

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：24201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21767

研究課題名（和文）全身性老化予防の新しい臓器：骨細胞の栄養ネットワーク解明

研究課題名（英文）A New Organ for Preventing Systemic Aging: Elucidating the Nutrient Network of Osteocytes

研究代表者

辰巳 佐和子（Tatsumi, Sawako）

滋賀県立大学・人間文化学部・教授

研究者番号：80420545

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：骨細胞は自身や骨の他の細胞とネットワークを形成する。そのネットワークを介して、栄養素の受け渡しや情報伝達を行うと考えられているが、その詳細はよくわかっていない。本研究において、骨細胞ネットワーク破断マウスを作成し、栄養代謝を詳細に解析した。その結果、骨代謝異常、ミネラル代謝異常、脂質代謝異常を生じ、老化に伴いリスクが高まる骨粗鬆症、慢性腎臓病、筋萎縮などが重症化することがわかった。さらに骨細胞ネットワークが再構築されると、それらの病態が改善した。本研究結果は、「骨細胞が栄養センサーの役割を担い、その骨細胞ネットワークの破綻は全身性の栄養代謝障害を介して老化を促進する」可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会にあるわが国では健康寿命の延伸を目指す研究は喫緊の課題である。研究成果より、加齢に伴う骨細胞ネットワークの破綻が栄養代謝不良を加速させる可能性が明らかとなった。この成果は、骨細胞数、骨細胞ネットワーク維持のための運動療法、栄養療法に展開でき、老化に伴う疾患、栄養障害、フレイル予防にもつながると考えられる。そのため、さらに研究を進めることで、健康寿命の延伸、医療費削減が期待できる可能性がある。そのため、本研究成果は、社会的、学術的意義があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Osteocytes establish networks with themselves and with other cells in the bone. It is thought that they transfer nutrients and information through this network, but the details of this process are not well understood.

In this study, we generated osteocyte network-breaking mice and analyzed nutrient metabolism in detail. As a result, it was found that abnormalities in bone, mineral, and lipid metabolism occur, and that osteoporosis, chronic kidney disease, and muscle atrophy, whose risks increase with aging, become more severe. Furthermore, when the osteocyte network was restructured, those pathological conditions improved. The results of this study suggest that "osteocytes play the role of nutrient sensors, and the disruption of their osteocyte network may promote aging via systemic nutrient metabolism disorders."

研究分野：臨床栄養学、骨ミネラル代謝学

キーワード：骨細胞 栄養 加齢

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1) 骨細胞は骨基質に埋め込まれた細胞であり、骨基質中の骨小腔という空間に存在している。骨細胞は骨組織を司る細胞の中で最も多くおよそ 90% を占める。骨細胞を特異的に減少させたマウスでは、骨芽細胞の機能を抑制され、破骨細胞が活性化し、骨吸収が促進し骨粗鬆症を発症させることが示された(Tatsumi S et al. Cell Metab. 2007)。また、骨細胞には破骨細胞分化因子でもある RANKL (Receptor activator of NF- κ B ligand) が非常に多く発現しており、破骨細胞を活性化させることが明らかとなっている。これらの研究から、骨細胞は骨表面の骨芽細胞、破骨細胞を制御する司令塔細胞であることがわかってきた。また骨細胞は自身から多数の細胞突起を伸ばし、それらの突起は骨細管と呼ばれる細い管を通して骨基質中に張り巡らされており、骨細胞-骨細管ネットワークを形成している。このネットワークは、血管および骨髄腔から酸素やカルシウム、リンを含む栄養素の輸送路となっており、骨細胞の生存に非常に重要であると考えられている。また、近年、G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) 投与で骨細管ネットワークを破断させたモデルマウスが報告された (Sato M et al. Cell Stem Cell. 2013)。G-CSF は交感神経シグナルの増強を惹起し、交感神経より放出されたカテコールアミンが骨芽細胞に存在する α 2 アドレナリン受容体を介して骨芽細胞の機能を低下させ、骨細胞への分化を抑制することが報告されている。

2. 研究の目的

骨細胞は加齢に伴い減少する細胞である。骨細胞は自身や骨の他の細胞とネットワークを形成し、栄養素の受け渡しや情報伝達を行うと考えられているが、実態は明らかではない。これまでに、我々は骨細胞を死滅させ、そのネットワークを破断できるマウスの樹立に成功し研究をおこなってきた。その過程で、骨細胞ネットワークの破断は、骨代謝異常、ミネラル代謝異常、脂質代謝異常を生じ、老化に伴いリスクが高まる骨粗鬆症、慢性腎臓病、筋萎縮、痩せや寿命短縮を誘発することを見出した。これらの成果により、「骨細胞が栄養センサーの役割を担い、その破綻は全身性の栄養代謝障害を介して老化を促進する」という仮説をたてた。本研究目的は、栄養センサーとしての骨細胞が機能するのかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

1) 動物実験

滋賀県立大学動物実験専門委員会の承認を受け実施した。動物飼育は、滋賀県立大学動物実験規則に従い実施した。マウスは恒温の飼育室で明暗サイクル(明期 6:00 ~ 18:00, 暗期 18:00 ~ 6:00) の条件下、プラスチックケージ内で、実験動物飼育用固形食 (MF 食) と滅菌水の自由摂取により飼育した。尿を採取する場合は、代謝ケージを用いた。

2) 骨細胞ネットワーク破断マウス作成

A) TRECK 法による骨細胞欠損マウス (OCL マウス)

ジフテリア毒素 (DT) 投与により任意の時期に骨細胞を特異的に死滅させることができるトランスジェニックマウス (DMP-1-hHB-EGF Tg : 以下 Tg マウス) の系統を使用した (Tatsumi S et al. Cell Metab. 2007)。8 ~ 10 週齢の Tg マウスおよび野生型 (WT) マウスに DT (20-50 μ g/kg) を投与し作成した。骨細胞は 48 時間以内に欠損した。DT 濃度により骨細胞の欠損率は異なる。

B) G-CSF 投与による骨細管萎縮マウス (OCND マウス)

8 ~ 10 週齢の WT マウスに G-CSF (250 μ g/kg/day) を 12 時間毎に 5 日間皮下注射を行った。最後に皮下注射してから、3 日後に骨細管萎縮、骨細胞ネットワークの破断を確認した (Sato M et al. Cell Stem Cell. 2013, Fujii O, Tatsumi S et al. Front Endocrinol. 2017;8:359)

3) 血液・尿生化学検査

各マウスより得た血漿および尿を以下の各種キットを用いて測定した。無機リン濃度：p-メチルアミノフェノール還元法を用いたホスファCテスト Kit (Wako, Osaka, Japan)、カルシウム濃度：メチルキシレールブルー発色法を用いたカルシウム E テスト Kit (Wako)、クレアチニン濃度：酵素法を用いた L タイプワコー CRE・M (Wako)、総胆汁酸：総胆汁酸 テストワコー (Wako)、FGF23: FGF-23 ELISA Kit (KAINO LABORATORIES, INC., Tokyo, Japan)、PTH: Mouse PTH 1-84 ELISA Kit (Immunotopics, California, USA) を用いて測定した。総 NAD 測定は情報に従って実施した (Nomura K, Tatsumi S et al. J Am Soc Nephrol. 2014, Miyagawa A, Tatsumi S et al. Kidney Int. 2018)

4) 腸内細菌叢解析

2日間で回収した糞をそれぞれ0.05 gずつ量り、合わせて0.1 gのサンプルとした。サンプルからのDNA抽出はFavor Prep Stool DNA Isolation Mini Kit (FAVORGEN)を用いて行った。DNA抽出後、定量PCRで腸内細菌叢を調べた。それぞれの内部標準として16S rRNA 遺伝子 (rDNA, Universal) を用いて補正した。

4. 研究成果

1) 骨細胞ネットワーク破断マウス作成・栄養代謝異常解析

OCL マウスでは、これまでの我々の報告通り、尿中リン排泄の異常な上昇が認められた。骨細胞の減少に伴い、リン調節因子であるFGF23の減少とPTHの上昇が認められた。また、胆汁酸濃度の上昇が認められた。さらに胆汁組成変化をHPLC分析により検討した結果、OCL マウスではケノデオキシコール酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA)、 α -ミユリコール酸 (α -muricholic acid, α -MCA)、7-ODCA (7-oxodeoxycholic acid) の増加が認められた。また、ウルソデオキシコール酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) は増加傾向を示した(図1)。この結果より、骨細胞ネットワーク破断により、胆汁酸代謝異常が生じることが明らかとなった。次に、二次胆汁酸代謝を担う腸内細菌の分布を検討した。また、尿毒素産生に關する Enterobacteriaceae が OCL マウスで増加を示していることが明らかとなった(図2)。この結果より、骨細胞を欠損させたマウスでは腎機能の低下を誘導した可能性も考えられた。

図1 胆汁酸組成の違い

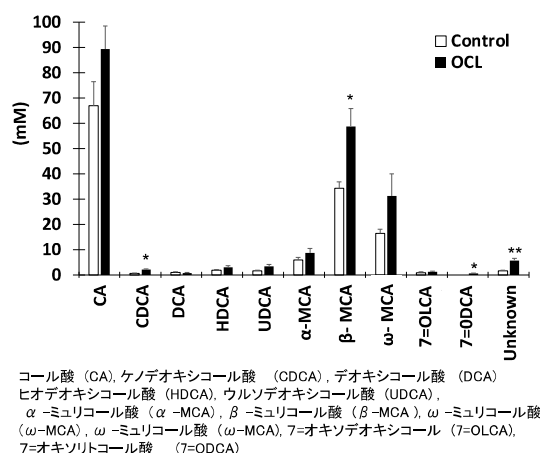
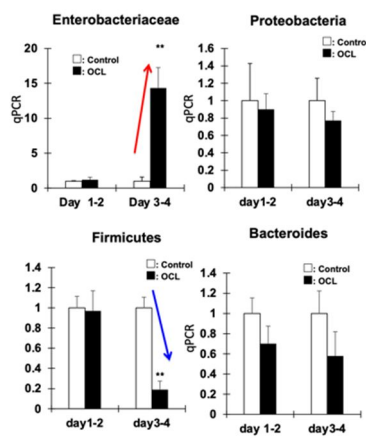


図2 腸内細菌叢の変化



2) 骨細胞ネットワーク破断による老化表現型の解析

OCL マウスではこれまでの報告通り骨粗鬆症が生じているだけでなく、筋萎縮により骨格筋量が著しく低下していた。サルコペニアの症状が見られた。骨細胞ネットワーク破断による、急速に生じる骨格筋量の減少については、さらに詳細に解析をする必要がある。また最近の報告で老化関連因子、慢性腎臓病患者の慢性炎症に關わる因子として考えられている、フェチイン A タンパク質等を核としたリン酸カルシウムの結晶体 (CPP: calciprotein particle) について検討したところ、OCL マウス、OCND マウスの尿中 CPP 量の著しい上昇が認められた。その後、腎機能が低下した。著しい腎機能低下は尿中 CPP 濃度の異常な上昇により、尿管などに慢性炎症が生じることが要因の可能性が示唆された。また興味深いことに、腎機能がさらに低下すると尿中 CPP は減少し血中 CPP が生じることが明らかとなった。そのため尿中 CPP 量は腎老化の指標となると考えられた。よって、尿・血液中の CPP の上昇により、全身性の慢性炎症が生じるため、老化が加速した可能が示唆された。また、尿中 CPP 量の増加に伴い、OCL マウスでは摂食量の減少も認められた。摂食量の減少は高齢者でも認められるが、骨細胞ネットワークの破断により生じた摂食量の減少の原因は今回の研究からは明らかにできなかった。今後さらに検討を進める必要がある。

3) 新生骨細胞による栄養代謝異常・老化の改善効果の検討

骨細胞ネットワーク破断マウスは、新生骨細胞を産生できるため、骨細胞ネットワークの修復過程で継時的に観察したところ、ネットワーク破綻の1ヶ月後には尿中リン代謝異常、摂食量が改善し、3ヶ月後には、骨量および骨格筋量、腎機能の全てが対照マウスと同レベルにまで改善した。よって新生骨細胞数の増加は、骨細胞ネットワークを形成し、老化を抑制することが明らかとなった。さらに、新生骨細胞の産生を促す食餌を検討し栄養補給 (ミレラル、タンパク質強化) をしたが、消化吸収能が低下している

め栄養状態の改善効果は認められなかった。

5. まとめ

骨細胞数の減少や骨細胞ネットワークの破断は全身性の栄養代謝障害として、ミネラル代謝、胆汁酸組成の変動、腸内細菌叢の分布が大きく変動することが明らかとなった。そして老化にもなう疾患を生じさせ、この現象は新生骨細胞が生じることで、改善することが明らかとなった。これらの成果より、骨細胞が体内の栄養状態を把握する栄養センターの役割を担う可能性も考えられる。寝たきりなど不動により骨細胞が細胞死を迎え、減少することもわかっていることから、骨細胞数を減らすことのない、運動と栄養介入方法をさらに検討し、考案する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 TATSUMI Sawako, KUWAHARA Shoji, SEGAWA Hiroko, MIYAMOTO Ken-ichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulation of Plasma Phosphate Concentration and Diurnal Rhythm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oleoscience	6. 最初と最後の頁 135 ~ 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/oleoscience.21.135	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 TATSUMI Sawako, KUWAHARA Shoji, SEGAWA Hiroko, MIYAMOTO Ken-ichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Regulation of Plasma Phosphate Concentration and Diurnal Rhythm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oleoscience	6. 最初と最後の頁 135 ~ 140
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5650/oleoscience.21.135	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 辰巳佐和子
2. 発表標題 栄養代謝面からみた腎臓リハビリテーション
3. 学会等名 日本腎臓リハビリテーション学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 室岡響, 田口裕子, 外池奈美, 桑原頌治, 辰巳佐和子
2. 発表標題 慢性腎臓病におけるリン代謝異常と 肝臓Namp1-NAD合成系について
3. 学会等名 第24・25回日本病態栄養学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口裕子, 室岡響, 桑原頌治, 辰巳佐和子
2. 発表標題 腸管リン吸収におけるNamp1/NAD系の関与
3. 学会等名 第24・25回日本病態栄養学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桑原頌治, 外池奈美, 河瀬瑞生, 古川菜摘, 廣瀬かなこ, 田口裕子, 室岡響, 辰巳佐和子
2. 発表標題 CPP測定による腎機能低下の早期発見
3. 学会等名 第24・25回日本病態栄養学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辰巳佐和子, 室岡響, 桑原頌治
2. 発表標題 血中リン濃度の日内リズムにおける 肝臓Namp1の役割
3. 学会等名 日本時間栄養学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辰巳佐和子
2. 発表標題 血中リン濃度調節機構と日内リズム形成
3. 学会等名 第7回日本時間栄養学会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辰巳佐和子
2. 発表標題 リン代謝における腎 - 肝連関
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 CPP 測定系の樹立:腎機能低下の早期発見
2. 発表標題 桑原頌治, 辰巳佐和子 他
3. 学会等名 第59回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会
4. 発表年 2020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	桑原 頌治 (Kawahara Shoji) (70645209)	滋賀県立大学・人間文化学部・准教授 (24201)	

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