

機関番号：32658

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20700598

研究課題名（和文） 骨代謝に及ぼす食事中ミネラルの影響に関する分子栄養学的研究

研究課題名（英文） Effect of dietary minerals on bone metabolism by molecular nutritional procedure

研究代表者

勝間田 真一（KATSUMATA Shinichi）

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：10424681

研究成果の概要（和文）：高リン食投与および鉄欠乏食投与が骨代謝に及ぼす影響について分子栄養学的検討を行った。高リン食投与は破骨細胞分化誘導因子の mRNA 発現量の増加や小腸でのカルシウム吸収に関係する mRNA の発現量低下により、骨代謝に影響することが示唆された。また、これら mRNA の発現量の違いが高齢マウスにおける高リン食投与の影響の受けやすさに違いを及ぼしていることが示唆された。鉄欠乏食投与は骨形成関連遺伝子の mRNA 発現量を低下させること、小腸カルシウム吸収に関わる mRNA の発現量を低下させることにより、骨密度を低下させることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the effects of high phosphorus diet or iron deficient diet on bone metabolism by molecular nutritional procedure. High phosphorus diet increased mRNA expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and decreased mRNA expressions of intestinal calcium absorption-related factors. Dietary iron deficiency decreased mRNA expressions of osteoblast-related factors and intestinal calcium absorption-related factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：栄養科学

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：リン、鉄、骨代謝、カルシウム吸収

1. 研究開始当初の背景

生活の質(QOL)に大きな影響を及ぼす問題として、骨粗鬆症が挙げられる。骨粗鬆症に影響を与える要因として、遺伝、栄養、運動などが知られているが、栄養に関してはカルシウムに対する知見が多いのが現状である。カルシウムの摂取不足により、血中カルシウム濃度が低下すると骨からカルシウムが溶

出し、結果として骨が折れやすい状態になる。栄養の面から考えると、骨代謝に対してカルシウムの摂取は重要ではあるが、実際の骨代謝はカルシウムだけでなくその他の栄養素も密接に関わっている。これまでカルシウム以外のミネラル、特にリン、マグネシウム、鉄と骨代謝の関係について検討してきており、これらミネラルの過剰や欠乏によっても骨代謝に悪影響を及ぼすことを観察してき

た。

リンは日常の食生活では不足することはなく、逆に各種リン酸化合物が強化剤、乳化剤などの食品添加物として加工食品に広く利用されている関係で、摂取過剰が問題視されている。これまで、ラットやマウスを用いて骨代謝に対するリン過剰の影響について検討を行ってきた。その結果、高リン食投与は副甲状腺ホルモン(PTH)の分泌亢進を伴い、骨形成と骨吸収が亢進する高回転型の骨量減少を引き起こすことを観察した。この骨量減少の機構として、高リン食投与により分泌の亢進したPTHが骨における破骨細胞分化誘導因子(Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand: RANKL) mRNA 発現量を増加させ、破骨細胞数を増加させることが原因であることが考えられた。しかし、副甲状腺摘除ラットを用いた実験や食餌中にマグネシウムを添加した実験から、高リン食摂取時の骨量減少は二次性副甲状腺機能亢進症から始まるこの機構だけでは説明できず、リンの直接作用などその他の因子も関与することが示唆された。また、リンの過剰摂取はライフステージによってその影響の強さが変化することも報告している。

鉄は摂取不足になりやすいミネラルのひとつであり、その欠乏により鉄欠乏性貧血となる。鉄欠乏性貧血は栄養性貧血の中で最も占める割合が大きく、その発症率も世界的に高い。過去の研究により、ラットへ鉄欠乏食を投与すると、生体膜脂質の過酸化亢進やビタミン A、E 代謝の変動など生体内で様々な影響があらわれることをすでに報告している。人においても貧血のみならず、鉄欠乏は生体内反応にさまざまな影響を及ぼすことが報告されているが、その中で、鉄摂取量と骨密度に正の相関がみられると報告された。そこで、鉄欠乏食投与ラットの骨塩量、骨密度、骨強度を測定したところ、これらの低下が引き起こされることを観察した。また、その時に骨形成と骨吸収が低下していることも観察され、血清中活性型ビタミン D 濃度の低下がこの原因として考えられた。ビタミン D の活性化は肝臓と腎臓で行われる二つの水酸化反応である。その水酸化反応にかかわる酵素には鉄が補因子として必要なため、鉄の欠乏によりビタミン D の活性化反応が低下したことにより血清中活性型ビタミン D 濃度の低下につながったのではないかと推察された。また、骨の健康にとってはミネラルのみではなくタンパク質も重要である。過去の研究において、骨を構成する主要なタンパク質の一つである一型コラーゲンは鉄欠乏食投与により減少することが示唆された。この一型コラーゲンの生成反応にも鉄が関与する酵素が存在するため、このことも骨強度が低下する一要因だと考えられた。

以上のように、リン過剰や鉄欠乏はいずれも骨代謝に悪影響を及ぼすことが示唆されているが、その機構の詳細についてはまだ検討する必要がある。また、近年、栄養素と遺伝子の関係について様々な知見が報告されてきている。これには分子生物学的手法を用いた報告が多く、これらの手法をミネラル栄養学の分野に取り入れることにより、ミネラルと骨代謝の関係について更なる知見が得られるものとして考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、骨代謝に影響を及ぼすミネラルの中でもリンならびに鉄に焦点を絞り、リン過剰摂取もしくは鉄欠乏食摂取と骨代謝との関係について、分子栄養学的手法も取り入れて検討することで、カルシウム以外のミネラルと骨代謝の関係を明らかにするとともに、栄養素摂取と遺伝子発現の変動について関係性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、マウスまたはラットを用い、高リン食や鉄欠乏食を投与し、下記3つの実験を行った。また、実験動物を扱うにあたり、「動物の愛護及び管理に関する法律」を遵守し、東京農業大学実験動物委員会の承認を受けて動物実験を行った。

(1) 週齢の異なるマウスへの高リン食投与の影響

高リン食投与は若齢マウスに比べて高齢マウスへの悪影響が強いことを既に報告している。そこで、その詳細を検討するために、週齢の異なるマウスに高リン食を投与し、大腿骨中の骨代謝関連遺伝子および十二指腸中のカルシウム吸収関連遺伝子の mRNA 発現量について検討した。被験動物として12および80週齢 ddY 系雄マウスを用い、各週齢マウスを正常食(0.3%)群と高リン食(1.2%)群の2群に分け、4週間の飼育観察を行った。飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき作成した。解剖時に血清を得、大腿骨、十二指腸を採取した。大腿骨および十二指腸の mRNA 発現量は TaqMan probe を用いた Real-time PCR 法により解析を行った。

(2) 骨代謝に及ぼす鉄欠乏食投与の影響

ラットへ鉄欠乏食を投与し、大腿骨中各種骨代謝関連遺伝子発現量の違いを観察することで、鉄欠乏食投与時の骨塩量、骨密度、骨強度の低下の原因の詳細について検討した。被験動物として3週齢の雄性 Wistar 系

ラットを用い、飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき正常食と鉄欠乏食を作成し、4 週間の飼育観察を行った。解剖時に血清を得、大腿骨を採取した。血清はビタミン D、骨代謝マーカーの測定に用い、大腿骨は骨塩量、骨密度、遺伝子発現観察に用いた。大腿骨の各種骨代謝関連遺伝子の mRNA 発現量は TaqMan probe を用いた Real-time PCR 法により解析を行った。また、24 時間尿を採取し骨吸収マーカーの測定に用いた。

(3) 骨代謝に及ぼす鉄欠乏食投与とビタミン D の影響

鉄欠乏食投与ラットの十二指腸中カルシウム吸収関連遺伝子の発現を観察し、鉄欠乏投与時の骨代謝に及ぼす影響について検討した。被験動物として 3 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用い、飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき正常食と鉄欠乏食、さらには鉄欠乏食に活性型ビタミン D を添加した飼料を作成し、4 週間の飼育観察を行った。また、解剖前 3 日間の糞を採取し、カルシウム濃度を測定した。大腿骨は骨塩量、骨密度の測定を行った。十二指腸中のカルシウム吸収関連遺伝子の mRNA 発現量は TaqMan probe を用いた Real-time PCR 法により解析を行った。

4. 研究成果

(1) 週齢の異なるマウスへの高リン食投与の影響

血清中 PTH 濃度は両週齢マウスにおいて高リン食投与により有意に高値を示し、高リン食投与群間において 12 週齢マウスに比較し、80 週齢マウスで有意に高値を示した。十二指腸におけるカルシウム吸収に關与する ECaC2、CaBP9k、PMCA1b の mRNA 発現量は両週齢マウスにおいて高リン食投与により有意に高値を示し、ECaC2 および CaBP9k mRNA 発現量は高リン食投与群間において 12 週齢マウスに比較し、80 週齢マウスで有意に低値を示した。大腿骨における破骨細胞分化誘導因子である RANKL の mRNA 発現量は両週齢マウスにおいて高リン食投与により有意に高値を示し、正常食投与群間ならびに高リン食投与群間において、12 週齢マウスに比較し、80 週齢マウスで有意に低値を示した。また、おとりレセプターとして働く OPG mRNA 発現量に対する RANKL mRNA 発現量の比は、12 週齢マウスにおいて高リン食投与の影響はみられなかったが、80 週齢マウスにおいて高リン食投与により有意に高値を示した。以上より、高リン食投与若齢マウスと比較し高リン食投与高週齢マウスにおいて、PTH 分泌の増加、OPG mRNA 発現量に対する RANKL mRNA 発現量

の比の増加、カルシウム吸収に關係する遺伝子の mRNA 発現量の低下について、影響が強く観察されたため、これがライフステージの違いによる高リン食投与の骨代謝への影響の違いに關与している可能性が示唆された。

(2) 骨代謝に及ぼす鉄欠乏食投与の影響

4 週間の鉄欠乏食投与により、ヘモグロビン濃度、血清中活性型ビタミン D 濃度、骨形成マーカーである血清中オステオカルシン濃度、骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン排泄量の低下が観察された。また、大腿骨の骨塩量、骨密度の低下も観察された。大腿骨中の骨形成にかかわるタンパク質である一型コラーゲン、オステオカルシン、転写因子である Cbfa1 (core binding factor 1) の mRNA 発現量は鉄欠乏食投与により有意に低値を示した。以上のことから、ラットへの鉄欠乏食投与は、骨形成関連遺伝子の mRNA 発現量を低下させることにより、骨密度の低下を引き起こすことが示唆された。また、この遺伝子発現量の低下に血清中活性型ビタミン D 濃度の低下が關与していることが考えられた。

(3) 骨代謝に及ぼす鉄欠乏食投与とビタミン D の影響

4 週間の鉄欠乏食投与により、大腿骨の骨塩量、骨密度の低下やカルシウム吸収率の低下が観察されたが、活性型ビタミン D 投与によりこれらの低下は抑制された。十二指腸中カルシウム結合タンパク質の mRNA 発現量は鉄欠乏食投与により有意に低値を示したが、活性型ビタミン D 投与による影響は観察されなかった。以上のことから、ラットへの鉄欠乏食投与はカルシウム吸収を低下させるが、その機構として十二指腸中のカルシウム吸収に關わる mRNA 発現量を低下させることが關係していると推察され、このことも骨密度の低下を引き起こす一要因であることが示唆された。

以上のように、カルシウム以外のミネラル（リンと鉄）も骨代謝に影響を及ぼすことが示唆されたが、一部は生体内でのカルシウム代謝に影響を及ぼした結果であることが推察された。今後はこれらミネラルの骨代謝に対する直接的な影響の検討や、その他の微量元素についても同様に検討していく必要がある。さらに、骨以外の臓器（腎臓や小腸など）についても骨代謝にかかわるため、臓器間相互作用も含めて検討していく必要がある。また、ミネラル栄養学の研究に分子栄養学的手法を導入することにより、生体内で引き起こされる現象のメカニズムについて詳

細に検討できることが示された。したがって、ミネラルのみならず、栄養素摂取と遺伝子の関係について今後も検討していくことで、これまでに理解できなかった問題についても解決できる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

勝間田真一：鉄欠乏による脂質・骨代謝変動、第64回日本栄養・食糧学会大会、2010年5月21日～5月23日、アスティとくしま

勝間田真一：リンの過剰摂取と骨代謝変動、第53回日本薬学会関東支部、2009年10月3日、城西大学薬学部

勝間田真一、上原万里子、鈴木和春：マウスへの高リン食投与が骨形成関連遺伝子発現に及ぼす影響、第56回日本栄養改善学会学術総会、2009年9月2日～9月4日、札幌コンベンションセンター

勝間田真一、上原万里子、鈴木和春：マウス骨代謝関連遺伝子発現量に及ぼす高リン食投与および週齢差の影響、第63回日本栄養・食糧学会大会、2009年5月20日～5月22日、長崎ブリックホール

6. 研究組織

(1)研究代表者

勝間田 真一 (KATSUMATA Shinichi)
東京農業大学・応用生物科学部・助教
研究者番号：10424681

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

無