

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19591772
 研究課題名（和文）エストロゲン欠乏マウスに対する高脂質食投与が骨代謝におよぼす影響を明らかにする
 研究課題名（英文）To clarify the effects of high-fat diet on bone metabolism in ovariectomized mice
 研究代表者 田中 伸哉（TANAKA SHINYA）
 埼玉医科大学・医学部・講師
 研究者番号：20412645

研究成果の概要（和文）：

卵巣摘除マウスに対する高脂肪食投与は視床下部neuropeptideY mRNAの発現の上昇により末梢におけるdopamine作動性を亢進させ、骨髄接着基質細胞におけるnogginおよびranklの発現上昇による骨芽細胞性骨形成を低下、破骨細胞性骨吸収を亢進させ海綿骨量を減少する。

研究成果の概要（英文）：

The high-fat diet increases neuropeptideY mRNA expression in the hypothalamus and peripheral dopaminergic neuron activity and which results in decreases of the cancellous bone and the osteoblastic bone formation and increases in osteoclastic bone resorption in ovariectomized mice in relation with the increased expression of noggin and rankl mRNA in the bone marrow adherent cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：高脂血症

1. 研究開始当初の背景

閉経後骨粗鬆症はエストロゲン欠乏による、骨吸収、骨代謝回転の亢進を原因とする骨粗鬆症である。閉経後余命が約30年とエストロゲン欠乏状態が長く続く女性では、誰もが骨粗鬆症に陥る危険がある。

日本人の嗜好の変化にともない高脂質食の摂取割合が増加している。このことは近年メタリックシンドロームが注目されていることから明らかである。脂質代謝異常は糖代謝や血圧のコントロールに影響をおよぼすのみならず、血管の石灰化・骨化を生じるなど骨代謝にも影響をおよぼすものと考えられる。われわれのこれまでの研究では、高脂質食により骨髄接着器質細胞の骨芽細胞分化が抑制され、骨芽細胞にアポトーシスが誘導されることにより骨形成の低下が生じ、同時に、破骨細胞分化が亢進し骨吸収が亢進し、骨量および骨密度が低下すること。脂質代謝関連遺伝子（アポリポ蛋白E）の欠損によりさらに骨芽細胞のアポトーシス誘導が顕著になり骨密度の低下がすることが明らかになった。アポリポ蛋白は高脂質食による骨芽細胞の分化を抑制とアポトーシス誘導を制御している。骨に限らず高脂質食の影響は若年時には顕著ではないが、年齢が高くなるにしたがい顕著になり合併症が惹起される。年齢により低下する内分泌物質が恒常性を保つために高脂質食の影響を制御しているものと推察される。

この実験では、エストロゲン欠乏の状態により代謝状態が容易に変化する骨を題材にし、エストロゲン欠乏状態では高脂質食がどのように骨代謝に影響を与えるかを組織学的、細胞学的および分子生物学的に明らかにする。

2. 研究の目的

エストロゲン欠乏状態に対する高脂質食の投与によりエストロゲン欠乏による骨代謝変化が助長されるか否か、高脂質食投与による骨代謝変化はどのような機序が関与するか、副甲状腺ホルモン（PTH）の間歇投与により骨代謝変化が防止されるか否かを明らかにすること。

3. 研究の方法

7週齢の雌性C57BL/6Jマウスを1週間の予備飼育の後に体重にしたがって2群にわけ、卵巣摘除手術（OVX）および偽手術（sham）をおこなった。それぞれの群をさらに高脂質食

（ high-fat diet: 4.14kcal/g: (1.25%cholesterol, 7.5% cacao butter, 0.5%sodium cholate) ）投与群と通常食（ Standard diet: 3.43kcal/g ）投与群にわけそのうちの半数は術後6週間の飼育をし、残りのマウスは12週間の飼育の後に検体を摘出した。12週投与群の高脂質投与の2群はさらにPTH投与群と溶媒（vehicle）投与群にわけ、PTHもしくはvehicleを週5日投与した。12週間の飼育をおこなった通常食投与群にはvehicleのみを投与した。12週間飼育したマウスは2週毎に麻酔下に骨密度測定をおこなった。摂食量は個々のマウスについて調整をおこなった。

sham + standard diet: (SS)

sham + high-fat diet: (SH)

OVX + standard diet: (OS)

OVX + high-fat diet: (OH)

sham+ high-fat diet + PTH: (SHP)

OVX + high-fat diet + PTH: (OHP)

評価項目

ex vivo BMD 測定 (Aloka DSM- -R)

(1) 第2-4 腰椎 (術後6週、12週)

(2) 大腿骨 (全体、遠位 1/3) (術後6週、12週)

骨形態計測; 骨標識のため sacrifice7 日、3 日前にカルセイン (8mg/kg) の皮下注射をおこなった。摘出した骨組織について術後6週飼育の4群では凍結切片を薄切しでおこない、12週屠殺群の6群ではMMA包埋をもちいた。形態計測には system-supply 社製 Histometry-RT-Camera を用いた。パラメーターの計測内容・計算方法・表記は米骨骨代謝学会のガイドラインにしたがった¹⁾。

測定項目; 海綿骨量 (BV/TV)、破骨細胞面 (Oc.S/BS)、破骨細胞数 (Oc.N/BS)、骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、骨形成率 (BFR/BS)

視床下部のmRNA発現変化 (術後6週)

脳内ペプチド in situ hybridization : NeuropeptideY (NPY)

骨髄接着基質細胞のmRNA発現変化

(1) micro-array; 摘出直後の大腿骨・脛骨より骨髄細胞を alpha-MEM 培養液を用いて flush-out し、チャンパー内で6時間培養した後、接着基質細胞から mRNA を抽出し micro-array をおこなった (術後12週)。

(2) quantitative RT-PCR) : 上記と同

様の方法で接着基質細胞からmRNAを抽出し逆転写の後quantitative RT-PCRをおこなった。

測定項目；酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ：TRACP、receptor activator of NFkB ligand: RANKL、col1a1、osteocalcin、bone morphogenic protein2: BMP2、noggin (術後6週)

4. 研究成果

ex vivo BMD測定

(1) 第2-4腰椎

術後6週；OS群ではSS群、OH群と比較して有意に骨密度の低下がみられた。OH群ではOS群と同程度の低下がみられたがSS群、OH群との比較で有意差がみられなかった。

術後12週；有意差はみられなかったがOH群ではSS群、SH群と比較して低下がみられた。PTHの間歇投与によりSHP群ではSH群と比較して有意なBMD増加がみられたが、OHP群ではOH群と比較して有意なBMD増加がみられなかった。SHP群とOHP群には有意差をみとめ、OVXに対するPTH間歇投与による骨増加効果は高脂質食により抑制された。

(2) 大腿骨

術後6週；大腿骨全体ではOH群はSS群およびOS群と比較して有意なBMDの低下が認められた。OS群でもSH群と比較して有意な低下がみられたがSS群との間に差はみられなかった。大腿骨遠位1/3においてはOS群、OH群ともにSS群、SH群と比較して有意な低下がみられた。OH群はOS群より低下している傾向がみられたが有意差はみとめられなかった(図1)。

術後12週；大腿骨全体および大腿骨遠位1/3においてともにOH群で低下傾向を認めたが有意ではなかった。PTHの投与によりSHP群は増加傾向をしめしたがいずれの群と比較しても有意ではなかった。またOHP群ではSHP群と比較して増加が抑制されていたが有意ではなかった(図2)。

骨形態計測；脛骨近位海綿骨

(1) 術後6週；OH群ではOc.S/BS、Oc.N/BSともに増加しており、Oc.S/BSはSH群と比較して有意に増加していた。破骨細胞数の増加による骨吸収の亢進が生じていた。骨形成についてOH群ではSS群、SH群比較して有意にMS/BSの低下がみられた。MARには低下・亢進はみられなかった。BFR/BSはOH群で他の3群と比較して低下傾向をしめしたが有意ではなかった。OS群のMS/BSおよびMARはSS群、SH群と同様であった。OH群では活性化した骨芽細胞数の低下により骨形成が低下していると判断された。BV/TVはOS群でSS群より低下し、OH群でSS群および

SH群より低下していた。OH群では破骨細胞性骨吸収が亢進し、骨芽細胞性骨形成が低下したためSS群より海綿骨量が低下した。

(2) 術後12週；OS群、OH群ではともにOc.S/BS、Oc.N/BSの増加傾向がみられたが、ともにSS、OSとの間に有意差はみられなかった。OVXマウスに対する高脂質食投与による破骨細胞性骨吸収の亢進は12週では顕著ではなかった。OH群ではMS/BS、MARともに低下する傾向がみられ、BFR/BSはSS群、SH群と比較して有意に低下していた。OHPではOHと比較してMS/BSを増加させていたが有意ではなかった。PTHの投与はOVXに対する高脂質食投与による活性化した骨芽細胞数の低下を防止すると判断された。OH群では骨形成の低下によりOS群より海綿骨量が低下していた。PTHの骨形成促進効果は高脂質食とOVXの同時負荷によって抑制されていた。

視床下部におけるmRNA発現

術後6週でのマウスの視床下部におけるNPY mRNAはOS群でSS群と比較して有意に発現が低下し、OH群ではOS群と比較して有意に発現の亢進がみられた。

骨髄接着基質細胞のmRNA発現変化

(1) micro-array

術後12週のマウスから摘出した大腿骨・脛骨骨髄接着基質細胞のmicro-arrayによりOH群ではOS群と比較してdopamin receptorの発現およびnogginの発現亢進がみられた。

(2) quantitative RT-PCR

術後6週のマウスから摘出した大腿骨・脛骨骨髄接着細胞でopgの発現は各群で差がみられなかったが、rank1のmRNA発現はOH群でSS群、SH群と比較して有意に亢進していた。OS群、OH群ともにSS群と比較してrank1/opg比が上昇していた。OS群はSH群と比較してrank1/opg比の上昇がみられ、OH群ではさらに上昇していた。tracplはOS群、OH群で他の2群と比較して上昇する傾向があった。骨形成についてはOH群でbmp2発現が増加傾向にあった。OH群ではSS群と比較してnogginが有意に上昇していた。runx2-p2はSH群、OH群で低下傾向をしめした。col1a1はSH群、OS群、OH群の順に低下傾向を示していた。

考察

OVXマウスに対する高脂肪食投与は活性化した骨芽細胞数の低下による骨形成の低下と破骨細胞数の増加による骨吸収の亢進により普通食投与マウスと比較して海綿骨量が低下する傾向を認めた。脳内視床下部におけるNPYと、骨髄接着基質細胞のdopamine receptorのmRNA発現上昇が骨量減少に関与することが推察された。

高脂肪食投与が脳内dopamineを誘導されことはすでに報告されている。また、高脂質食の摂食はleptinさらにNPYの発現を促進する。脳内に投与したNPYにより細胞外のdopamineが増加することが報告されている。高脂質食が直接もしくはNPY発現を介してdopamineを増加させている。dopamineは細胞内にとりこまれ、軸索内を神経終末まで運ばれ神経伝達物質として働く。また脳内での代謝産物はadrenalineとなる。Adrenalineによる交感神経系の興奮が骨形成を抑制し骨吸収を亢進することについては多く報告されている。この研究では末梢のadrenaline受容体を直接確認していないが、dopamine D2 receptorが増加していることより、高脂質食投与したマウスでは交感神経活動が末梢でも亢進していることが推測される。

末梢においてadrenalineは骨芽細胞や幹細胞の α -および β -adrenagic receptorを介してRANKLの発現を促進する。また、直接的には破骨細胞上の β -adrenagic receptorを介し破骨細胞の骨吸収活性を促進する。この実験において、骨髄接着基質細胞ではranklおよびtracpの発現がOVXマウスで上昇、さらに高脂質食投与で上昇し、組織において破骨細胞数と骨吸収面上昇が認められた。術後6週で顕著であった破骨細胞面の増加は12週では顕著ではなくなっているが、これは骨吸収により骨量に対し骨梁面が相対的に増加したため差が減少したと考えられる

骨髄接着基質細胞では高脂質食ないしOVXはnogginの発現が亢進させる傾向があり、同時に負荷がかかることによりnogginの発現亢進が顕著となった。Noradrenalineがnogginの発現を上昇することが報告されている。BMP2により促進される骨芽細胞分化はnogginにより抑制される。この研究では、さらにrunx2-p2の抑制を介しcol1a1の発現を抑制しているように捉えられる。しかし、SH群、OS群を個々にみていくと骨芽細胞の分化調節が非常に複雑であることがわかる。高脂質食のみを投与したマウスではrunx2-p2の発現が抑制される傾向にあるが、OVXに高脂質食投与したマウスではこの傾向がすくなくなっている。OVXはrunx2-p2の発現にむしろ促進的に働く可能性がある。さらに、骨芽細胞分化においてrunxのみでなくその他の因子がcol1a1の発現調節に関与している。

OVXと高脂質食を負荷したマウスに対するPTH間歇投与は骨芽細胞面の低下を抑制し骨形成の低下を抑制したが、骨形成促進効果は高脂質食とOVXの同時投与で抑制されていた。

PTHには骨芽細胞分化促進効果があることが分かっており、PCRの結果から予測されるOVXと高脂質食による分化抑制に対し有効に機能したと推察される。しかし、PTH投与による骨石灰化速度の促進効果はOVXと高脂質食の同時負荷により抑制され骨形成促進効果が減弱した。

OVXマウスに対する高脂質食投与は顕著ではないが骨芽細胞性骨形成を抑制し、破骨細胞性骨吸収を亢進させる傾向があることを示した。摂食は生存のために必要な行動であり、偏食に対して体は寛容であり、摂食内容の多少の異常はhomeostasisにより打ち消されてしかるべきである。今研究でわれわれは高脂質食投与による脳内NPYの上昇とdopamineの活動性の上昇による骨量低下という仮説を証明した。しかし、prolactinの上昇による骨量減少はdopamineによって抑制されることも報告されている。生体は食餌を含め環境の変化に対応するために適確な反応をする。OVX状態に対する高脂質食投与により、OVXのみやshamマウスに高脂質食投与を投与した場合は違う脳内の反応が生じ、末梢では顕著でないが海綿骨量の減少がみられることが明らかになった。

結論

OVXマウスに対する高脂肪食投与は脳内NPYの発現の上昇により末梢におけるdopamine作動性を亢進させ、骨髄接着基質細胞におけるnogginおよびranklの発現上昇による骨芽細胞性骨形成を低下、破骨細胞性骨吸収を亢進させ海綿骨量を減少する。

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)

[雑誌論文](計5件)

Tanaka S, Narusawa K, Onishi H, Hijioka A, Kanazawa Y, Nishida S, Ikeda S, Nakamura T. Lower Osteocalcin and osteopontin contents of the femoral head in hip fracture patients than osteoarthritis patients. *Osteoporosis Int. in press*(査読有)

Katae Y, Tanaka S, Sakai A, Nagashima M, Hirasawa H, Nakamura T. Elcatonin injections suppress systemic bone resorption without affecting cortical bone regeneration after drill-hole injuries in mice. *J Orthop Res* 2009;27:1652-1658 (査読有)

Yamane H, Sakai A, Mori T, Tanaka

S, Moridera K, Nakamura T. The anabolic action of intermittent PTH in combination with cathepsin K inhibitor or alendronate differs depending on the remodeling status in bone in ovariectomized mice. Bone 2009;44:1055-1062 (査読有)

Sabanai K, Tsutsui M, Sakai A, Hirasawa H, Tanaka S, Nakamura E, Tanimoto A, Sasaguri Y, Ito M, Shimokawa H, Nakamura T, Yanagihara N. Genetic disruption of all NO synthase isoforms enhances BMD and bone turnover in mice in vivo: involvement of the renin-angiotensin system. J Bone Miner Res 2008;23:633-643 (査読有)

Taketa T, Sakai A, Tanaka S, Nakai K, Menuki K, Yamane H, Tanaka K, Nakamura T. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor prevents reduction of trabecular bone mass in collagen-induced arthritic mice in association with suppression of RANKL/OPG ratio and IL-6 mRNA expression in synovial tissues but not in bone marrow cells. J Bone Miner Metab 2008;26:143-151 (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

Notomi T, Tanaka S, Amano T, Nakamura T, Noda M, Skerry T, Kuno M. Pacemaker channel HCN1 affects osteoclast function in vitro and bone remodeling in vivo, 31st Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, 2009 Sep 11-15, Denver

納富拓也、田中伸哉、天野均、中村利孝、野田政樹、久野みゆき。ペースメーカーチャネル(HCN1)の破骨細胞機能と骨代謝機構への関与。第27回日本骨代謝学会学術集会、2009年7月23-25, 大阪

Tanaka S, Sakai A, Tanigawa T, Hirasawa H, Katae Y, Tanaka K, Nakamura. High-fat diet facilitated decreases in BMD of ovariectomized mice and suppressed the anabolic effects of PTH on bone. 30th annual meeting of American Society for Bone and Mineral Research. 2008 September 12-16, Montreal

田中伸哉、酒井昭典、谷川隆久、平澤英幸、片江祐二、田中和広、土屋卓人、中村利孝。卵巣摘除マウスに対する高脂質食投与は骨塩量低下を促進しPTH間歇投与による骨量増加効果を抑制する。第28回日本骨

形態計測学会 2008年7月27日 東京

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 伸哉 (TANAKA SHINYA)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号：20412645

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし