

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17282

研究課題名(和文)腸内細菌が骨-糖代謝-免疫ネットワークに及ぼす新機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel mechanisms by which intestinal bacteria affect bone-glycolytic metabolism-immune network

研究代表者

福原 瑶子(内田瑶子)(Fukuhara, Yoko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60779742

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):骨は全身を支えるだけでなく腸内細菌や免疫機能と関連して健康維持に重要な役割を担う器官であることが明らかになってきた。我々は腸内細菌による骨代謝・内軟骨性骨成長を制御する機構を、無菌状態『germ free (GF)』および菌保有『specific pathogen free (SPF)』マウスを使用し解析を行った。GF・SPFマウスの骨格解析や頭蓋骨由来骨芽細胞の解析より、常在細菌は破骨細胞、骨芽細胞を共に活性化し、骨代謝を活性化していること、母体GFおよびSPFマウスの胎児の肋軟骨から単離した軟骨細胞の解析より、母体の細菌層の存在が胎生期の内軟骨性骨形成を負に制御している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の仮説は母体腸内細菌叢が胎生期から胎児骨格制御を行うというものであり、その分子メカニズムを解明することは歯科のみならず産科・小児科学的にも重要な意義をもつ。腸内細菌叢は臓器のひとつであり、これらにより我々の健康が制御されているといっても過言ではない。近年、腸内細菌叢の影響は一個人だけでなく、母親・胎児間といった垂直的な影響も注目され始めているが、垂直的な腸内細菌叢と骨との関係についての報告は、ほぼ皆無である。本研究により胎児の骨格成長発育に影響を与える分子機構を明らかにすることで、妊娠前の状態がいかに胎児に影響を与えるか新しい知見を広く社会に広めることができ、国民の健康増進に寄与できる。

研究成果の概要(英文):Recently, there is accumulating evidence that bone is an organ that not only supports the whole body but also plays an important role in maintaining health in association with intestinal bacteria and immune function. In this study, we analyzed the mechanism that controls bone metabolism and endochondral bone formation by intestinal bacteria using germ-free (GF) and bacterial-carrying "specific pathogen free (SPF)" mice. From the skeletal analysis of GF and SPF mice and the analysis of calvaria-derived osteoblasts, gut microbiome activates both osteoclasts and osteoblasts and activate bone metabolism. Analysis of chondrocytes isolated from fetal costal cartilage suggests that the presence of maternal microbiome may negatively regulate endochondral bone formation during embryonic period.

研究分野：口腔衛生

キーワード：腸内細菌叢 無菌マウス 軟骨細胞 内軟骨性骨形成 母体腸内細菌 胎児骨格発達 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2012年に腸内細菌の有無が骨代謝に影響を及ぼすことが報告(Sjogren et al. 2012)されて以降、国内外で骨—腸内細菌の関係が注目されている。しかし、これまでの研究結果では、腸内細菌の有無が骨代謝に及ぼす影響はマウスの系統によって様々であり、一定の見解が得られない (Yan et al, 2016、Novince et al, 2017)。研究代表者らのグループは、日本で開発されたICR系統GFマウス(無菌マウス)とSPFマウス(常在菌マウス)を比較し、GFマウスではSPFマウスに比べ歯槽骨表面上の破骨細胞数が減少すること(Irie et al. 2014, Irie et al. 2015)を確認していた。同時に、GFマウスでは骨格が小さいことも確認していた。しかし、長管骨長、つまり身長を規定する内軟骨性骨成長に腸内細菌の有無が与える影響についての報告は全くなかった。

腸内細菌叢による影響は一個人だけでなく、母親—胎児間といった垂直的な影響も注目され始めていた。妊娠糖尿病の妊婦の腸内細菌叢は、正常な妊婦の腸内細菌叢よりも多様であることが報告された (Ferrocino et al., 2018)。さらに、母体が無菌マウスである場合や母体に抗生物質を投与した場合、胎児の免疫組織の発達や神経組織における炎症性因子の発現に影響があることから (Nakamura et al.,2012; Tormo-Badia et al.,2014; Castillo-Ruiz et al.,2018) 母体の腸内細菌叢が胎児の免疫・神経系の発達に大きな影響を与えることが示唆されていた。また、GFマウスを用いた高脂肪モデルでは、母親の腸内細菌叢が将来の子孫の代謝機能に影響を与えることが判明していた。このように母親の腸内細菌叢の有無が、胎児の免疫や神経組織に影響を与えることが明らかとなりつつあるものの、垂直的な腸内細菌叢と骨との関係についての報告は、ほとんど皆無であった。

2. 研究の目的

胎生期～成熟期にかけて腸内細菌が骨格形成に与える影響を細胞・分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

まず、腸内細菌叢の有無が骨格成長に与える影響を調べるため、8週齢の germ free (GF)マウス・specific pathogen free (SPF)マウスを用いて以下の解析を行った。

骨組織レベルでの石灰化状態の比較(下顎骨)

酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)陽性破骨細胞の比較(下顎骨)

頭蓋骨由来初代骨芽細胞における基質石灰化および転写調節因子発現の比較(頭蓋冠)

続いて、母体腸内細菌叢の有無が胎児の骨格形成に与える影響を確かめるため、GFおよびSPFマウス 18.5日齢胎児を用いて以下の解析を行った。

胎児体格の比較およびホールマウント骨格標本の比較

脛骨の組織化学的解析および脛骨の骨化部の比較

肋軟骨由来初代培養軟骨細胞の増殖能および長期培養における基質蓄積能の比較

4. 研究成果

(1) 常在細菌の有無が骨格成長に与える影響

8週齢 GF・SPFマウスの体重を比較すると、GFマウスと比較して SPFで体重が大きかった。さらに下顎骨を採取し、microCT解析を行ったところ、GFマウスと比較して SPFマウスの骨密度が低かった(図1)。また破骨細胞のマーカー蛋白である酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)の血清中濃度を比較すると SPFマウスの方が高く、下顎骨の組織切片上においても TRAP陽性破骨細胞の骨表面における存在が SPFマウスで顕著に多かった(図

2)

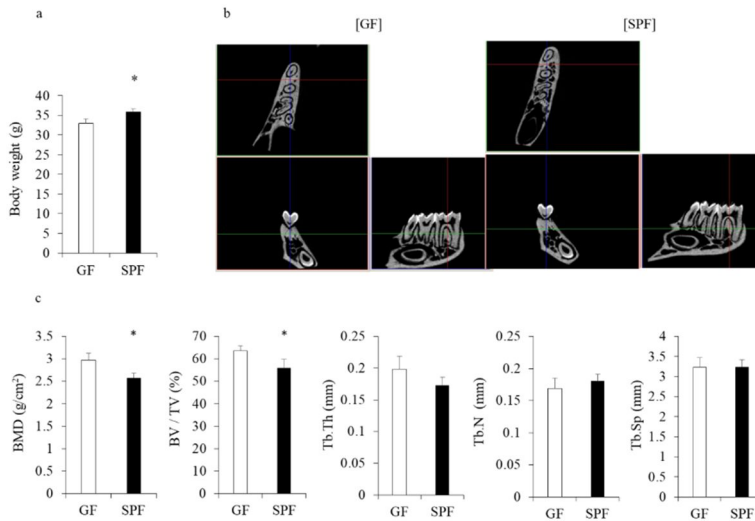


図1 a. 8週齢マウスの体重比較、b. 下顎骨のマイクロCT解析像、c. 骨測定パラメーター。

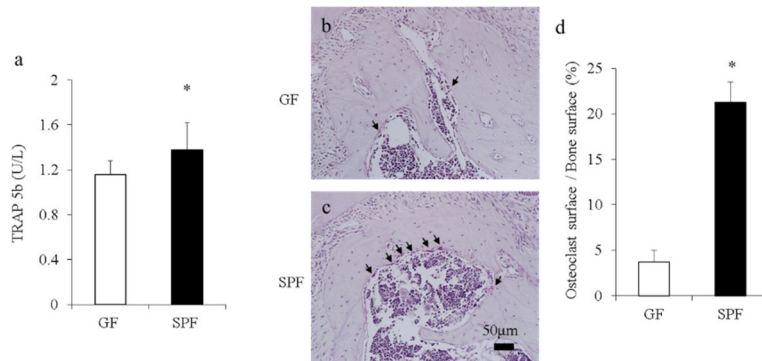


図2 a. 8週齢 GF・SPF マウスにおける TRAP 血清濃度、b,c. 下顎骨の TRAP 染色像、d. TRAP 陽性海綿骨の破骨細胞の表面長の海綿骨表面長に対する割合

次に 8 週齢 GF・SPF マウスの下顎骨より直接 RNA および蛋白成分を抽出し、PCR アレイ解析を行ったところ、SPF 群において GF 群と比較して著しい骨芽細胞分化マーカーのみでなく破骨細胞分化マーカー遺伝子の誘導が認められ、そのうちオステオカルシン蛋白およびカテプシン K 活性の SPF 群における上昇が認められた (図 3)。

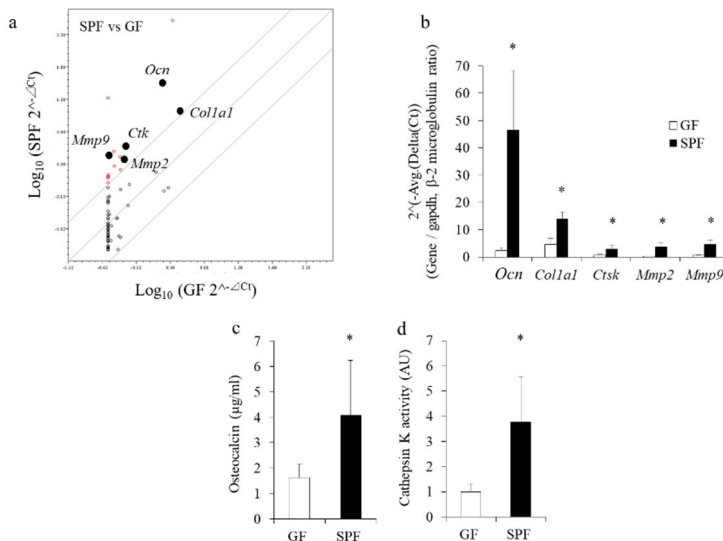


図3 a, b. 8週齢 GF・SPF マウス下顎骨より直接採取した RNA の PCR アレイ解析の結果。下顎骨抽出液中の c. オステオカルシン濃度、d. カテプシン K 活性。

さらに頭蓋冠より骨芽細胞を単離し、分化誘導培地中で培養を行った。分化誘導開始後5週間でアリザリンレッド染色性が SPF マウスで顕著に低かった(図4)。それぞれの骨芽細胞より RNA を精製し、遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR で解析した結果、分化誘導開始後3週間で OPG の遺伝子発現が SPF において有意に上昇していたが、5週間で違いは観察されなかった。一方、RANKL は分化誘導後3週、5週ともに SPF 群で有意に遺伝子発現の上昇が観察され、OPG/RANKL 比は5週目で SPF 群において有意に低下が観察され、SPF 群における破骨細胞の誘導を支持する結果となった。一方で、SPF 群におけるオステオカルシンの顕著な誘導を観察し、オステオカルシンによる石灰化の阻害作用を示唆するものであった。さらに骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼも有意に SPF 群において誘導が認められた一方で、1型コラーゲン遺伝子の発現は誘導されていなかった。さらに IGF-I, II の遺伝子発現も SPF 群で高く、これらの結果は SPF 群の骨芽細胞において GF 群と比較して骨芽細胞が活性化されており、また、破骨細胞の誘導能が高い事を示唆している。

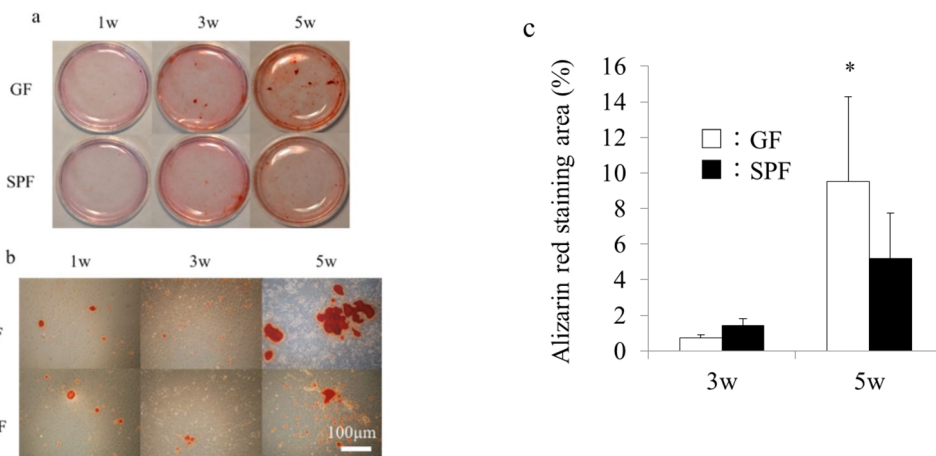


図4 8週齢 GF・SPF マウスの頭蓋骨より単離した初代骨芽細胞の分化誘導後のアリザリンレッド染色性の変化。a. 培養皿全体像、b. 細胞像、c. アリザリンレッド陽性石灰化領域面積の全体に占める割合

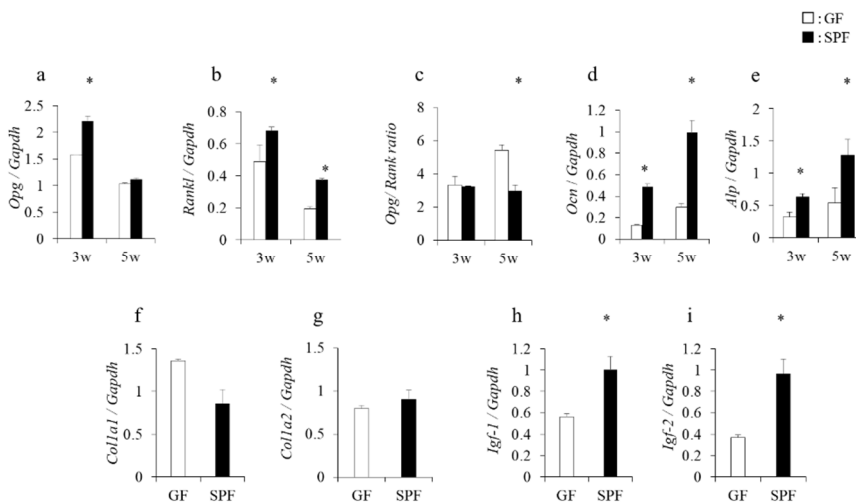


図5 8週齢 GF・SPF 頭蓋骨由来初代骨芽細胞より単離した RNA のリアルタイム PCR に

よる遺伝子発現変化解析。 *osteoprotegerin (Opg) gene* (a), *receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (Rankl) (b) gene*, the *Opg/Rankl ratio* (c), *osteocalcin (Ocn) (d) gene*, *alkaline phosphatase (Alp) (e)*, *collagen type I alpha (Colla) 1 (f) Colla2 (g) gene*.

次に骨芽細胞における遺伝子発現の変化が転写調節因子の発現の変化に由来するのか調べるため、PCR アレイ解析を行った。その結果、SPF マウスと GF マウス間で顕著な遺伝子発現の変化を認める転写調節因子を認めた。

(2) 母体腸内細菌叢の有無が胎児の骨格形成に与える影響

18.5 日齢 GF マウス胎児、SPF マウス胎児の頭殿長および体重に大きな差異は見られなかった。また石灰化領域、軟骨領域をそれぞれ染色した骨格標本では、GF マウス胎児、SPF マウス胎児の骨格に大きな差異は認められなかった。さらにマイクロ CT 解析の結果、SPF マウスの方が GF マウスと比較して骨化度が低い傾向があった。

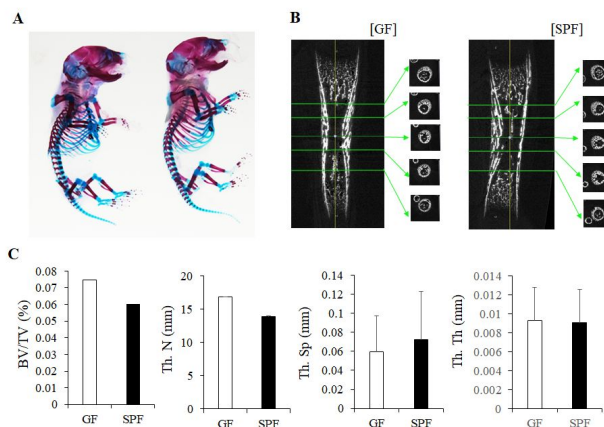


図7 18.5 日齢 GF・SPF 胎児の骨格比較 a. 透明標本、b. 脛骨のマイクロ CT 解析像、c. 骨測定パラメーター。

肋軟骨由来初代培養軟骨細胞の増殖能を比較したところ、SPF マウスの方が GF マウスと比較して増殖能が顕著に低かった。さらに長期培養における基質蓄積能の比較した結果、SPF マウスの方が GF マウスと比較して顕著に基質蓄積能が低かった。

(2)に関しては現在論文作成中である。

(1)の結果は菌を有することで骨芽細胞・破骨細胞双方を活性化することを示している。その機序は菌の有無が転写因子発現に影響を与えるものであり、エピジェネティックな変化を与えていることを示唆するものである。さらに(2)の結果から母体の細菌層の存在が胎生期の内軟骨性骨形成を負に制御している可能性を示している。菌の有無は骨格形成に関して生後影響を与えるのではなく、胎生期の段階から潜在的に影響を与えることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Taniguchi-Tabata A, Takeuchi N, Uchida Y, Ekuni D, Morita M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Association between maternal periodontal status and ultrasonographic measurement of fetal growth: A longitudinal study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 1402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-58396-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Toyama N, Ekuni D, Taniguchi-Tabata A, Yoneda T, Kataoka K, Yokoi A, Uchida Y, Fukuhara D, Saho H, Monirul IM, Sawada N, Nakashima Y, Iwasaki Y, Morita M.	4. 巻 68
2. 論文標題 Associations between sleep bruxism, sleep quality, and exposure to secondhand smoke in Japanese young adults: a cross-sectional study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sleep Med	6. 最初と最後の頁 57-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.sleep.2019.09.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Islam MM, Ekuni D, Toyama N, Kobayashi T, Fujimori K, Uchida Y, Fukuhara D, Taniguchi-Tabata A, Kataoka K, Iwasaki Y, Morita M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Relationship of Salivary Microbiome with the Worsening of the Periodontal Health Status in Young Adults: A 3-Year Cohort Study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Environ Res Public Health	6. 最初と最後の頁 E1764.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijerph17051764	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Uchida Yoko, Irie Koichiro, Fukuhara Daiki, Kataoka Kota, Hattori Takako, Ono Mitsuaki, Ekuni Daisuke, Kubota Satoshi, Morita Manabu	4. 巻 23
2. 論文標題 Commensal Microbiota Enhance Both Osteoclast and Osteoblast Activities	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1517 ~ 1517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules23071517	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fu Shanqi, Kuwahara Miho, Uchida Yoko, Kondo Sei, Hayashi Daichi, Shimomura Yuji, Takagaki Asami, Nishida Takashi, Maruyama Yusuke, Ikegame Mika, Hattori Atsuhiko, Kubota Satoshi, Hattori Takako	4. 巻 241
2. 論文標題 Circadian production of melatonin in cartilage modifies rhythmic gene expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 161 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1530/JOE-19-0022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 内田瑠子, 服部高子, フー・シャンキー, 近藤 星, 桑原実穂, 福原大樹, モハマドモニルルイスラム, 片岡広太, 江國大輔, 久保田聡, 森田 学
2. 発表標題 腸内細菌が胎生期内軟骨性骨形成に与える影響
3. 学会等名 岡山大学次世代研究拠点シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Uchida, Takako Hattori, Fu Shanqi, Sei Kondo, Miho Kuwahara, Daiki Fukuhara, Kota Kakaoka, Daisuke Ekuni, Satoshi Kubota, Manabu Morita
2. 発表標題 The impact of gut microbiome on embryonic endochondral ossification
3. 学会等名 第33回日本軟骨代謝学会 (新型コロナウイルスの影響にて延期)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Uchida, Koichiro Irie, Daiki Fukuhara, Kota Kataoka, Takako Hattori, Mitsuaki Ono, Daisuke Ekuni, Satoshi Kubota, and Manabu Morita
2. 発表標題 Commensal microbiota enhanced both osteoclast and osteoblast activities.
3. 学会等名 ASEAN-JAPAN Genome Medicine Research Promotion Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fu Shanqi, Miho Kuwahara, Yoko Uchida, Daichi Hayashi, Yuji Shimomura, Asami Takagaki, Takashi Nishida, Yusuke Maruyama, Mika Ikegame, Atsuhiko Hattori, Takako Hattori, Satoshi Kubota
2. 発表標題 Circadian production of melatonin and its receptors in cartilage influences chondrocyte rhythmic gene expression
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------