

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460794

研究課題名(和文) Phytoestrogensによる骨芽細胞活性化機構の解明と骨粗鬆症予防への応用

研究課題名(英文) To prevent osteoporosis using food derived phytoestrogen

研究代表者

西條 清史 (Kiyofumi, Saijoh)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00178469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽・皮膚細胞の機能維持に必要な栄養因子を検索している。今回は、安価かつ容易に摂取できる大豆食品から得られるgenisteinと肉や卵、乳製品に含まれるmenaquinone-4 (MK-4) の共同作用について報告する。骨芽細胞様MC3T3-E1細胞に1μMのgenisteinと24時間培養下、microarray上で発現上昇するmRNAsを選別した。genistein+MK-4の組合せでRT-qPCRで細胞接着因子であるCHADと骨のALPが反応し、蛋白レベルを測定したところ、蛋白活性のみならず、各細胞の形態を紡錘形・卵形へ変化させた。これら栄養因子が骨芽細胞の機能活性に有用であることを示した。

研究成果の概要(英文)：Bone is a basic component of the musculoskeletal system and is constantly remodeled due to the function of osteoblasts and osteoclasts. The bone remodeling decreased especially in women following menopause, accelerated bone loss and leads to osteoporosis. Osteoporosis is a serious social and health problem in a progressively aging society. Utilization of food-based nutrients like genistein, contained in soybeans, and menaquinone-4, in dairy foods, are considered to be the most economical and easy way to prevent bone loss. In the present study, effect of genistein and menaquinone-4 on osteoblastic MC3T3-E1 cells were examined. We could isolate 21 mRNAs of which expression were increased more than three as much as control when genistein was supplied. Thereafter, co-effects of genistein and menaquinone-4 were examined. We confirmed their simultaneous effectiveness on maintenance of using Chad and ALP.

研究分野：衛生学

キーワード：ゲニステイン メナキノン-4 (MK-4) BGLAP CHAD ALP3 DPP4 骨芽細胞様 MC3T3-E1細胞

1. 研究開始当初の背景

(1)高齡化の進む本邦において、骨質の維持は骨折を予防し高いQOLを保つのに必須であり、医療費を減少させるという観点からも極めて重要である。特に女性は閉経とともに estrogen を失うことで、骨粗鬆症のリスクにさらされるため、食事から簡単に摂取できる phytoestrogen による防護が注目されている。

(2)骨密度の維持に保護的に作用することが疫学的に示唆されている Vitamin K2 の一種である menaquinone-7 が、骨芽細胞好性培養細胞である MC3T3E1 細胞で、osteocalcin や osteoproteogreïn の発現を増加し骨芽化が促進させることを示した。しかしながら、menaquinone-7 の供給はほぼ納豆からのみに限られ、食事からの摂取は必ずしも容易とは言えない。

(3)estrogen の作用は、核内受容体を介する genomic action と介さない non-genomic action があり複雑であるが、phytoestrogen の作用はさらに複雑であると考えられている。例えば、Zebrafish の頭蓋骨の初期発生にあたる各舌骨軟骨形成期には、estrogen、genistein とともに保護的では泣く形成不全をひきおこすが、estrogen が Patched 1 の発現阻害を介するのに対し、genistein には阻害作用はない。作用点の検討が必要であると考えられる。

(4)皮膚の分化を引き起こす cis-trans 調節の解析、methylation による angiotensinogen 遺伝子の活性変動の解析などを同時進行しており、genomic/non-genomic action の解析・estrogen/ genistein の作用の異同の解析などに、同様の方法を導入できる。

2. 研究の目的

骨質・量の低下は骨折して初めて表面化することが多いが、高齡者の骨折はそのものが QOL を低下させるのみならず、鬱・認知症などのリスクでもある。良好な骨質・量の維持を、安価で、かつ誰でもが好き嫌いなく摂取できるような食品に含まれる栄養素の利用が好ましい。そこで、大豆に含まれる phytoestrogen である genistein と肉や卵、乳製品に含まれる vitaminK2 である menaquinone-4 の骨芽細胞に対する影響を検討し、骨芽/骨機能の維持・促進に有効な作用を同定する。

3. 研究の方法

genistein 存在下または非存在下で培養した MC3T3E1 細胞から RNA を抽出、mRNA を精製し、蛍光標識した。micro array を用い、存在下プールに非存在下プールの 3 倍以上発現している mRNA を選定した。micro array は必ずしも定量性が高くないので、骨芽/骨の機能と関与すると推定される遺伝子を選択し、

real-time RT-PCR で estrogen (E)、genistein (G)、menaquinone-4 (M)、E+G、E+M、G+M 存在下での発現量を確定した。特に注目される mRNA に関しては、さらに免疫細胞染色や活性測定等蛋白レベルの動向を同定した。

4. 研究成果

genistein は $10^{-4}M$ 以上の濃度でのみ、MC3T3E1 細胞の増殖を抑制し、以下の濃度では対照群と増殖速度に差を認めなかった。一日摂取量は $50 \mu mol$ 程度と推定されているので、 $10^{-6}M$ を妥当と考え、24hr 存在・非存在下で培養した MC3T3E1 細胞から RNA を得た後、mRNA を精製し、それぞれ cy3、cy5 で標識後 micro array assay に供した。Genistein 投与で 3 倍以上の発現増加があると推定された 21 種の mRNA を選別した(表 1)。

表 1: Genistein $10^{-6}M$ 投与により micro array 上で 3 倍以上の増加が観察された mRNAs

NM_007432	alkaline phosphatase 3, intestine, not Mn requiring (ALP3)
NM_015804	ATPase, class VI, type 11A (ATP11A)
NM_007541	bone gamma carboxyglutamate protein (BGLAP)
NM_007557	bone morphogenetic protein 7 (BMP7)
NM_013878	calcium binding protein 2 (CABP2)
NM_007689	chondroadherin (CHAD)
NM_010074	dipeptidylpeptidase 4 (DPP4)
NM_015744	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (ENPP2)
NM_010258	GATA binding protein 6 (GATA6)
NM_008398	integrin alpha 7 (ITGA7)
M21041	microtubule-associated protein 2 (MAP2)
NM_144557	myosin VIIA and Rab interacting protein (MYRIP)
BC059256	Notch gene homolog 2 (NOTCH2)
NM_172766	nuclear factor related to kappa B binding protein (NFRKB)
NM_008873	plasminogen activator, urokinase (PLAU)
NM_173413	RAB8B, member RAS oncogene family (RAB8B), mRNA
NM_009446	tubulin, alpha 3 (TUBA3)
NM_009521	wingless-related MMTV integration site 3A (WNT3A)
NM_009524	wingless-related MMTV integration site 5A (WNT5A)
NM_007431*	alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL)

Genistein と menaquinone4 の相互作用が確認できた mRNAs

これらの発現量および、menaquinone4 との相互作用を確認するために、E、G、M、E+G、E+M、G+M 存在下での発現量を real-time RT-PCR で確認した。Genistein と menaquinone4 の相互作用が確認されたものを青字(表 1)で示す。多くの骨機能増進にかかわると推定される mRNAs (ALP3、ATPAAA、BGLAP 等) が得られている一方、骨代謝に働くとされている GATA6 や DPP4 の発現増強も観察され、全体としての骨活動化に作用している可能性が示唆された。そこで、最も骨形成に有用であると考えられる細胞間接着いんしである Chad の動向を検討した。G+M は E 単独よりも Chad の mRNA 発現、蛋白合成を促進するのみならず、細胞の形体をより骨に近い放射状や楕円状に変形し、ALP 即ち骨マーカーの増量も行なった(図 1)。

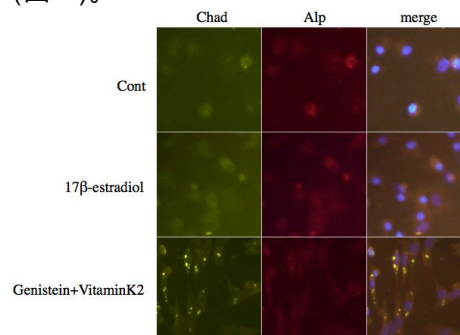
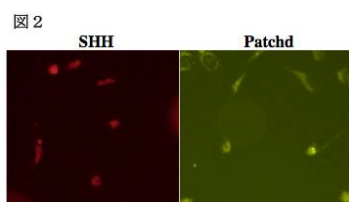


図 1: Chad, Alp 蛋白の免疫細胞染色と 17 β estradiol と Genistein+menaquinone4 の効果

現在は、このような変化がどのような背景にもとづいているのかの解析のために骨の活性に必要な sonic hedgehog、patched 1 遺伝子の解析を行っている(図 2)。sonic hedgehog、patched 1 遺伝子を挿入した reporter gene の蛍光。



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)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

MIDORI KATSUYAMA, MASASHI DEMURA, HIRONOBU KATSUYAMA, HIDEJI TANI, KIYOFUMI SAIJOH.

Genistein and menaquinone-4 treatment-induced alterations in the expression of mRNAs and their products are beneficial to osteoblastic MC3T3-E1 cell functions.

Molecular Medicine Reports (in press) 査読有.

Demura M, Saijoh K. The Role of DNA Methylation in Hypertension. Hypertension. Adv Exp Med Biol. 2016 Nov 26. [Epub ahead of print] 査読有. DOI: 10.1007/5584_2016_80

Tani H, Sugitani K, Saijoh K. Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Repeated Exposure to Cruciferous Allyl Nitrile in Sensitizer-Induced Ear Edema in Mice. Med Sci Monit Basic Res. 2016 Feb 29;22:20-26. 査読有. DOI: 10.12659/MSMBR.897771.

Hironobu Katsuyama, Shigeko Fushimi, Kunikazu Yamane, Yoko Watanabe, Koichiro Shimoya, Toshiko Okuyama, Midori Katsuyama, Kiyofumi Saijoh, Masafumi Tomita. Effect of vitamin K2 on the development of stress induced osteopenia in a growing senescence accelerated mouse prone 6 strain. Exp Ther Med. 2015 Sep;10(3):843-850. 査読有. DOI: 10.3892/etm.2015.2621

Rahayu SR, Katsuyama H, Demura M, Katsuyama M, Ota Y, Tani H, Higashi T, Semadi NP, Saijoh K. Factors associated with tuberculosis

cases in Semarang District, Indonesia: case-control study performed in the area where case detection rate was extremely low.

Environ Health Prev Med. 2015 Jul;20(4):253-261. 査読有. DOI: 10.1007/s12199-015-0443-9

Demura M, Demura Y, Takeda Y, Saijoh K. Dynamic regulation of the angiotensinogen gene by DNA methylation, which is influenced by various stimuli experienced in daily life. Hypertens Res. 2015 Mar 26. [Epub ahead of print] 査読有. DOI: 10.1038/hr.2015.42.

Higashi T, Kambayashi Y, Fujimura M, Ohkura N, Yoshizaki T, Nakanishi S, Saijoh K, Hayakawa K, Kobayashi F, Michigami Y, Hitomi Y, Nakamura H. Asian dust (kosa) in allergic diseases. Earozoru Kenkyu (in Japanese). 2014 Apr 29(S1) 212-217. 査読有.

Higashi T, Kambayashi Y, Ohkura N, Fujimura M, Nakai S, Honda Y, Saijoh K, Hayakawa K, Kobayashi F, Michigami Y, Orlando AE, Hitomi Y, Nakamura H. Effects of Asian dust on daily cough occurrence in patients with chronic cough: a panel study. Atmospheric Environment. 2014 Aug 92 506-513. 査読有.

Higashi T, Kambayashi Y, Ohkura N, Fujimura M, Nakanishi S, Yoshizaki T, Saijoh K, Hayakawa K, Kobayashi F, Michigami Y, Hitomi Y, Nakamura H. Exacerbation of daily cough and allergic symptoms in adult patients with chronic cough by Asian Dust: A hospital-based study in Kanazawa. Atmospheric Environment. 2014 Aug 97 537-543. 査読有.

Le NA1, Katsuyama M, Demura M, Tani H, Katsuyama H, Saijoh K. Regulation of serine protease inhibitor Kazal type-5 (SPINK5) gene expression in the keratinocytes. Environ Health Prev Med. 2014 Jul;19(4):307-13. 査読有. DOI: 10.1007/s12199-014-0393-7

〔学会発表〕(計 8 件)

勝山博信、佐藤友美、渡辺洋子、西條清史、某病院勤務者における高ストレス背景因子の検討、第 90 回日本産業衛生学会、2017 年 5/11-5/13、東京ビッグサイト(東京都江東区)

Shigeko Fushimi, Tsutomu Nohno, Shin-ichiro Nishimatsu, Naoki Katase, Kumiko, Terada, Midori Katsuyama, Masashi Demura, Kiyofumi Saijoh, Hitoshi Nagatsuka, Hironobu Katsuyama. miRNA-mediated crosstalk between Wnt3a and TGFP3 in osteoblast differentiation. EXPERIMENTAL BIOLOGY 2017. April 22- 26 2017. シカゴ (アメリカ)

伏見滋子、濃野勉、寺田久美子、片瀬直樹、西松伸一郎、渡辺洋子、長塚仁、勝山碧、西條清史、勝山博信、水浸拘束ストレスマウスにおける筋委縮メカニズムの解明、第 86 回日本衛生学会学術総会、2016 年 5/11-5/13、旭川市民文化会館 (北海道旭川市)

Shigeko Fushimi, Tsutomu Nohno, Shin-ichiro Nishimatsu, Naoki Katase, Kumiko Terada, Yoko Watanabe, Yoko Ota, Midori Katsuyama, Kiyofumi Saijoh, Hironobu Katsuyama. Mouse Model of Muscle Atrophy with Water-Immersion Restraint Stress. EXPERIMENTAL BIOLOGY 2016. April 2- 6 2016. サンディエゴ (アメリカ)

勝山博信、伏見滋子、渡辺洋子、佐藤友美、勝山碧、西條清史、職場ストレス度とストレス関連遺伝子多型の関連、第 74 回日本公衆衛生学会、2015 年 11/4-11/6、長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

勝山博信、伏見滋子、渡辺洋子、勝山碧、西條清史、職場ストレスに及ぼすストレス関連遺伝子多型と職場支援の影響、第 88 回日本産業衛生学会学術総会、2015 年 5/13-5/16、グランフロント大阪 (大阪府大阪市)

M, Katsuyama, N.A. Le, M. Demura, H. Tani, Y. Ota, H. Katsuyama, K. Saijoh. SPINK5 expression in keratinocytes. EXPERIMENTAL BIOLOGY 2015. March 28-April 1 2015. ボストン (アメリカ)

H. Katsuyama, S.Fushimi, K. Yamane, M.tomita, Y. watanabe, T. Okuyama, M, Katsuyama, S.R. Rahayu, K. Saijoh. Effect of vitamin K2 on trabecular bone mass in senescence-accelerated mice P6 (SAMP6) with water-immersion restraint stress. EXPERIMENTAL BIOLOGY 2014. 26-30 April 2014. サンディエゴ (アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西條 清史 (SAIJOH, Kiyofumi)
金沢大学・医薬保健研究域医学系・教授
研究者番号 : 0 0 1 7 8 4 6 9

(2) 研究分担者
無

(3) 連携研究者
無

(4) 研究協力者
無