

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K02360

研究課題名(和文) 軽度マグネシウム欠乏食投与による骨代謝への影響とその機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effects of mildly magnesium-deficient diet on bone metabolism and its mechanism

研究代表者

石島 智子 (ISHIJIMA, Tomoko)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任助教

研究者番号：80568270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在の日本人のMg摂取不足状態を反映するような軽度のMg欠乏食投与による骨代謝への影響とその機序について、生化学的解析、物理学的解析および網羅的遺伝子発現解析を行い包括的に理解することを試みた。0.04%、0.02%および0.01%のMg欠乏食投与により、それぞれ異なる骨代謝への影響が示唆された。また軽度のMg摂取不足状況下においても、骨代謝への影響は引き起こされるという新たな知見を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先行研究においては、重度Mg欠乏食投与による骨脆弱化が報告されているが、本研究のように現在の日本人のMg摂取不足状態を反映するような軽度Mg欠乏食投与状況下においても骨代謝への影響は引き起こされるという新たな知見を得ることができた。軽度のMg摂取不足でも骨代謝への影響は引き起こされることから、適正量のMg摂取を継続することで骨脆弱化を予防し、骨の健康を維持することでQOLの向上に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：I tried to comprehensively understand the effects of mild Mg-deficient diets reflecting the current insufficient Mg intake state of Japanese, on bone metabolism and their mechanisms by biochemical, physical and comprehensive gene expression analyses. These results of analyses suggested that different effects on bone metabolism among the three groups (rats fed the 0.04%, 0.02% and 0.01% Mg-deficient diets). I also obtained new findings that even in mild Mg deficiency, the effect on bone metabolism was caused.

研究分野：栄養生化学

キーワード：マグネシウム欠乏食 骨代謝 骨代謝マーカー 骨密度 網羅的遺伝子発現解析 大腿骨 ラット

1. 研究開始当初の背景

マグネシウム (Mg) は、カルシウム (Ca)、リンと同様に骨の構成成分であり、骨の弾力性の維持に關与するなど骨代謝に重要な役割を果たしている。

平成 29 年度国民健康・栄養調査の結果、Mg 摂取量は、食事摂取基準において不足による健康障害のリスクがほぼないとされる推奨量のみならず、健康障害のリスクが 50% である推定平均必要量をも下回った状態である。

低 Mg 状態は、骨粗鬆症などの骨の脆弱化を引き起こし、骨折につながる。そして、骨折による寝たきり状態は、運動機能の低下のみならず、認知症などの脳機能の低下を引き起こし、著しく生活の質 (QOL) を低下させる。そのため骨の健康を維持するために、適切な Mg 摂取を促す必要があるが、科学的エビデンスは不足している。

動物実験において、Mg 欠乏食投与により骨吸収の促進、骨形成の抑制による骨脆弱化 (骨密度・骨強度の低下) が報告されている。報告者らは、まず基礎研究の観点から、正常食の約 10 分の 1 の飼料中 Mg 濃度 0.004% (重度) の Mg 欠乏食投与による骨代謝への影響について調べた。比較的遅い段階で現れる成長抑制が引き起こされた 4 週間 (長期) の投与を行ったラットにおいて、骨代謝マーカーなどの評価方法に加えて、骨密度については、従来の評価方法よりもより詳細な qCT 法を用いた部位別・構造別の解析を行った。その結果、大腿骨全体の骨密度や皮質骨密度は低下するが、中間部の海綿骨密度は上昇することを明らかにした。さらに大腿骨全体への Mg 欠乏食投与による影響を知るため、DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、遺伝子発現変動からも骨吸収の促進、骨形成の抑制が示唆された。また新たな知見として軟骨細胞分化や軟骨基質形成の抑制および分解の亢進といった軟骨への影響がみられ、これによる軟骨の減少が示唆された。これは Mg 欠乏食投与による骨長の低下や剛性の上昇 (骨弾力性の低下) といった物理的解析の結果による示唆と一致し、骨の脆弱化の一因であると考えられた。

重度 Mg 欠乏食投与による生体への影響については、経時的なエネルギー代謝の変化についても解析を行ってきた。その後、現在の日本人の Mg 摂取不足状況を反映する Mg 摂取量として飼料中 Mg 濃度 0.04%、またその半量として 0.02% を軽度 Mg 欠乏食とし 2 週間 (中期) 投与がエネルギー代謝に及ぼす影響について解析を行った (平成 28 年度 ~ 平成 29 年度若手研究 (B)、課題番号 16K16275)。その結果、一部の組織重量および血清中成分において、Mg 欠乏度合いの軽い 0.04% の方が、Mg 欠乏度合いの重い 0.02% よりも大きな変化を示した。軽度の Mg 欠乏でも Mg 摂取状況によって代謝変化は異なることが示唆され、このような変化は、重度 Mg 欠乏食投与によって影響を受ける骨代謝においても引き起こされるのではないかと推察された。

2. 研究の目的

本研究では、現在の日本人の Mg 摂取不足状態を反映するような軽度の Mg 欠乏食を投与したラットの骨代謝への影響とその機序について、生化学的解析、物理的解析、網羅的遺伝子発現解析を行い包括的に理解することを試みた。

3. 研究の方法

(1) 【軽度マグネシウム欠乏食投与による骨代謝への影響の生化学的解析】

現在の日本人の Mg 摂取不足状態を反映するような軽度 Mg 欠乏食をラットに投与し、その摂取状態で引き起こされる骨代謝への影響について生化学的解析を行った。

飼料は AIN-93G 飼料組成に基づき作製した。正常食の Mg 濃度 0.05% を推奨量 (充足率 100%) と仮定し、Mg 欠乏食は、現在の日本人の Mg 摂取量の推奨量に対する充足率約 70% を想定した 0.04% Mg 欠乏食、その半量の 0.02% Mg 欠乏食 (充足率 40%)、さらにその半量の 0.01% Mg 欠乏食 (充足率 20%) に設定し、Mg 給源である酸化マグネシウム量にて調製した。

0.01% Mg 欠乏食投与実験

3 週齢の Wistar 系オスラットを正常食で 1 週間予備飼育後、平均体重が等しくなるように 3 群に分け、正常食を自由摂取させる正常食群、0.01% Mg 欠乏食を自由摂取させる 0.01% Mg 欠乏食群、0.01% Mg 欠乏食投与による飼料摂取量の低下が引き起こされることから、飼料摂取量を等しくするため、正常食でペアフィーディングを行ったペアフィーディング群とし、2 週間飼育を行った。

0.04% Mg 欠乏食および 0.02% Mg 欠乏食投与実験

3 週齢の Wistar 系オスラットを正常食で 1 週間予備飼育後、平均体重が等しくなるように 3 群に分け、正常食を自由摂取させる正常食群、0.04% Mg 欠乏食を自由摂取させる 0.04% Mg 欠乏食群、0.02% Mg 欠乏食を自由摂取させる 0.02% Mg 欠乏食群とし、2 週間飼育を行った。

共に解剖 4 日前から 3 日間の糞と尿の採取、解剖前日から 24 時間尿の採取を行った。解剖時には血液の採取と左右の大腿骨の摘出を行った。

血液は、遠心分離により血清を得て、Mg、Ca およびリン濃度の測定と副甲状腺ホルモン

(parathyroid hormone, PTH) 骨形成マーカーであるオステオカルシン(osteocalcin, OC)、アルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase, ALP)の測定を行った。24時間尿では、骨吸収マーカーであるⅠ型コラーゲン架橋C末端テロペプチド(C-telopeptide of type I collagen, CTX-I)、デオキシピリジノリン(Deoxypyridinoline, DPD) またそれらの値を補正するクレアチニン(creatinine, Cr)の測定を行った。

(2) 【軽度マグネシウム欠乏食投与による骨代謝への影響の物理的解析】

軽度 Mg 欠乏食投与ラットにおける骨代謝への影響の物理的解析として、骨密度の測定を行った。骨密度の測定は、(1)で飼育を行った 0.01%Mg 欠乏食投与実験では、正常食群、0.01%Mg 欠乏食群、ペアフィーディング群、0.04%Mg 欠乏食および 0.02%Mg 欠乏食投与実験では、正常食群、0.04%Mg 欠乏食群および 0.02%Mg 欠乏食群の各群のラットから抽出した左大腿骨を用い、実験動物用 X 線 CT 装置(Latheta LCT-100 Lite, 日立アロカメディカル)を使用した qCT 法により行った。各実験において、測定した大腿骨の骨密度を構造別(全骨、皮質骨、海綿骨、骨梁)および部位別(全長、遠位部 膝側、中間部、近位部 腰側)に分けて解析を行った。

(3) 【軽度マグネシウム欠乏食投与による骨代謝への影響の網羅的遺伝子発現解析】

軽度 Mg 欠乏食投与ラットにおける骨代謝への影響の網羅的遺伝子発現解析として、大腿骨の DNA マイクロアレイ解析を行った。DNA マイクロアレイ解析は、(1)で飼育を行った 0.01%Mg 欠乏食投与実験では、0.01%Mg 欠乏食群、ペアフィーディング群、0.04%Mg 欠乏食および 0.02%Mg 欠乏食投与実験では、正常食群、0.04%Mg 欠乏食群および 0.02%Mg 欠乏食群の各群のラットから抽出した右大腿骨を用いて、各実験において解析を行った。サーモフィッシャーサイエンティフィック社のマニュアルに従い、大腿骨より抽出した total RNA から GeneChip WT PLUS Reagent Kit を用いて ss-DNA を作製し、Clariom S Arrays, rat へのハイブリダイゼーション、洗浄、染色、スキャンの過程を得て、データを取得した。取得したデータは正規化を行い、まず各実験においてサンプル間の遺伝子発現様式の類似度を示す階層的クラスタ解析を行った。Mg 欠乏食投与により発現が有意に変動した遺伝子の抽出は、0.01%Mg 欠乏食群は、ペアフィーディング群との比較により、0.04%Mg 欠乏食群、0.02%Mg 欠乏食群はそれぞれ正常食群との比較によって、同条件にて行った。その後、各比較において抽出された遺伝子群の機能的な特徴について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 【軽度マグネシウム欠乏食投与による骨代謝への影響の生化学的解析】

0.01%Mg 欠乏食投与実験

0.01%Mg 欠乏食群において、飼料摂取量の低下が引き起こされたため、0.01%Mg 欠乏食群と摂取量が等しいペアフィーディング群との比較を行ったところ、血清中 Mg 濃度は、0.01%Mg 欠乏食群で有意に低下した。また 0.01%Mg 欠乏食群において血清中 Ca 濃度の有意な上昇、リン濃度の有意な低下もみられ、重度 Mg 欠乏食投与と同様な変化が示された。骨形成マーカーである血清中 OC 濃度および ALP 活性は、0.01%Mg 欠乏食群において有意に低下した。血清中 PTH 濃度、尿中 CTX- 濃度および DPD 濃度に 0.01%Mg 欠乏食投与による影響は見られなかった。

0.04%Mg 欠乏食および 0.02%Mg 欠乏食投与実験

飼料摂取量に 3 群間での有意な差は見られなかった。血清 Mg 濃度は、正常食群に比較して 0.04%Mg 欠乏食群で低下傾向を示し、0.02%Mg 欠乏食群では有意に低下した。血清中 Ca 濃度は、3 群間に有意な差はみられず、リン濃度は、0.04%Mg 欠乏食群が正常食群に比べ上昇傾向を示した。血清中 PTH 濃度と尿中 DPD 濃度に 3 群間での有意な差はみられなかった。血清中 OC 濃度および ALP 活性は、正常食に比較して 0.04%Mg 欠乏食群、0.02%Mg 欠乏食群に有意な差は見られなかったが、血清中 OC 濃度は、0.02%Mg 欠乏食群が 0.04%Mg 欠乏食群に比べ有意に低下し、血清中 ALP 活性は、0.02%Mg 欠乏食群が正常食群に比べ上昇傾向を示した。尿中 CTX- 濃度は 0.04%Mg 欠乏食群が正常食群に比べ有意に上昇した。

(2) 【軽度マグネシウム欠乏食投与による骨代謝への影響の物理的解析】

0.01%Mg 欠乏食投与実験

近位部の骨梁密度は、0.01%Mg 欠乏食群がペアフィーディング群に比べ上昇傾向を示した。その他の解析項目における影響はみられなかった。

0.04%Mg 欠乏食および 0.02%Mg 欠乏食投与実験

骨密度解析の全ての項目において、0.04%Mg 欠乏食群と正常食群との間に有意な差は見られなかった。0.02%Mg 欠乏食群では、正常食群に比べ、骨梁密度が全長、遠位で有意に上昇し、中間部で上昇傾向を示した。また皮質骨密度が中間部において上昇傾向を示した。

(3) 【軽度マグネシウム欠乏食投与による骨代謝への影響の網羅的遺伝子発現解析】

0.01%Mg 欠乏食投与実験

階層的クラスター解析の結果、0.01%Mg 欠乏食群、ペアフィーディング群の各群内のラットの大腿骨における遺伝子発現パターンは類似しており、0.01%Mg 欠乏食群とペアフィーディング群で大きくクラスターは分かれた。このことから、0.01%Mg 欠乏食群とペアフィーディング群では遺伝子発現パターンが大きく異なることが示された。0.01%Mg 欠乏投与により発現が有意に変化した遺伝子を統計的に抽出したところ、発現上昇した遺伝子には炎症応答に関連する遺伝子が多く含まれており、また発現低下した遺伝子にはミネラルの代謝に関連する遺伝子が多く含まれていた。

0.04%Mg 欠乏食および0.02%Mg 欠乏食投与実験

0.04%Mg 欠乏食群、0.02%Mg 欠乏食群は、それぞれ正常食群との比較を行ったが、階層的クラスター解析の結果、各群内のサンプルでクラスターは形成されず、0.04%Mg 欠乏食投与および0.02%Mg 欠乏食投与による大腿骨の遺伝子発現への影響は弱いことが示唆された。0.04%Mg 欠乏食投与および0.02%Mg 欠乏食投与それぞれにおいて発現が有意に変化した遺伝子を統計的に抽出したところ、0.04%Mg 欠乏食投与、0.02%Mg 欠乏食投与共に発現上昇した遺伝子に骨代謝に関連する遺伝子が多く含まれていた。

(4) 【軽度マグネシウム欠乏食投与による骨代謝への影響の生化学的解析、物理的解析および網羅的遺伝子発現解析の結果の包括的考察】

血清中 Mg 濃度は、0.01%および0.02%Mg 欠乏食投与により有意な低下を示し、0.04%Mg 投与では低下傾向を示した。有意な低下を示した0.01%Mg 欠乏食群では0.82mg/dL、0.02%Mg 欠乏食群では1.50mg/dLと0.02%Mg 欠乏食投与に比べ0.01%Mg 欠乏食投与の方が低下の度合は大きかった。このことから投与飼料のMg濃度が低い程、血清中Mg濃度は低下し、生体のMg欠乏の度合も重度になることが示唆された。0.01%Mg 欠乏食投与では、重度のMg欠乏食投与と同様な血清中Ca、リン濃度の変化もみられており、本実験の3群間の中で最もMg欠乏が重度であることがわかった。0.04%Mg 欠乏食投与では、生体内はMg欠乏傾向となり、骨密度への影響もみられなかったが、骨吸収の促進や骨代謝に関連する遺伝子が発現上昇するなど、生体内Mg不足状態が軽度であっても影響は及ぼされていることが示唆された。0.02%Mg 欠乏食投与では、生体内におけるMg欠乏状態は引き起こされたが、他の血清中ミネラル濃度への影響はみられなかった。骨形成の促進傾向と一部の骨密度の上昇、また骨代謝関連遺伝子の発現上昇がみられた。今後は、それぞれの解析結果の関連性について詳細に調べる必要がある。0.01%Mg 欠乏食投与では、Mg欠乏状態および他のミネラル代謝の変動、骨形成の抑制、近位部の骨梁密度の上昇傾向がみられた。0.01%欠乏食投与による大腿骨の遺伝子発現変動においては、Mg欠乏による炎症応答やミネラル代謝への影響が強く示唆された。骨代謝に関連する遺伝子の発現変動については、今後詳細な解析を行う必要がある。

本実験において、0.04%、0.02%および0.01%と軽度のMg欠乏食投与による骨代謝への影響について解析を行ったが、それぞれのMg欠乏度合において異なる影響が示された。重度Mg欠乏食投与による骨代謝への影響は、炎症応答に起因する骨吸収の促進や骨形成の抑制、これによる骨密度や骨強度の低下が報告されているが、0.04%Mg 欠乏食投与や0.02%Mg 欠乏食投与のように生体内Mg欠乏状態が軽度であり、炎症応答が顕著ではない状況下においても、骨代謝への影響が引き起こされていることを新たな知見として得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------