

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17702

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21764

研究課題名（和文）骨代謝異常に対して新たな運動効果を引出す低酸素刺激感受性神経の役割

研究課題名（英文）Role of hypoxia-sensitive neurons in promoting the exercise effects on bone with metabolic bone disorders

研究代表者

田巻 弘之（TAMAKI, HIROYUKI）

鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・教授

研究者番号：40253926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,700,000円

研究成果の概要（和文）：運動などの力学的刺激は骨量維持に有効だが、高齢期や代謝異常の骨組織ではその効果の現れ方が減弱する。この問題を解決するため、低強度刺激運動でも骨量維持により効果を創出しうるための運動を行う外的環境条件（低酸素環境）と骨内支配する低酸素感受神経の関連を検証した。低酸素環境下での低強度運動（水中運動）は定常環境下よりも糖尿病脛骨の骨量を高いレベルに維持した。次に低酸素感受性神経の薬理的阻害は骨量低下を引き起こした。低強度運動刺激でも骨内支配神経を活性化する外的環境（低酸素環境）が設定できれば、骨量維持に対する運動効果を高める可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は運動する外的環境を調整することでその効果の現れ方を最大限引き出そうとする取り組みであり、得られた結果は、骨代謝異常を有する骨組織において低酸素環境での有効性を示唆した。このことは高齢期や骨代謝異常であっても、力学的強度が低い運動でも骨量維持に有効であり、外的環境を工夫することで骨折リスクが高いケースでの運動処方にも活用できる可能性がある。またこの効果創出に骨内支配する酸素感受性神経が関連している可能性が示されたことは、神経系をターゲットとした新たな療法開発など各分野に波及するポテンシャルを有する。

研究成果の概要（英文）：Mechanical stimulation such as exercise is effective in maintaining bone mass, but its effect is diminished in bone tissue with metabolic abnormalities and/or in old age. To overcome this dilemma, we examined the osteogenic effects of low-intensity exercise under a hypoxic environment and investigated the role of hypoxia-sensitive neurons innervating bone tissue to maintain bone mass in diabetic aged rats. Low-intensity exercise (swimming) interventions under hypoxic conditions resulted in higher bone mass in the diabetic tibia than that under normoxic conditions. Second, pharmacological inhibition of hypoxia-sensitive neurons caused significant bone loss. Our results suggest that an external environment during exercise (hypoxic environment) that activates the neurons innervating bone tissue, even with low-intensity exercise stimulation, may enhance the effect of exercise on the maintenance of bone mass in metabolic abnormalities.

研究分野：体力科学

キーワード：骨組織 神経 マイクロCT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

洋の東西、性差を問わず成人から中年期以降骨量や骨強度は加齢とともに低下し、骨代謝が低調となる高齢期では骨折リスクは高まる。日常生活においては、骨の健康を維持するために食事内容や適度な運動実践が注目される。運動科学の立場からは、高齢期においても加齢性骨減少の改善に適した運動処方プログラムが望まれている。しかしながら、従来、骨への運動刺激はハイ・インパクトの方が効果的であることから、より高強度な運動処方が望まれており、骨折リスクの高い高齢者のようなケースでは低強度(ロー・インパクト)運動を採用する方が安全である。特に高齢期の運動実施においては安全性と有効性の間でジレンマが生じている。この問題を解決するために、1)骨折リスクが低い低強度での運動刺激でも骨形成の効果を高める外的条件(運動環境の整備)の検索や、2)従来から検討されている骨代謝促進に関連する因子(力学的因子、ホルモンなどの液性因子)とは別に、骨内を支配する神経系(感覚神経、交感神経)を利用した骨形成の活性化等が取り組まれてきている。

運動するときの環境(外的環境)に関しては、特殊環境下運動としてスポーツ科学や運動療法領域では高地トレーニングや環境シミュレーター内トレーニングに代表される低圧低酸素環境がよく用いられてきた。その効果は特に呼吸循環器系の生理学的指標に現れやすく、代謝プロファイルの改善も報告されているが、骨格系(骨代謝)に対する特殊環境下運動の相乗効果的検証報告は希少である。一方、骨代謝に着目すると、近年骨内支配神経が骨関連細胞の運動刺激感受性(内的因子)に影響して骨代謝を調節し、骨量維持に有用な働きをすることが報告されてきている。これら神経の中には、新規酸素センサーとして発見された transient receptor potential ankyrin (TRPA1)チャネルを高発現している感覚神経もあり、比較的穏やかな低酸素環境でもこれら感覚神経を活性化させることが解ってきた。以上のことから、感覚神経を介した低酸素応答システムを利用した骨代謝異常への低強度運動処方(療法)とその効果創出の仕組みの解明が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は以下を主たる目的とした。

- ・骨代謝異常を呈する2型糖尿病ラットの骨量維持に対するローインパクト運動介入の効果が、低酸素環境下(外的因子)でより強く創出されるか検証する。
- ・骨代謝を調節する新規因子として骨内支配感覚神経、特に酸素感受性神経(内的因子)の骨量維持に果たす役割を検証するとともに、低酸素環境下での低強度運動の新しい効果創出の機序の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

若齢期から高齢期の Normal 及び自然発症2型糖尿病ラットを対象とした。まず、骨代謝異常を呈する高齢期の2型糖尿病ラット骨に対するより良い運動効果を引き出す外的環境を検証するために、低圧低酸素環境下でローインパクトな水中運動を1ヶ月間実施し、その効果を検証した。気圧及び酸素濃度を調整可能なチャンバーで平地環境及び標高2500m相当環境を設定した。運動は両環境条件下でチャンバー内に設置した小動物用水槽内で自由泳を1日30分間、週5日の頻度で実施した。運動介入終了後、脛骨及びヒラメ筋を採取した。次に、その効果創出に低酸素応答する骨内支配感覚神経が関与するかを検証するために、若齢期から高齢期のラットを対象に transient receptor potential ankyrin (TRPA1)チャネル阻害剤を用いて低酸素感受性神経の骨代謝調節への役割について検証した。各ラットに低濃度もしくは高濃度で TRPA1 チャネル阻害剤(AP-18)を皮下投与し1ヶ月後に脛骨及び下肢骨格筋を採取した。また薬剤効果を検討するため疼痛試験(Hot plate 試験)を実施した。骨格筋は筋湿重量を計測し、脛骨は3次元マイクロCT撮影、骨強度試験、組織分析等に供した。各測定項目の詳細は以下である。

・3次元マイクロCT撮影

マイクロCT撮影装置(Skyscan)を用いて採取した脛骨を3次元スキャンし、解析ソフトで立体構築したのちに海綿骨及び皮質骨の3次元微細構造解析を行った(図1)。分析項目として骨量(trabecular bone volume; BV/TV, %)、骨梁数(trabecular number; Tb.N)、骨梁幅(trabecular thickness; Tb.Th)、骨梁連結密度(connectivity density; Conn.Dn)、骨梁間距離(trabecular separation; Tb.Sp)、structure model index (SMI)等の骨梁微細構造を解析した。

・骨破断強度試験

3点支持骨破断強度試験機(Shimadzu)を用いて脛骨の力学的特性を調べた。採取した各ラット脛骨骨幹部中央を2つの支持台に静置し、ロードセルが設置されたクロスヘッドを支持間の中央部に置き上方から骨が破断するまで移動させ、この時ロードセルからの力と変位距離を記録し、専用の測定分析ソフトで force-deformation 曲線を作成した。この曲線の最高点を maximal load (N)、maximal load に至るまでの力の傾きをスティフネス(N/mm)、破断時点の力を破断点強度として計測した。

・組織処理、染色及び解析

採取した脛骨及び骨格筋は固定の後パラフィン包埋もしくは凍結包埋し、ミクロトームもし

くはクリオスタットにて薄切し組織染色用スライド標本を作製した。骨組織においては、H-E 染色(吉木法)で骨芽細胞によって形成される類骨を同定して骨形成の指標とし、骨石灰化の因子としてDMP1(dentin matrix protein 1)を免疫組織化学染色にて同定した。筋組織においては、NADH-TR 染色、Dystrophin/Laminin 等の免疫組織化学染色を行った。各染色標本は CCD カメラ内臓の蛍光顕微鏡、デジタル蛍光顕微鏡を用いて観察した。撮影した画像は画像解析ソフトで形態計測に供した。骨組織では、脛骨骨幹端正中断面を対象に類骨層を観察し類骨幅を計測した。筋組織では、前脛骨筋、長趾伸筋、ヒラメ筋を対象に筋線維横断面積(myofiber cross sectional area; MCSA)、Type I/Type II 別の MCSA を計測し、各群比較した。

・免疫組織化学染色

リン酸緩衝液(PBS)で洗浄した骨及び筋組織切片を固定後、室温で1時間ブロッキングした。続いて1次抗体として anti-DMP1 抗体を用いて4°Cで一昼夜インキュベートした。その後数回PBSで洗浄後、2次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG 抗体、Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG 抗体もしくはビオチン標識抗体を用いて1時間室温でインキュベートした。ABC法においては過酸化水素水溶液で処理後にABC-ペルオキシダーゼ試薬にて1時間インキュベートした後、DABにて発色反応を行いマウント剤で封入し、顕微鏡観察に供した。多重蛍光染色を行った切片は蛍光顕微鏡にて観察した。

・Hot plate 試験

各ラットを52.5に保ち四方を囲ったホットプレート上に載せ温熱刺激を与え、その後、ラットが前肢/後肢をなめる行動や climbing や jumping の逃避行動が現れるまでの潜時を計測した。Cut-off time は60秒とした。

4. 研究成果

・低酸素環境下で実施する力学的低強度運動の影響

自然発症2型糖尿病ラットを対象として、低酸素環境下でのローインパクトな水中運動を実施した結果、血中グルコース濃度は常酸素、低酸素いずれでも運動介入2週間目で有意に低下し、また常酸素+運動群よりも低酸素+運動群ではさらに低値を示し正常値に近づいた。骨量は、常酸素+無介入の Control 群と比較して運動介入により有意に高値を示したが、低酸素+運動群ではさらに約30%以上高いレベルにあった(図2)。脛骨骨幹端部骨梁の3次元マイクロCT撮影から微細構造解析を行った結果、骨梁幅はいずれも Control 群と有意な差異はみられなかった。骨梁数、骨梁連結密度については、低酸素+運動群ではそれぞれ有意に高値を示した。一方、骨梁間距離は両運動介入群で Control 群よりも有意に低値を示したが、低酸素暴露による差異はみられなかった。骨組織観察では骨梁類骨幅、DMP1 immunoreactivity は低酸素環境の影響はみられなかった。

このことから、糖尿病ラットへのローインパクト運動は、骨量に関しては低酸素環境と組み合わせることにより骨量維持効果が創出でき、骨梁数や骨梁の連結性など骨梁構造の維持に現れることが示唆された。一方で両群ラットの体重、下肢骨格筋(ヒラメ筋)の筋湿重量はいずれも有意な差異はみられなかった(図2)。ローインパクト運動介入によって下肢骨格筋の重量は変化しなかったこと、体重に差異はなかったことから、筋肥大による筋力増大や自重による骨への荷重の増大(力学的刺激因子)による骨量改善への影響度は低いものと考えられた。血中グルコース濃度は運動介入で低下するが、低酸素環境下ではより低下することから、糖代謝改善による骨代謝への影響も一因として考えられるが、他方では低酸素感受性神経を介した骨代謝への影響も考えられ検証すべき点であると思われた。

・TRPA1 チャネル阻害の骨及び筋組織への影響

ラットに2つの濃度のTRPA1チャネル阻害剤を投与した結果、Vehicle 処置群(Control)と比較して骨量(BV/TV)は有意に低いレベルであり、これは阻害剤濃度依存的であった(図3)。脛骨骨幹端部骨梁の3次元マイクロCT撮影から微細構造解析を行った結果、骨梁数(Tb.N)、骨梁幅(Tb.Th)、骨梁連結密度(Conn.Dn)については、阻害剤投与群ではそれぞれ有意に低値を示した。一方、骨梁間距離(Tb.Sp)、structure model index (SMI)、trabecular pattern factor (Tb.Pf)は阻害剤投与群ではそれぞれ有意に高値を示した。また、骨破断強度等の機能性については阻害剤投与群では低値を示す傾向にあった。骨量に代表されるようにこれらの阻害剤投与前の basal-control よりも有意に低値/高値を示すことはなく、対象ラットが骨量増加フェイズ(成長期)である場合、Control 群で見られる正常な骨量増加を阻害剤投与により約43%~57%抑制したことが理解された。

次に骨格筋への影響について検証した結果、筋湿重量に関しては前脛骨筋、長趾伸筋、ヒラメ筋ともに阻害剤投与群と Vehicle 群とで有意な差はみられなかった(図4)。Slow-type dominant な筋でも fast-type dominant な筋でも正常な筋湿重量の成長増大を抑制することはないものと示唆された。また、筋線維横断面積についても両群で有意な差はみられなかった。筋組織染色により Type I / Type II 線維に区分し、各 Type 別で筋線維横断面積を両群で比較しても有意な差はみられなかった。これらのことからラット下肢骨格筋に対しては本実験で使用した用量範囲での阻害剤投与の影響はみられない可能性が示唆された。

TRPA1チャネル阻害剤の感覚神経(Ad線維/C線維)への影響を検証するため、温熱刺激テストを実施した。阻害剤投与前と比較して投与後1週間後には反応潜時は有意に高値を示した。

また Control 群と比較しても阻害剤投与群では有意に高いレベルにあった。

TRPA1 チャンネルを有する酸素感受性感覚神経は骨内組織を走行しており、適度な低酸素刺激により活動することが知られている。本研究ではこれらの神経を薬理的に阻害することで骨組織形成を妨げる影響がみられたことから、これらの感覚神経は骨組織に対して量的構造的にポジティブに機能していることが考えられた。

総じて、骨代謝異常を呈する骨組織は骨量低下しておりハイインパクトな運動介入を実施するには不向きな傾向にある。そこでローインパクトな運動介入であっても、運動実施する外的環境(低酸素環境)を整備することで骨の量的構造的な観点からはより効果を創出することが示唆された。この要因として骨内支配する酸素感受性感覚神経がポジティブな働きをしている可能性が示唆された。

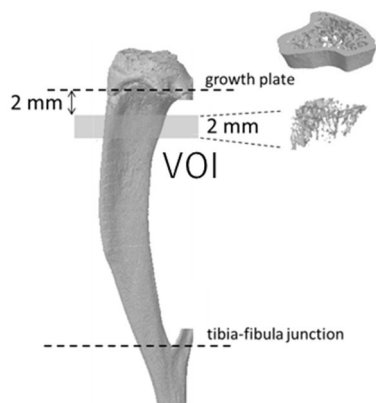


図 1. 脛骨マイクロ CT 撮影の 3 次元構造および骨幹端骨梁部の分析対象 (VOI; voxel of interest)。

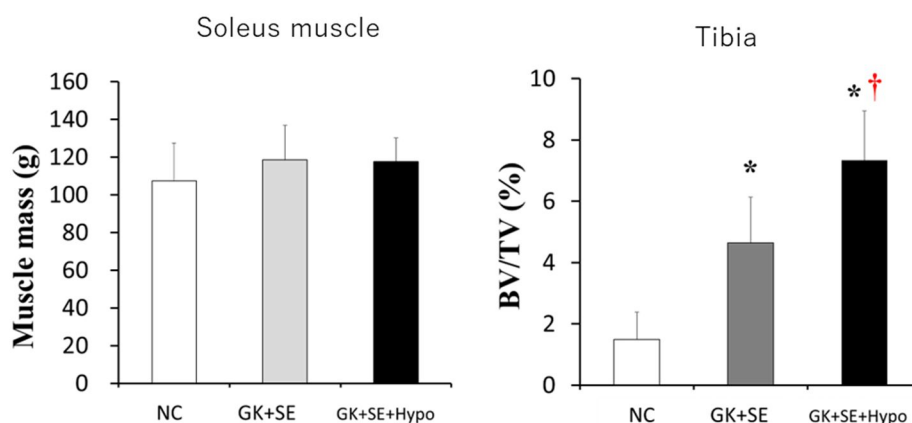


図 2. 糖尿病ラット(GK)の骨格筋及び骨量への水中運動(SE)及び低酸素環境下(Hypo)での SE の影響 . * $P < 0.05$, vs NC, † $P < 0.05$, vs GK+SE. NC: normal control.

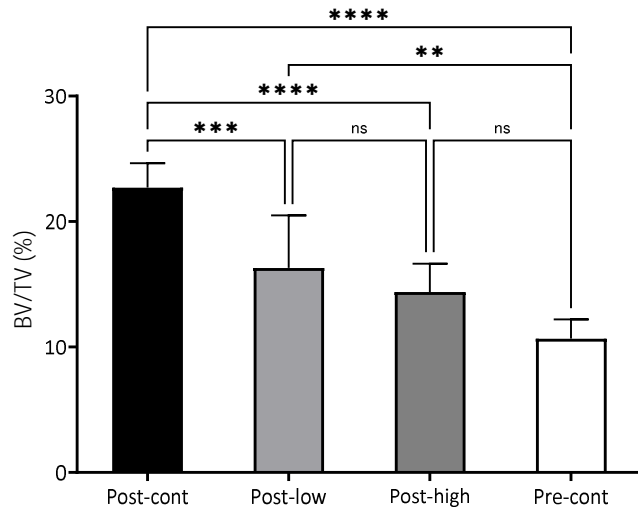


図 3. TRPA1 チャンネル阻害剤 (低用量 Low , 高用量 High) の骨量(BV/TV)に対する影響 .

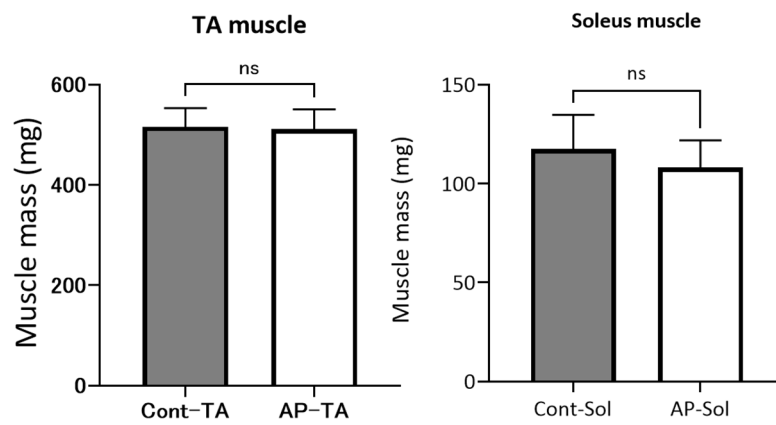


図 4. TRPA1 チャンネル阻害剤の筋湿重量 (TA , Sol) に対する影響 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Tamaki H, Yotani K, Ogita F,
2. 発表標題 In vivo bone strain environment of rat tibia during eccentric, concentric and isometric contractions induced by electrical stimulation.
3. 学会等名 2021 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田巻弘之, 與谷謙吾, 荻田 太
2. 発表標題 坐骨神経及びカプサイシン感受性神経のdenervationがラット脛骨骨梁構造に及ぼす影響.
3. 学会等名 第76回日本体力医学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tamaki H, Yotani K, Ogita F,
2. 発表標題 Effects of bone strain of rat tibia during electrical stimulation-induced muscle contraction on bone strength in the early stages of disuse musculoskeletal atrophy.
3. 学会等名 2020 Annual Meeting of American Society for Bone and Mineral Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荻田 太, 與谷謙吾, 田巻弘之
2. 発表標題 低圧低酸素環境下における短時間高強度インターバル運動が身体組成、血中脂質、耐糖能に及ぼす影響
3. 学会等名 第28回日本運動生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田巻弘之, 與谷謙吾, 荻田 太,
2. 発表標題 電気刺激誘発性筋収縮時の収縮様式の違いによるラット脛骨のひずみ特性.
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakagawa K, Oga R, Yotani K, Ogita F, Tamaki H,
2. 発表標題 Effects of sciatic nerve and capsaicin-induced sensory denervation on trabecular bone in young rats.
3. 学会等名 28th Annual Congress of European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Oga R, Nakagawa K, Hayao K, Tamaki H,
2. 発表標題 Muscle force profiles in the rat tibialis anterior as a function of different frequencies of eccentric muscle contraction.
3. 学会等名 28th Annual Congress of European College of Sport Science (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tamaki H, Yotani K, Ogita F,
2. 発表標題 Effects of hypobaric swimming training on trabecular bone volume and structure in old type 2 diabetic rats.
3. 学会等名 49th Annual Meeting of European Calcified Tissue Society Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田巻弘之, 中川弘毅, 大賀亮也, 吉塚有紀子, 西山 輝, 横田幹太, 與谷謙吾
2. 発表標題 若齢及び中高齡期ラット脛骨の荷重による骨ひずみ特性.
3. 学会等名 第77回日本体力医学会大会
4. 発表年 2022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	荻田 太 (Ogita Futoshi) (50224134)	鹿屋体育大学・スポーツ生命科学系・教授 (17702)	

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