

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15962

研究課題名(和文)腸内細菌叢解析による骨粗鬆症のメカニズム解明と新治療開発の試み

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of osteoporosis and development of new treatment by analysis of intestinal microbiota.

研究代表者

灘谷 祐二(Nadatani, Yuji)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00634007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は腸内細菌叢の異常が骨粗鬆症の悪化因子となるという仮説のもとに、腸内細菌叢の是正というアプローチで骨粗鬆症の新しい治療法、予防法を確立することを目的とした。本研究の結果より、大腸細菌叢はエストロゲン欠乏マウスでは変化していることがあきらかとなり、腸内細菌叢はエストロゲン欠乏の影響をうけることがあきらかとなった。しかしながら、抗生剤投与および腸内細菌移植により、大腸細菌叢を変化させても、骨塩量の変化は小さいという結果となり、腸内細菌自体の骨塩に対する影響は小さい可能性が高いということがあきらかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、既報により提唱されてきた大腸細菌叢を変化させることによって骨粗鬆症を治療しようというアプローチは骨粗鬆症の治療として適していないことがあきらかとなった。しかしながら、本研究の結果よりエストロゲン欠乏により腸内細菌の変化、および腸内環境の変化は観察されているため、今後エストロゲン欠乏が腸内細菌叢に与える影響に注目した研究を進めていく必要があるということがあきらかとなった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that abnormalities in the intestinal microbiota would be an aggravating factor in osteoporosis. The purpose of this study was to establish a new treatment and prevention method for osteoporosis through the approach of correcting the intestinal microbiota. The results of this study showed that the colonic microbiota was altered in estrogen-deficient mice, and that the intestinal microbiota was affected by estrogen deficiency. However, even though the colonic microbiota was changed by antibiotic administration and intestinal bacterial transplantation, the change in bone mineral content was small, indicating that the effect of intestinal bacteria itself on bone mineral content was not large.

研究分野：消化器内科学

キーワード：骨粗鬆症 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腸内細菌叢異常 (dysbiosis) と関連疾患

近年の次世代型シーケンサーの開発により、細菌培養で検出できなかった種類の細菌や微量にしか存在しない細菌を根こそぎ検出可能なメタゲノム解析が可能となった。医学的には腸内細菌叢解析により、腸内細菌叢の微細な異常、いわゆる dysbiosis が様々な疾患の発生や病勢に関与することが明らかとなってきた。一例として、肥満症においては、腸内細菌叢が健康人と異なることが指摘された。面白いことに無菌マウスにこの肥満マウスの腸内細菌叢を移植するだけで、そのマウスも肥満となることが報告されており、腸内細菌叢の変化が病勢を考える上で重要であることが証明されている。原理としては、細菌そのものによる微小粘膜炎症だけではなく、腸内細菌叢の変化に伴う盲腸内の短鎖脂肪酸濃度の変化により、糞便中のカロリーに変化をきたしていることも原因と報告されている。他にもディスバイオーシスが関与しているとされる病態は多彩であり、今までに炎症性腸疾患や、2型糖尿病、動脈硬化、自閉症、肝硬変、肝癌などで腸内細菌叢の働きが証明されている。どの疾患においても、ディスバイオーシスが短鎖脂肪酸やコハク酸など食事由来腸内細菌代謝産物に影響を与え、生理活性を持った物質の腸内、体内濃度を変化させていることが病態に影響を与える一因と考えられており、腸管局所の微小炎症や細胞間タイトジャンクションの障害、腸管免疫反応を介した制御性T細胞 (Treg) 分化誘導作用腸管免疫などの細菌そのものによる影響と合わせて、プロバイオティクス療法、腸内細菌叢移植による腸内細菌叢の補正が様々な疾患の治療法となりえることが示唆されている。

Dysbiosis をおこす原因の一つは薬剤慢性投与である。

dysbiosis は薬剤の慢性投与でも引き起こされることが知られており、その代表的な薬剤にプロトンポンプ阻害薬 (PPI) がある。PPI は強力な胃酸分泌抑制作用を有し、胃潰瘍、逆流性食道炎など胃食道病変の治療に加え、抗血小板薬などによる薬剤性出血性胃潰瘍の予防として広く処方されている。PPI の胃に対する効果には異論はないが、本来胃で殺菌される細菌が必要以上に小腸、大腸に到達することにより、腸内細菌叢に異常を生じさせ、様々な疾患の原因となる可能性が指摘されている。実際にクロストリジウム・ディフィシル菌感染症では、PPI 起因性腸内細菌叢異常が発生のリスク、再発のリスクを上昇させることが明らかとなっている。他にも、この PPI 起因性腸内細菌叢異常が骨折、誤嚥性肺炎、ビタミン欠乏症のリスクであるという報告がある。PPI 以外にも免疫抑制剤であるステロイド剤の慢性投与なども腸管粘膜免疫の低下に伴う腸内細菌叢の変化が引き起こすことが報告されている。以上のように、高齢社会に伴う薬剤の慢性投与も、腸内細菌叢の変異に関わり、様々な疾病に影響を与えていると予測している。

骨粗鬆症

骨粗鬆症は WHO の定義では低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し骨折の危険性が増大する疾患とされている。骨粗鬆症学会の予防と治療ガイドラインによると本邦で大腿骨頸部もしくは腰椎で診断された骨粗鬆症患者は 1000 万人を超えるとされており、国民の健康寿命を規定する重大な要因の一つとなっている。特に閉経後の女性での骨折が問題となっているが、これはエストロゲン分泌低下による骨吸収が骨量減少を引き起こしているためであるとされている。現在骨吸収抑制作用を示すビスホスホネートが治療薬として広く使用されており、破骨細胞分化因子である RANKL をターゲットとしたデノスマブも使用できるようになった。しかし、現在の内服薬には、顎骨壊死や低カルシウム血症などの重篤な副作用のリスクがあるため、将来の骨粗鬆症のリスクから考えた予防ターゲットである妊娠可能年齢

女性に予防投与することは推奨されていない。このように、現在の投薬療法は骨量低下が認められてからの治療を主としており、発症予防という観点では不十分である。

骨粗鬆症と腸内細菌

現在のところ、骨粗鬆症と腸内細菌との関連を直接指摘した報告はない。しかし、関連既報では、ビタミン D とカルシウムの吸収が腸内環境の影響を強く受けることが報告されている。すなわち、ビタミン D は脂溶性ビタミンであり脂肪吸収能が低下する疾患では体内ビタミン D 活性が低下する。カルシウムは腸内細菌が競合消費すること、腸内細菌由来のプロピオン酸などによるイオン化が吸収を制御していることにより、腸管吸収段階で腸内細菌叢の影響を強く受ける。実際の臨床研究でも、肥満症や潰瘍性大腸炎、糖尿病、慢性腎不全など様々な Dysbiosis をおこす疾患で骨粗鬆症が起こり骨折リスクがあがっていることが報告されている。

本研究の特徴と過去の報告との関連

腸内細菌叢と関連し、乳酸菌製剤、もしくは抗生剤が骨粗鬆症に与える影響を検討した論文は実験動物レベルでは報告が少数存在する。すべてが動物モデルでの検討であるが、結果は様々であり、どの乳酸菌製剤や抗生剤が骨粗鬆症の改善に効果があるのか、メカニズムはどうなっているのかなど結論は出ておらず、未だ活発な議論をされている分野である。

2．研究の目的

我々は以上の知見より腸内細菌叢の異常が骨粗鬆症の悪化因子となるという仮説を立てた。本研究により腸内細菌叢の是正というアプローチで骨粗鬆症の新しい治療法、予防法を確立することを目的とした。

3．研究の方法

骨粗鬆症動物モデルを用いた腸内細菌叢が骨塩量に及ぼす影響の検討

既報で骨粗鬆症の検討で使われているエストロゲン欠如性骨粗鬆モデルマウス(8 週令の雌性マウスに対し子宮摘除術を施行した後さらに 4 週飼育する。:OVX マウス)を用いた。

(1)骨粗鬆症の評価

骨量は大腿骨を高分解能マイクロフォーカス X 線 CT スキャナー (マイクロ qCT) で測定し評価した。その上で Trabecular Thickness、Number などの骨パラメータを算出した。

(2)骨の組織学的検討

脱灰後薄切標本を用いて、骨構造に関するパラメータ (海綿骨量、骨梁幅、骨梁数など) を評価した。

(3)腸内細菌叢の計測

採取した検体から DNA の収量がよく、メタゲノム解析に適した DNA 調製方法である複合酵素法による細菌 DNA の抽出・精製を行った。抽出した DNA の 16SrRNA 遺伝子 V1-2 領域を PCR 増幅後、高速シーケンサーである Miseq (Illumina 社)を用いたバーコードシーケンシングに供した。得られた配列データの情報学的解析(Operational Taxonomic Unit:OTU 解析、データベース照会による菌種帰属)を介して細菌叢の菌種組成を明らかにした。

(4)骨粗鬆症関連分子の評価

種々の骨破壊、骨形成のマーカーをマウスにて測定した。また、腸管における IL-1 や TNF などのサイトカインやジャンクション蛋白などの局所の発現量を Real Time rt-PCR、Western Blotting、免疫染色などのテクニックで評価した。

4 . 研究成果

(1)腸内細菌叢の変化

我々の検討により OVX マウスとコントロールマウスの小腸細菌叢は α -diversity では有意な差がないことが明らかになった。それに対し、OVX により、大腸細菌叢の α -diversity は有意に減少することが明らかとなった。また大腸細菌叢では、主座標分析によってもコントロール群の細菌叢と OVX モデル群の細菌叢が異なることが明らかとなった。

また、両群とも再優勢のバクテリアは Firmicutes であったが、OVX により、大腸において二番目に優勢な Bacteroidetes の構成比率の減少傾向が認められることが明らかになった。

(2)大腸サイトカインの変化

我々の検討により、大腸の炎症性サイトカインである TNF- α の上昇がみとめられた。それに伴いジャンクション蛋白である ZO-1 の発現低下をみとめ、OVX によりいわゆるリーキーガットの状態になることがあきらかになった。

(3)骨に関するマーカーについて

マウスに OVX 処置を行うことにより、大腿骨の骨塩量は減少することがあきらかになった。また血中の骨吸収マーカーである CTX-1、骨形成マーカーである Ⅰ型プロコラーゲン-N-プロペプチド(P1NP)についてはともに上昇することがあきらかになった。

(4)抗生剤による腸内細菌の調整

まず、骨に対する腸内細菌の影響を観察するために、マウスに4週間の抗生剤カクテルの内服を自由飲水させた。大腿骨の骨塩定量、CTX-1、P1NP にて骨の状態を評価したところ、抗生剤による骨塩の変化、各種マーカーの変化はみとめられなかった。

(5)便移植による腸内細菌叢移植の影響

腸内細菌叢移植は、抗生剤投与後に便を5日間経口内服投与する方法でおこなった。OVX マウスに正常マウスの便を移植したところ、骨塩、骨吸収マーカー、骨破壊マーカーに変化をみとめなかった。また、反対に正常マウスに OVX マウスの便を移植した場合にも骨塩、骨吸収マーカー、骨破壊マーカーの変化はみとめられなかった。

(6)結論

以上の結果より、大腸細菌叢はエストロゲン欠乏の影響はうけることがあきらかとなった。しかしながら、大腸細菌叢を変化させることによる骨塩量の変化は小さく、腸内細菌自体の骨塩に対する影響は小さいということがあきらかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------