

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17677

研究課題名（和文）大腸上皮ホメオスタシスに焦点を当てた閉経に起因する骨密度低下の機序解析

研究課題名（英文）Mechanistic analysis of menopause-induced bone mineral density loss focussing on colonic epithelial homeostasis

研究代表者

近藤 位旨（Kondo, Takashi）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部・研究員

研究者番号：30832307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000 円

研究成果の概要（和文）：閉経に起因する骨密度の低下は女性ホルモンの欠如のみからメカニズムが説明されている。本研究では、女性ホルモンの欠如が大腸のホメオスタシスを破綻させ、大腸由来の炎症性物質が骨密度低下を誘導するの否かを検証した。その結果、正常メスマウスと閉経後モデルマウスにおいて、盲腸内ムチン量、血中LPS結合タンパク質濃度に変化はなく、生体位において女性ホルモンの欠如が大腸のバリア機能に影響しないという結果を得た。一方、骨髄遺伝子の網羅解析を行ったところ、女性ホルモンの欠如が細胞死の1つであるフェロトーシス経路を抑制することを見出した。この知見は抗炎症成分による骨密度低下の作用機序を説明する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉経により生じる疾患は女性のキャリア形成に限らず、生活の質を著しく低下させる。女性ホルモンの分泌停止が大腸のバリア機能に影響しないという知見は骨密度低下の主要因とされる炎症が何に由来するのかを探索手掛かりになる。また、骨密度低下とフェロトーシスの関連性は、これまでに存在しない副作用のない閉経後骨粗鬆症予防食品を開発するきっかけとなる。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of menopause-induced reduction in bone mineral density has been explained solely from the lack of estrogen. In the present study, we tested whether the lack of estrogen disrupt colonic homeostasis and whether colon-derived inflammatory substances induce the reduction in bone mineral density. The cecal mucin and the concentration of LPS-binding protein in the blood did not change in normal female mice and ovariectomized mice, indicating that the lack of estrogen does not affect the barrier function of the large intestine. On the other hand, the RNA sequences of comprehensive analysis of bone marrow genes found that the lack of estrogen suppressed the ferotosis pathway. This finding may explain the mechanism of action of anti-inflammatory components in reducing bone mineral density.

研究分野：栄養生理

キーワード：骨代謝 閉経後骨粗鬆症

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

閉経に起因する骨密度の低下は女性ホルモンの欠如のみからメカニズムが説明されている。この時、炎症が誘導されることで破骨細胞の骨吸収が増加し、骨密度低下が低下すると考えられている。しかし、その炎症の起源は不明である。近年の研究から、女性ホルモンが大腸上皮のムチン分泌を制御していることが細胞実験で明らかになった。これらの知見と申請者が観察した閉経後骨粗鬆症 (OVX) モデルマウスにおける大腸上皮の炎症から、閉経は、大腸上皮のホメオスタシスを破綻させ、腸内細菌由来の LPS による炎症の増加を介して破骨細胞の活性化することで、骨密度の低下を惹起していると予測された。

2. 研究の目的

本研究では、女性ホルモンの欠如が大腸のホメオスタシスを破綻させ、大腸由来の炎症性物質が骨密度低下を誘導するの可否かを検証することを主目的とした。

3. 研究の方法

実験①

ICR 雌マウスを用いて、偽手術マウス (Sham) および閉経後骨粗鬆症モデル (OVX) マウスを作成した。これらマウスを AIN93G 飼料 (脂質源; コーン油) および飲料水で 1、2、6 週間の飼育を行った。各飼育期間終了後、解剖を行い、血漿、盲腸、大腿骨および脛骨を採取した。血漿は炎症性サイトカインおよび血中 LPS 濃度を、盲腸は炎症性マーカー (ミエロペルオキシダーゼ活性、炎症関連遺伝子発現量) を、大腿骨は骨密度 (CT 法) を、脛骨は骨代謝関連遺伝子発現量を測定した。

実験②

実験①の脛骨由来 mRNA (6 週間の飼育を行ったサンプル) を用い、遺伝子発現の網羅解析を行った。骨髄由来 mRNA はオリゴdT 磁気ビーズで精製した後、断片化した。その後、cDNA を合成し、次いで、アダプターを付加し他サンプルをライブラリーとした。シーケンシングは Illumina NovaSeq (PE150) で行った。NGS データは STAR alligner でマッピングし、正規化後、遺伝子発現量の定量を行った。なお、RNA サンプルは等量の RNA 濃度に調整した後、各群の 2 検体をプールした物を用いた。そのため、各群の n 数は 6 から 3 となっている。

実験③

ICR 雌マウスを用いて偽手術マウス (Sham) および閉経後骨粗鬆症モデル (OVX) マウスを作成した。AIN93G 飼料またエストロゲン製剤添加飼料 (プレマリン 0.1%) で 6 週間の飼育を行った。飼育終了後、解剖を行い、大腿骨および脛骨を採取した。大腿骨は骨密度 (CT 法) を、脛骨は骨代謝関連遺伝子発現量を測定した。

実験④

骨芽細胞 (MC3T3-E1) に GPX-4 阻害剤 (ML-162) を作用させ、骨形成への影響を解析した。GPX-4 阻害剤を 10-250 nM の濃度で作用させ、乳酸デヒドロゲナーゼ活性および細胞増殖活性の測定を行った。細胞増殖活性などの結果から 100nM 以上で細胞死が観察されことから、25-100 nM の濃度条件で、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定を行った。また、骨芽細胞の成熟促進剤である β -グリセロリン酸およびアスコルビン酸の存在下で GPX4 阻害剤を作用させ、成熟への影響も解析した。

4. 研究成果

① 飼料摂取量は各試験期間において群間に差はなかった（表 1）。一方、体重増加量はいずれの試験期間においても Sham 群に比べ、OVX 群で有意な増加が認められた。OVX 群では卵巣摘出の 2 週間後に、Sham 群と比べ、骨密度が低下し、その差は卵巣摘出 6 週間後も維持されていた。盲腸内容物重量およびムチン総量は、試験飼育 1 週間後において、Sham 群に比べ、OVX 群で有意な増加が認められたものの、試験飼育 2 および 6 週間後では群間に差はなく、飼育期間の差もなかった。また、血中 LPS 濃度は試験飼育 1 週目では Sham 群に比べ、OVX 群で有意な低下が認められたものの、試験飼育 2 および 6 週間後では群間に差は認められなかった。骨髄の骨代謝関連遺伝子発現量はいずれも群間に変化は観察されなかった。

表 1 成長、骨密度、盲腸および血中リポポリサッカライド結合タンパク質 (LBP)

	1 week		2 weeks		6 weeks	
	Sham	OVX	Sham	OVX	Sham	OVX
Food intakes, g/each periods	33.9 ± 0.8	33.7 ± 1.1	72.3 ± 2.7	68.5 ± 2.1	201.7 ± 9.5	203.8 ± 2.4
Body weight gain, g/each periods	3.31 ± 0.42	4.97 ± 0.49*	6.40 ± 0.75	9.78 ± 0.80*	13.00 ± 2.08	20.37 ± 1.38*
Uterus, g	0.129 ± 0.007	0.040 ± 0.001*	0.150 ± 0.029	0.031 ± 0.001*	0.183 ± 0.031	0.026 ± 0.002*
Total BMD in femur, mg/cm ³						
Whole	580 ± 7	567 ± 12	617 ± 10	557 ± 11*	697 ± 13	617 ± 7*
Proximal	720 ± 12	705 ± 18	763 ± 9	699 ± 14*	817 ± 20	751 ± 14*
Mid	647 ± 15	630 ± 21	648 ± 15	593 ± 17*	736 ± 20	670 ± 8*
Distal	473 ± 8	457 ± 10	515 ± 13	452 ± 8*	599 ± 16	501 ± 7*
Cecal tissue, g	0.073 ± 0.006	0.081 ± 0.004	0.083 ± 0.003	0.092 ± 0.008	0.089 ± 0.004	0.093 ± 0.003
Cecal contents, g	0.159 ± 0.007	0.268 ± 0.034*	0.228 ± 0.038	0.279 ± 0.031	0.308 ± 0.036	0.277 ± 0.030
Mucin contents, μmol/cecum	0.356 ± 0.047	0.842 ± 0.088*	0.708 ± 0.158	0.814 ± 0.089	0.633 ± 0.093	0.792 ± 0.160
Plasma						
LBP, μg/mL	10.97 ± 0.45	8.99 ± 0.45*	8.06 ± 1.19	7.57 ± 0.85	8.37 ± 0.66	9.58 ± 0.57

Data are expresses means ± SEMs, n = 6. *p < 0.05 (vs. each Sham) tested by non-paired t test.

② 実験①の脛骨由来 mRNA を用い遺伝子発現の網羅解析を行った結果、1118 種類の遺伝子発現が増加し、1244 種類が減少した（図 1）。パスウェイ解析では、B セル受容体シグナル経路、造血幹細胞関連経路などの変動が認められた。この経路は骨密度の減少と矛盾しない。その他の特徴としては、フェロトシス関連遺伝子の変動が認められた。そこで、RT-PCR により試験①サンプルの gpx-4 遺伝子発現量を測定した。その結果、骨密度の低下が生じる卵巣摘出後 2 週間後では OVX 群で有意な低下認められたものの、6 週間後ではその差は消失した。

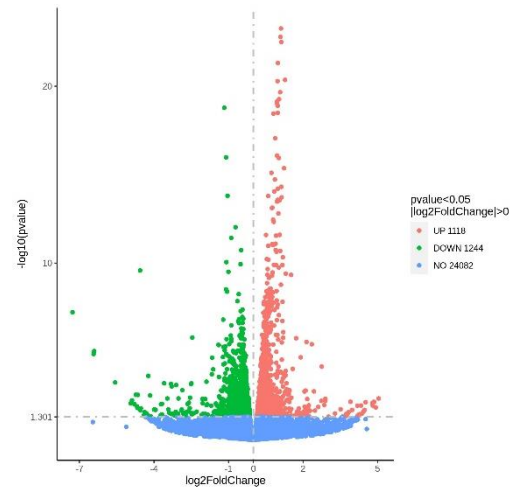


図 1 RNA-seq の volcano plot 図 (Sham vs OVX)

③ 実験①、②の結果から、エストロゲンは骨髄細胞の膜酸化を調整している可能性が考えられた。そこで、卵巣摘出マウスにエストロゲンを供給した場合に GPX-4 遺伝子発現にどのような影響を与えるのかを検討した。なお、エストロゲン製剤（プレマリン）の供給量は予備検討の結果から食餌への添加では 0.1%以上では子宮の異常肥大を生じさせるが、0.1%添加で肥厚化はなく、卵巣摘出により生じる骨密度の低下を予防できることを確認している。表 2 の結果では Sham 群に比べ、エストロゲン製剤添加飼料群で子宮重量の有意な増加が認められているものの、解剖のタイミング（性周期）によって Sham 群でも子宮は 0.2g 程度の値を示すため、この結果は異常な子宮肥大を意味するものではないと考えられる。エストロゲン製剤の飼料への添加により、骨髄の GPX-4 遺伝子発現量は有意に増加した（post-hoc test, Sham vs. E）。この結果はエストロゲンが細胞膜酸化のカウンタータンパク質である GPX-4 を調整している可能性を示唆している。

表 2 成長、骨密度および gpx-4 遺伝子発現量

	Sham	OVX	
		C	E
Food intakes, g/42 days	198.0 ± 6.9	186.7 ± 7.0	197.6 ± 11.5
Body weight gain, g/42 days	13.3 ± 1.3 ^a	17.4 ± 2.4 ^a	6.8 ± 0.7 ^b
FE	0.067 ± 0.006 ^b	0.091 ± 0.009 ^a	0.036 ± 0.004 ^c
Uterus, g	0.153 ± 0.018 ^b	0.024 ± 0.001 ^c	0.229 ± 0.006 ^a
Total BMD in femur, mg/cm ³			
Whole	715 ± 8 ^a	626 ± 6 ^b	733 ± 17 ^a
Proximal	859 ± 10 ^a	766 ± 9 ^b	874 ± 12 ^a
Mid	744 ± 12 ^a	664 ± 8 ^b	746 ± 14 ^a
Distal	605 ± 10 ^a	511 ± 6 ^b	637 ± 21 ^a
Gene expression, a.u.			
Bone			
gpx-4	1.00 ± 0.26	1.20 ± 0.14	1.92 ± 0.42*

Data are expresses means ± SEMs, n = 6. Labeled means in a row without a common letter differ, P < 0.05. *p < 0.05 (vs. Sham).

④ 試験①-③の結果から、エストロゲンは骨髄の GPX-4 のレギュレーター因子である可能性が考えられる。一方、脛骨の遺伝子発現は骨芽細胞と破骨細胞を区別できていない。そのため、GPX-4 がどちらの細胞の機能に関与しているのか否かは判別できない。そこで、骨芽細胞に GPX-4 阻害剤を作用させ、成熟への影響を解析した。その結果、GPX-4 阻害剤は骨芽細胞の初期成熟マーカーである ALP 活性に影響を与えなかった。また、成熟促進剤添加条件では、GPX-4 阻害剤 (0 nM vs. 50 nM) により ALP 活性の有意な低下が認められた。しかし、この作用は弱く、用量依存性も観察されなかった。

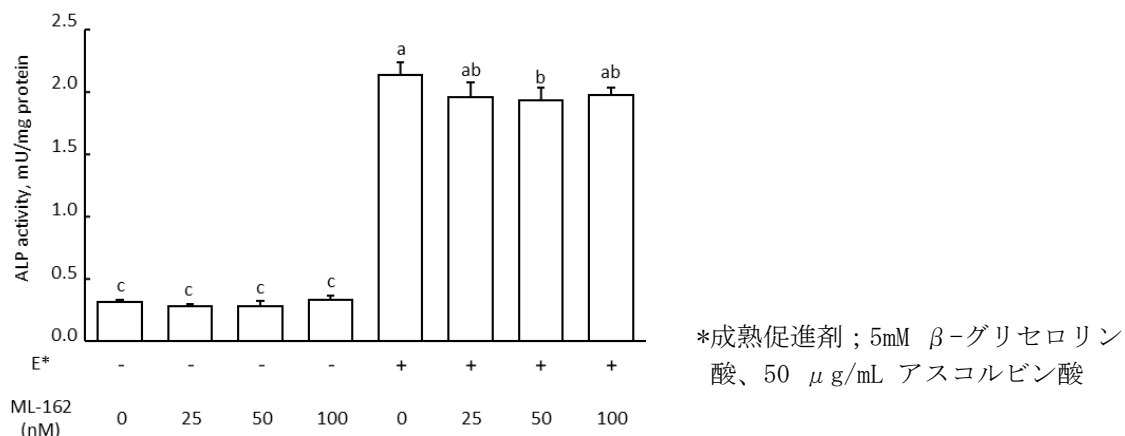


図 2 アルカリフォスファターゼ活性

以上が本研究で得られた結果である。試験④では破骨細胞への影響を計画していたものの、RAW264 では破骨細胞の分化条件が設定できなかったため、GPX-4 が破骨細胞の骨吸収に影響を及ぼすのか否かを解析することが達成されなかった。この解析は今後も続けることでエストロゲン欠乏による骨密度低下の新規メカニズムを明らかにする予定である。

以上から、エストロゲンの欠乏は大腸上皮の恒常性に関与しないことが明らかにでき、細胞膜の酸化による炎症が閉経後骨粗鬆症の発症を説明する可能性を見出すことに繋がった。つまり、エストロゲン欠乏で生じると考えられている炎症はエンドクラインではなく、パラクラインまたはオートクラインであると考えられる。また、本研究はエストロゲン様作用を持たない抗炎症性成分が閉経骨密度低下を予防する従来の研究の解釈を裏付けることに寄与するものと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kondo Takashi、Chiba Tsuyoshi、Tousen Yuko	4. 巻 73
2. 論文標題 Short-chain fatty acids, acetate and propionate, directly upregulate osteoblastic differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Food Sciences and Nutrition	6. 最初と最後の頁 800～808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09637486.2022.2078285	査読の有無 有
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 Kondo Takashi、Suzuki Ippei、Chiba Tsuyoshi、Tousen Yuko	4. 巻 88
2. 論文標題 Safety assessment of herbal supplement components targeting hepatotoxicity and CYP3A4 induction in cell-based assay using HepG2 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Food Science	6. 最初と最後の頁 563～573
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1750-3841.16410	査読の有無 有
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 -

〔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
---------	---------