

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：34309

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K01452

研究課題名（和文）間葉系幹細胞へのストレスによる骨関節疾患発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the onset mechanism of osteoporosis and osteoarthritis caused by stress on mesenchymal stem cells

研究代表者

木村 智子（Kimura, Tomoko）

京都橘大学・健康科学部・専任講師

研究者番号：00449852

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：妊娠5.5～11.5日まで対照群の40%に給餌量を制限した低栄養ラットの産仔雌に、生後12週齢で卵巣摘出術を行ったところ、生後34週齢まで過度の運動負荷などを与えなければ、骨関節疾患特有の変化は認められなかったが、高度肥満に陥ることが明らかとなった。また、血糖値や循環コレステロール値は正常範囲であったが、肝臓の中性脂肪上昇や肝表面に点状の黄白斑が確認されるなど、胎生初期低栄養ストレスにより非アルコール性脂肪性肝疾患を引き起こすことが示唆された。加齢性運動器疾患とも深い関わりを持つ「肥満」ならびに「メタボリックシンドローム」が、低栄養ストレス暴露により引き起こされる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会である今、加齢性骨関節疾患やメタボリック症候群の増加はQOLの著しい低下や医療費負担増などの点で大きな社会問題となっている。また、本邦では低出生体重児の割合が20年前の約2倍に増加しており、この背景に妊娠前から妊娠中の過激なダイエットが示唆されている。胎生期に低栄養ストレスに曝されることで生後に種々の疾患発症リスクを増加させることが疫学的に示されている。本研究では、まだ妊娠に気付かない時期における幹細胞への低栄養ストレスが、閉経後の高度未満ならびに脂肪性肝疾患などのメタボリック症候群発症リスクが増加することを示した。なかでも非アルコール性脂肪性肝疾患の予防や治療に対する知見を提供した。

研究成果の概要（英文）：Surgery to remove the ovaries was performed on female offspring undernutrition in the rat dams during early pregnancy. Osteoporosis and osteoarthritis could not be confirmed in the undernutrition menopausal model rat. However, it led to clear that they fell into severe obesity. In addition, it was suggested that early embryonic undernutrition stress causes non-alcoholic fatty liver disease.

研究分野：DOHaD

キーワード：ストレス 胎生 低栄養 胎生初期低栄養 メタボリックシンドローム 骨関節疾患 非アルコール性脂肪性肝疾患 発生・分化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢社会では、生命寿命のみならず如何に QOL を保ちつつ健康寿命を延ばしていくかが克服課題とされる。骨関節疾患は要介護原因の 22.7% を占め、約 5 人に 1 人が骨関節疾患で自立度を低下させていることから、骨粗鬆症や変形性関節症などの骨関節疾患予防・治療が健康寿命延長の鍵ともなり得る。そして現在、骨粗鬆症では閉経後の骨芽細胞および破骨細胞の活性インバランスに、変形性関節症では軟骨再生医療に焦点を当てた研究が数多く成されている。

一方、母体の妊娠期における低栄養ストレスは、感受期とされる胎生期における各器官発生に影響を与えるとともに胎児の体質変化を引き起こす。この変化は胎児プログラミングという形で、生後の細胞・組織あるいは器官内に蓄積され、形態や機能に恒久的変化をもたらす。そして近年、胎生期の低栄養暴露が骨粗鬆症などを含むメタボリック症候群の発症リスクを高めることが、疫学調査や動物実験により示唆されている。しかし、これまで間葉系幹細胞への低栄養ストレスに対するエピジェネティクスの変化と骨・関節軟骨形成障害との関係に着目した研究はみられない。

我々は、これまでにラット胎生初期(胎生 5.5~11.5 日)の低栄養暴露により、仔ラット雌の生後の脛骨成長障害が生じることを見出した。また、骨のモデリングに關与する *Col2a1* や *IGF1r* の遺伝子発現が胎生初期の低栄養ストレスにより低下することや、これら遺伝子のキートンヌアクティブーターである *Sp1* が低下していることも見出した。従って、まだ後肢芽も形成されず間葉凝集も認められない時期の低栄養ストレスが、後に後肢骨を形成する側板中胚葉の間葉系幹細胞のエピゲノム変化が骨端軟骨の増殖・分化特性に影響を与えたと考えている。また、我々は、胎仔後肢芽間充細胞における *Grem1* の発現量が胎生期低栄養ストレスにより低値を示すことを明らかにした。*Grem1* は肢芽伸長維持に関わる分子としても知られているが、生後の関節軟骨における *Grem1* の発現低下は、関節軟骨細胞の肥大分化を招き、OA の原因となることが示唆されており、後肢芽間充細胞に生じた *Grem1* のエピゲノムの変化は、生後の骨モデリングや OA 発症リスクにも関連している可能性が示唆される。

以上より、骨髄間葉系幹細胞由来の骨芽細胞と関節軟骨細胞に着目し、未分化間葉系幹細胞の低栄養ストレスによる胎生期起源の骨粗鬆症および変形性関節症発症メカニズムの解明に向けた研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究は、胎生初期(5.5~11.5 日)の低栄養暴露により生じる仔の骨関節疾患発症メカニズムの解明を目的とする。

(1) 胎生初期の低栄養ストレスが引き起こす間葉系幹細胞のエピゲノム変化について、骨芽細胞・関節軟骨に関連した遺伝子の発現量を real-time RT-PCR により定量するとともに、エピジェネティクスの変化を ChIP-qPCR などを用いて解析した上で、これが骨形成(骨モデリング)過程ならびに関節軟骨形成過程に与える影響を明らかにする。

(2) 胎生初期の低栄養ストレスによる OCR stem cell への影響を明らかにするために、大腿・脛骨の組織学的観察ならびに免疫組織化学的観察を行い、骨リモデリングのインバランスならびに軟骨修復過程との関連性を明らかにする。

(3) 胎生初期の低栄養ストレスの影響を確認するために、骨髄由来間葉系幹細胞を培養し、骨芽・軟骨細胞へ分化誘導し、増殖・分化特性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 給餌ならびにモデルラットの作成

Wistar ラットを低栄養群と対照群に分け、妊娠 2 日前より出産まで標準粉末飼料 AIN-93G を与えた。低栄養群は妊娠初期(5.5~11.5 日)に対照群の 40% 量に給餌制限を行った。対照群は自由摂餌させた。この 2 群より生まれた仔ラット雌に対し、性成熟後の 12 週齢時点で卵巣提出術(OVX)か偽手術(Sham)を行ない、対照 OVX 群、対照 Sham 群、制限 OVX 群、制限 Sham 群の 4 群を作成した。

(2) 形態学的あるいは生化学的解析

術後 12 週(24 週齢)まで経過を追いながら、定期的に採血と採尿を行なった。さらに 24 週(36 週齢)まで経過を追い、12 週齢(対照群と制限群のみ)ならびに 24 週齢と 36 週齢(4 群すべて)時点の 3 点で材料採取を行なった。

胎生初期低栄養閉経モデルラットの表現型を確認する目的で、術後 12 週・24 週時に体重・血糖値を測定するとともに、後肢骨(大腿骨と脛骨)・肝臓・皮下脂肪・血液採取を行ない、4 群間で、膝関節ならびに大腿骨と脛骨、皮下や腹部内臓、肝臓の脂肪蓄積度について形態学的あるいは生化学的解析を行った。

骨・関節疾患関連の解析として、骨ならびに関節軟骨の断片化が術後どのように変化しているかを確認した。術後 2・4・6 週に採取した血清中の CTX- 量ならびに尿中の CTX- 量を比較検討した。

骨端軟骨細胞の形状ならびに軟骨細胞肥大化に関わる分子の動向を確認するため、脛骨関節面の組織切片をサフラニン 0 染色ならびに Grem1 抗体を用いた免疫染色を行い変形性関節症発生の有無について検討した。

4. 研究成果

(1) 胎生初期低栄養曝露による閉経モデルラットは高度肥満に陥る。

12 週齢時には両群間で体重差が認められなかったが、術後は OVX 群が Sham 群に比べ体重増加率が高かった。特に、制限 OVX 群では顕著に体重増加が認められ、胴回りを中心に丸々と太った体型となっており、胎生初期低栄養ストレスが閉経後に高度肥満を引き起こすことが明らかとなった。これはメタボリックシンドロームに繋がる事象である。胎生初期低栄養ストレス暴露のみでは高度肥満に陥ることはないにも関わらず、これに閉経というイベントが重なった場合には高度肥満に陥っていることから、胎生初期に低栄養ストレスに曝された者に対しては、体重増加による骨関節疾患への影響をも考慮すべきことが明らかとなった。

(2) 胎生初期低栄養ストレスは、閉経の有無に関わらず血糖値や血中コレステロール、中性脂肪量を変化させず、循環血液中の異常値を引き起こすことはない。

4 群全てにおいて血糖値や循環コレステロール値には変化(異常値)が認められなかったが、制限 OVX 群においては肝臓内の中性脂肪が高く、肝表面所見も著明な点状の黄白斑が確認され、胎生初期低栄養ストレスは非アルコール性脂肪性肝疾患も引き起こすことが示唆された。なお、これら研究成果は、学会(第 123 回日本解剖学会、2017.)で発表した。さらに、術前の対照群と低栄養群から採取した肝臓から肝細胞を単離し、培養実験にて E2 への反応性を確認したところ、両群間で有意差は認められなかったものの、低栄養群の肝細胞は E2 を添加しなかった場合の脂肪蓄積量が高い傾向を示し、低栄養群の肝細胞は脂質代謝異常を来することが示唆された。この成果については、学会(第 7 回日本 D O H a D 学会学術集会、2018.)で発表した。

(3) 閉経後にもラット後肢骨関節の肉眼的変化は引き起こされず、胎生初期低栄養ストレスの有無によっても肉眼的な変化は認められない。

24 週齢(術後 12 週齢)ならびに 34 週齢(術後 24 週齢)時点における各群の左脛骨近位関節面を、実体顕微鏡にて形態的に確認したところ、4 群間に大きな変化は認められず、変形性関節症を確認できる所見は得られなかった。

(4) 閉経後 6 週間の経過中には骨吸収率や軟骨のターンオーバー率は変化しない。

骨粗鬆症様の変化を確認するために、型コラーゲン断片化を、変形性関節症様の変化を確認するために、型コラーゲン断片化を ELISA 法にて調査した。術後 2・4・6 週に採取した血清中の CTX- 量ならびに尿中の CTX- 量には 4 群間で有意差が認められなかった。このことから、術後 6 週間の経過の中では、低栄養 OVX 群の骨吸収率ならびに軟骨ターンオーバー率は他群と比べ大きな差が認められないことが明らかとなっており、肉眼観察の結果とも一致する結果となった。

(5) 低栄養閉経モデルの膝関節部には組織学的な大きな変化を見出すことができない。

24 週齢(術後 12 週齢)ならびに 34 週齢(術後 24 週齢)時点における各群の右膝関節のパラフィン切片を作成し、サフラニン 0 染色にて関節軟骨の扁平化ならびに軟骨基質の厚みなどの解析を試みた。さらに、Grem1 抗体を用いた免疫染色を行い Grem1 陽性細胞数の解析を試みた。本解析について最終確認遂行中であるも、現在のところ大きな変化を見出すことができていない。

これらの結果から、胎生期低栄養ストレスに曝された閉経モデルラットについて、生後 34 週齢までは過度の運動負荷などを強いることのない日常的な活動状態の下では重篤な骨関節疾患を誘発するには至らないことが示唆された。しかしながら、まだ軟骨形成に関わる分子活性の変容に主眼を置いた研究は不十分であることから、今後さらに、閉経というホルモン環境の変化に間葉系幹細胞の低栄養ストレスが加えられることによる分子活性変化のメカニズムを明らかにしていく必要性が明らかとなった。さらに今回、変形性関節症という加齢性の運動器疾患とも深い関わりを持つ「肥満」ならびに「メタボリックシンドローム」が、低栄養ストレス曝露により引き起こされる可能性が示唆されたことから、これらについても同時に解析を進めていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hino Kodai, Kaneko Shunya, Harasawa Toshiya, Kimura Tomoko, Takei Shiro, Shinohara Masakazu, Yamazaki Fumiyo, Morita Shin-ya, Sato Shumpei, Kubo Yoshihito, Kono Tadaaki, Setou Mitsutoshi, Yoshioka Mina, Fujino Junya, Sugihara Hiroyuki, Kojima Hideto, Yamada Naoto, Udagawa Jun	4. 巻 39
2. 論文標題 Change in Brain Plasmalogen Composition by Exposure to Prenatal Undernutrition Leads to Behavioral Impairment of Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 7689 ~ 7702
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1523/JNEUROSCI.2721-18.2019	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 Nishikura Noriko, Hino Kodai, Kimura Tomoko, Uchimura Yasuhiro, Hino Shinjiro, Nakao Mitsuyoshi, Maruo Yoshihiro, Udagawa Jun	4. 巻 150
2. 論文標題 Postweaning Iron Deficiency in Male Rats Leads to Long-Term Hyperactivity and Decreased Reelin Gene Expression in the Nucleus Accumbens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Nutrition	6. 最初と最後の頁 212-221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jn/nxz237	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 -
1. 著者名 Kodai Hino, Tomoko Kimura, Jun Udagawa	4. 巻 18
2. 論文標題 Handling has an anxiolytic effect that is not affected by the inhibition of the protein kinase C pathway in adult prenatal undernourished male rat offspring	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Congenital Anomalies	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) 10.1111/cga.12332	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 -
1. 著者名 Kimura Tomoko, Hino Kodai, Kono Tadaaki, Takano Atsushi, Nitta Norihisa, Ushio Noritoshi, Hino Shinjiro, Takase Ryuta, Kudo Motoi, Daigo Yataro, Morita Wataru, Nakao Mitsuyoshi, Nakatsukasa Masato, Tamagawa Toshihiro, Rafiq Ashiq Mahmood, Matsumoto Akihiro, Otani Hiroki, Udagawa Jun	4. 巻 260
2. 論文標題 Maternal undernutrition during early pregnancy inhibits postnatal growth of the tibia in the female offspring of rats by alteration of chondrogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 58 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2017.12.008	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内村康寛、日野広大、木村智子、篠原正和、醍醐弥太郎、宇田川潤
2. 発表標題 胎児期低栄養で発現が増加するSLC22a23輸送体の機能解析（公募シンポジウム2 俚約型表現型を形態と機能から統合的理解する）
3. 学会等名 日本解剖学会第126回全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宇田川潤、日野広大、金子隼也、原澤俊也、木村智子、武井史郎、篠原正和、山崎文義、森田真也、吉岡美奈、佐藤駿平、藤野淳也、瀬藤光利、杉原洋行、小島秀人、山田尚人
2. 発表標題 脳内リン脂質構成変化とラットの行動との関連
3. 学会等名 第8回日本DOHAD学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 木村智子、日野広大、宇田川潤
2. 発表標題 胎生初期低栄養曝露による閉経モデルラットは非アルコール性脂肪性肝疾患を呈する
3. 学会等名 第7回日本DOHAD学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 日野広大、木村智子、宇田川潤
2. 発表標題 妊娠中の低栄養ストレスは母乳成分の変化をもたらす
3. 学会等名 第7回日本DOHAD学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村智子、日野広大、小野哲男、西倉紀子、宇田川潤
2. 発表標題 胎生期低栄養ストレスと閉経後高度肥満ならびに非アルコール性脂肪性肝疾患の関連
3. 学会等名 日本解剖学会第123回全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 日野広大、小野哲男、木村智子、小島秀人、村上節、宇田川潤
2. 発表標題 胎生期低栄養ストレス下での過剰葉酸曝露は生後に抗不安様行動を引き起こす
3. 学会等名 日本解剖学会第123回全国学術集会
4. 発表年 2017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	宇田川 潤 (Udagawa Jun) (10284027)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	
研究分担者	醍醐 弥太郎 (Daigo yataro) (30345029)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	
研究分担者	桑形 麻樹子 (Kuwagata Makiko) (70398684)	昭和大学・医学部・その他 (32622)	

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
連携研究者	松本 暁洋 (Matumoto Akihiro) (70346378)	島根大学・医学部・助教 (15201)	

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