

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01484

研究課題名(和文)新規開発する刺激法による老化に伴う疾患発症の作用機序解明とその利用発展の検討

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of action of disease development associated with aging by a newly developed stimulation method and examination of its utilization development.

研究代表者

山田 晃司(Yamada, Kouji)

藤田医科大学・保健学研究科・教授

研究者番号：60278306

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)：転倒を予防する平衡感覚を養う装置と骨折治癒時に老化した細胞を活性化する刺激方法である振動刺激に、新規の振盪刺激を組み合わせたコンビネーション刺激装置を作製した。卵巣摘出術を施した骨密度低下マウスを作成し、1日30分間、10週間コンビネーション刺激を継続して行った。その結果、類骨幅、類骨量、骨石灰化速度において刺激なし群に比べ刺激あり群が有意に高い値を示した($p<0.05$)。また、下肢帯におけるBMP-2、IL-1、IL-6、MyoDの発現解析においても刺激あり群が刺激なし群に比べ有意に高い値を示した($p<0.05$)。これらの結果から骨代謝が現在進行形で活発に行われてい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

新規に振盪と振動のコンビネーション刺激装置を作製し、骨密度低下モデルマウスにて検証したところ、骨代謝が活発に行われることが示唆された。また、腰椎は骨粗鬆症が原因で骨折する好発部位の1つで体幹の深部にあり刺激をすることが困難である。その腰椎において開発した装置により一定の効果が得られたことは、予防医学として閉経前後女性を対象としたヒトへの装置開発、効果の検証により将来臨床応用できる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：We have newly created a combination stimulator that combines a vibration stimulator that activates aged cells during fracture healing and a shaking stimulator that cultivates a sense of balance to prevent falls. Ovariectomized mice with reduced bone density were prepared and subjected to combination stimulation for 30 minutes a day for 10 weeks. As a result, the osteoid width (O.Th), osteoid mass (OV/BV), and bone mineralization rate (MAR) were significantly higher in the stimulated group than in the unstimulated group, which was the target group ($p<0.05$). Moreover, in the expression analysis of BMP-2, IL-1, IL-6, and MyoD in the lower limb zone, the value in the stimulated group was significantly higher than that in the unstimulated group ($p<0.05$). Since the bone mass (OV/BV) and bone mineralization rate (MAR) were high, it was suggested that this stimulus might promote bone formation.

研究分野：生理学

キーワード：骨密度 振動 振盪 骨形態計測 マイオカイン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療の進歩に伴い高齢化社会となった現代において、数千万人が骨粗鬆症に罹患しており、転倒による大腿骨頸部の骨折の発生件数は 65 歳以上では指数関数的に上昇し、数年後には 20 万人を超えることは明らかである (1-3)。高齢者にとって骨折は、歩行障害や長期臥床を引き起こす原因となり、身体的にも精神的にも大きな支障をきたし QOL が著しく低下する (4,5)。また、腰椎の骨粗鬆症の有病率も同様に非常に高い (6-7)。椎体の変形や骨折をもつ高齢女性の総死亡が、死亡関連交絡因子 (年齢、喫煙、高血圧、心臓病など) を考慮しても相対リスク上昇に深く関与しているのは明らかである (8)。骨密度低下は女性にとって避けられない生理現象で、閉経後 1 年間で全骨量の 2~3% の減少が数年間続き、約 20 年で 30~40% 低下する。また、非荷重期間が長期になると例え運動を再開したとしても元の骨量レベルまで回復することはまれである。そのため閉経前から力学的負荷の継続は、予防医学の検知から骨密度低下を緩和する重要なポイントとなる。

振動刺激と振盪刺激を組み合わせた新規二重運動負荷 (コンビネーションメカニカルストレス) 刺激法に加え、さらにそれを発展させ骨細胞を活性化し平衡感覚を養う不規則性振盪振動刺激装置の新規物理療法の開発を行う。研究代表者らは振盪刺激の単独刺激において骨格筋および骨でその効果を実証している (9-11)。そのメカニズムは Wolff の法則に従い筋の収縮弛緩、腱を介した骨への直接刺激であると考えて来た。しかし、一方で骨細胞の活性化には別のメカニズムの存在があるのではないかとする仮説を立てた。『運動することは身体によい』とは一般的によく言われていることである。では、どう身体によいのか? その 1 つの可能性としてマイオカインの存在がある。運動刺激により誘発されたマイオカインが血管、血液を介して骨細胞を活性化しているのではないかと考えた。また、このようなマイオカインの存在は全身を循環し、遠隔の組織・器官に作用するのではないかと考えられる。ISVsR の開発、マイオカインが骨細胞の活性化を誘発する新規メカニズムの解明、マイオカインの可能性と利用発展について検証する。

マイオカインを効率よく発現、分泌を促す刺激装置の開発を行う。それは筋肥大及び骨刺激に効果的と言われる既存の振動刺激に振盪刺激を組み合わせた新規刺激装置を作製し、その相乗効果を培養細胞、疾患モデルマウスで解析後、人へ移行し検証する。刺激箇所からマイオカインが全身性に遠隔の組織、器官に運ばれ成人病予防や老化防止など『~基礎研究から臨床応用、多方面への展開まで~』その効果の可能性と利用発展について検証する。

2. 研究の目的

骨粗鬆症は高齢女性に多い疾患であり、これが原因となる骨折のリスクは高い。骨折は ADL (Activities of Daily Living) に影響を及ぼし、QOL (Quality of Life) を低下させるため予防策の検討が必要である。骨粗鬆症に伴う骨折の好発部位には大腿骨頸部や腰椎椎体などがある。また、一方で『運動することは体に良い』とよく言われるが、どこにどうよいか? そのメカニズムの 1 つに骨格筋から運動誘発されるサイトカイン (マイオカイン) が、血液を介して全身の細胞を活性化することに着目をした。本研究はそのマイオカインを効率よく発現、分泌を促す刺激装置の開発を行う。それは筋肥大及び骨刺激に効果的と言われる既存の振動刺激に振盪刺激を組み合わせた新規刺激装置を作製し、その相乗効果を培養細胞、疾患モデルマウスで解析後、人へ移行し検証する。刺激箇所からマイオカインが全身性に遠隔の組織、器官に運ばれ成人病予防や老化防止など『~基礎研究から臨床応用、多方面への展開まで~』その効果の可能性と利用発展について検証する。

本研究では高齢者に頻発する骨粗鬆症に伴う腰椎圧迫骨折の予防を目的とし、振動と振盪刺激を組み合わせた新規刺激装置を作製し、骨密度低下モデルマウスに対して検討を行った。腰椎椎体の骨折は転倒などの不測の事態に生じた外的要因によるものだけではなく、日常生活における着座動作などでも十分に骨折する可能性がある。また、骨への物理的な刺激は骨を活性化するが、運動の種類として跳躍動作や走るといった動作は身体機能が衰えた高齢者には困難な場合も考えられる。このため高齢者の腰椎圧迫骨折に対して安全で身体機能的にも配慮された骨密度を増加させる推奨された運動方法が確立されていないのが現状である。本研究は筋や骨に対して効果的な運動刺激方法が確立されていないことに対して実験動物を対象として、新規に独自に作成した刺激装置を用いてその効果について検証を行った。作成した装置は、既存で骨折予防効果があるとされる振動刺激に振盪刺激を加えこの 2 種類の刺激を組み合わせたコンビネーション刺激装置である。また、骨密度の増加には筋収縮による腱を介した直接的な物理的刺激要素が必要であり、この装置による刺激は筋収縮を強制的に促し、腱を介し腰椎に対して直接的に骨細胞に刺激が加わると考えられる。また、振盪刺激は、水平板の回転軸がずれる円運動する装置であり、水平板がずれることで姿勢を維持するために、全身性に筋肉が活動し転倒しないように“踏ん張る動作”を促すと考えられる。この運動では、膝蓋腱反射とアキレス腱反射を誘発し、持続的に筋収縮が促す等尺性収縮の状態を作り出し、腱反射によりバランスをとることで転倒を回避する事ができると考えられる。また、本装置は従来のトレッドミルのような運動刺激装置と比較してもコンパクトで同時に 12 個体の運動刺激が可能であり、装置も簡便となっており、作成にも高額なコストがかからないメリットがある。

本研究では卵巣摘出を行った骨密度低下モデルマウスを使用し、振動刺激と振盪刺激を組み合わせた新規に開発したコンビネーション装置により、今まで困難と考えられていた腰椎への刺激が可能となり、骨形態計測法を用いて骨密度への影響について解析を行った。また、その効

果を検証することで、高齢者に頻発する骨粗鬆症に伴う腰椎圧迫骨折など加齢に伴う骨折予防方法への新たなアプローチに発展していくと考えられる。

3. 研究の方法

1) 骨密度低下モデルマウス

ICR (日本ククリア株式会社) メス 8 週齢を 12 匹使用した。飼育条件は床敷使用ケージで群飼育 (3 匹/ケージ) し、1 週間馴化飼育した後に卵巣摘出術を施し、骨密度低下モデルマウスを作成した。更に 1 週間馴化飼育した後に運動刺激を開始した。尚、この研究は藤田医科大学動物実験規定に基づいて行った (承認番号: H0771)。

2) 刺激装置と刺激方法

刺激には水平方向に 360 度どの方向からも均一な刺激を与える軸移動型の水平回転型振盪 (NX-25D 日進理化) 装置と移動距離 0.5mm のトルネード型振動 (SK-40-D1 日進理化) 装置を組み合わせたコンビネーション刺激装置を作成した (日進理化特注)。刺激条件は振盪刺激を 150 回/分、振動刺激を 2,400 回/分に設定した。

実験群と対照群の各 6 匹ずつ 2 群に分けて実験を行った。実験群は卵巣摘出から 1 週間馴化した後、1 日 1 回 30 分間の刺激を 6 日間連続して行い、1 日休息するスケジュールを 10 週間継続して行った (以下刺激あり群)。対照群は実験群同様に卵巣摘出から 1 週間馴化した後、刺激を行わず通常飼育を行った (以下刺激なし群)。刺激あり群と刺激なし群は刺激以外の飼育環境は同条件とした。

3) 骨形態計測による組織解析

テトラサイクリン (Wako, Japan) は 2mg/ml 溶液 / PBS、カルセイン (DOJINDO, Japan) は 1N KOH/PBS で 2mg/ml (pH7.0) に調整し骨の標識に用いた。サンプル採取の 96 時間前にマウス背部にテトラサイクリンを体重 40g に対して 0.4ml 皮下投与し、更にその 48 時間後にカルセイン 0.4ml を同様に皮下投与した。最終刺激後のマウスを麻酔下にて PBS で全身灌流した後、腰椎を摘出し 70% エタノールにて計 3 回固定したその後、Villanueva Bone Stain 溶液に約 4 日浸透させた。エタノール/アセトンで脱水後、メタクリル酸メチル (methyl methacrylate: MMA) モノマー浸透後メチルメタクリレート樹脂 (MMA 樹脂) 包埋した。組織標本を作成し自然光下と蛍光下で観察し、骨形態計測を行い、一次パラメーターを直接測定した (図 1) 後、一次パラメーターを基に二次パラメーターを算出した。

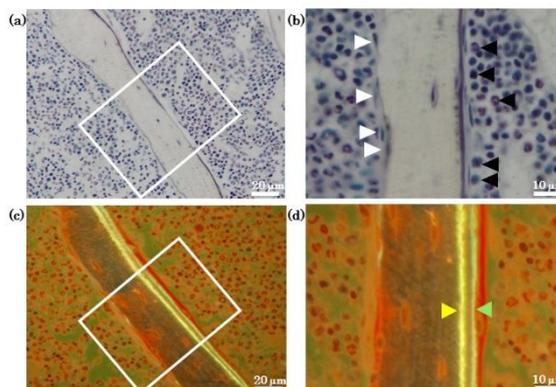
4) 筋タンパク質発現解析

最終刺激後のマウスを麻酔下にて PBS で全身灌流した後、大腿四頭筋を採取した。採取した筋はドライアイスにて急速凍結し、液体窒素下で粉碎し、プロテアーゼインヒビター (Complete protease inhibitor cocktail, Roche Applied Science 10190300) 入りの T-PER (Thermo SCIENTIFIC PB196592) に溶解した。遠心後、上清を回収し、最終濃度を 1 µg/µl に調整した後、-80 にて保存し、解析に用いた。インターロイキン (IL) -6、IL-15、IL-8、IL-1 について ELISA Kit (R&D SYSTEMS or abcam) を用いて測定を行った。また、筋肥大の解析には MyoD 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Lot: H2107) を用いて Western Blotting 法を行い、検出したバンドは Image J (NIH, USA) を用いて数値化した。

4. 研究成果

骨組織標本を直接計測により一次パラメーターである類骨量 (OV)、類骨面 (OS)、類骨幅 (O.Th)、骨芽細胞数 (N.Ob)、多核破骨細胞数 (N.Mu.Oc) などを算出した (図 1)。

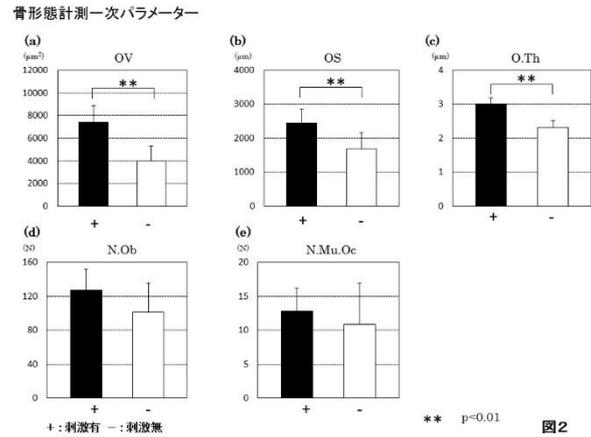
腰椎組織 Villanueva Bone Stain



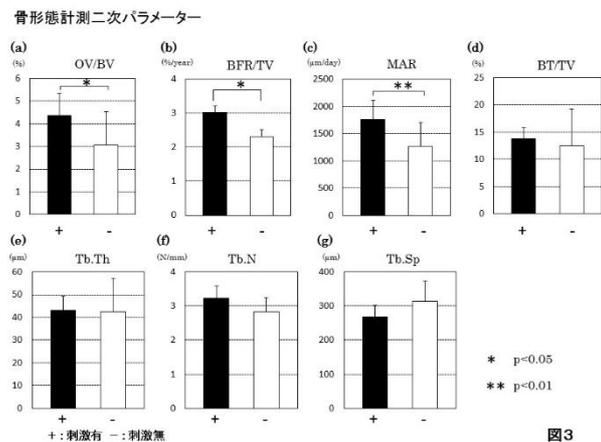
△破骨細胞 ▲骨芽細胞 緑:カルセイン 黄:テトラサイクリン

図4

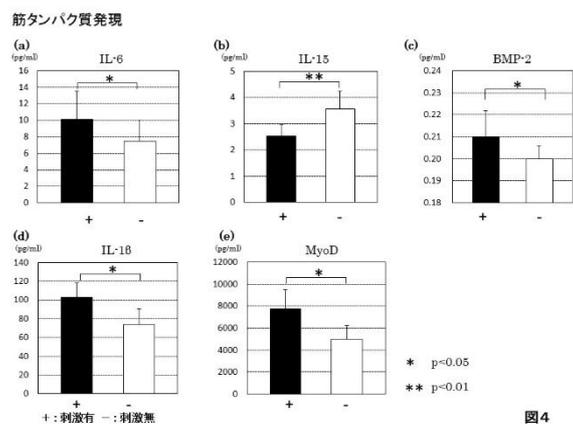
この結果、OV、OS、O.Thで刺激あり群は刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。また、N.ObとN.Mu.Ocに有意差は認められなかったものの、刺激あり群が刺激なし群に比べ高い値を示した (図2)。



さらに、二次パラメーターとして、骨量を表すパラメーターとして骨量/組織量 (BV/TV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N)、骨梁間隙 (Tb.Sp)、骨形成を表すパラメーターとして類骨量/骨量 (OV/BV)、石灰化を表すパラメーターとして骨石灰化速度 (MAR) と骨形成速度/組織量 (BFR/TV) などを算出した。その結果、OV/BV と BFR/TV は、刺激あり群は刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。また MAR は、刺激あり群は刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。BV/TV、Tb.Th、Tb.N に有意な差は認められなかったものの、刺激あり群が刺激なし群に比べ高い値を示した。また、Tb.Sp に有意な差は認められなかったものの刺激あり群が刺激なし群に比べ低い値を示した (図3)。



筋タンパク質発現解析では、ELISA 法にて Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2、IL-1、IL-6、IL-15 の発現解析を行った。BMP-2、IL-1、IL-6 はいずれも刺激あり群が刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。IL-15 は刺激あり群が刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。また、Western Blotting 法により MyoD の発現解析を行った。検出したバンドを ImageJ にて数値化し、比較検討を行った結果、刺激あり群が刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$) (図4)。



本研究では骨粗鬆症モデルマウスを対象に振盪刺激と振動刺激の2つの刺激を同時に行う装置を作成し、骨や筋に対してどのような影響を与えるかについて比較検討を行った。

骨形態計測法により OS、O.Th、OV において刺激あり群が刺激なし群に比べ高い値を示した ($p < 0.01$)。また、二次パラメーターである OV/BV も刺激あり群が刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。さらに、MAR、BFR/TV において刺激あり群が刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。これらのことから本研究に使用した刺激装置は、骨形成に必要な類骨の増加と同時に骨石灰化速度を促進し、刺激あり群の骨形成がより速く進んでいることが推測された。また、N.Ob や N.Mu.Oc に有意な差は認められなかったが、刺激あり群が刺激なし群に比べ高い値を示した。これらにより骨形成と同時に骨吸収も活発に進んでいる可能性が示唆された。また、BV/TV や Tb.Th、Tb.N では、刺激あり群に比べ刺激なし群で高い値を示す傾向が認められ、Tb.Sp は刺激あり群が刺激なし群に比べ低い値を示した。これらの結果から骨量自体の増加が促進され、現在骨代謝が進行している段階にあることが推察された。本研究に使用した新規刺激装置によって骨代謝が活発に行われ、骨形成が促進されることが確認できた。

また、骨代謝に関与する因子 BMP-2 と IL-1 について刺激あり群と刺激なし群で筋タンパク質の発現解析を行い、比較検討を行った。BMP-2 は TGF-スーパーファミリーに属し、BMP-2 は

骨芽細胞の分化を強く誘導し、IL-1 は破骨細胞介して骨吸収を促進する。BMP-2 と IL-1 の発現が、共に刺激あり群が刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$) ことから、本研究に使用した刺激装置によって骨格筋の収縮が促進され、骨に対する直接的な刺激が加わる事で骨代謝が活性化され、骨形成がより活発に行われている事が推測された。今回マイオカインの代表として知られる IL-6 や IL-15 についても測定を行った。その結果 IL-6 と IL-15、MyoD は刺激あり群は刺激なし群に比べ有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。本刺激装置を用いてマイオカインの発現が観察されたことは、刺激装置の有効性を証明している。また、IL-6 と IL-15 の発現量が刺激なし群に比べ刺激あり群で有意に高い値を示した結果から骨吸収が促進され骨代謝が活発に行われていることが推察された。骨解析、筋タンパク質発現解析から、本刺激装置は骨への物理的な直接刺激により骨吸収を抑制することで骨形成を促進しているのではなく、骨格筋を刺激したことによりマイオカインの分泌を促進させ、骨代謝を活発に行わせた体液性因子による効果の可能性が高いと考える。骨リモデリングは骨吸収が先に起こりその後、穏やかに骨形成が進むとされている。今回の刺激期間 10 週間では骨量が増加するまでの刺激期間として短かった可能性がある。

通常のトレッドミルなどの運動刺激では腰椎への直接刺激が困難であるため本研究ではそれを可能にする刺激装置を開発しその効果について実証した。腰椎に付着する腸腰筋などを介した直接刺激と他筋から分泌される体液性因子により急激な骨密度低下を緩和する効果が得られたことは、将来臨床応用する上で意義深い。また、この装置は受動的刺激であり呼吸器や循環器への負荷が一般的な筋力強化などに比べ少ないと考えられる。また、自ら身体を動かして行う運動ではないため身体的障害などがあっても適応できると考えられる。さらに虚弱な高齢者にも負担が少なく刺激強度の条件設定などで適応できる。また、この装置によるマイオカインの分泌は体液性因子として血液、血管を介して全身性に運ばれ、骨だけでなく様々な臓器に作用し、さまざまな疾患の予防、症状改善の効果が期待できると考えられ大変意義が大きい。

1) Kawashima T, J Bone Miner Metab. 7:46-54 1989 2) Dohmae Y, et al. J Bone Miner Metab 9:94-98 1991 3) Orimo H, et al. J Bone Miner Metab 15:100-106 1996 4) Melton LJ 3rd, et al. J Bone Miner Res. 12(1):16-23 1997 5) Hasegawa K, et al. J Bone Joint Surg Br. 79(3):452-6 1997 6) Yoshimura N, et al. Int J Epidemiol. 39(4):988-95. 2010 7) Yoshimura N, et al. J Bone Miner Metab. 27(5):620-8 2009 8) Ensrud KE, et al. J Am Geriatr Soc. 48(3):241-9 2000 9) Yamada K, et al. J Anal Bio-Sci 33(4) 355-365 2010 10) Yamada K, et al. J Anal Bio-Sci. 33(2):141-50 2010 11) Yamada K, et al. Aging Clin Exp Res. 25(6): 625-32, 2013

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Runhong Yao, Kazuhiro Nishii, Takumi Kito, Toshio Teranishi, Tomohisa Sugiyama, Kazuyoshi Sakai, Mamoru Matsubara, Kouji Yamada	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A novel device to prevent osteoporosis by promoting bone metabolism using a newly developed double-loading stimulation with vibration and shaking	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Okajima Folia Anatomica Japonica	6. 最初と最後の頁 印刷中
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 Takumi Kito, Kazuhiro Nishii, Runhong Yao, Toshio Teranishi, Tomohisa Sugiyama, Kazuyoshi Sakai, Mamoru Matsubara, Kouji Yamada	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Effect of shaking and vibration stimulation on lumbar vertebrae in ovariectomized mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fujita Medical Journal	6. 最初と最後の頁 印刷中
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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鬼頭巧
2. 発表標題 高齢モデルマウスにおける振動振盪刺激による腰椎への影響
3. 学会等名 第40回生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 姚潤宏
2. 発表標題 骨密度低下モデルマウスを用いて骨粗鬆症を予防する新規刺激法の検討
3. 学会等名 第40回生命科学系学会合同年次大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----