

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560314

研究課題名(和文)新規二重運動負荷刺激法の開発と誘発されるマイオカインの作用機序解明とその利用検討

研究課題名(英文) A study to develop a new method of double mechanical stress, to examine the use of that method, and to ascertain the mechanism of action of myokines induced by that stress

研究代表者

山田 晃司 (Yamada, Kouji)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・教授

研究者番号：60278306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：転倒による骨折は日常生活活動に大きな影響をもたらす。また、関節炎も老化に伴う疾患の一つで、予防や治療を積極的に行っていく必要がある。本研究は骨密度低下モデルマウスを用い新規二重運動負荷刺激法を用いてその症状緩和について検討を行った。その結果、閉経後の骨密度代謝は活発に行われていることが推察でき、運動刺激と休息を十分にとることが骨密度低下の症状緩和につながるのではないかと推察された。また、関節炎モデルマウスを用いた実験からは、運動後に骨格筋から抗炎症性作用マイオカインの発現量が増加し、炎症性マイオカインの発現量が抑制された。それにより関節炎の発症の遅延化と症状進行の遅延化が推察された。

研究成果の概要(英文)：Fractures due to falls and decreased bone density greatly affect the activities of daily living. In addition, arthritis is a condition that develops with aging, and this condition must be actively prevented and treated. The current study used a new method to apply 2 forms of mechanical stress to a mouse model of decreased bone density and it examined the relief of symptoms due to that stress. Results revealed that bone density actively decreased and bone metabolism actively occurred after menopause. Sufficient rest following mechanical stress presumably led to relief of symptoms of decreased bone density. An experiment involving a mouse model of arthritis also indicated that the level of expression of antiinflammatory myokines by skeletal muscle following mechanical stress increased while the level of expression of inflammatory myokines was limited. This presumably delayed the development and progression of arthritis.

研究分野：生理学

キーワード：骨折予防 マイオカイン 関節炎

1. 研究開始当初の背景

医療の進歩に伴い高齢化社会となった現代において、数千万人が骨粗鬆症に罹患しており、転倒による大腿骨頸部の骨折の発生件数は 65 歳以上では指数関数的に上昇し、数年後には 20 万人を超えると考えられる。高齢者にとって骨折は、歩行障害や長期臥床を引き起こす原因となり、身体的にも精神的にも大きな支障をきたし QOL が著しく低下する。骨密度低下は女性にとって避けられない生理現象で、閉経後 1 年間で全骨量の 2~3% の減少が数年間続き、約 20 年で 30~40% 低下する。また、非荷重期間が長期になると例え運動を再開したとしても元の骨量レベルまで回復することはまれである。そのため閉経前から力学的負荷の継続は、予防医学の検知から骨密度低下を緩和する重要なポイントとなる。そこで骨細胞を活性化、平衡感覚を養う装置の開発とその利用発展について検証することとした。

2. 研究の目的

高齢化が進む日本において転倒による大腿骨頸部骨折の発生率は、近い将来患者数が急増することが予測されている。これを回避するためには、転倒を予防する平衡感覚を養う装置と骨折治癒時に老化した細胞を活性化する刺激方法が必要であると考え新規な装置の開発を行う。その効果について骨密度低下マウスや関節炎モデルマウスで解析後、人へ移行することを考える。また、日本の関節リウマチ患者は約 70 万人以上であり、自己免疫疾患の中では最も罹患率が高い疾患であるため、予防や治療を積極的に行っていく必要がある。これらの疾病経過の際、骨格筋から分泌される運動誘発サイトカイン(マイオカイン)が血液を介して細胞の活性化を誘発するか、発現量の経時的变化を測定する。そのマイオカインが全身性に遠隔の組織、器官に運ばれ成人病予防や老化防止など『~基礎研究から臨床応用まで~』その効果の可能

性と利用発展について考察する。

3. 研究の方法

骨密度低下モデルマウス(閉経後モデル)および関節炎モデルマウスを用いた基礎研究を行った。

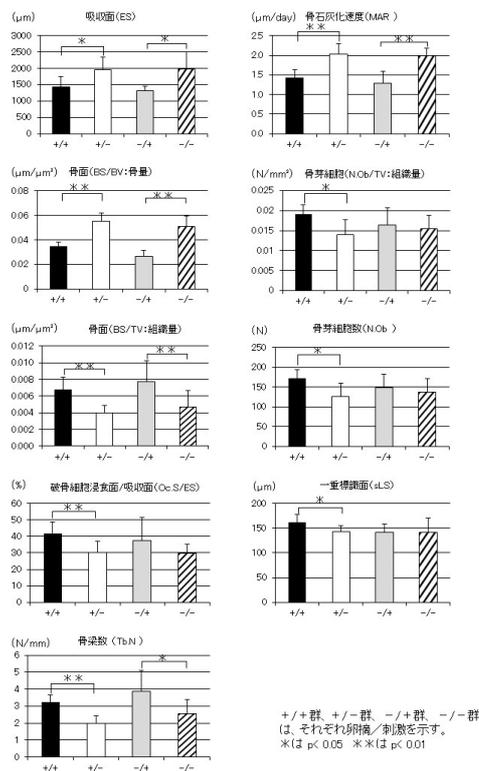
1) 卵巣摘出マウス(OVX モデル) ICR メス 8 週令に対して卵巣摘出術を施した。刺激は 1 日 1 回の週 6 回で、1 回が 30 分間を 10 週間継続して行った。実験群には卵巣摘出/刺激(運動): +/+、+/-、-/+、-/- の 4 群を設定した。骨組織標本を作成し Villanueva Bone Stain を行い、骨形態計測により解析を行った。テトラサイクリン(TC)とカルセイン(CL)の皮下投与(二重標識)により骨への取り込みを観察した。一次パラメーターを測定した後、それをもとに二次パラメーターの算出を行い定法に従い骨形態計測項目を算出し解析を行った。

2) 自然発症型の関節炎モデルマウス(SKG/Jcl)に対して刺激は 1 日 1 回の週 6 回で、1 回が 30 分間を 10 週間継続して行った。関節炎の誘導にはマンナン 20 mg (100 mg/ml) を、また、対照群には同量の生理食塩水を腹腔内に投与した。最終運動刺激後、膝関節部分を採取し定法に従い、軟骨を特異的に染色するサフラニン O 染色を行い、標本作製し観察を行った。また、タンパク質発現解析用に筋を採取し急速凍結後に粉碎した後、筋溶液を作製した。各種サイトカインの測定には市販の ELISA kit を用いた。

4. 研究成果

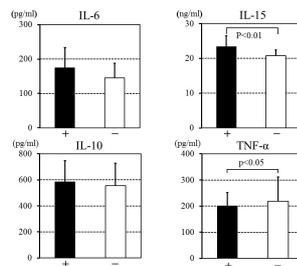
骨密度低下モデルマウス: 大腿骨の組織標本を作製し、骨形態計測により一次パラメーターを測定した後、それをもとに二次パラメーターの算出を行い定法に従い解析を行った。吸収面(ES)は対照群に比べ OVX マウス群が有意に低値を示した($p < 0.05$)。骨石灰化速度(MAR)、骨面(BS/BV: 骨量)は対照群に比べ OVX マウス群が有意に低値を示し

た ($p < 0.01$)。一方、骨芽細胞 (組織量: N.Ob/TV)、骨芽細胞数 (N.Ob)、一重標識面 (sLS) は対照群に比べ OVX マウス群が有意に高値を示した ($p < 0.05$)。骨面 (BS/TV: 組織量)、破骨細胞浸食面/吸収面 (Oc.S/ES)、骨梁数 (Tb.N)、骨石灰化遅延時間 (Mlt) は対照群に比べ OVX マウス群が有意に高値を示した ($p < 0.01$) (Fig. 1)。



2) 関節炎モデルマウス: 1週間毎に関節炎係数の判定を行った結果、マンナン投与から1週後の刺激なし群に初期の関節炎症状が認めはじめた (9週齢)。また、刺激あり群では、刺激なし群に4週遅れて初期の関節炎症状が認めはじめた (14週齢)。さらに刺激なし群は12週齢以降に大きくそのスコアが高くなり、最大でスコア3に達した。一方、刺激あり群では14週から刺激なし群に続きそのスコアが高くなったが、最大でもスコア1.5にしか到達しなかった。膝関節の組織標本を作製し、サフラニンO染色を行い観察した結果、刺激なし群に比べ刺激あり群では、関節軟骨部分の肥厚が認められた。また、その部分には軟骨細胞が多数密集しているこ

とが観察された。また、骨格筋で発現するサイトカインはELISA法を用いてIL-6、IL-10、IL-15、TNF- α について測定を行った。その結果、IL-6とIL-10は共に刺激なし群と比較し刺激あり群で高値を示した。IL-15は刺激あり群の方が刺激なし群に比べ有意に高値を示し ($p < 0.01$)、対照的にTNF- α では刺激なし群の方が刺激あり群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$) (Fig. 2)。



骨密度低下モデルマウスモデルマウスを用いての実験により運動刺激により吸収面 (ES)、骨石灰化速度 (MAR)、骨面 (BS/BV: 骨量) は OVX マウス群で低値を示し、一方、骨芽細胞 (組織量: N.Ob/TV)、骨芽細胞数 (N.Ob)、一重標識面 (sLS)、骨面 (BS/TV: 組織量)、破骨細胞浸食面/吸収面 (Oc.S/ES)、骨梁数 (Tb.N)、骨石灰化遅延時間 (Mlt) は OVX マウス群で高値を示した。この結果から閉経後の骨密度代謝は活発に行われていることが推察でき、運動刺激と休息を十分にとることが骨密度低下の緩和につながるのではないかと考えられる。また、関節炎モデルマウスを用いての実験では運動刺激により IL-6、IL-10、IL-15 の発現量が増加し、TNF- α の発現量が抑制された。運動刺激により発現量が増加した IL-6 や IL-10 の抗炎症性作用が、TNF- α の炎症性作用を抑制したことが推察された。また、それが関節炎の発症の遅延化と症状の進行の遅延化に有効であることが示唆された。これらのことより本研究を進展させ、臨床応用すれば、疾病予防と治療の可能性が期待できると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Kito T, Teranishi T, Nishii K, Sakai K, Matsubara M, Yamada K. Effectiveness of exercise-induced cytokines in alleviating arthritis symptoms in arthritis model mice. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 2016; 93(3): 81-88. (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

山田晃司、西井一宏、酒井一由、寺西利生、松原守、ダブルメカニカルストレス刺激がマウス大腿骨に与える影響についての検討、第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15 ~ 18 日、京都 国立京都国際会館

山田晃司、鬼頭巧、西井一宏、酒井一由、寺西利生、松原守、関節炎モデルマウスがマイオカインにより症状が緩和されるかについての有効性の検討、2015 年 12 月 1 ~ 4 日、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会合同大会、神戸 神戸国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

特記事項無

6 . 研究組織

(1) 研究代表者 山田晃司 (YAMADA, Kouji)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授

研究者番号：6 0 2 7 8 3 0 6