆される。以上のことから、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、全身の糖代謝を改善することが明らかになった。

7. 性差について

GluOCは経口投与でも代謝改善効果を発揮するため、糖尿病を含む生活習慣病の簡便な予防薬や治療薬としての応用が期待される。しかし、性差があることを知っておかなければならない。ヒトの疫学的調査から、血中GluOC濃度と糖・エネルギー代謝指標の相関には男女差があることが示唆されている(24, 29-31)。特に血中アディポネクチン濃度とGluOC濃度に関して、女性に見られる正の相関が男性では見られない(32)。

2型糖尿病の発症と性ホルモンとの間には密接な関連があり、例えば閉経後のエストロゲンの減少によって肥満・糖尿病のリスクは上昇すること(33-35)、血中のアンドロゲン濃度と2型糖尿病の罹患率に正の相関が見られることなどが知られている(36, 37)。一方、GluOCは代謝の調節作用に加えて、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た(5, 38)。実際、男性2型糖尿病患者の血中GluOC濃度と血中テストステロン濃度には有意な正の相関が認められることが報告されている(39)。我々も動物の解析を行う過程でGluOCの代謝改善効果には性差があることを示唆するデータを得ており、性差に関しては、今後さらなる検討が必要である。

8. おわりに

全身のエネルギー代謝の恒常性を保つ多臓器間ネットワークにおいて、骨はGluOCを介して積極的に関与していることが明らかになってきた。GluOCは、そのGLP-1分泌促進作用やインスリン分泌促進作用に加えて脂肪細胞にも作用してアディポネクチンの分泌も促す。また、GluOCは経口投与でも糖代謝改善効果を発

揮する。今後、受け手側にストレスの無い投与方法である経口投与によって血中GluOC濃度を適切に上げることに主眼をおいた肥満・メタボリックシンドロームの予防・治療法の確立を目指したい。

謝辞：本研究は科研費(24229009, 26861553)の補助を受けておこなわれたものである。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Shimada T, et al. *J Bone Miner Res.* 2004;19:429-435.
- 2) Lee NK, et al. *Cell.* 2007;130:456-469.
- 3) Fulzele K, et al. *Cell.* 2010;142:309-319.
- 4) Ferron M, et al. *Cell.* 2010;142:296-308.
- 5) Oury F, et al. *Cell.* 2011;144:796-809.
- 6) Oury F, et al. *Cell.* 2013;155:228-241.
- 7) Hauschka PV, et al. *Physiol Rev.* 1989;130:287-335.
- 8) Ducy P, et al. *Nature.* 1996;382:448-452.
- 9) Pi M, et al. *J Bone Miner Res.* 2011;26:1680-1683.
- 10) Clemmensen C, et al. *Br J Pharmacol.* 2014;171:1129-1141.
- 11) Pi M, et al. *Endocrinology.* 2012;153:4608-4615.
- 12) Oya M, et al. *J Biol Chem.* 2013;288:4513-4521.
- 13) Pi M, et al. *J Biol Chem.* 2010;285:39953-39964.
- 14) Pi M, et al. *PLoS One.* 2008;3:e3858.
- 15) Wei J, et al. *Diabetes.* 2013;63:1021-1031.
- 16) Mizokami A, et al. *PLoS One.* 2013;8:e57375.
- 17) Drucker DJ. *Cell Metab.* 2006;3:153-165.
- 18) Seino Y, et al. *J Diabetes Invest.* 2013;4:108-130.
- 19) Nauck MA. *Am J Med.* 2011;12:S3-18.
- 20) Ferron M, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:5266-5270.
- 21) Yang R, et al. *Cell Cycle.* 2006;5:180-183.
- 22) Mizokami A, et al. *Bone.* 2014;69:68-79.
- 23) Lacombe J, et al. *Mol Metab.* 2013;2:498-504.
- 24) Kanazawa I, et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:45-49.
- 25) Pittas AG, et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:827-832.
- 26) Kindblom JM, et al. *J Bone Miner Res.* 2008;24:785-791.
- 27) Ferron M, et al. *Bone.* 2012;50:568-575.
- 28) Otani T, et al. *Cell Signal.* In press.
- 29) Kanazawa I, et al. *Bone.* 2011;48:720-725.
- 30) Richards JB, et al. *Eur J Endocrinol.* 2009;160:265-273.
- 31) Rui X, et al. *Med Sci Monit.* 2014;20:711-719.
- 32) Buday B, et al. *Bone.* 2013;57:98-104.
- 33) Stubbins RE, et al. *Diabetes Obes Metab.* 2012;14:58-66.
- 34) Zhu L, et al. *Diabetes.* 2013;62:424-434.
- 35) Camporez JP, et al. *Endocrinology.* 2013;154:1021-1028.
- 36) Ding EL, et al. *JAMA.* 2006;295:1288-1299.
- 37) George JT, et al. *Clin Endocrinol.* 2013;79:100-104.
- 38) Oury F, et al. *J Clin Invest.* 2013;123:2421-2433.
- 39) Kanazawa I, et al. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:45-49.