

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年05月16日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390406

研究課題名（和文） アルコール及び脂肪摂取による骨・骨髄機能関連障害の解明と防止法の開発

研究課題名（英文） Investigation of disorders of interaction between bone and bone marrow after intake of alcohol and fat

研究代表者

中村 利孝 (NAKAMURA TOSHITAKA)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：50082235

研究成果の概要（和文）：ApoE遺伝子欠損マウスに高脂肪食を摂取させた結果、脛骨二次海綿骨における骨形成率は低下し、海綿骨量は減少する。このマウスの血清過酸化脂質濃度と血清LDL濃度は高く、これらの値と骨芽細胞におけるp53遺伝子発現は有意な正の相関を示した。骨芽細胞のアポトーシスが生じ、骨芽細胞の分化・増殖に障害が生じることによって、骨形成が低下するメカニズムが考えられた。また、アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスにアルコールを摂取させた結果、骨髄細胞におけるp21遺伝子の発現が亢進し、骨芽細胞の細胞周期が停止し、骨石灰化が障害され骨形成が低下することが明らかとなった。過剰なアルコール及び脂肪摂取により誘導された骨芽細胞の細胞周期停止やアポトーシスが骨芽細胞機能を障害するメカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Disruption of Apo E gene with high fat diet resulted in trabecular bone loss and reduced bone formation at the secondary spongiosa of the tibia in mice. In these disrupted mice, apoptosis was induced in osteoblasts through enhanced expression of p53 mRNA and osteoblastic differentiation and proliferation were suppressed. Bone formation was decreased. Disruption of aldehyde-dehydrogenase 2 gene with alcohol intake resulted in trabecular bone loss and reduced bone formation in mice. Cell cycle arrest was induced through enhanced expression of p21 mRNA and osteoblastic mineralization was disturbed. Bone formation was decreased. Thus, we demonstrated the mechanism underlying trabecular bone loss induced by alcohol intake or high fat diet through cell cycle arrest or apoptosis of osteoblasts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2011年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：外科・整形外科

キーワード：アルコール、脂肪、骨芽細胞、骨髄細胞、シグナル伝達、p21、アセトアルデヒド脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

メタボリック症候群（内臓脂肪症候群）の該当者は、我が国では約 940 万人いるといわれている。高脂肪食や運動不足などによるエネルギー過剰により惹起される。その結果、動脈硬化や骨粗鬆症を生じるが、全身の代謝異常と骨の代謝異常の相互作用についてはいまだ明らかではない。

もうひとつの背景には、骨粗鬆症に対する薬物治療開始基準に生活習慣要因（過剰なアルコール摂取と喫煙）が取り入れられたことである（骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2006 年版）。アルコールを 1 日 2 単位（日本酒換算で 2 合）以上摂取している者は、摂取していない者と比べて骨折の相対危険度が、骨折全体で 1.23、骨粗鬆症性骨折で 1.38、大腿骨頸部骨折で 1.68 に増すことが報告されている（Kanis JA, et al. Osteoporos Int 16:737-742, 2005）。アルコール過剰摂取は骨密度とは独立した骨折の危険因子であることが WHO によるメタアナリシスで明らかにされている。

また、我々は、最近、マウスに高脂肪食を摂取させると、通常の餌を摂取しているマウスに比べて、血清 LDL と酸化 LDL が高値となり、脛骨二次海綿骨における骨形成速度と骨芽細胞面が有意に低下することを明らかにしている（Hirasawa H, Sakai A, Nakamura T, et al. J Bone Miner Res 22:1020-1030, 2007）。

このような背景から、国内外において生活習慣に起因するメタボリックシンドロームの研究解明が進む中、骨の健康管理についての管理指針を確立することが重要なテーマであると考え、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、アルコール及び脂肪摂取が骨代謝に与える影響を組織から分子のレベルで明らかにし、骨の障害に対する防止法を開発することである。

我々は、アルコールと脂肪摂取によって増加した酸化ストレスが、骨芽細胞分化を障害することを明らかにしてきた。それをさらに発展させて、ApoE 遺伝子を欠損させたマウスおよびアルデヒド脱水素酵素遺伝子を欠損させたマウスを用いて、海綿骨と皮質骨における分子シグナルの異常を明らかにすることを中心に研究を進める。

3. 研究の方法

（実験1）ApoE遺伝子欠損マウスに高脂肪食を摂取させた研究：ApoE遺伝子欠損マウスと野生型マウスにそれぞれ普通食あるいは高脂肪食を摂取させた。骨組織の構造と骨形態計測による骨代謝動態の評価を行った。

骨髄細胞培養実験により、骨芽細胞への分化障害、p21活性化、細胞周期停止があるか否かを調べた。ALP染色陽性CFU-fで骨芽細胞への分化能を調べた。骨髄細胞を用いて、quantitative RT-PCRでmRNAの発現を解析した。特に、osterix、cbfa-1、osteocalcinなど骨芽細胞分化マーカーのmRNAの発現を調べた。

（実験2）アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスにアルコールを摂取させた研究：アルデヒド脱水素酵素2（ALDH2）遺伝子欠損マウスを用いて実験を行った。ALDH2はアルコールの代謝によって生じるアセトアルデヒドを酢酸に分解する主な代謝酵素である。日本人の約40%がALDH2欠損型とされ、骨粗鬆症との関連性が指摘されている。アルコール（5%エタノール）摂取によって生じる骨代謝異常と骨芽細胞分化異常のメカニズムを明らかにした。実験には、8週齢の雄性、野生型マウス及びアルコール障害が生じやすいALDH2遺伝子欠損マウスを用いた。最長4週飼育した。アルコール負荷によるp21活性化、骨芽細胞の細胞周期停止・分化障害を生じるか否かを調べた。骨形態計測により骨量、骨構造および骨代謝動態を評価した。未分化骨髄細胞から骨形成細胞と骨吸収細胞への分化について、骨髄細胞を採取し、細胞培養およびquantitative RT-PCRで解析した。細胞培養は、ALP染色陽性CFU-fを、RT-PCRは、osterix、cbfa-1、osteocalcinのmRNAの発現を調べた。

（実験3）アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスをエストロゲン欠乏状態にした研究：エストロゲン欠乏による骨代謝回転の亢進が、アルコール負荷によるp21活性化、骨芽細胞の細胞周期停止・分化障害を増幅するか否かを調べた。骨形態計測により骨量、骨構造および骨代謝動態を評価した。未分化骨髄細胞から骨形成細胞と骨吸収細胞への分化について、骨髄細胞を採取し、細胞培養およびquantitative RT-PCRで解析した。細胞培養は、ALP染色陽性CFU-fを、RT-PCRは、osterix、cbfa-1、osteocalcinのmRNAの発現を調べた。

（実験4）アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスの海綿骨と皮質骨の形態と構造変化：アルデヒド脱水素酵素2（ALDH2）遺伝子欠損マウスは、アルコール負荷の有無に関わらず、野生型マウスと比べて、皮質骨の長軸成長は障害されないが、横径成長は障害されることから、その分子メカニズムについて調べた。骨膜における骨形成を障害する分子を調べた。骨形態計測により骨量、骨構造および骨代謝動態を評価した。pQCTにより皮質骨の縦断面と横断面の形態

を定量的に評価した。骨髄と骨膜における未分化間葉系細胞から骨形成細胞への分化について、骨髄と骨膜からそれぞれ細胞を採取し、quantitative RT-PCRで解析した。Wnt/ β -catenin経路に関連する分子とosterix、cbfa-1、osteocalcinのmRNAの発現を調べた。

4. 研究成果

(実験1) ApoE遺伝子欠損マウスに高脂肪食を摂取させた研究:ApoE遺伝子欠損マウスに高脂肪食を摂取させると、脛骨二次海綿骨における骨形成率は低下し、海綿骨量は減少する。このマウスの血清過酸化脂質濃度と血清LDL濃度は高く、これらの値と骨芽細胞におけるp53遺伝子発現は有意に正の相関を示した。ApoE遺伝子欠損マウスに高脂肪食を摂取させると、骨髄細胞中の骨芽細胞のp53遺伝子の発現が増加し、アポトーシスを生じ、骨芽細胞の分化・増殖に障害が生じることによって、骨形成が低下するメカニズムが考えられた。

(実験2) アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスにアルコールを摂取させた研究:脛骨近位骨幹端部二次海綿骨における組織形態計測の結果、アルデヒド脱水素酵素2 (ALDH2) 遺伝子欠損マウスマウス (KO) -アルコール群の海綿骨量 (BV/TV) は、KO-水群あるいは野生型-水群と比較して有意に減少していた。KO-アルコール群の骨石灰化面 (MS/BS) と骨形成速度 (BFR/BS) は、他の3群と比較して有意に低下していた。骨代謝回転の指標である活性化頻度 (Ac.f) は、KO-アルコール群で低下していた。破骨細胞 (TRACP陽性多核細胞) 数は各群間で差はなかった。骨代謝マーカーについて、血清オステオカルシン濃度はKO-アルコール群で有意に低下しており、尿中デオキシピリジノリン濃度は各群間で差はなかった。大腿骨及び脛骨から採取した骨髄細胞を用いて定量的RT-PCRによりmRNA発現を評価した結果、KO-アルコール群において、骨芽細胞分化に関連するtype I collagen、osterix、osteopontin、osteocalcinのmRNA発現は有意に低下し (図1)、細胞周期停止に関連するp21のmRNA発現は有意に亢進していた (図2)。アポトーシスに関連するp53のmRNAには変化がなかった。骨髄細胞を細胞培養し、mineralized noduleの形成により骨髄細胞における石灰化能を評価した。KO-アルコール群は石灰化能が低下していた。細胞培養液にp21 kinase specific inhibitorを添加することにより、石灰化能とオステオカルシンの発現は、Wild-水群と同程度まで回復した。これ

らの結果から、アルコール摂取による骨量減少は、骨髄細胞におけるp21遺伝子の発現亢進による骨芽細胞の分化障害により骨石灰化が障害され骨形成速度が低下することにより生じていることが明らかとなった。

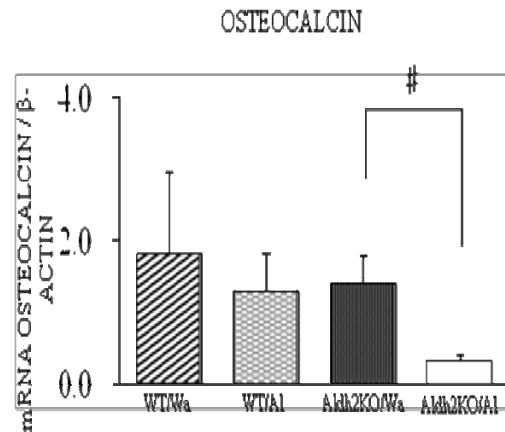


図1. 骨髄細胞における osteocalcin mRNA の発現

アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスにアルコールを与えた群は有意に低値を示した。値は平均値±標準誤差で示す。WT/Wa: 野生型マウス+水群, WT/A1: 野生型マウス+アルコール群, Aldh2KO/Wa: 遺伝子欠損マウス+水群, Aldh2KO/A1: 遺伝子欠損マウス+アルコール群, #: $p < 0.05$ by Tukey-Kramer post hoc test after two-way ANOVA.

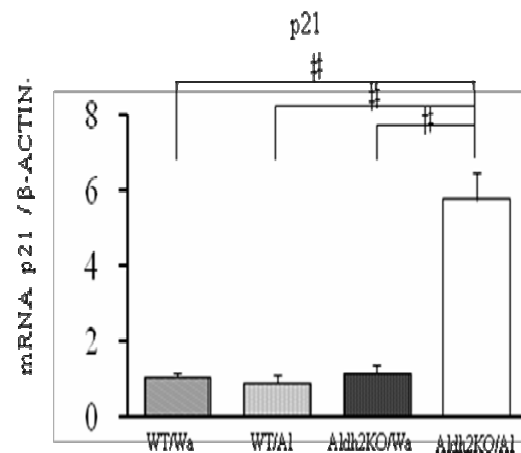


図2. 骨髄細胞における p21 mRNA の発現

アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスにアルコールを与えた群は有意に高値を示した。値は平均値±標準誤差で示す。WT/Wa: 野生型マウス+水群, WT/A1: 野生型マウス+アルコール群, Aldh2KO/Wa: 遺伝子欠損マウス+水群, Aldh2KO/A1: 遺伝子欠損マウス+アルコール群, #: $p < 0.05$ by Tukey-Kramer post hoc test after two-way ANOVA.

(実験 3) アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスをエストロゲン欠乏状態にした研究：卵巣を摘出した（エストロゲンを欠乏させ脂質代謝異常をきたした）アルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) 遺伝子欠損マウスを用いて実験を行った。卵巣摘出により脛骨二次海綿骨における骨代謝回転は亢進したが、アルコール負荷により骨形成と骨吸収はともに低下した。卵巣摘出による骨量減少はアルコール負荷によりさらに低下した。卵巣摘出した ALDH2 遺伝子欠損マウスにアルコールを負荷すると、骨髄細胞における p21 mRNA の発現が増加した。卵巣摘出した ALDH2 遺伝子欠損マウスは、アルコール負荷の有無に関係なく、海綿骨よりも皮質骨の構造と強度に強い影響を与えた。具体的には、pQCT の結果から、野生型マウスと比べて、脛骨中央での皮質骨面積と皮質骨横径が有意に小さかった。そこから算出される力学強度は有意に低下した。以上の結果から、エストロゲン欠乏状態の ALDH2 遺伝子欠損マウスは、アルコール負荷に依存することなく、皮質骨の構造が劣化し強度が低下することがわかった。

(実験4) アルデヒド脱水素酵素遺伝子欠損マウスの海綿骨と皮質骨の形態と構造変化：アルコール非投与下でのアルデヒド脱水素酵素 2 (ALDH2) 欠損マウスにおける骨構造の解析を行った。4、8、12週齢、雄性のALDH2遺伝子欠損マウスおよび対照群としてC57BL/6Jマウスを使用した。大腿骨を摘出し大腿骨長、pQCTおよび骨幹部皮質骨の骨形態計測を行った。さらに両群の8週齢において両大腿骨、脛骨の皮質骨のmRNA発現を定量的RT-PCRで評価した。その結果、4、8、12週齢いずれにおいても、体重、大腿骨長は両群間で有意差を認めなかった。大腿骨のpQCTの結果、ALDH2遺伝子欠損マウスは遠位骨幹部部海綿骨の骨密度は12週齢で有意差を認めなかったが、骨幹部皮質骨の骨密度は8、12週齢において有意に高値を示した。骨断面積は有意に低下していたが、骨断面積に占める皮質骨面積の割合は高値を示した。骨幹部皮質骨の骨形態計測では、ALDH2遺伝子欠損マウスは8週齢で骨外膜面、内膜面ともに石灰化速度 (MAR)、骨形成速度 (BFR/BS) が有意に高値を示した。8週齢での硬組織のmRNA解析においてもBMP2、Runx2、osterixなどの骨形成のシグナル発現が有意に増加していた。ALDH2遺伝子欠損マウスでは、海綿骨の骨密度に変化はないが、骨形成のシグナル亢進により大腿骨骨幹部皮質骨の骨密度が増加していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- 1) Nakamura T, et al. Dose-response study of denosumab on bone mineral density and boneturnover markers in Japanese postmenopausal women with osteoporosis. *Osteoporos Int* 23: 1131-1140, 2012. 査読有
- 2) Shimizu Y, Sakai A, Nakamura T, et al. Reduced bone formation in alcohol-induced osteopenia is associated with elevated p21 expression in bone marrow cells in aldehyde dehydrogenase 2-disrupted mice. *Bone* 48: 1075-1086, 2011. 査読有 DOI:10.1016/j.bone.2011.01.008
- 3) Tanaka K, Sakai A, Nakamura T, et al. Deficiency of vitamin A delays bone healing process in association with reduced BMP2 expression after drill-hole injury in mice. *Bone* 47: 1006-1012, 2010. 査読有 DOI:10.1016/j.bone.2010.08.016
- 4) 酒井昭典, 中村利孝. 生活習慣病を合併した骨粗鬆症に対するSERMの骨折抑制効果. *Clinical Calcium* 20: 16-23, 2010. 査読無
- 5) Sakai A, Nakamura T, et al. Shorter unipedal standing time and lower bone mineral density in women with distal radius fractures. *Osteoporos Int* 21: 733-739, 2010. 査読有
- 6) Katae Y, Sakai A, Nakamura T, et al. Elcatonin injections suppress systemic bone resorption without affecting cortical bone regeneration after drill-hole injuries in mice. *J Orthop Res* 27: 1652-1658, 2009. 査読有 DOI:10.1002/jor.20920
- 7) Yamane H, Sakai A, Nakamura T, et al. The anabolic action of intermittent PTH in combination with cathepsin K inhibitor or alendronate differs depending on the remodeling status in bone in ovariectomized mice. *Bone* 44: 1055-1062, 2009. 査読有 DOI:10.1016/j.bone.2008.05.010

[学会発表] (計 8 件)

- 1) Tsuchiya T, Sakai A, Nakamura T, et al. Disruption of aldehyde dehydrogenase 2 gene resulted in altered cortical bone structure and increased cortical

- BMD without affecting bone length and trabecular BMD in femurs of mice. 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research. 2011年9月17日. San Diego, California, USA (San Diego Convention Center).
- 2) Takeuchi Y, Sakai A, Nakamura T, et al. Alcohol consumption delays bone healing in association with reduced osteocalcin expression after drill hole injury. 33rd Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research. 2011年9月17日. San Diego, California, USA (San Diego Convention Center).
 - 3) 竹内慶法、酒井昭典、中村利孝、ほか。慢性的なアルコール摂取は骨・骨髄損傷後の皮質骨形成を遅延させる。第29回日本骨代謝学会学術集会。2011年7月28日。大阪（大阪国際会議場）
 - 4) 清水勇樹、酒井昭典、中村利孝、ほか。アルコール負荷後のAldh2ノックアウトマウスでは、骨髄細胞がG2期で停止し、骨芽細胞の石灰化形成が抑制され骨形成が低下する。第25回日本整形外科学会基礎学術集会。2010年10月14日。京都（国立京都国際会館）。
 - 5) 清水勇樹、酒井昭典、中村利孝、ほか。アルコール負荷後のAldh2ノックアウトマウスでは骨髄細胞がG2期で停止し骨形成が低下する。第28回日本骨代謝学会学術集会。2010年7月21日。東京（京王プラザホテル）。
 - 6) Sakai A, Menuki K, Nakamura T, et al. Skeletal loading enhances osteoblast differentiation and inhibits adipogenic differentiation in bone marrow cells. International Symposium on Biophysical Stimulation on Bone and Fracture Healing. 2008年11月26日. Kyoto (Kyoto International Conference Center).
 - 7) Shimizu Y, Sakai A, Nakamura T, et al. Osteopenia by high alcohol consumption in the absence of ALDH2 attributes to the disturbance of the differentiation in osteoblasts. 30th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research. 2008年9月15日. Montreal, Quebec, Canada (Palais des congrès de Montreal).
 - 8) Tanaka S, Sakai A, Nakamura T, et al. High-fat diet facilitated decreases in BMD of ovariectomized mice and suppressed the anabolic effects of PTH on bone. 30th Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral

Research. 2008年9月13日. Montreal, Quebec, Canada (Palais des congrès de Montreal).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 利孝 (NAKAMURA TOSHITAKA)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：50082235

(3) 連携研究者

酒井 昭典 (SAKAI AKINORI)
産業医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90248576