

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300259

研究課題名(和文)骨量調節に関与するアルカリホスファターゼ遺伝子発現と加齢・老化や栄養因子との関連

研究課題名(英文) Association between functional alkaline phosphatase gene expression and aging and/or nutritional factors

研究代表者

五関 正江 (Goseki, Masae)

日本女子大学・家政学部・教授

研究者番号：00170449

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルカリホスファターゼ(ALP)はリン酸エステルを加水分解する反応を触媒する酵素で、骨型ALPは石灰化との関連が深い。骨量は食生活等の環境因子と複数の遺伝因子によって決定される。本研究では、本酵素の遺伝子発現と加齢・老化や栄養因子との関連について検討を行い、リン酸代謝を含めたミネラル代謝等に関する有用な結果を示唆することができた。すなわち、実験実施計画に従って、骨量調節に関与するALPや骨代謝等への各種栄養因子(ビタミン、高脂肪食など)の影響を検討し論文に報告した。さらにヒトを対象とした栄養素等摂取状況と骨量測定、骨型ALP、遺伝子多型等との関連についても詳細な解析を行って論文に報告した。

研究成果の概要(英文)：Alkaline phosphatase (ALP) hydrolyzes a variety of monophosphate esters, and bone-type ALP is indispensable for bone mineralization. The bone mass may be determined by genetic as well as environmental factors. In this study, we demonstrated the effects of ALP gene expression on associations among aging and nutritional factors. Our data may be useful for the regulation of mineral metabolism, including the phosphate metabolism pathway. Following the research plan, we examined the effects on bone-type ALP and bone metabolism of various nutrients (vitamins and high-fat diet, etc.), and we reported our findings. Moreover, we analyzed the associations among dietary nutrients intakes, bone mass, bone-type ALP, and related genetic polymorphisms, and we published our discoveries.

研究分野：総合領域

キーワード：骨量調節 アルカリホスファターゼ 遺伝子発現 栄養因子 食生活

1. 研究開始当初の背景

アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP) は植物を除き、細菌から高等動物まで広く生物界に存在し、骨、肝臓、腎臓、小腸、胎盤など種々の組織に存在する酵素である。ヒトでは、骨、肝臓、腎臓などに存在する組織非特異型ALP

(tissue-nonspecific ALP: TNSALP)、小腸型、胎盤型、生殖細胞型の4つのアイソザイムが知られている。TNSALPの中でも、骨組織に存在するALPは「骨形成マーカー」として知られ、石灰化に深く関わっている。しかしながら、ALPの生理機能については、未だ不明な点が多く残されている。研究代表者は1983年より、本酵素の酵素化学的性質、免疫学的性質、遺伝子発現調節機構、先天的なTNSALP遺伝子異常である低ホスファターゼ症について遺伝子診断・遺伝子解析を進め、骨代謝における本酵素の重要な生理的役割について報告してきた (J Bone Miner Res 16:2313-2319, 2001 他)。

また、近年になって骨粗鬆症の発症に関連する候補遺伝子が同定されてきているが、TNSALP遺伝子多型についてはまだ研究が行われていなかった。そこで、2003年から日本人閉経後女性501名を対象とし、TNSALP遺伝子の多型検索を行い、アミノ酸置換を起こすSNP (一塩基多型、スニップ) と骨密度との関連について解析を行い、TNSALP遺伝子が骨粗鬆症の発症要因に関与する重要な候補遺伝子の1つであることを示した (J Bone Miner Res 20:773-782, 2005)。

2. 研究の目的

骨量調節に関与するALPについて、加齢・老化や各種栄養因子の影響に着目し、本酵素の遺伝子発現調節のメカニズムを探り、ミネラル代謝との関連を明らかにして、今後の骨粗鬆症一次予防のための年代別公衆栄養プログラムの作成および実践活動に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 細胞培養による各種栄養因子によるALP活性やALP遺伝子発現への影響についての研究：マウス骨芽細胞様細胞 (ST2) などを用いて、細胞培養における各種栄養因子によるALP活性やALP遺伝子発現への影響などについて比較し、培養細胞からRNAを抽出し、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 分析により、遺伝子発現の比較を行った。

- (2) 動物実験による各種栄養因子によるALP活性やALP遺伝子発現ならびにミネラル代謝への影響についての研究：リン、ビタミンK、ビタミンD、葉酸などの摂取量の付加や制限、高脂肪食による影響について、骨、肝臓、腎臓や小腸などの組織からRNAを抽出し、RT-PCR分析により、遺伝子発現の比較を行った。
- (3) ヒトを対象とした研究 (ALP遺伝子多型と血中骨代謝マーカー、食事摂取状況、骨量測定など): 対象者の身体計測 (体重、体脂肪率など)、採血前の3日間の食事調査、食物摂取頻度調査、血液生化学検査、食生活アンケート調査、骨量測定などを行った。採血した血液からDNAを抽出し、TNSALP遺伝子などの遺伝子多型のタイピングを行った。

4. 研究成果

- (1) 細胞培養による各種栄養因子によるALP活性やALP遺伝子発現への影響についての研究：研究実施計画に従って、細胞培養を行って、各種栄養因子によるALP活性やALP遺伝子発現への影響ならびにALP発現ベクターを用いることにより、ALPの生理機能や栄養素の作用機序を明らかにすることを検討した。なお、用いる発現ベクターとして、すでに作成済みのTNSALP発現ベクター (J Bone Miner Res 20:773-782, 2005) だけでなく、小腸ALP発現ベクターを新規に作成し、比較検討を進めており、得られた研究成果について論文を作成中である。
- (2) 動物実験による各種栄養因子によるALP活性やALP遺伝子発現ならびにミネラル代謝への影響についての研究：研究実施計画に従って、「卵巣摘出骨粗鬆症モデルラット」や「妊娠ラット」等を用いて飼料の違いによる影響について、骨型ALPをはじめとする骨代謝マーカーを測定して検討を行った。その結果、「卵巣摘出骨粗鬆症モデルラット」を用いて、牛乳・乳製品による骨代謝や骨型ALP等への影響について明らかにすることができ、アメリカ骨代謝学会における海外での発表を行い (Minneapolis, USA: J Bone Miner Res 27:S150, 2012)、論文にまとめて報告することができた (J Nutr Biochem 24:1000-1008, 2012; 日本栄養・食糧学会誌 66:87-94, 2013; 日本家政学会誌 64:199-206, 2013)。また、「妊娠ラット」についても、葉酸摂取量による骨代謝や骨型ALPへの影響について明らかにすることができ、論文

にまとめて報告した(日本栄養・食糧学会誌 66:287-292, 2013)。

栄養因子の中でも、リンの摂取量については、興味深い課題であり、最近の研究に関する知見を学術雑誌「腎と骨代謝」に「総説」として報告した[リンの栄養学、「リンと骨代謝」アルカリホスファターゼとリン代謝 26:49-55, 2013]。

また、ICR 系雌マウスを用いた動物実験により、ラクトース(乳糖)摂取だけでなく、高脂肪食下でのラクトース摂取による体組成への影響について論文にまとめて報告した(日本女子大学大学院紀要家政学研究科・人間生活学研究科第20号:173-178, 2014)。

ビタミンKあるいは、リンの摂取量とALPとの関連についても論文にまとめて報告した(日本栄養・食糧学会誌 68:217-223, 2015; 日本栄養・食糧学会誌 68:271-277, 2015; 日本家政学会誌 67:133-140, 2016)。

また、ビタミンD制限と高脂肪食に着目し、Fig. 1に示した通り、ビタミンD制限食と高脂肪食により大腿骨のALP活性が顕著に低下することを明らかにし、論文にまとめて報告した(日本栄養・食糧学会誌 69:57-63, 2016)。

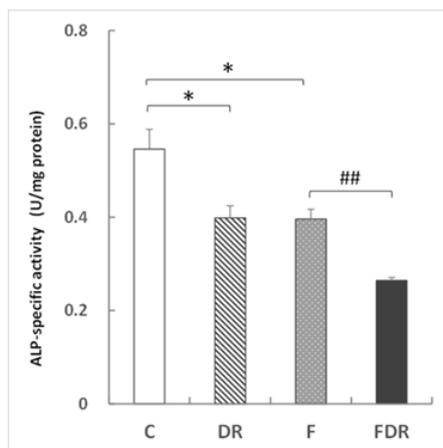


Fig. 1 大腿骨のALP比活性の比較
C: コントロール食, DR: ビタミンD制限食, F: 高脂肪食, FDR: ビタミンD制限+高脂肪食(日本栄養・食糧学会誌 69:57-63, 2016より)

さらに、ロコモティブシンドローム予防の観点から、骨組織だけでなく、筋組織への影響についても論文にまとめて報告した(J Nutr Biochem, 2016, in press.)。

- (3) ヒトを対象とした研究:研究実施計画に従って、栄養素等摂取状況と骨量測定、骨型ALP、遺伝子多型との関連について

詳細な解析を進めた。すなわち、骨量調節に関連している -グルタミルカルボキシラーゼ遺伝子多型について、アメリカ骨代謝学会における海外での発表を行い(Minneapolis, USA: J Bone Miner Res 27:S192, 2012)、論文にまとめて報告した(Asia Pac J of Clin Nutr 22:646-654, 2013)。さらに、ビタミンD受容体遺伝子多型との関連についても解析を進め、得られた成果について、アメリカ骨代謝学会における海外での発表を行い(Baltimore, USA: J Bone Miner Res 28:S328, 2013)、論文にまとめた(Asia Pac J of Clin Nutr 24:329-335, 2015)。また、ヒトの血清リン濃度と血清骨型ALP活性との関連についても、研究成果を論文にまとめて報告した(J Nutr Sci and Vitaminol 58:442-445, 2013)。

- (4) The 11th Meeting of Research Group for Alkaline Phosphatasesの主催:第11回ALPS研究会を企画し、本学(日本女子大学、東京)において、2015年7月18日(土曜日)に開催した。本研究会は、ALPに関する研究・検査・臨床に従事する基礎、臨床の研究者が一堂に会する場として、平成7年に新潟で行われて以来、隔年で開催されており、今回は11回目である。この間、ALPならびにその欠損症である低ホスファターゼ症に関する知見は大きく進展し、わが国においても低ホスファターゼ症の酵素補充療法の臨床治験が開始された。今回の研究会では、ALP研究で世界的に著名な研究者であるJosé Luis Millán博士(Sanford-Burnham Medical Research Institute, USA)を海外より招聘して特別講演を依頼し、基礎・臨床の研究者による研究発表だけでなく、低ホスファターゼ症の会(患者会)の方々との連携したセッションも企画し、多くの参加者による活発な討論が行われ、有意義な研究会を実施することができた。

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 25 件)

- 1) Oku Y, Tanabe R, Nakaoka K, Yamada A, Noda S, Hoshino A, Haraikawa M, Goseki-Sone M, Influences of dietary vitamin D restriction on bone

- strength, body composition, and muscle in rats fed a high-fat diet: Involvement of mRNA expression of MyoD in skeletal muscle. The Journal of Nutritional Biochemistry, 査読有, 2016 in press.
DOI:10.1016/j.jnut bio.2016.01.013
- 2) 野田聖子、五関-曽根 正江、特集：健康寿命をのばす栄養学-ロコモティブシンドローム予防のための栄養・食生活について-、POSTURE(ポスチャー)「しせいと生活」(株式会社プラネット)、査読無(依頼原稿)2016 in press.
DOI:10.14986/shokuiku.10.25
 - 3) 曾我部夏子、田辺里枝子、祓川摩有、井上美津子、五関-曽根 正江、1歳2か月児における外食頻度と食生活状況との関連、日本食育学会誌、査読有、10巻、2016、25-30
DOI:10.14986/shokuiku.10.25
 - 4) 中岡加奈絵、田辺里枝子、奥裕乃、山田麻子、野田聖子、星野亜由美、祓川摩有、五関-曽根 正江、高脂肪食摂取ラットにおけるビタミンD制限がアルカリホスファターゼ活性に及ぼす影響、日本栄養・食糧学会誌、査読有、69巻、2016、57-63.
DOI:10.4327/jsnfs.69.57
 - 5) 祓川摩有、曾我部夏子、田辺里枝子、奥裕乃、山田麻子、五関-曽根 正江、若齡雄ラットにおけるリン摂取量によるアルカリホスファターゼ活性および骨代謝への影響、日本家政学会誌、査読有、67巻、2016、133-140.
DOI:10.11428/jhej.67.133
 - 6) 祓川摩有、田辺里枝子、曾我部夏子、山田麻子、五関-曽根 正江、高脂肪食摂取ラットのアルカリホスファターゼ活性に及ぼすビタミンK₂(メナキノン)摂取の影響、日本栄養・食糧学会誌、査読有、68巻、2015、271-277.
DOI:10.4327/jsnfs.68.271
 - 7) 祓川摩有、曾我部夏子、田辺里枝子、五関-曽根 正江、ラットにおけるビタミンK₁またはビタミンK₂経口投与によるアルカリホスファターゼ活性への影響、日本栄養・食糧学会誌、査読有、68巻、2015、217-223.
DOI:10.4327/jsnfs.68.217
 - 8) 田辺里枝子、奥裕乃、中岡加奈絵、菅野真由美、定行まり子、五関-曽根 正江、東日本大震災後の家庭の食生活の変化について -福島県の保育所・幼稚園に通園する児童の保護者を対象とした調査結果より- 日本食育学会誌、査読有、9巻、2015、239-245.
DOI:10.14986/shokuiku.9.239
 - 9) Tanabe R, Kawamura Y, Tsugawa N, Haraikawa M, Sogabe N, Okano T, Hosoi T, Goseki-Sone M, Effects of Fok-I polymorphism in vitamin D receptor gene on serum 25-hydroxyvitamin D, bone-specific alkaline phosphatase and calcaneal quantitative ultrasound parameters in young adults. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 査読有、24:329-335, 2015.
DOI:10.6133//apjcn.2015.24.2.01
 - 10) Nakajima-Adachi H, Kikuchi A, Fujimura Y, Shibahara K, Makino T, Goseki-Sone M, Kihara-Fujioka M, Nochi T, Kurashima Y, Igarashi O, Yamamoto M, Kunisawa J, Toda M, Kaminogawa S, Sato R, Kiyono H, Hachimura S. Peyer's patches and mesenteric lymph nodes cooperatively promote enteropathy in a mouse model of food allergy. PLOS ONE, 査読有, Published: October 7, 9:1-10, 2014.
DOI:10.1371/journal.pone.0107492
 - 11) 曾我部夏子、田辺里枝子、祓川摩有、中村房子、井上美津子、五関-曽根 正江、1歳2か月児における母乳・ミルク・牛乳の摂取状況と食生活との関連の検討、日本食育学会誌、査読有、8巻、2014、273-281.
DOI:10.14986/shokuiku.8.273
 - 12) 田辺里枝子、祓川摩有、杉山哲司、澤田美砂子、定行まり子、五関-曽根 正江、地域食育支援に関する一考察 -福島県保育

- 所における調査より-日本女子
大学大学院紀要家政学研究科・
人間生活学研究科 査読無 第
20号:179-185, 2014.
- 13)田辺里枝子、曾我部夏子、細井
孝之、五関-曾根 正江、ラクト
ース摂取による体組成への影響、
日本女子大学大学院紀要家政学
研究科・人間生活学研究科 査
読無 第20号:173-178, 2014.
- 14)田辺里枝子、杉本 碧、被川摩
有、川村有香、五関-曾根 正江、
ラットの妊娠前の葉酸制限が母
体の骨密度に及ぼす影響、日本
栄養・食糧学会誌、査読有、66
巻、2013、287-292.
[DOI:10.4327/jsnfs.66.287](https://doi.org/10.4327/jsnfs.66.287)
- 15)Haraikawa M, Tsugawa N,
Sogabe N, Tanabe R, Kawamura
Y, Okano T, Hosoi T,
Goseki-Sone M, Effects of
gamma-glutamyl carboxylase
gene polymorphism (R325Q) on
the association between
dietary vitamin K intake and
gamma-carboxylation of
osteocalcin in young adults.
Asia Pacific Journal of
Clinical Nutrition, 査読有,
22:646-654, 2013.
[DOI:10.6133/apjcn.2013.22.4.01](https://doi.org/10.6133/apjcn.2013.22.4.01)
- 16) 田辺里枝子、五関-曾根 正江、女性のラ
イフサイクルにおける健康と食生活
-思春期・若年女性-、日本栄養士会雑誌、
査読無(依頼原稿)、56巻、2013、14-17.
- 17)Makino Y, Takahashi Y, Tanabe
R, Tamamura Y, Watanabe T,
Haraikawa M, Hamagaki M,
Hata K, Kanno J, Yoneda T,
Saga Y, Goseki-Sone M, Kaneko
K, Yamaguchi A, Iimura T,
Spatiotemporal disorder in
the axial skeleton
development of the
Mesp2-null mouse: A model of
spondylocostal dysostosis
and spondylothoracic
dysostosis. Bone 査読有,
53:248-258, 2013.
[DOI:10.1016/j.bone.2012.11.033](https://doi.org/10.1016/j.bone.2012.11.033)
- 18)Sogabe N, Tanabe R, Haraikawa
M, Maruoka Y, Orimo H, Hosoi T,
Goseki-Sone M, Associations
between serum bon-specific
alkaline phosphatase activity,
and biochemical parameters,
and functional polymorphisms
of the tissue-nonspecific
alkaline phosphatase gene in a
Japanese population. Asia
Pacific Journal of Clinical
Nutrition, 査読有,
22:160-165, 2013.
[DOI:10.6133/apjcn.2013.22.1.11](https://doi.org/10.6133/apjcn.2013.22.1.11)
- 19)被川摩有、田辺里枝子、曾我部
夏子、杉本碧、川村有香、五関-
曾根正江、卵巣摘出ラットにお
ける牛乳・乳製品摂取による骨
密度ならびに組織中アルカリホ
スファターゼ活性に及ぼす影響
について、日本家政学会誌、査
読有、64巻、2013、199-206.
[DOI:10.11428/jhej.64.199](https://doi.org/10.11428/jhej.64.199)
- 20)田辺里枝子、被川摩有、曾我部
夏子、木ノ内俊、高杉諭、星清
子、五関-曾根 正江、高脂肪食
投与ラットにおける牛乳・乳製
品摂取による骨代謝へ及ぼす影
響、日本栄養・食糧学会誌、査
読有、66巻、2013、87-94.
[DOI:10.4327/jsnfs.66.87](https://doi.org/10.4327/jsnfs.66.87)
- 21)Haraikawa M, Tanabe R, Sogabe
N, Sugimoto A, Kawamura Y,
Michigami T, Hosoi T,
Goseki-Sone M, A study of the
association between serum
bone-specific alkaline
phosphatase and serum
phosphorus concentration or
dietary phosphorus intake.
Journal of Nutritional
Science and Vitaminology, 査
読有, 58:442-445, 2013.
[DOI:10.3177/jnsv.58.442](https://doi.org/10.3177/jnsv.58.442)
- 22)被川摩有、五関-曾根 正江、特
集：リンの栄養学「リンと骨代
謝：アルカリホスファターゼと
リン代謝」腎と骨代謝(日本メ
ディカルセンター)、査読無(依
頼原稿)、26巻、2013、49-55.
- 23)Tanabe R, Haraikawa M, Sogabe
N, Sugimoto A, Kawamura Y,
Takasugi S, Nagata M,
Nakane A, Yamaguchi A, Iimura
T, Goseki-Sone M, Retention
of bone strength by feeding of
milk and dairy products in
ovariectomized rats;
involvement of changes in
serum levels of 1 alpha,
25(OH)₂D₃ and FGF23. Journal

of Nutritional Biochemistry,
査読有, 24:1000-1007, 2012.
DOI:10.1016/j.jnutbio.2012.
07.004

- 24) 田辺里枝子、曾我部夏子、菟川
摩有、小林隆一、八代美陽子、
高橋 馨、五関-曾根 正江、特
別支援学校の児童・生徒の食生
活の特徴と体格との関連につ
いて、小児保健研究、査読有、
71 巻、2012、582-590.
- 25) 曾我部夏子、田辺里枝子、菟川
摩有、中村房子、土屋律子、井
上美津子、五関-曾根正江、1 歳
2 か月児における出生順位と生
活習慣・食生活との関係、小児
保健研究、査読有、71 巻、2012
年、366-370.

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 奥 裕乃(五関-曾根 正江):高
脂肪食摂取ラットにおけるビ
タミンD制限が骨代謝や体組成
に及ぼす影響. 第 19 回 日本
病態栄養学会、(2016 年 1 月 9
日)、横浜パシフィコ(神奈川
県).
- 2) Haraikawa M (Goseki-Sone M):
Effect of milk and dairy
products on bone mineral
density and alkaline
phosphates activity in
ovariectomized rats. 11th
Alkaline Phosphatase
Congress. July 18, 2015,
Japan Women's University
(Tokyo, Japan)
- 3) Tanabe R (Goseki-Sone M):
Effect of vitamin D receptor
gene polymorphism on
associations between serum
25-hydroxyvitamin D and
biochemical parameters in
young adults. アメリカ骨代
謝学会, Baltimore(Maryland,
USA), SU0448, J. Bone Miner.
Res. 28: S328, 2013.
- 4) Haraikawa M (Goseki-Sone M):
Effect of gamma-glutamyl
carboxylase gene
polymorphism on the
association between serum
vitamin K and
gamma-carboxylation of
osteocalcin in young adults.

アメリカ骨代謝学会,
Minneapolis(Minnesota,
USA) : SA0326

J. Bone Miner. Res.27: S192, 2012.

- 5) Tanabe R (Goseki-Sone M):
Comparative study of the
effects of milk and dairy
products on bone metabolism
in ovariectomized rats. アメ
リカ骨代謝学会,
Minneapolis(Minnesota,
USA) : SA0083 J. Bone Miner.
Res. 27: S150, 2012.

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 田辺里枝子、五関-曾根 正江、
丸善株式会社、児童学辞典 -
子どもと食生活-、(分担)2016
年、pp.118-119.
- 2) 田辺里枝子、五関-曾根 正江、
医薬ジャーナル社、ビタミンK
と疾患[第 8 章 6-2 -グルタ
ミルカルボキシラーゼ(GGCX)],
(分担)、2014 年、pp.82 - 89.

〔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:

<http://mcmwww.jwu.ac.jp/~goseki/>

・The 11th Meeting of Research Group for
Alkaline Phosphatases (ALPS 研究会)を
日本女子大学(東京)において主催した
(2015 年 7 月 18 日)招待講演:Professor
José Luis Millán (Sanford-Burnham
Medical Research Institute, USA) 研究
発表等。

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

五関 正江 (GOSEKI MASAE)

日本女子大学・家政学部・食物学科・教授
研究者番号:00170449

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし