

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19604

研究課題名(和文)腸管加齢による運動器退行性変化の制御機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of locomotor degenerative changes due to intestinal aging

研究代表者

麻生 義則 (ASOU, YOSHINORI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・ジョイントリサーチ講座教授

研究者番号：50345279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症、骨粗鬆症は、ロコモティブシンドロームの原因疾患として克服すべき疾患である。我々は、運動器の退行性変化が腸内細菌叢により制御されるとの仮説を立て、その検証を行った。我々は腸管加齢モデル作成のために、腸管特異的に長寿遺伝子Sirt6欠損するマウス(Lgr5cre::Sirt6floxedマウス)を作成した。また加齢マウスより糞便、盲腸内容物、腸管サンプルを採取し解析している。サルコペニアの解析を行うために、筋力解析の手法を確立した。また、無菌マウスに対する腸内細菌移植実験により、骨量を優位に増加させる細菌Xを同定した。今後、メタボローム解析などを行い、骨量増加のメカニズムを解析する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢の分子メカニズムの研究は近年盛んであるが、腸内細菌叢を介した運動器老化メカニズムの解明はない。本研究では次世代シーケンサーにより、加齢によって変動した菌種を特定し、なおかつその機能を明らかにすることを目標としている。本研究の成果をヒトに応用することにより、プレバイオティクス、プロバイオティクスによって加齢に伴う運動機能低下をコントロールすることができるようになる。国民医療費が40兆円を超える現在において、本研究の成功は、医療経済の視野から見ても、有意義なものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Osteoarthritis and osteoporosis are diseases that should be overcome as the causative diseases of locomotive syndrome. We hypothesized and tested the degenerative changes in the locomotorium by the gut microbiota. We created mice deficient in the longevity gene Sirt6 (Lgr5cre::Sirt6floxed mice) specifically for the intestinal tract to create an intestinal aging model. In addition, feces, cecal contents, and intestinal tract samples are collected and analyzed from aged mice. A method of muscle strength analysis was established to analyze sarcopenia. In addition, intestinal bacterial transplantation experiments on sterile mice identified Bacterial X, which significantly increases bone mass. In the future, we will analyze the mechanism of bone mass increase by performing metabolome analysis.

研究分野：分子生物学

キーワード：加齢 サルコペニア 骨粗鬆症 腸内細菌

1. 研究開始当初の背景

近年、腸内細菌が、食物の消化活動のみならず、様々な疾患の原因となることが明らかとされてきた。たとえば、腸内細菌叢は脂質吸収を制御し、肥満者の腸内細菌を移植されたマウスは、痩身者の腸内細菌を移植されたマウスよりも有意に太る。フィルミクテス門はいわゆる「デブ菌」と呼ばれ、腸内細菌叢におけるフィルミクテス門比率の増加は、脂肪吸収効率を増加させる(2013 Nature)。我々は、硬組織代謝に対するポリフェノールの投与効果を解析してきた。アントシアニジンは強い抗酸化活性をもつポリフェノールだが、変形性膝関節症の進行に対するアントシアニジンの投与効果を、マウス外傷性変形性膝関節症モデルを用いて検証した。その結果、アントシアニジンはマウス変形性膝関節症モデルにおいて軟骨保護作用を示した(2012 PLoS ONE, Nature Reviews Rheumatology に Research Highlight として紹介 業績参照)。しかしアントシアニジンの腸管からの吸収効率はきわめて低く、変形性膝関節症の予防効果が、腸管～門脈の経路を介するものとは考えにくいことから、腸内細菌叢を介する作用が考えられる。女性の閉経は骨粗鬆症、糖代謝異常などの原因となるが、我々は、閉経と腸内細菌叢の関連に着目し、マウス卵巣摘出モデルを用いて、卵巣摘出マウスでは、腸内細菌叢のフィルミクテス門が増加すること、増加したフィルミクテス門は、マウスに、プロアントシアニジンを経口投与することにより正常化することを見出した(図 A 特許出願中 特願 2016-144770 投稿中)。以上の結果より、閉経後女性における体重増加、耐糖能低下などの現象には腸内細菌叢の変化が寄与することが考えられる。しかし、エストロゲンを介さない個体の加齢変化と腸内細菌叢の関係は不明である。

2. 研究の目的

運動器の退行性変化が腸内細菌叢により制御されるとの仮説を立て、その検証を行うこととした。具体的には、高齢マウス、若年マウスの腸内細菌を無菌マウスに移植し、運動器に対する影響を解析する。マウスの腸管特異的に長寿遺伝子サーチュイン Sirt6 を欠損させ、腸管細胞の老化を促進させて腸内細菌叢に対する影響、運動器に対する影響を解析する。

3. 研究の方法

【腸管特異的 Sirt6 欠損マウスの作出】

腸管特異的に cre 遺伝子を発現する Lgr5cre マウスを Sirt6 floxed マウスと交配させ、腸管特異的 Sirt6 欠損マウスを作出した。

【加齢による腸内細菌叢変化の解析】

雄 C57Bl6/J マウスを対象に、高齢マウス、若年マウスから糞便、盲腸内容物を採取し、シーケンス解析により腸内細菌叢を比較する。同マウスの大腸から tRNA を採取し、RNA-seq 解析を行う。

【若年マウス、高齢マウスの筋力測定と筋組織解析】

生後6か月マウス、同1.5年マウスの腓腹筋力を評価した。麻酔下で外科的に腓腹筋を露出し、腓腹筋の筋張力を電気生理学的に計測した。1Hzで断続的に刺激する twitch 刺激(単収縮)と、50Hzで1秒間持続的に刺激する tetanic 刺激(完全強縮)により脛骨神経を刺激した。屠殺後に腓腹筋を組織学的に解析した。

【骨量増加させる腸内細菌の同定】

卵巣摘出(OVX)マウスと sham マウスから盲腸内容物を採取し腸内細菌のシーケンス解析を行った。OVXにより減少した菌を無菌マウスに移植し骨組織解析を行った。

4. 研究成果

【腸管特異的 Sirt6 欠損マウスの作出】

タモキシフェン投与依存的に、腸管特異的に cre 遺伝子を発現する Lgr5cre/ERT マウスを Sirt6 floxed マウスと交配させ、タモキシフェン依存的腸管特異的 Sirt6 欠損マウス(Lgr5cre/ERT)を作出した。マウスは正常に生まれ、体重はほぼコントロールと同等であった。現在、サンプル数を増やし、骨代謝、軟骨代謝、筋力などの解析を進めている。

【若年マウス、高齢マウスの筋力測定と筋組織解析】

生後12ヶ月、同18か月の雄 C57Bl6/J マウスでは、同生後6か月マウスと比較して腓腹筋の Twitch, Tetanic とともに筋力が低下した。組織学的解析では、生後12ヶ月、同18か月マウスでは、有意に筋線維の萎縮が生じていた。

【加齢による腸内細菌叢変化の解析】

腸内細菌叢には飼養環境や給餌が影響することから、東京医科歯科大学動物飼養施設にて発生した雄 C57Bl6/J マウスを生後1.5年まで飼養した。高齢群として生後1.5年、若年群として生後3か月マウスから盲腸内容物、糞便を採取し、シーケンス解析により腸内細菌叢を比較した。同マウスの大腸から tRNA を採取し、RNA-seq 解析を行った。

【骨量増加させる腸内細菌の同定】

シーケンス解析により OVX による腸内細菌の相違が認められた。OVX により減少した菌 X を無菌マウスに移植したところ骨量が増加した。特定の腸内細菌が骨量調整に参画することが明らかとなった。

Sars-CoV-2 流行による緊急事態宣言に伴う申請者および研究分担者が所属する研究施設からの研究活動自粛要請により、当初の計画よりも解析の進行が遅れているが、着実に上記計画を遂行しており、現在も解析を継続している。

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 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Aihemaiti A, Yamamoto N, Piao J, Oyaizu T, Ochi H, Sato S, Okawa A, Miyata T, Tsuji K, Ezura Y, Asou Y.	4. 巻 534
2. 論文標題 A novel PAI-1 inhibitor prevents ageing-related muscle fiber atrophy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 849-856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.10.089.	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 該当する

1. 著者名 Tenkumo T, Aobulikasimu A, Asou Y, Shirato M, Shishido S, Kanno T, Niwano Y, Sasaki K, Nakamura K.	4. 巻 Jun 1;10(1)
2. 論文標題 Proanthocyanidin-rich grape seed extract improves bone loss, bone healing, and implant osseointegration in ovariectomized animals.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 8812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65403-4.	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 該当する

1. 著者名 麻生 義則, アディハム・アハマット	4. 巻 52 (12)
2. 論文標題 PAI-1活性制御によるサルコペニア予防の可能性 3 .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 月刊「細胞」	6. 最初と最後の頁 709-712
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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Aidehamu Aihemaiti, Alkebaier Aobulikasimu, Takuya Oyaizu, Hiroki Ochi, Shingo Sato, Kunikazu Tsuji, Toshio Miyata, Atsushi Okawa, Yoshinori Asou
2. 発表標題 PAI-1 accelerates sarcopenia and ageing-related osteoporosis.
3. 学会等名 米国骨代謝学会（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
--	---------------------------	-----------------------	----

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