

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K11786

研究課題名(和文)腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸の骨代謝調節作用と作用機序の解明

研究課題名(英文)Regulatory effect and mechanism of short chain fatty acids produced by microbiota on bone metabolism

研究代表者

東泉 裕子(TOUSEN, Yuko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部・室長

研究者番号：20360092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では骨粗鬆症予防における腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸(酢酸、プロピオン酸、酪酸)の骨代謝への作用を明らかにするとともに、その作用メカニズムを検討した。破骨細胞前駆細胞において、短鎖脂肪酸は破骨細胞活性を抑制した。また、骨芽細胞様細胞において、酢酸は骨芽細胞への分化を促進する傾向を示した。閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける難消化性糖質の飼料添加により、盲腸内のプロピオン酸の相対濃度の増加および骨密度低下の抑制が認められた。以上の結果から、短鎖脂肪酸は骨密度の低下を抑制するとともに、骨代謝バランスにおいて有効に作用する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では高齢化が急速に進んでいることから、「健康寿命の延伸」への取り組みが求められている。日本において骨折は要介護の原因の第4位であることから、骨粗鬆症への対応は最重要課題のひとつといえる。本研究では、短鎖脂肪酸が骨密度の低下を抑制するとともに、骨代謝バランスにおいて有用である可能性を示唆した。本研究結果は、骨粗鬆症予防において食品摂取による新たな役割を提示しており、高齢化社会の日本において社会的に意義のある研究と考えられる。また、腸内細菌を介した短鎖脂肪酸の骨代謝における作用メカニズムを示しており、学術的な独自性も認められる。

研究成果の概要(英文)：We determined the effect and mechanism of action of three short-chain fatty acids (SCFAs), namely acetic acid, propionic acid and butyric acid, produced by the gut microbiota on bone metabolism, ultimately leading to the prevention of osteoporosis. The SCFAs suppressed the osteoclast activity of osteoclast precursor cells. Acetic acid tended to promote the differentiation of osteoblast-like cells into osteoblasts. In a postmenopausal osteoporosis model, mice fed a diet supplemented with indigestible saccharide displayed increased relative concentration of propionic acid in the cecum, and a decrease in bone mineral density was suppressed. The results suggest that SCFAs may suppress osteoporosis-associated decrease in bone mineral density and are useful for maintaining the balance of bone metabolism.

研究分野：骨粗鬆症、健康食品の安全性・有効性評価、骨代謝、食品、栄養

キーワード：骨代謝 短鎖脂肪酸 酢酸 プロピオン酸 酪酸 骨粗鬆症 腸内細菌叢 難消化性糖質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では高齢化が急速に進んでいることから、「健康寿命の延伸」への取り組みが求められている。骨折は要介護の原因の第4位であり、要介護の者の12%を占めることから骨粗鬆症への対応は最重要課題のひとつといえる¹⁾。女性は閉経期を迎えると血中エストロゲン濃度の低下により骨粗鬆症など生活習慣病のリスクが増加するが、その発症には食事や運動等の生活習慣が関わっていることから、それらの改善による予防が期待されている。近年、腸内細菌叢が宿主の免疫機能やエネルギー調節等に関与することで、様々な疾患に影響を及ぼすことが見出されている²⁾。また、それらの生理作用の一部は腸内細菌が食物繊維等の難消化性糖類から産生する短鎖脂肪酸の働きによることが報告されており、その作用は腸管内だけでなく肺や脂肪組織などの局所、ならびに全身の炎症・免疫系において報告されている^{3,4,5)}。

一方、骨と炎症・免疫系はサイトカインなど多くの制御たんぱく質を共有し密接に関係していることから、骨の健康維持において、骨-腸内細菌シグナリング経路が重要な役割を果たしていることが示唆されている⁶⁾。現在までに、無菌マウスでは大腸や骨での炎症性サイトカインの遺伝子発現量が減少するとともに骨量が増加したことが、骨粗鬆症モデルマウスへの乳酸菌の投与は、エストロゲン欠乏に起因する骨髄の炎症性サイトカインの遺伝子発現の増加を抑制するとともに、骨密度の低下を抑制したことが報告されている⁷⁾。また、*Tousen et al.* は、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける難消化性でんぷんの摂取は、腸内細菌叢を含む腸内環境を改善し、閉経に起因する骨密度の低下を抑制するとともに、骨髄の炎症性サイトカインおよび破骨細胞分化誘導因子遺伝子発現の増加を抑制することを見出している⁸⁾。

一方、先行研究において、難消化性糖類摂取により、腸管において産生された短鎖脂肪酸のミネラル吸収促進を介した骨量低下抑制作用は報告されているが、短鎖脂肪酸の炎症・免疫系を介した骨代謝調節に関しては検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では骨粗鬆症予防における腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸の骨代謝への作用を明らかにするとともに、骨代謝および炎症・免疫系調節における短鎖脂肪酸の新規作用メカニズムを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 短鎖脂肪酸の破骨細胞における骨吸収への作用を検討した

マウスマクロファージ様破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を用いた。RAW264.7 細胞は 10% FBS, 1% ペニシリンストレプトマイシン含有 -MEM において、37℃, 5%CO₂ 環境下で培養した。RAW264.7 細胞を播種後 24 時間培養した後、RANKL を培地に添加し破骨細胞へ分化誘導をおこなった。RANKL の添加と同時に短鎖脂肪酸(酪酸, プロピオン酸, 酢酸)を添加し 4 日間培養した後、RAW264.7 細胞の細胞活性に与える影響について、MTS アッセイを用いて評価した。同様に、RANKL の添加と同時に短鎖脂肪酸を添加し、短鎖脂肪酸の破骨細胞分化への作用を TRAP 活性測定により評価した。

(2) 短鎖脂肪酸の骨芽細胞における骨形成への作用を検討した

マウス頭蓋冠由来細胞 MC3T3-E1 細胞を用いた。MC3T3-E1 細胞は、10% FBS, 1% ペニシリンストレプトマイシン含有 -MEM において、37℃, 5%CO₂ 環境下で培養した。MC3T3-E1 細胞を播種後 24 時間培養した後、短鎖脂肪酸(酪酸, プロピオン酸, 酢酸)を添加し 3 日間培養した後、MC3T3-E1 細胞の細胞活性に与える影響について、MTS アッセイを用いて評価した。同様に、播種 24 時間後に短鎖脂肪酸を添加し、短鎖脂肪酸の骨芽細胞分化への作用をアルカリフォスファターゼ染色により評価した。短鎖脂肪酸の骨形成関連遺伝子発現に対する作用を qRT-PCR 法により評価した。また、陽性対照として、短鎖脂肪酸添加と同じタイミングで L(+)-アスコルビン酸および β-グリセロリン酸を添加し評価した。

(3) 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸(酪酸, プロピオン酸, 酢酸)の骨密度低下に対する作用、およびその作用メカニズムを検討した

8 週齢 ddY 雌性マウスに偽手術 (Sham 群) あるいは卵巣摘出手術 (OVX 群) を施し閉経後骨粗鬆症モデルマウスを作成した。閉経後骨粗鬆症モデルマウスに大腸内で短鎖脂肪酸を特異的に供給する難消化性糖質を含む飼料、すなわち、N アセチル-D-グルコサミン (GNA) を含む飼料 (OVX + GNA 群), N-アセチルノイラミン酸 (NA) を含む飼料 (OVX + NA 群), あるいはフコース (FC) を含む飼料 (OVX + FC 群) を 6 週間摂取させた。マウスの大腿骨骨密度、盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度および糞便中の腸内細菌叢を評価した。

4. 研究成果

(1) 短鎖脂肪酸の破骨細胞における骨吸収への作用

MTS アッセイにおいて、50mM プロピオン酸および 5mM 酪酸は細胞増殖を有意に抑制したが、酢酸は細胞増殖に影響しなかった。酢酸、プロピオン酸、酪酸添加により、対象群と比較し TRAP 活性が有意に抑制された。これらの結果より、酢酸、プロピオン酸、酪酸は破骨細胞への分化を抑制する可能性が示唆された。

(2) 短鎖脂肪酸の骨芽細胞における骨形成への作用

MTS アッセイにおいて、50mM 酢酸、5mM プロピオン酸および 5mM 酪酸は細胞増殖を有意に抑制した(図1)。短鎖脂肪酸添加 2 日後のアルカリフォスファターゼ遺伝子発現量において、短鎖脂肪酸添加群は対象群と比較し高値であった。アルカリフォスファターゼ染色において、酢酸添加は対象群と比較しアルカリフォスファターゼ陽性細胞の増加傾向が認められた。これらの結果より、酢酸は骨芽細胞への分化を促進することにより骨形成に作用する可能性が示唆された。

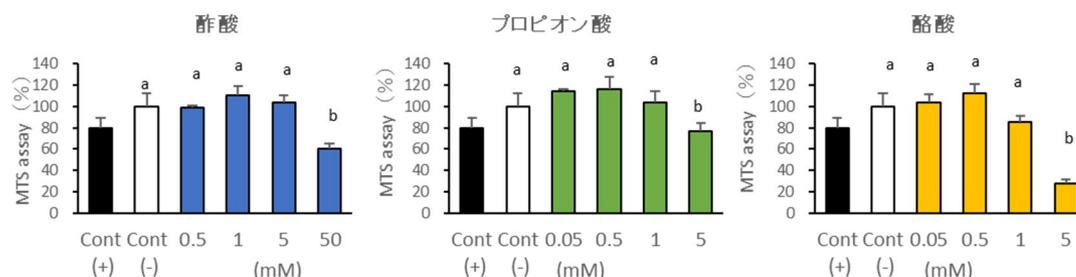


図1 短鎖脂肪酸がMC3T3-E1細胞の細胞活性に与える影響

Cont(+): 陽性対照群、Cont(-): 対照群。

値が等分散の場合、Cont(+を除いた5群間で分散分析を行った後、Tukeyの多重比較検定を行った。値が等分散でない場合、クラスカル=ウォリス検定を行った後、Scheffeの多重比較検定を行った。有意水準は5%とした。

a, b: 異なる記号間で有意差あり。

(3) 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける腸内細菌により産生される短鎖脂肪酸(酪酸、プロピオン酸、酢酸)の骨密度低下に対する作用および短鎖脂肪酸の作用メカニズム

飼料摂取量および最終体重において、すべての群間で有意差は認められなかった。大腿骨全体の骨密度は Sham 群と比較し OVX 群は有意に低値であったが、OVX + FC 群はエストロゲン欠乏に起因する骨密度の低下が有意に抑制された(図2)。OVX + FC 群における盲腸内容物中のプロピオン酸の相対濃度は他の群と比較し有意に高値であった。OVX + FC 群および OVX + NA 群は OVX 群と比較し腸内細菌叢の組成が異なっていた。これらの結果より、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける FC 摂取は骨密度低下を抑制する可能性を示すと同時に、その作用機序として腸内細菌叢や腸内代謝産物のプロピオン酸が関与している可能性が示された。

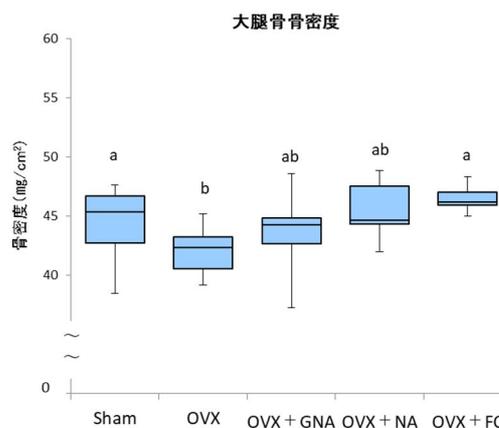


図2 短鎖脂肪酸が大腿骨骨密度に与える影響

Sham: 偽手術群、OVX: 閉経後骨粗鬆症モデル群、OVX+GNA: 閉経後骨粗鬆症モデル+GNA飼料摂取群、OVX+NA群: 閉経後骨粗鬆症モデル+NA飼料摂取群、OVX+FC群: 閉経後骨粗鬆症モデル+FC飼料摂取群。

分散分析を行った後、Tukeyの多重比較検定を行った(p<0.05)。

a, b: 異なる記号間で有意差あり。

研究全体の考察

今回の研究結果より、短鎖脂肪酸は骨密度の低下を抑制するとともに、骨代謝バランスにおいて有効に作用する可能性が示唆された。本研究結果は、骨粗鬆症予防において食品摂取による新たな役割を提示しており、高齢化社会の日本において社会的に意義のある研究と考えられる。また、本研究結果は、腸内細菌を介した短鎖脂肪酸の骨代謝における作用メカニズムの可能性を示唆しており、学術的にも国内外にインパクトを与える結果であると思われる。一方、短鎖脂肪酸が骨代謝メカニズムを介して骨密度低下を抑制する可能性を示唆したが、研究実施期間中に炎症・免疫系調節を介した短鎖脂肪酸の作用メカニズム解析は十分に実施することができなかった。今後は短鎖脂肪酸の炎症・免疫系を介した骨密度低下に関する詳細なメカニズムを検討する必要がある。

< 引用文献 >

- 1) 厚生労働省. 2019 年国民生活基礎調査の概況. 2020. <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa19/dl/14.pdf>.
- 2) Honda K, Littman DR. The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2012. 30:759-95.
- 3) Khan MT, Nieuwdorp M, Bäckhed F. Microbial modulation of insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2014. 20(5):753-760.
- 4) Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, Gordon JI. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. 105(43):16767-72.
- 5) Macia L, Tan J, Vieira AT, Leach K, Stanley D, Luong S, Maruya M, Ian McKenzie C, Hijikata A, Wong C, Binge L, Thorburn AN, Chevalier N, Ang C, Marino E, Robert R, Offermanns S, Teixeira MM, Moore RJ, Flavell RA, Fagarasan S, Mackay CR. Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. *Nat Commun*. 2015. 1;6:6734.
- 6) Li JY, Chassaing B, Tyagi AM, Vaccaro C, Luo T, Adams J, Darby TM, Weitzmann MN, Mulle JG, Gewirtz AT, Jones RM, Pacifici R. Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *J Clin Invest*. 2016. 126(6):2049-63.
- 7) Sjögren K, Engdahl C, Henning P, Lerner UH, Tremaroli V, Lagerquist MK, Bäckhed F, Ohlsson C. The gut microbiota regulates bone mass in mice. *J Bone Miner Res*. 2012 Jun;27(6):1357-67.
- 8) Tousen Y, Matsumoto Y, Nagahata Y, Kobayashi I, Inoue M, Ishimi Y. Resistant Starch Attenuates Bone Loss in Ovariectomised Mice by Regulating the Intestinal Microbiota and Bone-Marrow Inflammation. *Nutrients*. 2019. 11(2):297.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kondo T, Chiba T, Tousen Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Short-chain fatty acids, acetate and propionate, directly upregulate osteoblastic differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Food Sciences and Nutrition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Tousen Y, Ichimaru R, Kondo T, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y	4. 巻 12(7)
2. 論文標題 The Combination of Soy Isoflavones and Resveratrol Preserve Bone Mineral Density in Hindlimb-unloaded Mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2043-2055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu12072043.	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 Tousen Y, Matsumoto Y, Nagahata Y, Kobayashi I, Inoue M, Ishimi Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Resistant Starch Attenuates Bone Loss in Ovariectomised Mice by Regulating the Intestinal Microbiota and Bone-Marrow Inflammation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 297 ~ 297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu11020297	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 3件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 東泉裕子
2. 発表標題 食品・食事レベルでの骨粗鬆症に関する栄養素・成分
3. 学会等名 第24回・25回日本病態栄養学会年次学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tousen Y, Kondo T, Chiba Y
2. 発表標題 Green tea catechin, epigallocatechin gallate, prevents bone loss in hindlimb-unloading mice
3. 学会等名 American Society for Nutrition (ASN), NUTRITION 2021 LIV (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東泉裕子、市丸亮太、近藤位旨、稲田全規、宮浦千里、石見佳子
2. 発表標題 非荷重モデルマウスの骨密度低下に対する大豆イソフラボンとレスベラトロールの併用摂取による作用
3. 学会等名 第66回日本栄養改善学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tousen Y
2. 発表標題 Combined effects of soy isoflavone and indigestible food components on equol production and bone mineral density.
3. 学会等名 The 7th International Conference on Food Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 東泉裕子	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メディカルプレス	5. 総ページ数 8
3. 書名 理学療法. 理学療法士に必要な栄養学の知識 6 栄養・食品成分と骨	

〔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
---------	---------