

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17086

研究課題名(和文) 骨におけるリンと老化とオートファジーの解析

研究課題名(英文) Analyze of between phospholus, senescence and autophagy in bone.

研究代表者

佐々木 宗輝 (SASAKI, Muneteru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10706336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、骨の老化メカニズムを解明するために骨細胞、リン、オートファジーに注目した。老化加速因子であるリンの濃度を調整した餌をマウスに与え、それぞれの変化を確認した。高リン食を与えた群では、老化を示す身体的な特徴を示した。リン食濃度調整食を与えた群では、オートファジー特異的なタンパク質の発現が変化したことから、血中のリン濃度はオートファジー作用に影響を与えると示唆された。さらに大腿骨から採取した細胞を培養した骨細胞様細胞を用いた実験では培養液のリン濃度の変化によってオートファジー関連タンパク質の発現が変化した。以上から血中リン濃度の変化がオートファジー作用へ影響を与えることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会となった日本において高齢者のQOLの向上は充実した老後を過ごすために重要である。そのために身体の健康は大切で、骨折は寝たきりになる原因のひとつであることから、その予防は重要課題である。一方で、日本の医療費は年々増加の一途をたどり、年齢別に見た医療費は高齢者が50%以上を占めることから高齢者の健康増進は医療費を下げる面からも必要である。今回の研究結果は、骨の老化メカニズムを明らかにする一助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 investigate osteocytes, phosphorus and autophagy to explore the mechanism of bone senescence. Three types of feed, which have different phosphorus concentration (higher, lower, and normal concentration group, respectively), were fed to mice, since phosphorus is known as an accelerating factor of aging. The senescence characteristics were induced by higher concentration of phosphorus, whereas the production of autophagy associated proteins was altered in both higher and lower concentration groups, which suggest us that the blood level of phosphorus affects autophagy. Next, osteocyte-like cells obtained from murine femora were cultured under phosphorus controlled medium. The production of autophagy-related proteins was changed in a phosphorus-dose-dependent manner in osteocyte-like cells. Therefore, our findings strongly suggest that autophagy is affected by phosphorus in mouse.

研究分野：骨形態学

キーワード：リン 骨細胞 オートファジー 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リンは人間が生命を営むために必須の元素で、骨基質、細胞内ならびに血中に存在する。リン代謝は腎臓で調整され、骨細胞が産生する Fibroblast growth factor 23 (FGF23) (リンの再吸収を抑制) と、その受容体 FGF receptor 1c (FGFR1C) /klotho 複合体により制御される。Klotho 遺伝子欠損マウス (*kl/kl* マウス) では、短命、血管の石灰化、骨量減少といったいわゆる老化現象を認めるが、klotho 蛋白の投与は腎臓におけるリン代謝を亢進して短命をレスキューし老化を改善させる。また、*kl/kl* マウスは高リン血症を呈するが、リン濃度を低下させることで老化現象が改善することから、リンの濃度変化は、老化にとって極めて重要な役割を果たしていることが推測される。一方、老化がもたらす慢性腎疾患 (chronic kidney disease : CKD) 患者では骨折リスクが増大し、CKD の病態進行に伴って高リン血症が惹起されるものの、リンの濃度変化が骨細胞の老化に与える影響は不明である。

オートファジーは、生命を維持するために、不要な細胞内小器官や余分な蛋白質を分解してアミノ酸とし、新たな蛋白質を合成する自食作用と定義される。通常の状態でもオートファジーは認められるが、飢餓状態で最も活発となり、ストレス時に活性が上昇することなどが報告されている。最新の研究によれば、オートファジーは腎臓の近位尿細管の線維化を抑制して腎臓の老化を防ぐことが証明されている。一般的には、老化がもたらす不要な細胞内小器官や蛋白質の蓄積、ならびに傷害を受けた DNA などの蓄積はオートファジーの機能により処理されている。しかし細胞が老化するとオートファジー機能が低下して一連の処理を十分に行うことができず、例えば老化がもたらす腎臓の低酸素状態はオートファジーの機能を低下させて異常なミトコンドリアを蓄積し、CKD の発生や進行を加速させる。

一方骨細胞に着目すると、わずかに 1 報の論文でオートファジー関連分子である LC3b、Beclin、ULK1 の発現低下が認められ、老化がもたらす骨量低下との関連性を示唆しているが、リンが骨細胞のオートファジー機能に与える影響を検索した基礎研究は存在しなかった。

我が国は世界に類を見ないスピードで高齢化が進んでいる超高齢社会である。日本骨代謝学会によると、2011 年の骨粗鬆症患者は 1300 万人であることが推計されており、このことは 60 歳以上の約 3 人に 1 人が骨粗鬆症であることを意味する。骨粗鬆症は骨折リスクを有意に増大させるが、CKD を含む全身疾患がもたらす副次的な骨粗鬆症もまた骨折リスクを増大させる。大腿部骨折患者では、骨折治療を行っても約半数の患者は骨折前の歩行レベルに回復せず、さらには受傷後 1 年で 10.1% が死亡することから、老化により惹起される骨折リスクを予防もしくは低減させることは我が国の急務であるといえる。

研究代表者は *kl/kl* マウスを用いた基礎研究を行い、現在までに (1) 野生型マウスと比較して *kl/kl* マウスの長管骨における骨細胞は有意に細胞死が多いこと、(2) 死滅した骨細胞周囲の骨基質ではミネラル沈着が有意に抑制されていること、ならびに (3) 一部骨細胞では Dentin Matrix Protein1 (DMP-1) が過剰産生されて骨小腔内部に蓄積し、骨細胞自身が石灰化物に覆いつくされていることなどを明らかにしてきた。一方研究代表者は、高濃度のリンを含む餌 (高リン食) を与えたマウスの成長が著しく障害され、低身長かつ低体重であることを予備実験にて確認済みであり、リンの濃度変化が骨組織やひいては骨細胞にも著しい影響を与えていることが強く予想される。

以上のリンと老化、オートファジーと老化、骨折と老化についてと、研究代表者の研究成果を総合的に鑑みて、「血中におけるリン濃度の増加は骨細胞のオートファジー機能を低下させることで老化を惹起する」という仮説を立てたことが、研究代表者が本研究を着想した背景である。

2 . 研究の目的

リンは生体に必須の元素で老化の加速因子と考えられるが、骨細胞に対する老化作用は不明である。老化は慢性腎疾患を増加し、高リン血症を惹起して骨折のリスクを増大させるが、わが国が直面する未曾有の超高齢社会では骨折予防が重要な課題である。一方オートファジーは、細胞内小器官や蛋白質を分解する自食作用と定義されるが、オートファジーが骨細胞に与える影響は分からない。本研究は、「リン」、「骨細胞」、「オートファジー」に着目し、リン濃度が骨細胞のオートファジー機能に与える影響を検索して骨細胞の老化メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3 . 研究の方法

in vivo 研究として、リン濃度が異なる飼料を野生型マウスに与え、各リン濃度に対する骨細胞の老化とオートファジー機能を組織学的・分子生物学的に比較解析する。その後、*in vitro* 研究において、骨細胞様細胞を樹立後に、(1)異なるリン濃度の条件下で行う培養実験と、(2)オートファジー賦活剤または阻害剤を用いた培養実験を行うことでリン濃度の変化による骨細胞のオートファジー機能を探索し、骨細胞における老化メカニズムの解明を試みる。

4 . 研究成果

リン含有量を高濃度に調整した餌を与えたマウスでは明らかに他群のマウスと異なる成長を示した。それは老化を示す身体的な特徴が認められた。またリン濃度調整食を与えたマウスでは、免疫組織化学でオートファジー関連タンパク質の局在に変化を認めた。さらに骨から採取した細胞を培養した骨細胞様細胞の実験では、リン濃度を調整した培養液で培養した場合に、オートファジー関連タンパク質の発現に変化を認めた。以上から、リン濃度はマウスの成長に影響を与えること、オートファジー関連タンパク質の局在を変化させること、さらに *in vitro* 研究では、培養液中のリン濃度を変化させることでオートファジー関連タンパク質の発現に影響を与えることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sasaki M, Kurishima S, Sawase T
2. 発表標題 Effect of phosphorus concentration on osteocyte senescence.
3. 学会等名 28th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Muneteru Sasaki, Shinichiro Kuroshima, Takashi Sawase.
2. 発表標題 Effect of phosphorus on osteocyte function and aging.
3. 学会等名 Secretariat of the 7th Seoul Symposium on Bone Health (SSBH 2019) & the 31th Annual Meeting of the Korean Society for Bone and Mineral Research(KSBMR). (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Muneteru Sasaki, Shinichiro Kuroshima, Takashi Sawase.
2. 発表標題 Correlation between phosphorus concentration and autophagy.
3. 学会等名 29th Australian and New Zealand Bone and Mineral Society Annual Scientific Meeting. (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----