

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2017～2022
課題番号：17K12914
研究課題名(和文) 男性骨粗鬆症への性ホルモンの関与と、食品成分による制御可能性の検討

研究課題名(英文) Investigation of bone loss mechanism in ORX mice

研究代表者
尾関 温子(Ozeki, Atsuko Nakanishi)
東京大学・アイソトープ総合センター・特任助教

研究者番号：30780598
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：男性更年期における骨粗鬆症(LOH性骨粗鬆症)の発症機序を明らかにすること、食品成分や薬剤による予防・治療のターゲットを探ることを目的として研究を行った。LOH性骨粗鬆症モデルである精巣摘出(ORX)ラットの骨量は約4か月の飼育後、偽手術(sham)ラットに比較して減少した。血中および骨中の骨形成マーカー・骨吸収マーカーを測定したところ、骨形成マーカーに有意な変化はない一方、骨吸収マーカーの有意な上昇が見られた。また、ORX群では血中の炎症性サイトカインが有意に高値を示しており、ORXにおける炎症性サイトカインの上昇により骨吸収が促進され骨量減少が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
本研究では男性更年期を精巣摘出により再現し、血中の炎症性因子が増加することで骨吸収が促進され、骨量減少につながる可能性を示した。また、一部の食品成分に炎症性因子による骨吸収を抑制する作用がある可能性を示した。男性更年期は女性に比べて関心が低い、精神的な変化だけでなく骨代謝にも影響が出ることを示すエビデンスの一つになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the pathogenesis of osteoporosis (LOH-induced osteoporosis) in male menopause, and to find targets for prevention and treatment using food components and drugs. Bone mass in orchidectomized (ORX) rats, a model of LOH osteoporosis, decreased compared to sham surgery rats after about 4 months of breeding. Bone formation markers and bone resorption markers in blood and bone were measured, and a significant increase in bone resorption markers was observed. In addition, the ORX group showed significantly high levels of inflammatory cytokines in the blood, suggesting the possibility that the increase in inflammatory cytokines in ORX promotes bone resorption.

研究分野：骨代謝

キーワード：LOH骨量減少

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の日本では、骨粗鬆症による骨折の予防が急務である。平成 26 年の厚生労働省患者調査によると、骨折患者数は男女とも増加しつづけ、60 万人に迫っている。骨折は患者の QOL (Quality of Life) を大きく低下させるのはもちろん、医療費を圧迫する。大腿骨頸部骨折にかかる治療費は 1 人あたり約 150 万円と概算され、発生率を考慮すると年間約 1 兆円と推計される[1]。

これまで女性の閉経後骨粗鬆症に関しては、発症メカニズムから食品成分による予防・治療効果まで多くの研究が行われ、申請者も貢献してきた[2]。一方、男性の更年期障害に相当する LOH (Late-Onset Hypogonadism) 症候群でも同様に骨粗鬆症が起こるが、研究報告は著しく少なく、発症メカニズムも未解明である。男性の骨折患者数は女性の 7 割程度だが、大腿骨頸部骨折後の長期死亡率および生活障害の度合いは、男性の方がより深刻である[3]。また、一般に女性よりも健康や食生活への関心が薄いこと、骨粗鬆症は女性の疾患だという固定概念が強いことも問題である。

LOH 症候群は近年、その精神症状が引き起こす QOL の低下を中心に一般にも認知されはじめている。骨粗鬆症に関してもそのリスクを広く一般社会に理解させ、食生活を含めた生活習慣による予防策を伝えていくことが、今後の健康寿命の延伸および医療費の削減のためにも重要であると考えられる。

[1] Hagino H, et al. The Bone (2009) 23: 47-51

[2] Nakanishi A, et al. Molecular Medicine Reports (2013) 7: 1896-1903

[3] Center JR, et al. Lancet (1999) 353: pp.878-882

2. 研究の目的

閉経後骨粗鬆症モデルは卵巣摘出 (ovariectomy; OVX) により再現可能であり、LOH 性骨粗鬆症モデルも精巣摘出 (orchietomy; ORX) により再現できると考えられている。そこで、本研究では ORX における性ホルモンの濃度変化に着目し、LOH 性骨粗鬆症の発症機序を明らかにすること、また、食品成分や薬剤によるターゲットを定めることを目標とした。

3. 研究の方法

in vivo で男性更年期モデル (ORX) ラットを作成し、プロゲステロン投与による骨代謝への影響を検討した。具体的には、手術により両側の精巣を摘出した両側 ORX 群、右側のみの精巣を摘出した片側 ORX 群、および偽手術を施した sham 群を作製し、それぞれをプロゲステロン投与群と非投与群に分けて約 4 か月間飼育した。プロゲステロン投与は週に 1 度行い、週に 2 度の体重測定と食餌量の測定を行って健康状態に異常がないかをモニターしながら飼育を継続した。飼育終了時、24 時間の採尿の後、吸入麻酔下で開腹して採血、肝臓・脾臓・胸腺・脂肪 (後腹膜、腎周囲、腸管膜) の臓器および組織重量を測定、大腿骨・脛骨を採取して各種実験に供した。

また、骨髄細胞やマウス腹腔マクロファージ由来細胞株 RAW264.7 細胞の培養を中心とした *in vitro* 実験系で、詳細な骨代謝メカニズムの検討と、食品成分による LOH 性骨粗鬆症の予防の可能性についての検討を行った。

4. 研究成果

【ラット骨髄を使用した初代培養、細胞株 RAW264.7 での培養方法の確立】

Wistar 系ラットの大腿骨・脛骨から骨髄細胞を回収し、破骨細胞および骨芽細胞を形成する系は既に確立していた。本研究では、破骨細胞の研究に最もよく使用される細胞株：マウス腹腔マクロファージ由来 RAW264.7 細胞を用いて破骨細胞を形成する培養方法を確立した。

ラット骨髄を用いた初代培養では、破骨細胞分化因子である RANKL の添加濃度は 10ng/mL で十分に分化誘導ができていたが、RAW264.7 細胞からの破骨細胞形成ではその 10 倍にあたる 100ng/mL がよく使用されていた (文献調査による)。このような高濃度で破骨細胞の分化誘導を行った場合、食品成分等による抑制効果が見られにくいこと、生体内での分化誘導を模倣できないことが問題となる。そこで本研究では、細胞の状態および培地への添加物質を検討することで、従来よりも低濃度で破骨細胞形成を誘導する方法を確立することができた。

【 ラットへの性ホルモンの投与方法の検討】

長期飼育にあたり、対象動物に対する過度なストレスがなく（体重減少等で判断）、実験者が安全且つ確実に投与できる方法の検討を行った。その結果、性ホルモンを sesami oil に溶解し、軽度麻酔下で皮下投与することで、上記課題をクリアできた。

【 ORX ラットの骨量減少程度およびそのメカニズムの検討】

両側の精巣を摘出した両側 ORX ラット、右側のみ摘出した片側 ORX ラット、偽手術を行った sham ラットをプロゲステロン投与群、非投与群（sesami oil 投与群）に分けて約 4 か月間飼育し、血液・大腿骨および脛骨を用いて骨形成・骨吸収両者への影響を検討した。

-1. ORX およびプロゲステロン投与による骨吸収活性への影響の検討：両側 ORX 群では顕著な骨量の減少、骨吸収活性を示す TRAP 活性の上昇がおこっていたが、プロゲステロン投与によりこれらの改善がみられた。骨形成活性に有意な変化はみられなかったことから、ORX は骨吸収活性の上昇により骨量減少を引き起こすこと、プロゲステロン投与により改善する可能性が示唆された。

-2. ORX およびプロゲステロン投与による体内炎症レベルへの影響の検討：血中の炎症性サイトカインである TNF α のレベルを ELISA 法で測定した結果、Sham < 片側 ORX < ORX の順に有意に高く、ORX により血中の炎症レベルが増加していることが明らかとなった。また、ORX+プロゲステロン投与群では右 ORX 程度まで回復が見られた。

-3. ORX 投与による性ホルモンレベルへの影響の確認：血中テストステロンレベルは ORX < Sham で有意に高値を示したが、片側 ORX 群 は個体差が大きく他群との間に有意な差は見られなかった。

-4. 骨量減少メカニズムの推定：文献的検索により ORX ラットで RANKL の発現増加がみられること（Simko J. et al, 2019）が明らかとなっており、また、TNF α は RANKL 発現を増加させることが広く知られている。これらのことから、ORX ラットにおいては炎症 性サイトカイン TNF α の上昇により RANKL 発現が亢進し、破骨細胞形成が促進して骨吸収能が高まることにより骨量減少が起こる可能性が示唆された。

【 骨量減少のターゲット因子に対して効果をもつ食品成分の検討】

TNF α を介した RANKL 発現の増加を抑制しうる食品成分の探索：まず文献的探索を行い、食品や医薬品として用いられる天然成分から、いくつかのアミノ酸、脂肪酸、フラボノイド、カロテノイドなどを TNF α 抑制物質の候補として挙げた。

食品成分による LPS 誘導性 TNF α 産生への影響の検討：細胞モデルとしてマウス腹水マクロファージ由来であり RANKL 誘導により破骨細胞を形成する RAW264.7 細胞を用いて、LPS 誘導性 TNF α 産生への食品成分の影響を検討した。食品成分の添加は LPS 刺激の前培養とし、LPS 刺激後の TNF α 産生程度を qRT-PCR による mRNA レベル と WB によるタンパク質発現レベルで解析した。

LPS を使った簡易的な炎症励起による破骨細胞形成関連因子の発現への影響について、経時的な発現レベルの変化を捉えることができた。また、刺激後の TNF α 産生および破骨細胞形成を促進する諸因子の発現に影響を及ぼす食品成分を明らかにすることができた。

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 3件）

1. 著者名 Minami Akari, Ogino Mako, Nakano Noriko, Ichimura Mayuko, Nakanishi Atsuko, Murai Toshiyuki, Kitagishi Yasuko, Matsuda Satoru	4. 巻 39
2. 論文標題 Roles of oncogenes and tumor-suppressor genes in osteoclastogenesis (Review)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 261 ~ 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijmm.2017.2847	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 Matsuda Satoru, Nakagawa Yukie, Kitagishi Yasuko, Nakanishi Atsuko, Murai Toshiyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Reactive Oxygen Species, Superoxide Dimutases, and PTEN-p53-AKT-MDM2 Signaling Loop Network in Mesenchymal Stem/Stromal Cells Regulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 36 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells7050036	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 Matsuda Satoru, Nakagawa Yukie, Tsuji Ai, Kitagishi Yasuko, Nakanishi Atsuko, Murai Toshiyuki	4. 巻 6
2. 論文標題 Implications of PI3K/AKT/PTEN Signaling on Superoxide Dismutases Expression and in the Pathogenesis of Alzheimer ' s Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diseases	6. 最初と最後の頁 28 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diseases6020028	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中西 温子、石塚 理香、笠次 良爾	4. 発行年 2018年
2. 出版社 帝塚山大学出版	5. 総ページ数 112
3. 書名 管理栄養士を目指す学生のための解剖生理学実験ノート	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------