

## 論文審査結果報告書

論文提出者氏名 柄 慎太郎

学位論文題目：Promotion of insulin-induced glucose uptake in C2C12 myotubes by osteocalcin

審査委員（主査）教授 自見 英治郎 印

（副査）教授 稲永 清敏 印

（副査）教授 松尾 拓 印

### 論文審査結果の要旨

【目的】 QOL の悪化に繋がるメタボリックシンドロームは、エネルギー代謝の異常が大きな問題となるが、近年、全身のエネルギー代謝の恒常性を調節する多臓器間のネットワークにおける骨代謝の積極的な関与が注目されている。すなわち、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)の一部が血中を循環して、標的組織に発現する特異的受容体 GPRC6A に結合し、膵臓β細胞からのインスリン分泌の促進や、脂肪細胞などのインスリン感受性の向上などに寄与することが明らかとなった。一方、糖・エネルギー代謝において主要な役割を担う骨格筋に対する OC の直接的な作用に関する報告はまだない。そこで本研究では OC による糖代謝調節機構の全容解明を目指し、骨格筋に対する OC の作用を骨格筋由来細胞株 C2C12 細胞を用いて検討した。

【方法と結果】 マウス由来筋芽細胞 C2C12 は 10% のウシ胎仔血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)にて培養した。筋管細胞への分化はコンフルエントになった細胞を 2% ウマ血清含有 DMEM 中で 2 日間培養し、その後培地を 1% ウシ血清アルブミン含有 DMEM に置換して、2 日毎に培地を交換しながら分化誘導開始 5 日後に実験に用いた。細胞内シグナル伝達に関連するタンパク質のリン酸化は各々の抗リン酸化タンパク質抗体を用いたウェスタンブロット法にて解析した。インスリン刺激による細胞のグルコース取り込み量変化は 2-デオキシグルコースの取り込み量を指標に測定した。筋管細胞に分化誘導した細胞を OC で刺激すると extracellular signal-regulated kinase (ERK) のリン酸化が亢進した。OC 刺激による ERK のリン酸化は protein kinase A (PKA) 阻害剤 H89 では抑制されなかったが、ERK のリン酸化キナーゼ MEK の阻害剤 U0126 で強く抑制され、phospholipase C 阻害剤 U73122 によって抑制される傾向を認めた。これは OC によって PKA 経路が活性化される脂肪細胞などとは別のシグナル経路を介することが示唆された。また、分化した筋管細胞を OC で長時間 (72 時間) 処理すると、細胞のインスリン刺激に伴う Akt のリン酸化が亢進した。この効果は OC 処理中に U0126 によって ERK 経路を抑制すると消失したことから、OC が ERK 経路を介してインスリン-Akt シグナル経路を亢進させていることが示唆された。更に、同様の OC 処理をすることで筋管細胞のインスリン刺激依存的なグルコース取り込み量も増加した。

【結論】 以上の結果から、OC は骨格筋の GPRC6A に直接作用して ERK 経路を活性化し、インスリン刺激依存的な Akt シグナル経路を増強して、骨格筋によるインスリン依存的なグルコース取り込みを増加させることが示唆された。本研究結果は、骨代謝と全身の糖代謝の連関の分子機構の解明を進め、血中 OC 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・治療法の確立等への応用が期待できる。本研究内容について申請者の柄 慎太郎氏に対し、主査と 2 名の副査で OC 刺激 72 時間後にインスリンの感受性が亢進するメカニズムについて質問したが、概ね適切な回答を得た。総じて、審査委員会では本論文を学位論文として価値あるものと判断した。