

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10057

研究課題名（和文）骨細胞を基軸としたリン依存性オートファジー誘発型骨老化機構の解明

研究課題名（英文）Understanding of mechanism of bone senescence via phosphate-dependent autophagy in osteocytes.

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、血中リン濃度の変化に対するオートファジー機能の変化を明らかにし、さらに、オートファジー機能に関連した骨老化経路を明らかにすることを目的にした。その結果、リン調整食を与えたマウスの大腿骨において血中のリン濃度の上昇は、骨老化関連因子とオートファジー関連因子の局在の変化を招くことが明らかとなった。またマウスから採取した骨細胞を用いた培養実験では培養液中のリン濃度の変化が培養骨細胞の老化関連因子の発現上昇とオートファジー関連因子の発現に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会において、高齢者が健康的に生活することは重要項目であり、寝たきりの原因のひとつである骨折を予防することは社会的に大きな意義がある。また本研究は、近年摂取が増加傾向のリン、骨老化、オートファジーに着目し骨老化のメカニズムを明らかにしたものであり、この様な着目点から骨老化を考えた研究はこれまでにないことが学術的に意義がある。骨老化のメカニズムを明らかにすることは、より有効的な骨折予防対策を練るために一因となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our study aimed to clarify the functional alteration of autophagy in response to the change of phosphorus concentration in blood and the mechanisms of bone senescence related with the function of autophagy. High phosphorus concentration in murine blood provided by phosphorus concentration-adjusted chows altered bone senescence- and autophagy-related factors. Moreover, The alteration of phosphorus concentration in culture media affected bone senescence- and autophagy-related factors in cultured osteocytes.

研究分野：組織形態学

キーワード：骨細胞 オートファジー リン 老化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

学術的背景【食生活とリン】

リンの過剰摂取は世界的に問題となっている^{1,2)}。老化による慢性腎疾患の増加は、リンの排出を阻害し血中リン濃度を上昇させる。リンの過剰摂取はカルシウムの吸収を抑制して骨密度の低下を惹起し、骨折リスクを増加させると考えられている。一方、大腿骨部の骨折は、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、著しく健康寿命を低下させ、受傷後1年でその10.1%が死亡する³⁾。以上から、患者のQOLや医療費の問題を解決するには、骨折予防の鍵を握る骨老化機構を明らかにすることが必要不可欠である。

学術的背景【リンとオートファジーと骨老化】

リンは老化促進因子と考えられている⁴⁾。リンの代謝には fibroblast growth factor 23 (FGF23) が必要で、その受容体である FGF receptor1c (FGFR1c) /klotho 複合体を構成する klotho タンパク欠損マウスでは、高リン血症が生じて様々な老化現象が観察される⁵⁾。この現象は血中リン濃度の低下により回復するため、血中リン濃度は老化に重要な役割を果たすと考えられる。一方、オートファジーは、自己の細胞内小器官やタンパク質を分解して得たアミノ酸を再利用する働きの中で自食作用と定義されるが、心筋芽細胞におけるリン濃度の上昇がオートファジーを介したアポトーシストリガーとなることや⁶⁾、血管平滑筋細胞における高リン状態はオートファジーを誘導する⁷⁾ことなどが報告されている。しかしながら、リンの血中濃度変化が骨基質のオートファジー機能に与える影響を明らかにした基礎研究は極めて少ない【研究課題の核心をなす学術的「問い(1)」】。さらにオートファジーは、細胞の生命維持だけでなく、骨髄細胞⁸⁾や皮膚の老化⁹⁾とも関連性が認められているものの、オートファジーが骨老化機構へ与える影響は全く分かっていない【研究課題の核心をなす学術的「問い(2)」】。

2. 研究の目的

研究開始当初の背景で提起された研究課題の核心をなす学術的「問い」に対する答えを見出すため、以下を本研究課題の目的とした。

(1) 血中リン濃度の変化に対するオートファジー機能の変化を明らかにする。

(2) オートファジー機能に関連した骨老化経路を明らかにする。

上記(1)と(2)を明らかにすることで、リンのオートファジー機能に対する影響が明らかになり、最終的には、オートファジー機能を介した骨老化機構が明らかになる。

3. 研究の方法

【実験計画(1)】

リン濃度調整飼料によるリン濃度依存性オートファジー誘発型骨老化因子の候補探索

研究代表者は予備実験で、野生型マウスにリン濃度調整食を与えて飼育すると、骨細胞におけるオートファジー関連因子(LC3B)の局在が変化することを明らかにした(未発表)ことから、解析の対象は骨細胞とする。飼料のリン濃度は高リン食(P:1.73%, Ca:0.58%), 低リン食(P:0.2%, Ca:0.6%), コントロール食(P:0.6%, Ca:0.6%)とした。

生後3週齢の野生型マウスにリン調整食を1~4週間与えて血中リン濃度を管理する。

屠殺後に試料を作成し、パラフィン・レジン包埋切片で組織解析を行う。骨髄と骨組織から遺伝子とタンパク質を採取する。また、血清も採取する。

組織形態学的解析、免疫組織学的解析、電子顕微鏡学的解析、血清解析、遺伝子解析(マイクロアレイと定量qPCR)、プロテイン解析(プロテオーム解析とウエスタンブロッティング)によって、リン濃度依存性オートファジー誘発型骨老化因子の候補を選択する。なお、老化の証明は、老化因子[p16Ink4a, Cdkn1a(p21), Trp53(p53), senescence-associated secretory phenotype (SASP)]の発現解析¹⁰⁾と、透過型電子顕微鏡(TEM)により、細胞内小器官への蓄積、DNAの障害、ならびに蛋白質の過剰な蓄積などを確認する。オートファジーの機能的変化についても、オートファジー関連因子の発現解析に加え、TEMによるオートファゴソームの定量解析を行う^{11),12)}。

【実験計画(2)】

培養骨細胞によるリン濃度依存性オートファジー誘発型骨老化因子の絞り込み

実験計画1のIn vivoで観察されたリン濃度依存性オートファジー誘発型骨老化因子の発現を、in vitroで確認する。

骨細胞は、直接骨組織から採取・確立する(骨細胞の証明は、Sost, Fgf23, Dmp1, Fam20cの遺伝子発現と免疫染色にて確認する)¹³⁾。樹立骨細胞を用い、異なるリン濃度で培養する。

培養骨細胞における老化の評価は、細胞老化因子の検索で評価する。すなわち、p16Ink4a, Cdkn1a(p21), Trp53(p53), senescence-associated secretory phenotype (SASP)を評価する¹⁰⁾。

骨組織以外において、オートファジーの機能は老化とともに低下することが報告されている

14) .そこで、培養骨細胞でもオートファジーの機能が低下することを証明する.

リン濃度依存性オートファジー誘発型骨老化因子を特定するため、培養骨細胞のマイクロアレイ¹⁵⁾とプロテオーム解析¹⁶⁾を行い、実験計画1の動物実験で選択された候補分子と照合する.動物実験と培養実験の両者で変動した分子をリン濃度依存性オートファジー誘発型骨老化因子の最有力候補とし、動物実験と異なる新規分子が候補に挙げた場合には、次年度の実験にて関連性があるかを明らかにする.

【実験計画(3)】

絞り込んだリン濃度依存性オートファジー誘発型骨老化因子の確定とメカニズム探索

実験計画1と実験計画2で絞り込んだ候補分子そのものを投与するか、siRNAを作成して野生型マウスにトランスフェクションし¹⁷⁾、候補分子を強制発現または抑制して、リン濃度依存性オートファジー誘発型骨老化因子を同定する.この際、同定分子に関連するシグナル伝達経路もウエスタンブロッティングで探索し、骨老化機構を明らかにする.

4. 研究成果

本研究は、血中リン濃度の変化に対するオートファジー機能の変化を明らかにし、さらに、オートファジー機能に関連した骨老化経路を明らかにすることを目的にした.その結果、マウスにおいて血中のリン濃度の上昇は、骨老化を招くことが明らかとなった.骨細胞内では老化関連因子の上昇とオートファジー関連因子の局在と発現が変化することが明らかとなった.またマウスから採取した骨細胞を用いた培養実験でも培養液中のリン濃度の変化がマウス骨細胞と同様に培養骨細胞様細胞内の老化関連因子の発現上昇とオートファジー関連因子の発現に影響を与えることが明らかとなった.

引用文献

- 1) Chang AR et al. *Am J Clin Nutr.* 2014.
- 2) Takeda E et al. *Adv Nutr.* 2014.
- 3) Sakamoto K et al: *J Orthop Sci.* 2006.
- 4) Kuro-O M. *Int J Nephrol.* 2018.
- 5) Kuro-O M et al. *Nature.* 1997.
- 6) Lui YL et al. *Cardiorenal Med.* 2017.
- 7) Wang J et al. *Cell Physiol Biochem.* 2017.
- 8) Ma Y et al. *Aging Cell.* 2018.
- 9) Wu Q et al. *Biogerontology.* 2018.
- 10) Farr JN et al. *J Bone Miner Res.* 2016.
- 11) Yamamoto A et al. *Cell Struct Funct.* 1998.
- 12) Hayashi-Nishino M et al. *Nat Cell Biol.* 2009.
- 13) Miyagawa K et al. *PLoS One.* 2014.
- 14) Yamamoto T et al. *Autophagy.* 2016.
- 15) Fujiwara M et al. *bone.* 2016.
- 16) Guo D et al. *Proteomics.* 2010.
- 17) Fujita K et al. *Nat Med.* 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 Sasaki M, Kuroshima S, Sawase T
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 2019 (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
研究分担者	稲葉 菜緒 (Inaba Nao) (00814170)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員 (17301)	
研究分担者	右藤 友督 (Uto Yusuke) (10816680)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	
研究分担者	黒嶋 伸一郎 (Kuroshima Shinichiro) (40443915)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301)	

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