

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07813

研究課題名(和文) 鍼刺激が骨代謝ホルモンに作用する機序の基礎的研究—腸内細菌叢に及ぼす影響を中心に

研究課題名(英文) The Mechanisms of Bone Hormone Control with Acupuncture Stimulation via the Change of Gut Microbiota.

研究代表者

伊藤 俊治 (Itoh, Shunji)

関西医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：50275351

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)：予備的検討によって、マウスへの鍼刺激が血中ホルモン濃度に影響する可能性が示唆されていた。本研究で各種条件下で検討した結果、背部(B23)への刺激により血中Leptin濃度の上昇とそれに伴う骨密度の低下が、また下肢(Sp6)への刺激によって17-Estradiolの上昇が部位特異的に観察された。17-Estradiolの変化に着目、そのメカニズムを明らかにするため、卵巣の組織学的変化を調べたが大きな変化は見いだせなかった。そこで腸内細菌叢の関与を仮説し、Sp6鍼刺激に伴う腸内細菌叢の変化について検討した結果、sp6刺激による変化を見いだした。この変化は17-Estradiolの投与では起こらず、鍼刺激による変化と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オリンピックの開催を期に、国民の間でスポーツへの関心が高まっている。また高齢化社会を迎えて、運動・スポーツへの関心や社会的要請は大きい。人において運動器系の形成・機能維持は主にホルモンによって行われている。疾患や体維持のためのホルモンのコントロールは現在、主に薬剤によって行われているが、副作用も大きく、特にアスリートに対しては常にドーピングの危険が伴う。本研究では主に運動器系に作用するホルモンを対象として、そのコントロールを鍼刺激という外部からの薬剤投与によらない方法の可能性を検討し、一定の見通しを得た。またそのメカニズムの一つとして、腸内細菌叢の変化の可能性について知見を得られた。

研究成果の概要(英文)：Our preliminary studies suggest that acupuncture stimulation of mice may affect blood hormone levels. In this study, under various conditions, we observed an increase in blood Leptin concentration and a concomitant decrease in bone density after acupuncture stimulation of B23, while an increase in 17-Estradiol was observed after stimulation of Sp6. These changes were specific to the site of stimulation. To clarify the mechanism of acupuncture-induced changes in 17-Estradiol, we examined histological changes in the ovaries. However, there were no significant changes in ovarian tissue. Next, we hypothesized the involvement of the intestinal microflora and examined the changes in the intestinal microflora induced by Sp6 acupuncture stimulation and found several changes. Since the same changes did not occur with 17-Estradiol administration, we hypothesized that these changes in the gut microbiota were caused by acupuncture stimulation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：鍼灸 エストロゲン 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

鍼治療は日本をはじめ多くの国で行われており、様々な効果が報告されている。我々は、鍼刺激のエビデンスを得るため、主に動物実験により卵巣や運動器などへの効果や糖尿病への影響などを研究してきた。その結果エストロゲンやレプチンなど骨代謝に関係するホルモンが鍼刺激により上昇することを確認している。また糖尿病と骨代謝は密接に関わることも報告されており、我々の研究によって鍼刺激の作用機序を解明することで、骨粗鬆症や糖尿病などの疾患の予防・治療に寄与する事が期待できると考える。さらに鍼刺激の作用機序に関する我々の予備実験から、「鍼刺激に伴い腸内細菌叢にも変化が見られる」というデータをj得ている。近年、腸内細菌叢と慢性代謝疾患との関連性が注目されていることから、「鍼刺激が腸内細菌叢に変化を引き起こし、その結果ホルモン(レプチン、エストロゲン等)の変動を介して骨代謝に作用する」と仮説を立て、本研究を計画した。

我々はこれまで鍼刺激の骨代謝や糖尿病への影響を動物実験によって明らかにしてきた。近年摂食調節ホルモンのレプチンやエストロゲンなどのホルモンが骨芽細胞を活性化し(Takeda S., et al. *Cell* 111:305-317, 2002)それが活性化オステオカルシンの産生を介して脾臓細胞に影響する経路が見つかっている(Ferron M., et al. *Cell* 142:296-308, 2010)。また、糖尿病には骨折リスクがあることも知られ、糖尿病と骨代謝の関連は深い。

そこで、これらのホルモンへの鍼刺激の影響をマウスを用いて検討したところ、部位特異的な鍼刺激によりレプチンの血中濃度に変化が起こること、それに伴い骨密度も変動することが判った。

また我々は、別の科研費補助(課題番号 18K10911)により、女性アスリートの外傷受傷の可能性を低下させるために血中女性ホルモンを鍼刺激によって調整する研究をマウスを用いている。そこでエストロゲンを測定したところ、鍼刺激により血中エストロゲン濃度が上昇するとの結果を得た。

ただ、鍼刺激でレプチンやエストロゲンが変動するメカニズムは不明である。

近年、多くの研究者が腸内細菌叢の変化と生理機能、疾患との関係について注目しており、研究も盛んとなっている。腸内細菌の菌量、菌種数、産生代謝物濃度などは、宿主の免疫系、炎症反応、食物や体温などの環境条件によって多様な変化を示すことが分かっている。逆に、免疫系や炎症細胞への刺激、産生する代謝物質を介して、腸内細菌叢の変化は宿主に影響し、腸内細菌叢の変化は様々な疾患の発症に関わるとされている。

最近、血中エストロゲン濃度を上昇させる腸内細菌群(Estrobiome)が注目され、Estrogen-Gut Microbiome Axisが提唱されている(reviewed in *Maturitas* 103:45-53, 2017)。内分泌系と腸内細菌叢の関連も注目されている。またレプチンに関してもレプチン変異マウスは抗生剤を経口投与で耐糖能が改善する事(Membrez M., et al. *FASEB J.*, 22:2416-2426, 2008)が報告されており、腸内細菌との関連が指摘されている。

これまでに鍼治療の作用メカニズムについては、多くの研究がなされている(Interlandi J, *Scientific American*, 2016など)が、腸内細菌に着目したものはまだあまりない。これらの先行研究から我々は「鍼刺激が腸内細菌叢に変化を引き起こし、その結果ホルモン(レプチン、エストロゲン等)の変動を介して骨代謝に作用する」と着想した。

2. 研究の目的

本研究では、鍼刺激と腸内細菌叢の関係を仮説し、(1)鍼刺激がどのような機序により、どのような腸内細菌に作用しているか検証すると共に、従来のプロバイオティクスや糞便移植などとは異なる(2)新しい腸内細菌叢コントロール法として、鍼刺激を応用できるようにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ICR マウスまたは C57BL/J マウス、Wister 系ラットなどを用い、イソフルラン麻酔下でセイリン社製 J15SP タイプ 01 (0.14mm) 5 分(15mm)の鍼を用いて鍼刺激を行った。鍼刺激は週二度、一回 15 分を 5 週間行うのを基本とし、刺激量を揃えた。対照群は予備麻酔を含めた麻酔時間を鍼刺激群と同じに設定した動物群で行った。計 10 回の鍼刺激後、深麻酔下で屠殺しサンプリングした。サンプルは大腿骨、卵巣、腓腹筋、前十字靭帯などの組織標本の他、血清及び盲腸内容物を採取した。大腿骨標本は骨密度測定をキャノン・ライフケアソリューションズへ依頼、盲腸内容物を用いた腸内細菌のメタゲノム分析は、コスモバイオ社の腸内環境改善研究受託サービスを利用した。他のサンプルは保存後、組織化学的・生化学的・分子生物学的解析の対象とした。

4. 研究成果

(1) SP3 部位刺激と 17 Estradiol

研究対象として、更年期障害による骨粗鬆症などを想定し、エストロゲンを鍼刺激でコントロールできるかについて検討した。刺激部位を決定するため、伝統的鍼灸治療で婦人病に使用される部位を検討した(表1)。三陰交の使用例が最も多かったため、三陰交相当部位(SP3)を刺激部位として鍼刺激を行い、ELISA 法で血中 17 Estradiol 濃度を測定した。単純な比較では特に差は見られなかったが、サンプリングを発情期に行うと鍼群で 17 の上昇が認められた(図1a)。17

の供給源を検討するため、卵巢の最大径断面積を測定したが、鍼群で増加の傾向が認められたが差は小さかった(図1b)。

そこで、他の原因を探るため、腸内細菌叢のメタゲノム解析を行った。その結果、鍼群と対照群の間に違いが認められた(図2)。

腸内細菌叢の変化と 17 の変化の間の因果関係を探るため、17 の徐放性ペレットを頸部に留置する実験を行った。0.25mg/21days のペレットを留置後 5 週後に盲腸内容物を採取、Sham-ope 群との間で比較を行ったが、差は見いだせなかった(図3)。これらの結果から、SP3 相当部位への鍼刺激によって、発情後期に 17 の血中濃度の上昇が起きる。卵巢サイズの変化は小さいことから、卵巢の肥大によるものではないことが考えられ、一つの可能性として腸内細菌叢の変化が示唆された。

17 血中濃度の上昇が、運動器にどのような影響をもたらすかも併せて検討した。女性の ACL 損傷がエストロゲンと関係しているとの報告(Hewett et al. *Am J Sports Med*, 35(4):659-668, 2007)があったので、17 ペレット留置群と sham-ope 群から前十字靭帯を採取、引っ張り強度測定装置で最大破断強度を測定したところ、有意な差が得られた。このことから、鍼刺激によって 17 濃度を増すことで ACL 損傷リスクを減少させられるとの応用可能性が示唆された。

研究期間中のコロナ禍によってやや研究が停滞したこと、サンプリング上の問題によって実験対象動物の変更などがあったため、現在も条件を全て統一しての再現性チェックを実施中である。

経絡名	経穴名	経穴数	経絡名	経穴名	経穴数	経絡名	経穴名	経穴数
大腸経	合谷	1	腎経	然谷	3	肝経	大敦	2
	三里	2		水泉	7		行间	3
	曲池	2		照海	2		太衝	4
胃経	天枢	8	交信	3	厥陰	3	陰包	4
	氣衝	9	陰谷	2	陰廉	4	陰門	1
脾経	隱白	1	氣穴	6	任脈	会陰	2	
	三陰交	18	中注	3		中極	17	
	地機	1	四滿	6		關元	8	
	血海	7	心包経	関使		8	氣海	11
小腸経	太溪	1	三焦経	支溝	3	背穴	百勞	1
膀胱経	風門	1	胆経	委中	11		陰交	7
腎経	腎俞	8	五枢	1	奇穴	百勞	1	
	膀胱俞	1	足臨泣	4		交維	5	
	白環俞	1	臨泣	5		交維	5	
	中膠	5	俠溪	2		陰廉	4	
	合陽	1						

表1 月経不順に関する文献的考察
晋代(265年)~清代(1912年)の17文献を対象に「月経不順」に関する治療の記載をカウントした。

図1

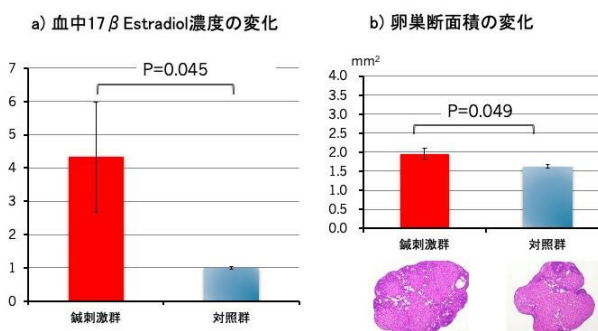


図2 腸内細菌叢の比較

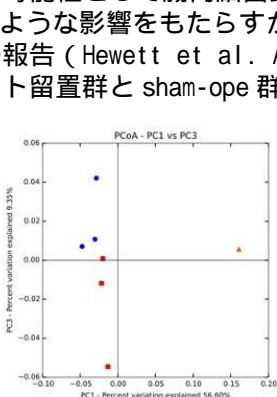


図2 腸内細菌叢の比較
■ 鍼刺激群 ● 対照群

図3 17βの腸内細菌叢への影響
■ ShamOpe群 ● 17β投与群



(2) B23 部位刺激と Leptin

肥満や糖尿病を対象疾患と想定して、Leptin を対象とした鍼刺激実験を検討した。先行研究から刺激部位は腎俞相当部位(B23)とし、(1)と同じく10回/5週の刺激を行った。最終刺激後、屠殺・サンプリングし血中 Leptin 濃度を ELISA 法で測定した。測定の結果、Leptin 濃度の上昇が認められた。また Leptin には骨密度への影響が知られている(Takeda S., et al. *Cell* 111:305-317, 2002)ため、大腿骨を採取、骨密度の測定を依頼したところ、僅かではあるが有意な骨幹端部骨密度の低下が明らかとなった。この二つの変化は相関しており(図4)、骨密度の変化が血中レプチン濃度の変化によって起こっていることが示唆された。大腿骨密度変化については、更に詳細を検討したが、コロナ禍期間中に、測定を依頼したキャノン・ライフケアソリューションズがサービスを終了し、同じ条件での測定・比較が困難になったため、現在再実験を検討中である。

さらに(1)で検討した 17 を測定したが、有意な差は無かった。逆に(1)と同じ刺激をしたサンプルで Leptin を測定したが、やはり有意な差は見いだせなかった(図5)。これらの結果から、鍼刺激によるホルモンの変化には、ある程度の部位特異性が考えられ、伝統的な経絡・経穴を反映している可能性が示唆された。

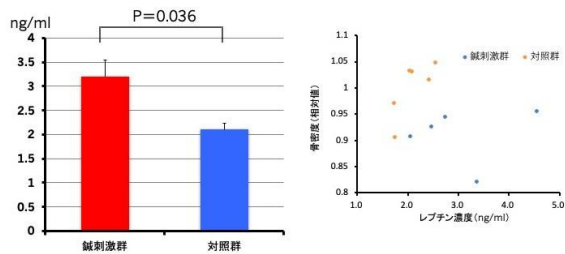


図4 血清中Leptin濃度と大腿骨骨密度

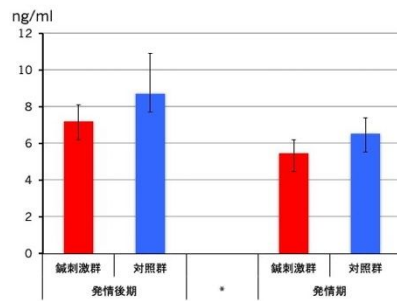


図5 SP3刺激によるLeptin動態

(3) BL57 部位刺激とホルモン変化

上記(2)で示された「ホルモン変化に対する鍼刺激の部位特異性」について検討するために、(1)(2)とは異なる部位への鍼刺激を検討した。(1)と近い部位であるが、婦人病とは関係の希薄な部位として下腿三頭筋の筋腱接合部、おおよそ承山相当部位 (BL57) を選び、同様に鍼刺激を 10 回/5 週間行って、その変化を検討した。BL57 相当部位への刺激では、17、Leptin の何れも有意な変化は認められなかった。また、腸内細菌叢にも目立った変化は観察されなかった (図 6)。

この部位への刺激も、何らかの生理学的変化をもたらしているかどうかを検討するため、特に運動負荷を掛けた後、刺激部位に近い腓腹筋を採取し運動の効果が鍼刺激によって上昇しているかどうかを、いくつかの筋肉関連遺伝子の realtime-PCR を行って検討した。その結果、Myh8 の発現上昇が観察された。これらの変化について、追加実験を企画していたが、コロナ禍により遅延しており、現在検討中である。

これらの結果から、(2)での結果と合わせ、鍼刺激は部位によって特異的な生理的变化を引き起こす事、一部の变化は腸内細菌叢の変化が関係している可能性があることが示唆された。

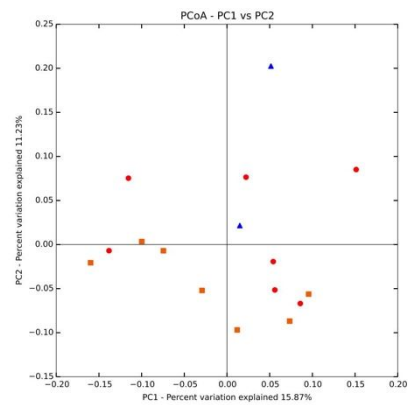


図6 B57 刺激と腸内細菌叢変化

■ 対照群 ● 鍼刺激群

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuya Arakawa, Shunji Itoh, Yohji Fukazawa, Hiroshi Ishiguchi, Junko Kohmoto, Masaya Hironishi, Hidefumi Ito, Tameko Kihira	4. 巻 1746
2. 論文標題 Association between oxidative stress and microRNA expression pattern of ALS patients in the high-incidence area of the Kii Peninsula	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	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） 10.1016/j.brainres.2020.147035	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 戸村多郎, 坂口俊二, 伊藤俊治, 宮井信行	4. 巻 28
2. 論文標題 未病スコアと生活習慣の検討で明らかになった 中高年者の未病対策	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本未病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 46-49
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澤井円香, 伊藤俊治, 吉田雅紀, 周建融, 宮内優, 石田卓巳, 武知進士
2. 発表標題 ジヒドロピラジンによる活性化 TLR4 シグナル抑制機構の解明
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸村多郎, 坂口俊二, 伊藤俊治, 村田信八, 宮下和久
2. 発表標題 未病スコアと生活習慣の検討で明らかになった中高年者の未病対策
3. 学会等名 第28回日本未病学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤井円香、伊藤俊治、吉田雅紀、周建融、宮内優、石田卓巳、武知進士
2. 発表標題 TLR4経路を介した炎症反応に対するDHP-3の軽減効果：接触性皮膚炎モデルマウスを用いた解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鍵弥朋子、伊藤俊治、畑村育次
2. 発表標題 精子形成関連遺伝子Kans11と精巢の一次線毛の関連
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤井円香、伊藤俊治、吉田雅紀、周建融、多田納 豊、宮内優、石田卓巳、武知進士
2. 発表標題 ジヒドロピラジンによる TLR4 ネガティブフィードバック機構の制御
3. 学会等名 フォーラム2022 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤俊治
2. 発表標題 鍼刺激メカニズムの分子生物学的解析
3. 学会等名 全日本鍼灸学会第42回近畿支部学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鍵弥朋子、伊藤俊治、畑村育次
2. 発表標題 新規雄性不妊遺伝子KansI1Lは線毛関連遺伝子発現を調節する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口由美子、河野凜、櫻井亮祐、山田雄介、湯川凌世、伊藤俊治
2. 発表標題 鍼刺激によるホルモンコントロールの試み -スポーツ傷害への応用
3. 学会等名 第72回全日本鍼灸学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 湯川凌世、河野凜、櫻井亮祐、山口由美子、山田雄介、伊藤俊治
2. 発表標題 運動負荷と鍼刺激の併用による筋肉の変化
3. 学会等名 第72回全日本鍼灸学会学術大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	山口 由美子 (Yamaguchi Yumiko) (00454661)	関西医療大学・保健医療学部・講師 (34438)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	大瀧 博文 (Ohtaki Hirofumi) (00733172)	関西医療大学・保健医療学部・准教授 (34438)	
研究分担者	深澤 洋滋 (Hukazawa Yohji) (70336882)	関西医療大学・保健医療学部・教授 (34438)	
研究分担者	畑村 育次 (Hatamura Ikuji) (80336883)	関西医療大学・保健医療学部・教授 (34438)	

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