

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K01377

研究課題名(和文) 座位・身体不活動により脆弱化する骨の代謝を非侵襲的にモニターする測定法の開発

研究課題名(英文) Noninvasive monitoring of inactivity/sitting resulting in deterioration of bone metabolism.

研究代表者

高垣 裕子 (Mikuni-Takagaki, Yuko)

神奈川歯科大学・歯学部・特任教授

研究者番号：60050689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：反応性充血の手法により得られた血流のパラメータは、運動の血管内皮細胞の機能に対する保護的効果を表している。OLETFラットにおいて、任意の運動ばかりでなく身体不活動も、食餌の量が減った場合にはダイエット効果により体重増加や血糖値の上昇などの糖尿病の症状を軽減しうる。尿中のCa 安定同位体比は、骨形成と骨吸収のバランスにより変化した骨のパラメータの直接的で鋭敏なマーカーとして利用できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動以外に日常的な活動も全身の健康には重要であり、座位・身体不活動が死亡率を有意に上昇させることが注目を浴びた(Rezende LF et al., 2016; Lee IM et al., 2012)。しかし、適切な動物モデルがないため、基礎研究は限られてきた。そこで、本研究では、創薬(治験)・治療の際必須となる、非侵襲的に測定可能なマーカーの確立を目指し、随時非侵襲的に測定できるマーカーとして、尿でも測定可能な生体内Ca 同位体組成(同位体比)と生体外から測定できる末梢血の血流量を選び、我々の確立した座位(歩行制限)身体不活動モデルラットを用いて検証した。

研究成果の概要(英文)：The parameters obtained through reactive hyperemia showed the effects of exercise onto the function of vascular endothelial cells. Not only voluntary exercise but also inactivity when the animals eat less reduce diabetic symptoms such as the increased serum glucose levels for OLETF diabetic rats.

The resulting Ca isotope ratios of urine can be sensitive and direct biomarker to evaluate the actual changes of bone parameters as a result of changed balance between bone formation and resorption.

研究分野：力学刺激の生体作用

キーワード：身体不活動 歩行制限 カルシウム同位体 抹消血流量 測定

1. 研究開始当初の背景

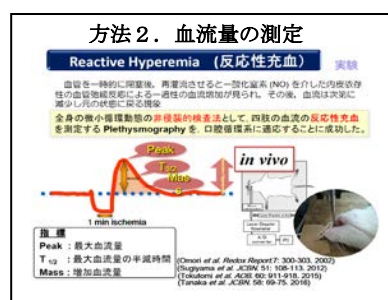
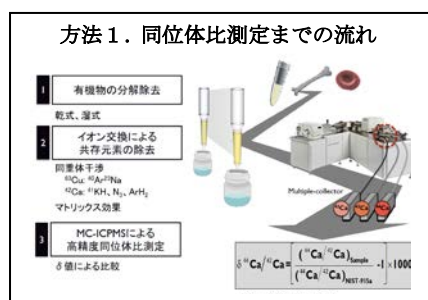
我々は、これまでに骨粗鬆症に関して座位・身体不活動が骨質の劣化、さらには疲労骨折を招く可能性を示唆した。運動ばかりでなく日常的な活動が運動器や全身の健康には重要であり、座位・身体不活動が死亡率を有意に上昇させることが注目を浴びて死亡原因別の解析や対策が急がれたが (Rezende LF et al., 2016など)、座位・身体不活動には動物モデルがなかったため基礎研究は限られ、創薬(治験)・治療の際必須となる非侵襲的に測定可能なマーカーも確立していなかった。

2. 研究の目的

骨の健康状態を非侵襲的に計るには、肥満個体では骨体積や骨塩量値が大きくなるため、見かけ上“良い骨”のように映ってしまうが必ずしも正しくないため、実測値ではなく体重(サイズ)の補正処理後の値が必要となる。一方身体不活動の場合は、栄養摂取量に左右されて著しい骨の劣化を示す場合もある(業績 Miyagawa et al., 2011)。運動不足や過食などの生活習慣改善により予防可能であるものの予備軍を含めた糖尿病患者数は多く、背景となる身体活動に依存して糖尿病発症に至る経過を評価するのは難しい。更に、血糖値ないし HbA1c による評価は必ずしも全身の機能的な病態の進行を示すといえないため、今回本研究では、運動の効果が既に報告されている糖尿病発症モデルラット、Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty: OLETF(峯松ら, 2017; Ortinau et al., 2017)において、**身体不活動により劣化する代謝を非侵襲的にモニターする測定法**を検討した。

3. 研究の方法

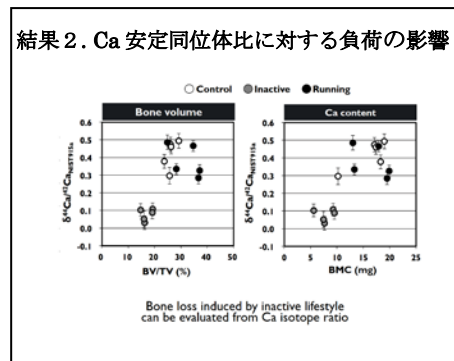
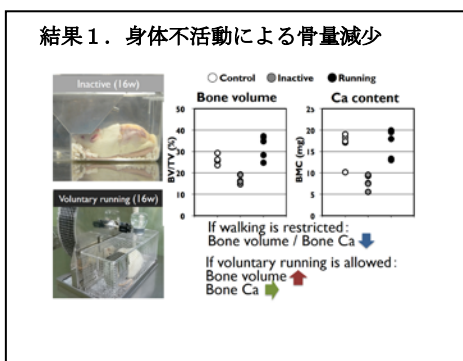
8週齢の雄性 OLETF および LETO を用い、各群5匹ずつ、OLETF は運動負荷群(R)、高垣らの開発した立位と歩行を制限した身体不活動モデル群(U)、通常の条件で飼育した歩行群(W)にわけた。野生型 LETO は歩行群と同様に飼育し、コントロール群(C)とした。8週齢から24週齢までの16週間の実験期間中に、体重計測のほか、ICP-MS(誘導型結合プラズマ質量分析)による Ca 安定同位体解析(業績 Tanaka, 2019, 田中, 2019, 方法1)のため尿を採取、血糖値及び血清アルブミンその他の測定用に血液採取を行った。実験期間中には、血圧・心拍数の測定と共にレーザードップラー血流計を用いた口蓋歯肉の血流測定(方法2)を行い、反応性充血を指標として血管内皮細胞の機能を解析した。



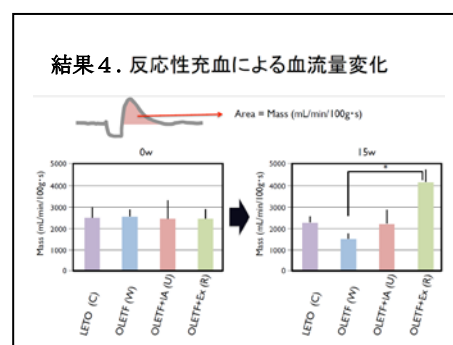
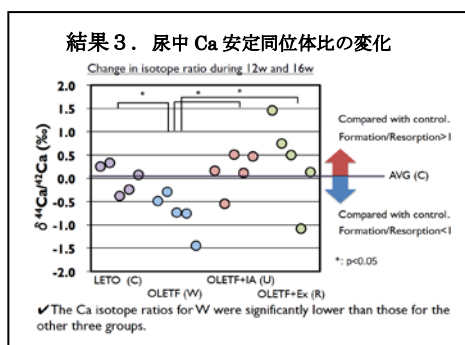
4. 研究成果

(1) 進行していく骨の劣化を随時モニターする方法としてICP-MS(誘導型結合プラズマ質量分析法)は高感度で定量性が高く、多元素の安定同位体間の主に質量数の違いによって生じる反応効率の差から安定同位体メタロミクスを解析でき、元素代謝指標としての活用が開発されてきた。本研究では、⁴⁴Ca/⁴²Caを標的として、磁場型の質量分離と多重検出器(信号の揺らぎがキャンセルされ、同位体比測定の精度が向上する)により、身体不活動がもたらす骨溶解の早期の検出を試みた。骨は血液よりも軽い同位体が豊富で尿は血液よりも重い同位体が豊富という特徴があるため、生体産物の同位体比を元にカルシウム代謝の状態の評価を行うことが可能な所以である。しかしながら、高感度ゆえの問題点

として、夾雑イオンによる「スペクトル干渉」が存在し、Ca 同位体の場合は $^{84}\text{Sr}^{2+}$ 、 $^{86}\text{Sr}^{2+}$ と $^{88}\text{Sr}^{2+}$ による干渉を受ける。そこで、精度の高い測定のため、既知濃度の微量の Sr^{2+} イオンを予め加えてそれに基づいて解析を行うことにより、血中及び尿中の測定値と骨の測定値および骨密度とを比較した。その結果、 CSr/CCa が 0.03という、既存の方法を用いた場合の混在限度の6倍の感度で測定が可能で、① CSr/CCa が 0.005-0.013において、Ca 安定同位体比が安定的に測定でき、②糖尿病モデルラットの血清および尿(傾向)で $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ が野生型より低く、③同位体比の偏差と大腿骨海綿骨の骨密度において相関(尿では傾向)がみられ、④身体不活動によって骨体積・骨塩量が減少するずっと以前に、カルシウム同位体比の変動から骨の溶解が検出できた。以上のとおり本研究による補正方法の改良によりこれまで不可能だった精細な安定同位体比の計測方法が確立されて安定同位体比が安定的に測定できるようになり(業績Tanaka, 2019, 田中, 2019), 糖尿病モデルラットでは $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$ の同位体比がコントロール群(C)のラットより低く、同位体比と大腿骨海綿骨の粗鬆化に相関がみられた(結果1・結果2)。



Ca 安定同位体比の場合は生体産物の同位体比を元にカルシウム代謝状態の評価を行うので、肥大化・委縮に拘わらず測定値がそのまま骨自体の代謝の度合いを示すという大きなメリットがある。更に今回の実験から、身体不活動によってそれらの骨から得られる測定値が変化するずっと以前に、カルシウム同位体比の変動から骨の溶解が検出できることが判明し、将来的な臨床応用の価値は高いと考えられた。尿中のCa同位体比では運動群で骨形成が骨吸収より優位となっており、Ca安定同位体比が指標として直近の全身状態の変化を反映するマーカーとなり得ることが示された(結果3; 12週と16週の間の変化)。反応性充血から算定された血流量の変化からは、呼応して運動群で血管内皮細胞の機能の保全が評価できた(結果4; 15週の変化)。



尿中の Ca 安定同位体比の測定については、採取の際に他の Ca 源からの混入を防ぐことさえできれば、家庭で蓄尿された常温の尿検体からでも、発症前に変化を察知できる可能性が高い。難点を挙げるとすれば、現在のところ安定同位体比の測定前の検体の処理が必須で、それを含めると測定にかかる時間が長いことと多数検体の同時測定が難しいことである(方法1)。この点、末梢血管の血流量を測

定する方法では、口蓋歯肉の血流量もリアルタイムで多数検体の連続的な測定が可能である。一検体の測定にかかる時間も15分程度で長くない。

まとめ：

- (1) 反応性充血により得られたパラメータは、運動の血管内皮細胞の機能に対する効果を表している。
- (2) OLETF ラットにおいて、任意の運動ばかりでなく身体不活動も、食餌量が減った場合にはダイエット効果により体重増加や血糖値の上昇などの糖尿病の症状を軽減する。
- (3) 尿中の Ca 安定同位体比は、骨形成と骨吸収のバランスにより変化した骨のパラメータの直接的で鋭敏なマーカーとして利用できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 高垣裕子	4. 巻 64
2. 論文標題 低出力超音波パルス療法の基礎-LIPUS照射が骨折治癒の過程で細胞に及ぼす多様な効果の細胞生物学的考察	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 整形・災害外科（招待）	6. 最初と最後の頁 9-15
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 無
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 -

1. 著者名 高垣裕子	4. 巻 56
2. 論文標題 骨折治癒のプロセスに低出力超音波パルスLIPUSがもたらす治癒促進効果の多様性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 臨床整形外科（招待）	6. 最初と最後の頁 219-226
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 無
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 -

1. 著者名 Yu-ki Tanaka, Yuko Mikuni-Takagaki, Kouki Hidaka, Satoko Wada-Takahashi Ryota Kawamata, Takafumi Hirata	4. 巻 35
2. 論文標題 Correction of Mass Spectrometric Interferences for Rapid and Precise Isotope Ratio Measurements of Calcium from Biological Samples Using ICP-Mass Spectrometry	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anal. Sci.	6. 最初と最後の頁 793-798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18P440	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 田中佑樹, 小椋康光, 高垣裕子, 平田岳史	4. 巻 67
2. 論文標題 安定同位体メタロミクス	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan	6. 最初と最後の頁 134-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5702/massspec.S19-31	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mikuni-Takagaki Y, Tanaka Y, Hidaka K, Wada-Takahashi S, Kawamata R, Hirata T
2. 発表標題 Development of Assessment Methods for Underuse in Osteoporosis
3. 学会等名 European Congress in Osteoporosis and Bone Diseases (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中佑樹, 小椋康光, 川股亮太, 高垣裕子, 小平将大, 青木一勝, 平田岳史.
2. 発表標題 安定同位体メタロミクス - 生体試料中のカルシウム安定同位体組成分析を通じた元素代謝評価
3. 学会等名 日本地球化学会第65回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中佑樹, 小椋康光, 川股亮太, 高垣裕子, 平田岳史
2. 発表標題 安定同位体メタロミクス - 精密同位体比測定と元素代謝指標としての活用
3. 学会等名 日本質量分析学会第67回質量分析総合討論会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中佑樹, 日高恒輝, 高橋聡子, 関あずさ, 河田 亮, 日高弘一, 高橋俊介, 平田 岳史, 高垣裕子
2. 発表標題 身体不活動と任意走行運動が糖尿病モデルラットOLETFにもたらす全身性の変化を非侵襲的に評価する試み
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高垣裕子, 日高恒輝, 高橋聡子, 河田亮, 日高弘一, 高橋俊介
2. 発表標題 2型糖尿病モデルラット発症時における身体不活動と自発的wheel runningの影響
3. 学会等名 第53回神奈川歯学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中佑樹, 日高恒輝, 高橋聡子, 関あずさ, 河田亮, 公一, 高橋俊介, 平田岳史, 高垣裕子
2. 発表標題 座位・身体不活動により脆弱化する骨の代謝を非侵襲的にモニターする測定法の開発
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	平田 岳史 (Hirata Takahumi) (10251612)	東京大学・大学院理学系研究科(理学部)・教授 (12601)	
研究分担者	河田 亮 (Kawata Akira) (30329198)	神奈川歯科大学・歯学部・講師 (32703)	
研究分担者	川股 亮太 (Kawamata Ryota) (40329199)	神奈川歯科大学・歯学部・特任教授 (32703)	

6. 研究組織（つづき）

	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	成瀬 康治 (Naruse Kouji) (60276087)	北里大学・北里大学メディカルセンター・講師 (32607)	平成17-18年度

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