

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03108

研究課題名(和文)閉経後の骨粗鬆症と体重増加を制御する本質的共通分子機構の解明と治療戦略への展開

研究課題名(英文)Elucidation of essential common molecular mechanisms that control postmenopausal osteoporosis and weight gain and development of therapeutic strategies

研究代表者

自見 英治郎(Jimi, Eijiro)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：40276598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲン欠乏は、NF- κ Bの活性化を介して骨吸収と体重増加を促進する。我々はNF- κ Bレポーターマウスを樹立し、卵巣切除(OVX)したところ、OVX後の発光強度は長骨の骨端とWATで増加した。野生型(WT)およびNF- κ Bの転写活性が亢進するp65(S534A)ノックイン(S534A KI)マウスにOVXを行うと、S534A KIマウスでは耐糖能の悪化に伴う体重増加と骨形成の抑制と骨髄脂肪細胞の増加により海綿骨量が減少した。抗アルコール薬であるジスルフィラムは、OVXによる長骨の骨端およびWATのNF- κ B活性化を抑制し、体重増加と骨量減少も抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉経後の女性の骨量の減少は運動機能の低下、また体重増加は生活習慣病やがんの発症と関連する。我々は閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出術(OVX)を用いて、OVX後1週間で骨端部と白色脂肪組織で骨代謝やエネルギー代謝に重要なNF- κ Bが活性化されること、NF- κ Bの活性化が亢進したマウスではOVX後の骨量減少と体重増加が亢進することを明らかにした。さらに、NF- κ Bの活性化の抑制効果を持つ抗アルコール薬であるジスルフィラム(DSF)の投与が、OVX後の骨量減少と体重増加を抑制することを明らかにした。以上の結果は、NF- κ Bが閉経後の骨量減少と体重増加の新たな治療標的になる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Postmenopausal women experience bone loss and weight gain via NF- κ B activation. We examined the role of NF- κ B in bone and energy metabolism following menopause. NF- κ B reporter mice, which can be used to measure NF- κ B activation in vivo, were ovariectomized (OVX) and the luminescence intensity after OVX increased in the epiphyses of the long bones and WAT, but not in the other tissues. OVX was performed on wild-type (WT) and p65 (S534A) mutant knock-in mice, in which enhances the transcriptional activity of NF- κ B. Compared to WT mice, weight gain with worsening glucose tolerance and trabecular bone loss due to the suppression of bone formation and increase in bone marrow adipocytes were observed in the S534A KI-OVX group. Disulfiram, an anti-alcoholic drug, suppressed OVX-induced activation of NF- κ B and also suppressed weight gain and bone loss. Taken together, activation of NF- κ B in the epiphyses of long bones and WAT after OVX regulates post-OVX weight gain and bone loss.

研究分野：骨・エネルギー代謝研究

キーワード：NF- κ B 閉経後骨粗鬆症 肥満 エストロゲン

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

閉経後女性では、骨密度の低下と、内臓脂肪の増加による体重増加が起こる。骨密度の低下は、骨折リスクを増大させ、内臓脂肪型肥満は、脂質異常症、メタボリック症候群や女性特有の乳がんなど、さまざまな疾患の発症リスクを上げる。超高齢化社会の健康寿命を伸ばすために、閉経後の骨量減少や肥満の予防は重要な課題である。

女性ホルモンであるエストロゲンの欠乏は、骨組織で骨形成と骨吸収の両方を活性化する。骨吸収量が骨形成量を上回るために、骨量が減少する。エストロゲンは、骨芽細胞の RANKL 発現、破骨細胞の分化や生存、さらに骨細胞の生存を制御することによって骨量を調節している。

一方、閉経後の女性の肥満が亢進する理由は不明な点が多い。エストロゲン欠乏による体重増加が視床下部に作用して、摂食・満腹中枢の制御の不調、脂肪組織のエネルギー恒常性やアディポカインの産生量の変化に起因するという報告がある。しかし、体重増加におけるエストロゲンの標的臓器について、統一した見解は得られていない。

Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) は、炎症反応や免疫応答などを始め、骨代謝やエネルギー代謝にも重要な転写因子である。NF- κ B1/NF- κ B2 は骨吸収を担う破骨細胞の分化に必須で、二重欠損マウスは破骨細胞が存在しない大理石骨病を呈する。また、NF- κ B は骨芽細胞による骨形成を負に制御することも知られており、骨芽細胞特異的に NF- κ B の活性化に必須の IKK β の機能を阻害したマウスでは骨量が増える。一方、エネルギー代謝に重要な臓器である肝臓や筋肉で NF- κ B の活性化を阻害すると、高脂肪食摂取による肥満やインスリン抵抗性が見られなくなる。

以上の結果は、女性ホルモン欠乏による骨量減少と体重増加には、共に NF- κ B シグナルが重要なことを示す。

2. 研究の目的

骨量減少と体重増加に重要な女性ホルモンの欠乏で起きる NF- κ B シグナルの活性化組織・細胞を同定し、特異的に NF- κ B シグナルを抑制することで、閉経後の骨量減少とエネルギー代謝の悪化に対する革新的な治療法や予防法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

すべての手順は九州大学動物管理委員会の承認を受(承認番号:A22-236-2)け、日本動物実験協議会のガイドラインおよび学術会議の動物実験の適正な実施に関するガイドラインに従って実施した。我々は、NF- κ B の p65 サブユニットの 534 位のセリン(ヒト Ser 536 のマウスホモログ)をアラニンに置換したノックイン(S534A KI)マウスを作製した。9週齢の雌 C57BL/6J または S534A KI マウスに偽手術(Sham)または 卵巣摘出術(OVX)を行った。OVX 後、マウスの体重を毎週 15:00 にモニタリングした。

雌 C57BL/6J マウスをランダムに3つのグループに分け、以下の実験を行った: ① 偽手術 + プロピレングリコール中の DMSO、n = 8)、② OVX グループ (プロピレン中の OVX + DMSO) グリコール、n = 9)、および、③ OVX + DSF グループ (OVX 操作 + DSF、50 mg/kg、n = 9)。OVX 後、マウスに異なる溶液を2日おきの皮下注射により4週間投与した。

(2) ex vivo イメージング

NF- κ B の 5 つの結合部位 (5'-GGGAATTTCCG-3') が最小プロモーターの制御下でルシフェラーゼ遺伝子に直接連結されている NF- κ B レポーター マウスを ex vivo イメージングに使用した (補足図 1A)。OVX1週間後にマウスに D-ルシフェリン(150 mg/kg)を腹腔内注射した。脳、胸腺、肺、肝臓、脾臓、筋肉、骨、pgWAT、および褐色脂肪組織 (BAT) を分離し、IVIS スペクトル (PerkinElmer) を使用して生物発光シグナルを取得した。

(3) 代謝評価

マウスを 16 時間絶食させた後、耐糖能試験 (GTT) を実施した。グルコース (2g/kg) を腹腔内注射し、FreeStyle Lite グルコース テスト ストリップを使用して異なる時間に血糖濃度を測定した。インスリン負荷試験 (ITT) を行うために、インスリン (OVX 3 週間後のマウスには 0.5 U/kg、OVX の 7 週間後のマウスには 0.25 U/kg を腹腔内注射しました。4 時間の絶食後、異なる時間に血糖濃度を測定した。

(4) μ CT による骨の3次元構造解析

マウスを安楽死させた後、大腿骨を 4% パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液で固定した。 μ CT (ScanXmate-L090T, Comscan Co) を利用して、大腿骨の三次元 (3D) 再構成画像を取得し、骨密度 (BMD) を分析した。

(5) 組織学的解析

組織を 4%PFA 溶液で固定後、通法に従ってヘマトキシリン&エオジン染色をおこなった。破骨細胞は酒石酸抵抗性ホスファターゼ (TRAP) 染色で同定した。骨の組織形態計測パラメータは、Dempsterらの方法に従って計算した。

(6) 骨髄間葉細胞 (BMC) の調製と分化

BMC は、生後 4 週目、またはシャムまたは OVX 投与後 4 週間の雌 WT または S534A KI マウス的大腿骨および脛骨から単離した。脂肪細胞分化は、BMC をデキサメタゾン (1 μ m)、トログリタゾン (1 μ m)、インスリン (10 μ g/ml)、および IBMX (0.5 μ m) で 6 日間処理し、その後さらに 2 日間インスリン (10 μ g/ml) で処理した。骨芽細胞分化は、BMC を 7 または 21 日間、 β -グリセロリン酸 (β -GP) (10 mM) およびアスコルビン酸 (A.A) (50 μ g/mL) で処理し、骨芽細胞分化をアルカリホスファターゼ (ALP) 染色、および石灰化能を Alizarin Red 染色で評価した。

4. 研究成果

(1) OVX 手術後の S534A マウス的大腿骨および脂肪組織における NF- κ B 活性の上昇

OVX 後にどの組織で NF- κ B が活性化されるかを調べるために、9 週齢の雌 NF- κ B レポーターマウスに Sham または OVX を行い、1 週間後に D-ルシフェリンを腹腔内投与しました。主要組織を摘出し、*ex vivo* イメージングを行ったところ、OVX グループでは、大腿骨骨端と WAT で発光が強くなったが、Sham グループと比較して他の組織では有意な差はなかった。次に、S534A KI マウスと NF- κ B レポーターマウスを交配し、Sham または OVX を行い、1 週間後の骨および WAT における NF- κ B の活性化を調べた。NF- κ B レポーターマウスと比較して、S534A KI/NF- κ B レポーターマウス的大腿骨端および脂肪組織でより強い発光が検出された。これらの結果は、OVX 後 1 週間で大腿骨骨端および WAT で NF- κ B 活性が増加し、S534A KI マウスでは NF- κ B 活性がさらに増強された。

(2) OVX 手術後の S534A KI マウスにおける体重増加と脂肪組織沈着の増加

閉経後の体重増加における NF- κ B 経路の影響を調べるために、Sham または OVX 後の S534A KI マウスのエネルギー代謝を WT 同腹子と比較した。WT および S534A KI 雌の体重を術後毎週測定したところ、S534A KI-OVX マウスは術後 4、8、および 12 週間で WT-OVX マウスよりも大幅に体重が増加した。WT-Sham マウスと S534A KI-Sham マウスの間では、20 週齢 (Sham 後 12 週間) で体重の有意な差が観察された。ただし、食物摂取量は 4 つのグループ間で差はなかった。OVX 4 週間後、S534A KI マウスの性線周囲白色脂肪組織 (pgWAT) の重量が WT マウスよりも有意に高かった。組織学的分析により、S534A KI-Sham の gWAT の脂肪細胞のサイズが WT-Sham よりも大きく、OVX による脂肪細胞の増加が OVX 4 週後の S534A KI マウスで顕著であった。

(3) S534A KI マウスのインスリン抵抗性

S534A KI マウスの糖代謝 (IPGTT)、インスリン感受性 (ITT)、およびインスリン耐性 (HOMA-IR) を調査したところ、IPGTT の曲線下面積 (AUC) 値は、対照グループよりも OVX グループの方が高かった。ITT テストでは、WT-OVX マウスは WT-Sham マウスと同様の AUC 値を示した。インスリン抵抗性は、対応する WT グループと比較して、S534A KI グループとで有意に観察された OVX 8 週後の S534A KI マウスにおける Sham グループと OVX グループ間のインスリン抵抗性は、OVX 4 週後の結果 (図 3B) と比較してより顕著になった。HOMA-IR は、S534A KI マウスで増加した。これらの結果は、S534A KI マウスでは糖代謝障害、特にインスリン抵抗性が著しく促進されており、これが卵巣由来のエストロゲン枯渇状態で起こる糖代謝異常や肥満の一因となっている可能性があることを示唆した。

CD11c および脂肪関連サイトカインの発現を調べたところ、WT-OVX マウスと比較して、S534A KI-OVX マウスの pgWAT では、CD11c とそれに続く TNF- α の発現が有意に増加したが、

IL-6 と IL-1 β の発現は増加しなかった。アディポネクチンの発現は、S534A KI-Sham マウスと比較して、S534A KI-OVX マウスの pgWAT で減少したが、レプチンの発現レベルにグループ間の顕著な差はなかった。これらの観察は、S534A KI-OVX マウスの肥満と異常なエネルギー代謝がこれらの脂肪組織で引き起こされたことを示唆した。

(4) S534A KI マウスにおける OVX 誘発性海綿骨量のさらなる減少

WT マウスと S534A KI マウスの OVX 後の骨量減少を比較したところ、WT-Sham マウスと S534A KI-Sham マウスの間で骨塩密度 (BMD) に違いはなかったが、WT-OVX 群と比較して、S534A KI-OVX グループの BMD はさらに減少した。

WT-OVX マウスと比較して S534A KI-OVX マウスの骨密度がさらに減少したのが、骨吸収の亢進によるものなのか、骨形成の抑制によるものなのかを調べるために、骨形態計測を実施した。S534A KI-OVX マウスの破骨細胞の数は、WT-OVX マウスの破骨細胞の数と変化しなかった。in vivo の結果と一致して、WT-Sham、WT-OVX、および S534A KI-Sham、KI-OVX マウスに由来する骨髄細胞における M-CSF および RANKL によって誘導される破骨細胞形成には有意差はなかった。破骨細胞の骨吸収活性は、S534A KI-OVX マウスでわずかに亢進した。

WT マウスと S534A KI マウスの Sham 群と OVX 群でカルセインとアリザリンレッドによる二重標識を実行し、骨形成速度を評価したところ、WT-Sham マウスと S534A KI-Sham マウスの間で標識幅に有意差はなかったが、標識幅は WT-OVX マウスでは増加しましたが、S534A KI-OVX マウスでは Sham グループの標識幅と有意な差がなかった。また、骨形態計測の結果、WT-OVX マウスでは、WT-Sham マウスと比較して骨形成速度 (BFR) が亢進したが、S534A KI-OVX マウスの BFR は、S534A KI-Sham マウスの骨形成パラメータと同等であった。以上の結果は、S534A KI マウスにおける OVX 誘発性の海綿骨の減少は骨形成の抑制に起因することが示唆された。

(5) NF- κ B 活性化による骨芽細胞と脂肪細胞の運命の決定

組織学的分析でも、WT-OVX マウスと比較して、S534A KI-OVX マウスでは骨梁の顕著な減少と骨髄脂肪細胞の増加が見られた。オイルレッド O 染色でも、骨髄脂肪細胞の数が WT-OVX マウスよりも S534A KI-OVX マウスで多いことが確認された。

そこで、WT-Sham、WT-OVX、S534A KI-Sham、S534A KI-OVX マウスの骨髄から骨髄間葉系細胞 (BMC) を調製し、骨芽細胞と脂肪細胞への分化能を調べた。骨芽細胞の分化マーカーである ALP 陽性細胞の数と ALP 活性は、Sham グループの細胞と比較して OVX グループで増加しましたが、ALP 陽性細胞数と ALP 活性の両方が、WT マウスよりも S534A KI 由来の BMC で低かった。

対照的に、S534A KI マウスからの BMC の脂肪細胞への分化は、アディポネクチンの発現を伴い、WT マウスと比較して増強されており、S534A KI マウスからの BMSC が脂肪細胞へ分化する可能性が高いことを示唆した。これらの結果は、NF- κ B 活性化の程度が骨芽細胞と脂肪細胞の分化を決定すると考えられた。

(6) ジスルフィラム (DSF) による NF- κ B の阻害と OVX 後の体重増加および骨量減少に対する抑制効果

アルデヒド脱水素酵素阻害剤であるジスルフィラム (DSF) は、60 年以上アルコール依存症の治療に使用されている臨床的に安全な薬である。雌の NF- κ B レポーターマウスに OVX を実施し、DSF (50 mg/kg) を毎日皮下投与すると、長骨の骨端および pgWAT における OVX 誘発性の NF- κ B 活性化を抑制した。次に、雌の WT マウスに OVX を施し、DSF を 2 日ごとに皮下投与して体重、および骨量減少を測定した。DSF は食物摂取量を抑制することなく、OVX 誘発の pgWAT の重量増加を抑制し、体重増加を抑制した。さらに、DSF は OVX 群による海綿骨密度の減少を抑制した。以上の結果から、DSF は閉経後の体重増加と骨量減少の両方を抑制した。

以上の結果より、NF- κ B の活性化は閉経後の体重増加と骨量減少の治療標的となる可能性があり、DSF はその有望な薬剤の 1 つである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aoki T, Hiura F, Li A, Yang N, Takakura-Hino N, Mukai S, Matsuda M, Nishimura F, Jimi E	4. 巻 -
2. 論文標題 Inhibition of Non-Canonical NF- B signaling suppresses periodontal inflammation and bone loss	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Jimi E, Katagiri T.	4. 巻 23
2. 論文標題 Critical roles of NF- B signaling molecules in bone metabolism revealed by genetic mutations in osteopetrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 7995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23147995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mori K, Mizokami A, Sano T, Mukai S, Hiura F, Ayukawa Y, Koyano K, Kanematsu T, Jimi E	4. 巻 253
2. 論文標題 RANKL elevation activates NIK/NF- B pathway, inducing obesity in ovariectomized mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1530/JOE-21-0424	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Huang F, Gao J, Li A, Mizokami A, Jimi E
2. 発表標題 The regulation of NF- B signaling by p65 serine 534 phosphorylation is involved in both postmenopausal osteoporosis and weight gain
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会（東京）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Huang F, Gao J, Li A, Mizokami A, Jimi E
2. 発表標題 NF- B signaling is involved in both postmenopausal osteoporosis and weight gain
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（福岡）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 自見 英治郎
2. 発表標題 加齢に伴う病態変化の生化学
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（福岡）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 自見 英治郎
2. 発表標題 閉経後骨粗しょう症と体重増加の共通分子機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（福岡）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黄 菲, 高 靖, 李 傲男, 溝上 顕子, 自見英治郎
2. 発表標題 NF- B シグナルの調節メカニズムは閉経後骨粗鬆症と体重増加に關与する
3. 学会等名 第64回齒科基礎医学会学术大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 青木 司, 松田 美穂, 自見英治郎
2. 発表標題 転写因子 NF- B の新たな活性化制御機構とその機能解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 馨代, 溝上 顕子, 佐野 朋美, 兼松 隆, 自見英治郎
2. 発表標題 閉経による血清RANKL濃度の上昇はNF- B の非古典的経路を活性化し肥満を引き起こす
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黄 菲、高 靖、自見英治郎
2. 発表標題 The role of serine 536 phosphorylation of NF- B p65 in the bone loss and obesity in postmenopausal women
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mori K, Mizokami A, Sano T, Ayukawa Y, Kanematsu T, Jimi E
2. 発表標題 Soluble RANKL exacerbates menopause-associated obesity via non-canonical NF- B signaling pathway
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience & OBT Research Center 5th Joint International Symposium 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学歯学研究院OBT研究センター <https://www.dent.kyushu-u.ac.jp/project/#obt>
大学院生の黄 菲 先生が第65回歯科基礎医学会学術大会にてモリタ優秀発表賞を受賞 <https://www.dent.kyushu-u.ac.jp/240209-2/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	片桐 岳信 (Katagiri Takenobu) (80245802)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	
研究分担者	川端 由子 (Kawabata Yuko) (40906830)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------