

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21500681

研究課題名（和文） 骨形成運動ではなく骨吸収抑制運動の同定とその機序解明

研究課題名（英文） Identification of the exercise not for bone formation but for bone absorption suppression and investigation of the underlying mechanisms

研究代表者

北村 敬一郎 (KITAMURA KEI-ICHIRO)

金沢大学・保健学系・准教授

研究者番号：80283117

研究成果の概要（和文）：マウス新生仔の頭蓋骨器官培養系をヒトの骨のモデルとして、低強度の振動加速度刺激による骨吸収ならびに骨形成細胞マーカー酵素活性及び遺伝子発現を調べ、0.5-G や 2.0-G の低加速度刺激により骨吸収は抑制され、骨形成は増加することを示した。また、ヒト運動時腰部加速度計測を行った結果、歩行により腰部に 0.5-G の運動加速度が発生していた。したがって、高齢者においては、跳躍などの高強度の運動でなくても多く歩くことで腰部の荷重負荷骨量低下防止ができる可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To investigate the effects of low intensity vibration on the enzyme activities and the gene expression for both bone absorption and formation, we cultivated neonatal mouse calvaria as human bone model. Mice calvaria treated with 0.5- and 2.0-G vibrational acceleration showed a significant inhibition of osteoclast enzyme activity and an increase of expression of type I collagen. We also found that slow walking generates 0.5-G or more acceleration at the waist. Therefore, our results suggested that not only high-intensity strength exercises such as jumping, but frequent walking can decrease bone absorption activity in the weight bearing bone of the waist in elderly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：運動処方と運動療法、骨粗鬆症、破骨細胞、骨芽細胞、マウス、頭蓋骨、バイブレーション、運動加速度記録システム

## 1. 研究開始当初の背景

従来、跳躍のような高強度運動や高加速度バイブレーション刺激 ( $3 \times g$  以上) により骨形成を促すことが報告されており、中高年には負担が大き過ぎる強度で継続実施は困難

であった。ところが、Rubin らは、羊の後肢へ極めて低強度のバイブレーション刺激 ( $0.3 \times g$ , 30 Hz) を1年間与えて、海綿骨が特異的に増加したという結果を2001年 Nature 誌に発表した。しかし、Rubin らの研究は MRI 画像観察からの結論で、細胞レ

ベルの作用は不明であった。

力学的刺激に対する骨代謝応答のメカニズムは、ほとんどが骨芽細胞（骨形成する細胞）株などの単独細胞培養系による *in vitro* 実験である。しかし、実際の骨組織は、骨芽細胞の他に破骨細胞（骨を壊し骨塩を吸収する細胞）、骨基質（コラーゲン等のたんぱく質）が共存している。そして、破骨細胞の成熟・活性化にはその細胞膜上の受容体 Receptor Activator of NF- $\kappa$ B (RANK) への骨芽細胞が発現するリガンド Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) の結合が必須である。したがって、生体内の骨組織に対する作用を正確に評価するためには、骨芽細胞の株細胞のような単純な系ではなく、破骨細胞と骨芽細胞が共存する *in vitro* の評価システムでの研究が望まれていた。

われわれは、破骨細胞と骨芽細胞が共存する魚類の鱗が、添加的石灰化と直接骨化によって形成される膜性骨であることに注目し、鱗を用いて破骨及び骨芽細胞活性を評価するアッセイ系を世界に先駆け開発し、2002年報告した。この系では単独細胞株ではわからない骨組織の相互作用を、生体内に近い状態で再現でき、この系を用いて骨代謝に関与するホルモンが哺乳類と同様に作用することを確認している。さらに、独自にバイブレーションによる加速度負荷装置を開発し、この鱗のアッセイ系に応用したところ、0.5-G という低振幅加速度の刺激にも破骨細胞が応答し、その活性が低下することを初めて証明した。つまり、動物実験ではわからなかった低強度刺激による海綿骨の特異的増加は、骨芽細胞活性増加による骨形成ではなく、破骨細胞の活性抑制による相対的骨吸収低下がもたらした骨量増加であることが示唆された。ただ、鱗アッセイ系のキンギョは魚類であり、ゲノム解析も未終了で、遺伝子発現解析には困難な点があった。そこでわれわれは、哺乳類で低強度力学的刺激に対し同様の細胞応答と、加えて遺伝子発現を示すことを確認するため、鱗同様の膜性骨の単純な系であるマウス新生仔の頭頂骨を対象に調べることにした。

## 2. 研究の目的

1) マウス新生仔頭頂骨でバイブレーションに対する影響評価のバイオアッセイ系を確立する。

2) 1) のアッセイ系を用いた低強度加速度による細胞特異的のmarker酵素活性及び特定遺伝子群の発現変化から、骨代謝が骨形成促進に動いているのか、骨吸収抑制に動いているのかを明らかにする。

3) アレイ解析により低強度加速度刺激に対する遺伝子発現を網羅的に解析する。

4) 低強度から高強度運動まで広範囲の加速度強度を計測できる運動加速度記録システムを開発する。

5) 健常ボランティア20名によるヒト運動時荷重負荷骨への負荷加速度を計測する。

6) *in vitro* 培養系での最適負荷加速度強度と運動時計測加速度との照合から、腰椎骨などの荷重負荷骨のための骨形成促進および骨吸収抑制に最適な運動を同定する。

7) 低強度加速度による骨代謝特異的の遺伝子群の発現変化とアレイ解析による遺伝子発現の網羅的解析から、低強度加速度刺激による骨代謝変化のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

膜性骨の単純な系で、1個体から左右対称の薄くそのまま器官培養可能な骨片が得られる生後3日齢マウス新生仔の頭頂骨を用いた。

(1) マウスをジエチルエーテル過剰吸入麻酔後断頭する。クリーンベンチ内の実体顕微鏡下でピンセットにより頭皮を剥がし、メスで頭頂骨を切り出し、PBSで洗浄後左右対称に切り分ける。それぞれを骨組織用合成培地 (BGJb 培地、10%FBS および抗生物質入り) が入った 1.5ml チューブ内で綿球により位置固定し、一方を対照群とし、他方を負荷群とした。

(2) モニター画面で負荷強度が確認できる加速度負荷装置により正確な加速度を20分間負荷後、37°C、(骨組織用合成培地、5%CO<sub>2</sub>)で6時間および24時間培養し、生食水で洗浄後-20°Cで凍結保存した。破骨及び骨芽細胞活性は、切片を蒸留水中で超音波破碎し、その上清を用いmarker酵素であるアルカリフォスファターゼと酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ活性を測定した。

(3) 遺伝子発現は、破骨細胞と骨芽細胞の機能遺伝子と分化に関わる遺伝子の発現をリアルタイムPCR法を用いて解析した。さらに、マウス遺伝子発現のアレイ解析用市販キットと解析ソフトを使用し、どの系列の遺伝子群が変化したかも解析した。

(4) ヒト運動時加速度記録は、ピエゾ抵抗型3軸加速度センサ MA3 (MicroStone 社) 3個からの電位をA/Dコンバータによりサンプリングし、データロガーへ記録できる装置を作製した。この装置の3軸加速度センサを被験者の脛 (腓側顆より3cm近位)、膝 (腓骨頭より2cm近位) および腰 (L4棘上) に貼り付け、さらにサポータやコルセットで軟部組織の振動がないよう固定し、21名の健常ボランティアを対象に、平地歩行、階段昇降、垂直ジャンプを課してその時の加速度を計測した。各軸方向の加速度は、市販のデータ解析ソフト BIMUTAS II (KISSE COMTEC 社)

で計測し、最終的に3軸の合成ベクトルを求めてその部位の負荷加速度とした。

#### 4. 研究成果

(1) ddY マウス新生仔からの頭頂骨の切り出しおよび培養手順と、マウス頭頂骨を蒸留水中で超音波破碎機を用いて破碎後遠心し、上精を用いて破骨及び骨芽細胞活性測定をそれぞれのマーカー酵素である酒石酸耐性酸フォスファターゼとアルカリフォスファターゼによりタンパク量当たりの酵素活性を測定する系を確立した。

(2) 破骨細胞マーカー酵素活性解析では、0.5 G 刺激後6時間で、67%の個体で酵素活性が低下し、2 G 刺激では83%の個体で酵素活性が低下した。一方、骨芽細胞マーカー酵素活性は、刺激後24hで0.5 G 刺激では66%個体で酵素活性が増加し、2 G 刺激では全個体の酵素活性が増加した。したがって、0.5 G 刺激による骨吸収活性抑制と、2 G 刺激による骨形成活性増加が認められた。

(3) DNAマイクロアレイで得られた網羅的な遺伝子発現データのネットワーク解析の結果、骨代謝系の遺伝子発現への影響が見られ、中でも2 G 刺激後6時間で $\alpha 1$ コラーゲン(骨基質タンパク)の発現が10倍に上昇することを見いだした。

(4) これまで低強度(0.3Gバイブレーション)加速度刺激でどうして海綿骨が特異的に増加したのか不明であったが、われわれの解析から、低強度刺激でも骨吸収の抑制と同時に骨形成も起こることが認められた。

(5) 運動中に過重負荷骨に生じる運動加速度を同時に3か所の体部位で計測できるポータブル加速度記録装置および解析システムを開発した。

(6) 21名の健常ボランティアを対象にしたポータブル加速度記録装置による運動時過重負荷骨での運動加速度測定から、垂直跳び以外では腰部に3~5Gの大きな加速度は生じないことと、水平歩行でも0.5~1Gの加速度が加わることを明らかにした。

(7) マウス新生仔の頭蓋骨器官培養系の酵素活性及び遺伝子発現の結果とポータブル加速度記録装置による運動時過重負荷骨での運動加速度測定から、中高年向けの無理のない骨粗鬆症予防のための骨吸収抑制運動は、日常生活における活発な歩行運動であることを根拠と共に社会へ提示できた。

#### 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9件)

① Suzuki, N., Yachiguchi, K., Hayakawa, K., Takada, K., Tabata, M. J., Kitamura, K., Srivastav, A. K., Chowdhury, V. S., Oshima, Y., Hattori, A. Effects of inorganic mercury on osteoclasts and osteoblasts of the goldfish scales in an in vitro. J. Fac. Agr. Kyushu U. 56(2011), 47-51. (査読有)

② Kitamura, K., Chen, W., Zhu, X., Suzuki, N., Yano, S., Nemoto, T., Acceleration-based study of optimum exercise for human weight-bearing bones enhancement. Biological Sciences in Space, 24(2010), 83-90, (査読有)

③ Hayakawa, K., Suzuki, N., Kitamura, K., Bekki, K., Nakano, J., Yoshita, M., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N. Toxic effect of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites on fish bone metabolism. WIT Transactions on Ecology and the Environment, 135(2010), 231-241, (査読有)

④ Kitamura, K. Effects of low-intensity ultrasound on osteoblasts and osteoclasts in goldfish scale. Biological Sciences in Space, 24(2010), 29-34, (査読有)

⑤ Kitamura, K., Suzuki, N., Sato, Y., Nemoto, T., Ikegame, M., Yamamoto, T., Shimizu, N., Kondo, T., Furusawa, Y., Shigehito Wada, S., Hattori, A. Osteoblast activity in the goldfish scale responds sensitively to mechanical stress. Comp. Biochem. Physiol. A, 156(2010), 357-363, (査読有)

⑥ Zhu, X., Chen, W., Nemoto, T., Kitamura, K., and Wei, D., Long-term monitoring of heart rate, respiration rhythm, and body movement during sleep based on network. Telemedicine and e-Health, 16(2010), 244-253, (査読有)

⑦ Suzuki, N., Kitamura, K., et al., Response of osteoblasts and osteoclasts in regenerating scales to gravity loading using an assay system developed with regenerating scales. Biological Sciences in Space, 23 (2009), 211-217, (査読有)

⑧ Kitamura, K., Zhu, X., Chen, W., Nemoto, T. Development of a new method for the noninvasive measurement of deep body temperature without a heater. Medical Engineering and Physics, 32 (2010), 1-6, (査読有)

⑨ Kitamura, K., Nemoto, T., Sato, N., Chen, W. Development of a new

accelerometer based physical activity-monitoring system using a high-frequency sampling rate. Biological Sciences in Space, 32 (2009), 77-83, (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Maeda, M., Hayashi, A., Nakamura, S., Serino, T., Kitamura, K., Suzuki, N.: Teleost Scale metabolite profiling reveals differential changes in response to gravitational stress. 58th American Society for Mass Spectrometry conference on Mass Spectrometry Conference, Salt Lake City, Utah, USA, May 23 - 27, 2010.
- ② Kitamura, K.: Investigation of the effects of low-intensity ultrasound on bone metabolism in the scale of goldfish (*Carassius auratus*), JSBSS23, Headquarters building, Tsukuba Space Center, JAXA (2009. Oct 2-3), Japan

[その他]

ホームページ等

[http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran\\_ku/info\\_e.php?teacher\\_id=439](http://kurt.kanazawa-u.ac.jp/souran_ku/info_e.php?teacher_id=439)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 敬一郎 (KITAMURA KEI-ICHIRO)  
金沢大学・保健学系・准教授  
研究者番号：80283117

### (2) 研究分担者

池亀 美華 (IKEGAME MIKA)  
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：70282986  
(H21：研究分担者)

高崎 一朗 (TAKASAKI ICHIRO)  
富山大学・生命科学先端研究センター・助教  
研究者番号：00397176  
(H21→H22：研究分担者)

### (3) 連携研究者

なし