

令和元年5月29日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08534

研究課題名(和文) 脂肪蓄積による筋と骨のネットワーク破綻メカニズムの解明

研究課題名(英文) Dysfunction in relationships between muscle and bone in obesity

研究代表者

河尾 直之 (KAWAO, Naoyuki)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70388510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メカニカルストレスによって誘導される筋と骨のネットワークに寄与する因子を探索し、脂肪が筋と骨のネットワークにおよぼす影響を検討した。今回、過重力負荷によって筋で産生され、骨代謝に影響を及ぼす因子としてフォリスタチンを見出し、フォリスタチンは、骨に正の作用を有することを明らかにした。さらに、非荷重による骨量減少に筋でのアイリシン産生減少が関与することが示唆された。また、肥満は非荷重によって減少した骨量、筋量、筋力の再荷重による回復を促進させることを見出し、アディポカインとしてのレプチンが肥満による筋と骨の回復促進に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた我が国において、健康寿命を著しく損なう骨粗鬆症や筋量と筋機能の両方が低下するサルコペニアへの対応が臨床的に喫緊の問題となっており、高齢者医療の現状と医療経済的な面を鑑みると、サルコペニアと骨粗鬆症の両者に有効な薬剤の開発が必要である。骨粗鬆症とサルコペニアの病因には共通したメカニズムの存在が推定されているが、これには筋と骨のネットワーク機構の関与が示唆されている。本研究より得られた成果は、骨粗鬆症とサルコペニアに共通した新しい病態機序の解明の手掛かりとなり、将来的には骨粗鬆症とサルコペニアの診断に有用な血中マーカーや治療標的の確立に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to investigate the humoral factors linking muscle to bone induced by mechanical stress and effects of obesity on the relationships between muscle and bone. We found that hypergravity increased follistatin levels in skeletal muscle. Follistatin may have beneficial effects on bone metabolism as a humoral factor linking muscle to bone. Moreover, we reported that mechanical unloading reduced irisin expression in the skeletal muscle of mice and irisin may contribute to disuse-induced bone loss in mice. We also found that obesity enhances the recovery of bone and muscle masses as well as strength decreased by disuse after reloading in mice. Leptin may be involved in the recovery of muscle and bone enhanced by obesity in mice.

研究分野：生理学

キーワード：骨粗鬆症 サルコペニア 筋骨連関 肥満 脂肪 メカニカルストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた本邦において、ロコモティブシンドロームの原因である骨粗鬆症や筋量と筋機能の両方が低下するサルコペニアへの対応が臨床的に喫緊の問題となっている。骨粗鬆症とサルコペニアの病因には共通したメカニズムの存在が推定されており、力学的要因、炎症、遺伝、内分泌的要因、加齢などの関与が示唆されている (Kawao and Kaji, J Cell Biochem 2015)。

長期臥床や宇宙飛行による微小重力環境は筋萎縮とそれに続いて骨量減少を引き起こす。さらに、微小重力環境における筋量と骨量の減少に対して運動療法が有効であることから、メカニカルストレスは筋と骨の両者において同時に強い影響をおよぼす。それゆえ、メカニカルストレスによる筋と骨の調節機構の破綻が骨粗鬆症とサルコペニアの病態機序に関与すると考えられるが、その機序の詳細な検討は行われていない。

筋と骨が局所的に相互作用する機構や液性因子を介して体液性に相互作用する機構が明らかになりつつある。これまでに、私共は筋組織と骨代謝の相互作用に関する研究を進め、局所で筋骨化を誘導する因子として Tmem119、Tmem176b、MMP-10 を見出した (Hisa, Kaji et al., J Biol Chem 2011; Yano, Kawao et al., Exp Clin Endocrinol Diabetes 2013; Mao, Kawao et al., Endocr J 2013)。さらに、申請者の所属する研究室では筋で発現が多く、骨形成を促進する体液性因子としてオステオグリシン、FAM5C を報告している (Tanaka, Kaji et al., Biochem Biophys Res Commun 2012; Tanaka, Kaji et al., J Biol Chem 2012)。

一方、生体内における筋と骨のネットワークの調節機構は未だ不明であることから、現在、私共はメカニカルストレスによって誘導される筋と骨のネットワークに着目して研究を進めている。これまでに、マウスにおいて、平衡覚を制御する前庭系が過重力負荷によって誘導される筋量と骨量の増加に寄与するとの知見を得ており、そのメカニズムを検討中である。

近年、骨粗鬆症やサルコペニア患者に肥満が合併することで、骨折リスクの増加、日常生活動作の低下など、脂肪組織の増加が病態の悪化に寄与することを示唆する知見が報告されており、骨粗鬆症、サルコペニア、肥満の三者が合併した状態は「Osteosarcopenic obesity」として注目されている (Ormsbee et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2014)。また、筋組織内の脂肪組織増加や骨髄の脂肪化はそれぞれ筋量と骨量の減少に関連し、筋と骨に負の影響をおよぼす。これらの知見から、脂肪組織が筋と骨の両者に影響をおよぼすメカニズムの存在が考えられるが、組織内脂肪の筋と骨のネットワーク機構への影響はこれまでに検討されておらず未だ不明である。

2. 研究の目的

今回の研究では、このような研究状況を背景として、メカニカルストレスによって誘導される筋と骨のネットワークに寄与する因子を見出し、脂肪増加が筋と骨のネットワークにおよぼす影響とその作用機構を解明すると共に、筋と骨のネットワークという観点から、骨粗鬆症の新しい病態機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 重力変化によって誘導される筋と骨のネットワークに寄与する因子の探索

前庭系を両側性に外科的に破壊したマウスおよび偽手術を施したマウスを、1 g あるいはゴンドラ型遠心機を用いて 3 g の重力環境で 4 週間飼育した。抗重力筋であるヒラメ筋を採取し、筋と骨のネットワークに寄与することが示唆されている体液性因子の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR 法によって解析した。また、マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて、同定された因子が筋分化関連因子 (Myogenin、Myf5) 発現、筋タンパク合成に関連する mTOR 経路、筋分解関連因子 (Atrogin-1、MuRF1) 発現に及ぼす影響を検討した。さらに、マウス単球様 RAW264.7 細胞からの破骨細胞形成系により、破骨細胞形成能に及ぼす影響を検討した。これにより、過重力負荷によって誘導される筋と骨のネットワークに寄与する因子を見出す。

(2) 非荷重状態による骨量減少に寄与する筋と骨のネットワーク因子の探索

マウスを尾懸垂により後肢免荷した状態で 3 週間、あるいは両側の坐骨神経切断による不動状態で 4 週間飼育し、脛骨骨密度および下腿筋量を定量 CT により解析した。脛骨において骨代謝に関連する因子、ヒラメ筋において筋と骨のネットワークへの寄与が示唆されている因子の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR 法によって解析した。C2C12 細胞を用いて、同定された因子の筋細胞での発現調節機構を検討した。マウス骨髄細胞を用いて、同定した因子の破骨細胞形成に及ぼす影響と、マウス初代骨芽細胞培養系において、骨芽細胞分化および receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 発現レベルに及ぼす影響を検討した。これにより、非荷重によって誘導される廃用性の骨粗鬆症に寄与する筋と骨のネットワーク因子を見出す。

(3) 肥満が非荷重による骨量減少および再荷重による骨量増加に及ぼす影響

高脂肪食あるいは通常食を 8 週間給餌させたマウスを後肢免荷した状態で 3 週間飼育し、筋量と骨量の減少を誘導した。その後、再荷重負荷のため、後肢免荷を解除し、4 週間飼育した。脛骨骨密度、全身脂肪量、全身筋量および下腿筋量を定量 CT により解析した。脂肪組織におけるアディポカイン発現レベルをリアルタイム PCR 法によって解析した。骨代謝関連指標とアデ

イボカイン発現レベルの相関分析により、メカニカルストレスによって誘導される骨用減少と筋と骨のネットワークに影響をおよぼすアディポカインを見出す。

4. 研究成果

(1) 重力変化によって誘導される筋と骨のネットワークに関連する因子の探索

抗重力筋のヒラメ筋において、過重力負荷は筋と骨のネットワークに関連する因子（インスリン様増殖因子1、線維芽細胞増殖因子2、オステオグリシン、アイリシン、トランスフォーミング増殖因子-、マイオスタチン）発現に影響をおよぼさなかったが、マイオスタチン阻害因子のフォリスタチン、インターロイキン-6、FAM5C 発現を増加させた。過重力負荷により誘導された因子のうち、フォリスタチンの増加のみ前庭系の破壊によって阻害された(図1)。C2C12細胞で、剪断ストレスはフォリスタチン発現に影響をおよぼさなかったが、クリノスタット装置を用いた模擬微小重力環境(10⁻³g)での培養は、フォリスタチン発現を減少させた。また、フォリスタチンは筋タンパク合成に重要なmTORシグナルに関連するAktとS6キナーゼリン酸化を促進したが、筋分解に関連するAtrogin-1とMuRF1 mRNAレベルに影響をおよぼさなかった。さらに、フォリスタチンは筋分化に関連するMyogeninおよびMyf5 mRNAレベルを増加させた。マウス血中フォリスタチン濃度は過重力負荷によって増加したが、脛骨のフォリスタチン mRNAレベルは過重力負荷によって変化がなかった。マウス骨芽細胞で、フォリスタチンは骨分化因子発現に影響をおよぼさなかった。一方、RAW264.7細胞で、フォリスタチンはRANKLによる破骨細胞形成に影響をおよぼさなかったが、マイオスタチンの破骨細胞形成促進を阻害した。

これらの結果から、重力変化の前庭系を介した筋と骨への影響にフォリスタチンが関与することが示された。フォリスタチンは重力増加によって筋で産生されることにより、蛋白合成と筋分化を促進することにより筋量増加に関わるのみならず、重力増加に反応する筋と骨のネットワーク因子として、マイオスタチンの破骨細胞形成促進作用を阻害することにより骨にも正の作用を有するものと考えられた。

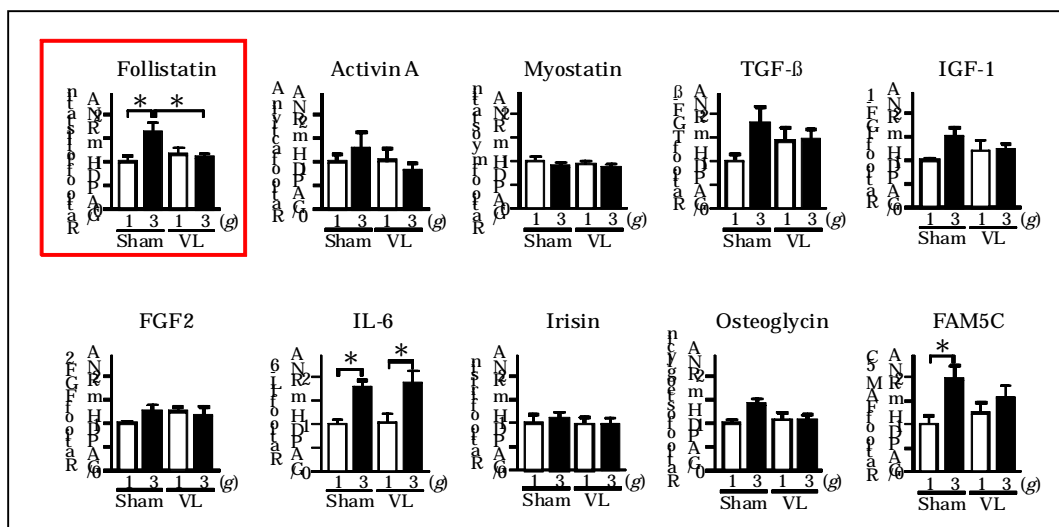


図1. 過重力負荷と前庭系破壊が筋と骨のネットワーク因子に及ぼす影響

(2) 非荷重状態による骨量減少に寄与する筋と骨のネットワーク因子の探索

後肢免荷および坐骨神経切断による不動は下腿筋量、腓腹筋およびヒラメ筋重量、海綿骨骨密度を減少させた。さらに、後肢免荷は脛骨のRANKL mRNA発現を増加させた。ヒラメ筋および腓腹筋における筋と骨のネットワークに寄与する体液性因子の発現解析では、後肢免荷および不動はアイリシン(FNDC5) mRNA発現を減少させた(図2)。さらに、後肢免荷はフォリスタチン発現を増加させたが、マイオスタチン発現に影響を及ぼさなかった。また、後肢免荷はヒラメ筋におけるインスリン様増殖因子1、線維芽細胞増殖因子2、トランスフォーミング増殖因子-発現を増加させ、腓腹筋におけるインターロイキン-6発現を減少させた。これら筋と骨のネットワーク因子発現と骨密度や骨関連遺伝子の関連の有意性を検討したところ、ヒラメ筋のアイリシン発現のみ、海綿骨骨密度と正相関、脛骨RANKL発現と負相関を示した。In vitroの検討では、C2C12において、剪断ストレスはFNDC5発現を増加させ、この増加は骨形成タンパク質(BMP)あるいはPI3キナーゼシグナルの阻害剤によって有意に抑制された。アイリシン添加は、マウス骨髄細胞培養におけるM-CSFとRANKLによる破骨細胞形成を抑制し、マウス初代骨芽細胞培養におけるRANKL発現を減少させた。

これらの結果より、マウスにおいて、非荷重による骨密度減少に筋におけるアイリシン産生抑制が関与することが示唆された。また、アイリシンは、BMP や PI3 キナーゼシグナルを介して、メカニカルストレスによって筋で誘導されること、筋から分泌されたアイリシンは、筋と骨のネットワーク因子として破骨細胞形成抑制により、メカニカルストレスによる骨量増加に寄与するものと考えられた。

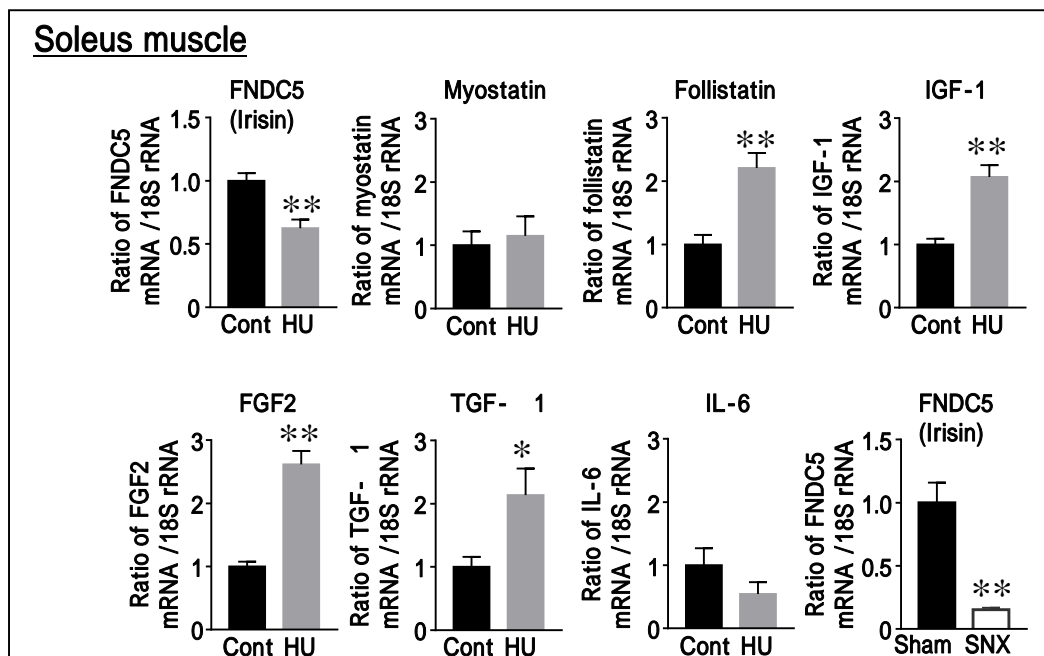


図2. 後肢免荷および不動が筋と骨のネットワーク因子に及ぼす影響

(3) 肥満状態は後肢免荷による脛骨海綿骨骨密度、下腿筋量、握力の減少に影響を及ぼさなかった。一方、肥満状態は再荷重による脛骨海面骨骨密度、下腿筋量、握力増加を有意に増強させた。内臓脂肪および皮下脂肪におけるアディポカイン発現量の解析により、再荷重後の肥満マウスでは、対照群と比較して、レプチン、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 発現の有意な増加が見られた。実験に用いたマウス検体を用いた単相関分析による脂肪組織のアディポカイン発現と脛骨海綿骨骨密度の回復率との関連性の検討により、骨密度回復率とレプチン発現のみ有意な正相関を示し、MCP-1, plasminogen activator inhibitor-1, tumor necrosis factor-1 発現との関連には有意な相関が見られなかった。さらに、肥満状態は、再荷重させたマウスにおいて、血中レプチン濃度を有意に増加させた。血中レプチン濃度と骨密度、全身筋量、握力の回復率との関連の有意性を検討したところ、いずれも有意な正相関を示した。

これらの結果より、マウスにおいて、肥満は非荷重によって減少した骨量、筋量、筋力の再荷重による回復を促進させることが示唆された。またアディポカインとしてのレプチンが肥満による筋と骨の回復促進に寄与するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計14件)

1. Takafuji Y, Tatsumi K, Ishida M, Kawao N, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency suppresses osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells in mice. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):9687-9697. doi: 10.1002/jcp.27655. 査読有り.
2. Ishida M, Kawao N, Okada K, Tatsumi K, Sakai K, Nishio K, Kaji H. Serpina3n, Dominantly Expressed in Female Osteoblasts, Suppresses the Phenotypes of Differentiated Osteoblasts in Mice. *Endocrinology.* 2018;159(11):3775-3790. 査読有り.
3. Moritake A, Kawao N, Okada K, Ishida M, Tatsumi K, Matsuo O, Akagi M, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 is involved in interleukin-1-induced matrix metalloproteinase expression in murine chondrocytes. *Mod Rheumatol.* 2018;28:1-5. doi: 10.1080/14397595.2018.1525018. 査読有り.
4. Okada K, Kawao N, Tatsumi K, Ishida M, Takafuji Y, Kurashimo S, Okumoto K, Kojima K, Matsuo O, Kaji H. Roles of plasminogen in the alterations in bone marrow hematopoietic stem cells during bone repair. *Bone Rep.* 2018;8:195-203. doi: 10.1016/j.bonr.2018.04.005. 査読有り.
5. Shimoide T, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Horiuchi Y, Okumoto K, Kurashimo S, Ishida M, Tatsumi K, Matsuo O, Kaji H. Role of Macrophages and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Delayed Bone Repair in Diabetic Female Mice. *Endocrinology.*

- 2018;159(4):1875-1885. doi: 10.1210/en.2018-00085. 査読有り.
6. Kawao N, Moritake A, Tatsumi K, Kaji H. Roles of Irisin in the Linkage from Muscle to Bone During Mechanical Unloading in Mice. *Calcif Tissue Int*. 2018;103(1):24-34. doi: 10.1007/s00223-018-0387-3. 査読有り.
 7. Moritake A, Kawao N, Okada K, Tatsumi K, Ishida M, Okumoto K, Matsuo O, Akagi M, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency enhances subchondral osteopenia after induction of osteoarthritis in mice. *BMC Musculoskelet Disord*. 2017;18(1):392. doi: 10.1186/s12891-017-1752-5. 査読有り.
 8. Kawao N, Morita H, Nishida K, Obata K, Tatsumi K, Kaji H. Effects of hypergravity on gene levels in anti-gravity muscle and bone through the vestibular system in mice. *J Physiol Sci*. 2018 Sep;68(5):609-616. doi:10.1007/s12576-017-0566-4. 査読有り.
 9. Okada K, Kojima K, Okumoto K, Kawao N, Matsuo O, Kaji H. A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances FGF-2-induced skin wound healing in mice. *Thromb Res*. 2017;157:7-8. doi: 10.1016/j.thromres.2017.06.032. 査読有り.
 10. Kawao N, Morita H, Obata K, Tatsumi K, Kaji H. Role of follistatin in muscle and bone alterations induced by gravity change in mice. *J Cell Physiol*. 2018;233(2):1191-1201. doi: 10.1002/jcp.25986. 査読有り.
 11. Tamura Y, Kawao N, Shimoide T, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in glucocorticoid-induced muscle change in mice. *J Bone Miner Metab*. 2018;36(2):148-156. doi: 10.1007/s00774-017-0825-8. 査読有り.
 12. Kawao N, Morita H, Obata K, Tamura Y, Okumoto K, Kaji H. The vestibular system is critical for the changes in muscle and bone induced by hypergravity in mice. *Physiol Rep*. 2016;4(19). pii: e12979. 査読有り.
 13. Shimoide T, Kawao N, Tamura Y, Morita H, Kaji H. Novel roles of FKBP5 in muscle alteration induced by gravity change in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479(3):602-606. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.126. 査読有り.
 14. Tamura Y, Fujito H, Kawao N, Kaji H. Vitamin D deficiency aggravates diabetes-induced muscle wasting in female mice. *Diabetol Int*. 2016;8(1):52-58. doi: 10.1007/s13340-016-0278-7. 査読有り.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Kawao N, Shimoide T, Tamura Y, Okada K, Okumoto K, Kurashimo S, Horiuchi Y, Tatsumi K, Matsuo O, Kaji H. Roles of macrophages and PAI-1 in diabetic delayed bone repair in female mice. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies. 2019.3.28-31. 神戸
2. 河尾直之、森竹章公、辰巳公平、石田昌義、高藤義正、梶 博史。メカニカルストレスが筋・骨連関に及ぼす影響におけるアイリシンの役割。第 36 回日本骨代謝学会学術集会。2018.7.26-28. 長崎
3. 河尾直之、森竹章公、岡田清孝、奥本勝美、辰巳公平、松尾 理、赤木将男、梶 博史。変形性膝関節症病態の軟骨下骨減少における PAI-1 の役割。第 40 回日本血栓止血学会学術集会。2018.0628-30. 札幌
4. 河尾直之、下出孟史、田村行識、高藤義正、石田昌義、辰巳公平、森田啓之、梶 博史。重力変化により誘導される新規因子 FKBP5 の骨格筋における役割。第 4 回日本サルコペニア・フレイル学会大会。2017.10.14-15. 京都
5. 河尾直之、森田啓之、西田一晃、小畑孝二、石田昌義、辰巳公平、梶 博史。重力変化が抗重力筋と骨の遺伝子発現におよぼす影響と前庭系の関与。第 35 回日本骨代謝学会学術集会。2017.07.27-29. 福岡
6. 河尾直之、汐見光人、岡田清孝、松尾 理、赤木将男、梶 博史。閉経後骨粗鬆症病態における a2-アンチプラスミンの役割。第 39 回日本血栓止血学会学術集会。2017.6.8-10. 名古屋
7. 河尾直之、森田啓之、小畑孝二、辰巳公平、石田昌義、梶 博史。Role of follistatin in alterations of muscle and bone induced by hypergravity via the vestibular system in mice. 第 94 回日本生理学会大会。2017.3.28-30. 浜松
8. Kawao N, Shiomi A, Okada K, Matsuo O, Akagi M, Kaji H. Role of 2-antiplasmin in bone loss induced by ovariectomy in mice. The 1st Joint Meeting of International Congress on Fibrinolysis & Proteolysis and International Workshop on Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation.2016.10.17-21 Shizuoka, Japan
9. 河尾直之、森田啓之、小畑孝二、田村行識、奥本勝美、梶 博史。重力変化は前庭系と交感神経系を介して筋量と骨量に影響をおよぼす。第 34 回日本骨代謝学会学術集会。2016.07.20-23 大阪
10. 河尾直之、森田啓之、小畑孝二、田村行識、梶 博史。重力変化の前庭系を介する筋・骨への影響におけるフォリストアチンの役割。第 34 回日本骨代謝学会学術集会。2016.07.20-23 大阪

11. 河尾直之. 組織修復・再生と線溶. 第38回日本血栓止血学会学術集会. 2016.6.16-18 奈良

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.med.kindai.ac.jp/physio2/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：梶 博史

ローマ字氏名：(KAJI, hiroschi)

所属研究機関名：近畿大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 90346255

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：森田 啓之

ローマ字氏名：(MORITA, hironobu)

研究協力者氏名：奥本 勝美

ローマ字氏名：(OKUMOTO, katsumi)

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、研究者個人に帰属されます。