

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25年 5月10日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年～2012年

課題番号：22500684

研究課題名（和文） 老化促進マウスを用いた骨量維持機構の基礎的解明

研究課題名（英文） Maintenance of bone mineral density in Senescence Accelerated Mice P6 (SAMP6)

研究代表者

勝山 博信 (Katsuyama Hironobu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00289175

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症を惹起する老化促進マウスP6(SAMP6)は種々の生理活性物質の効果を判定するために使用される。水浸拘束ストレス(WRS)を1日6時間、週5日間、4週間行なうことによりSAMP6の骨量が減少したので、6週齢雄SAMP6を用いて、WRSによる骨量減少に対するビタミンK₂(VK₂)の効果を骨代謝マーカーや骨形態計測により判定した。大腿骨遠位端の骨量を小動物用X線CT装置で測定したところ、海綿骨量、皮質骨量ともWRS群で有意に減少した。さらに、VK₂投与により海綿骨量が回復する可能性が示唆された。一方、骨代謝マーカーの変動を検討したところ、骨形成マーカーは変動しなかったが、骨吸収マーカーはI型コラーゲン架橋C-テロペプチド(CTX)がWRS群とWRS + VK₂群で高値を示した。尿中カルシウム量はWRSにより増加したが、VK₂により回復した。次に、骨形態計測により骨の微細な構造を検討した。骨構造パラメーターでは、コントロール群の二次海綿骨の骨梁は島状で連続性が途絶しており、このマウス種の特徴と考えられた。さらにWRSにより骨梁が細く小型となったが、VK₂により丸みを帯びてやや大型化した。骨吸収パラメーターでは、コントロール群と比較してWRS群で大型の多核破骨細胞と広い吸収窩を認めた。VK₂により多核破骨細胞は減少し、吸収窩も縮小した。骨形成パラメーターではWRSによる骨芽細胞の増加と類骨形成及び石灰化速度の亢進を認めた。VK₂はさらに骨芽細胞を増加させ、骨形成を促進した。以上より、WRSは骨吸収と骨形成が亢進する高代謝回転型の骨量減少を誘発するが、VK₂は骨吸収を抑制して、骨形成を亢進する形成優位の高代謝回転となり、骨量減少を抑制することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The P6 strain of senescence-accelerated mice (SAMP6) exhibit features of skeletal aging including reduced bone mineral density (BMD), so that various physiological active agents affecting BMD could be examined. We developed the further bone resorption model using water-immersion restraint stress (WRS). Male SAMP6 were divided into three groups, i.e., control group, WRS (6 h/day, 5 times/wk) group, and WRS + vitamin K₂ (VK₂) (30 mg/kg s.c.) group. SAMP6 were suffered from this stress between 6 to 10 weeks old. BMD was measured using computed tomography (CT) system for small animals, and fluctuation of bone turnover markers and bone histomorphometrical analysis were also performed.

BMD of trabecular bone for WRS groups was significantly lower than that of control group, suggesting that WRS was effective to reduce BMD. However, no significant difference of BMD was observed between WRS group and WRS + VK₂ group. In bone turnover markers, urinary excretion of CTX, bone resorption marker, was significantly higher in WRS groups than in control. And urinary excretion

of calcium was significantly higher in WRS group than in other groups. On the other hand, bone histomorphometrical analysis indicated that trabeculae of WRS showed thin and small shape, but that of WRS + VK₂ showed larger and round shape. On the resorption area, large osteoclast was observed in WRS, but the number of osteoclasts was significantly decreased in WRS + VK₂. These results indicated that vitamin K₂ could affect bone turnover.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：加齢・老化

1. 研究開始当初の背景 骨は生体の支持や内蔵の保護だけでなく、カルシウム代謝や造血への関与など多彩な機能を持った組織である。これらの機能を発揮するために種々のサイトカインやホルモンなどにより骨代謝は厳密に調整されており、骨は静的組織というよりはダイナミックに変化する動的な組織と考えられる。

2. 研究の目的 骨は骨芽細胞と破骨細胞による形成と吸収を繰り返して形態の維持やカルシウムホメオスタシスに関与している。特に骨芽細胞はM-CSFやreceptor activator of NFκB ligand (RANKL)の発現による破骨細胞の分化促進や osteoprotegerin (OPG)による破骨細胞の分化抑制を担うことより、骨代謝の中心的役割を果たしていると考えられる。骨芽細胞は間葉系幹細胞に Cbfa-1 が作用することにより分化するのに対して、破骨細胞は造血幹細胞由来の単球/マクロファージ系前駆細胞に骨芽細胞由来の因子が作用して分化することより、両細胞の起源は異なると考えられる。近年骨粗鬆症の治療薬として承認されたビタミン K₂ (VK₂)はこれら骨芽細胞と破骨細胞の両者に作用すると考えられている。すなわち、VK₂は骨芽細胞の分化増殖を促進する一方、破骨細胞の細胞死を誘導する。又、植物由来のエストロゲン類似構造を持つイソフラボンは骨芽細胞のOPG産生を活性化し、破骨細胞の分化を抑制すると言われる。これまで、VK₂を多量に含有する納豆を閉経前の女性に1年間摂取し

てもらい、骨量および骨代謝マーカーの変動を検討したところ、骨吸収が抑制されることを明らかにした(J Nutr Sci Vitaminol 2004; 50: 114-120)。さらに、イソフラボンの配糖体であるイソフラボンアグリコンを閉経前女性に3ヶ月間投与したところ、エストロゲンレセプター遺伝子多型と関連して、骨量減少のリスクが軽減することを明らかにした。生理活性物質の作用を直接的に判定するために、骨芽細胞培養系を用いて検討した。骨芽細胞培養系にVK₂を投与したところ、骨芽細胞特異的遺伝子が活性化されることを明らかにした(Int J Mol Med 2005; 15: 231-236, Int J Mol Med. 2007; 19: 279-284)。又、骨芽細胞培養系にイソフラボンを投与すると、破骨細胞分化を抑制する遺伝子の発現が得られた。しかしながら、これらの生理活性物質摂取による効果を判定するためには投与量および投与期間が十分ではないため、生体内におけるこれら生理活性物質の動態及び骨量の増加作用については必ずしも明らかとなっていない。そこで、老化促進マウスのうち、骨粗鬆症を引き起こす SAMP6 マウスを用いて、VK₂やイソフラボンなどの生理活性物質の生体内での作用を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法 4週齢の雌の SAMP6 マウスに卵巣摘出を行い、骨量をできるだけ低下させる。SAM マウスは飼育環境で老化の進行が異なるので、老化の進行を確認するため、正常老化を示す、同型の SAMR1 マウスを対

照とする。12 週齢に達した時点で投与前の骨量計測と骨代謝マーカ―の確認を行う。SAMP6 の骨量は 4 ヶ月から減少し始めるとの報告がある (J Jpn Menopause Soc 1998; 6: 186-192) ので、骨量減少が始まる前からマウスに VK_2 やイソフラボンなどの生理活性物質の投与を開始する。骨量計測は本大学で所有する小動物用 CT 装置を使用する。骨代謝マーカ―は、骨形成マーカ―としてオステオカルシンと骨型アルカリフォスファターゼ、骨吸収マーカ―として酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRACP)、I 型コラーゲン C 末端テロペプチド (CTX)、RANKL を測定する。生理活性物質を週に 3 回皮下投与し、1 ヶ月ごとに骨代謝マーカ―や骨量を測定する。少なくとも生理活性物質の投与は 6 ヶ月間行う。

次に、6 週齢雄 SAMP6 に WRS を実施して骨量の変動を確認した。又、 VK_2 を皮下投与し、 VK_2 の効果を X 線 CT 装置、骨代謝マーカ―及び骨形態計測で確認した。

4. 研究成果 骨粗鬆症モデルマウスである老化促進マウス (SAMP6) の雌 4 週齢に対して、早期に骨量減少を来す目的で卵巣を摘出し、骨量の変動を 20 週齢まで検討した。この結果、海綿骨密度はコントロールと差を認めず、骨粗鬆症は発症しなかった (図 1)。

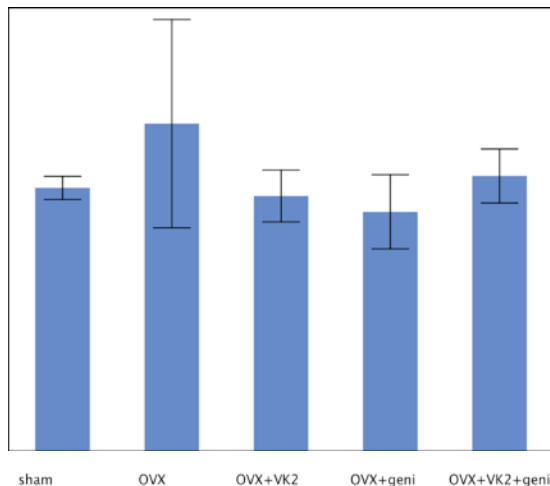


図1 卵巣摘出後の海綿骨密度

SAMP6 はエストロゲン非依存性に骨密度減少を来すため、この期間で骨密度を減少させることはできなかった。そこで、重力の影響を除外し短期間で骨密度を減少させることを目的として、6 週齢の雄 SAMP6 に対して水浸拘束ストレス (WRS) を行なった。成長期においては雄の方がホルモンバランスが安定していると考え、雄を使用することとした。WRS は拘束状態の

SAMP6 を 24°C の水中に 1 日 6 時間浸し、この状態を週 5 日、4 週間実施した。生理活性物質としては VK_2 の効果に限定して判定した。4 週後に骨代謝マーカ―の測定のため、採尿と採血をした後、屠殺して大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨は一本を骨密度測定、もう一本を骨形態計測に用いた。両測定とも大腿骨遠位端を測定した。

血中のコルチコステロンを測定すると (図 2)、

(ng/mL)

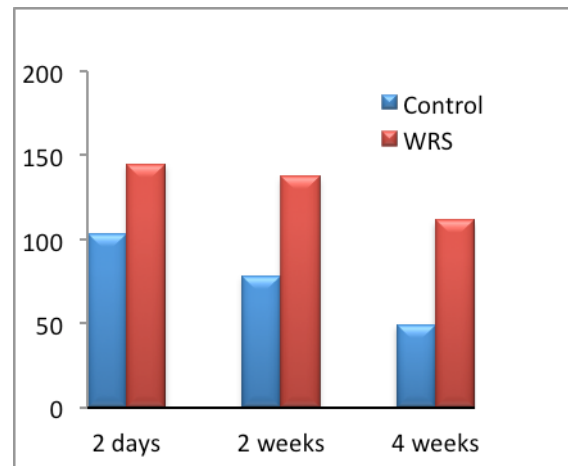


図 2. WRS によるコルチコステロンの変化

WRS により高値を維持していることより、WRS は SAMP6 にとってストレスであり、慣れの影響が少ないと考えられた。

次に、X 線 CT 装置による骨密度の測定では、海綿骨、皮質骨とも WRS 群で骨密度が減少した。 VK_2 投与により海綿骨密度は回復する傾向を示した。このことより、 VK_2 は骨密度に影響する可能性が示唆された。

骨代謝マーカ―の変動では、骨形成マーカ―であるカルボキシル化オステオカルシン (Gla-OC) は各群間で差を認めなかった。又、アルカリフォスファターゼは WRS 群で高値であった。一方、骨吸収マーカ―では、CTX が WRS 群と WRS + VK_2 群で高値を示した。破骨細胞が分泌する TRACP は 3 群間で差を認めなかった。尿中カルシウム排泄量は WRS 群で高値だが、 VK_2 を投与するとコントロール群と差を認めなかった。

次に WRS や VK_2 の効果を判定するために、骨形態計測法で骨の微細な変化を観察した。大腿骨遠位部の二次海綿骨領域で見られる骨梁は WRS により減少するが、 VK_2 投与により増加した (図 3A)。この領域をさらに微細に観察すると (図 3B)、コントロール群ではやや大型の棒状の骨梁と小型の骨梁が見られるが、WRS 群では棒状の骨梁は細く小型化するが、 VK_2 群では丸みを帯びた中型の骨梁が見られた。これらのことより、 VK_2 投与により、WRS で菲薄化した骨梁が改善す

ることが示唆された。

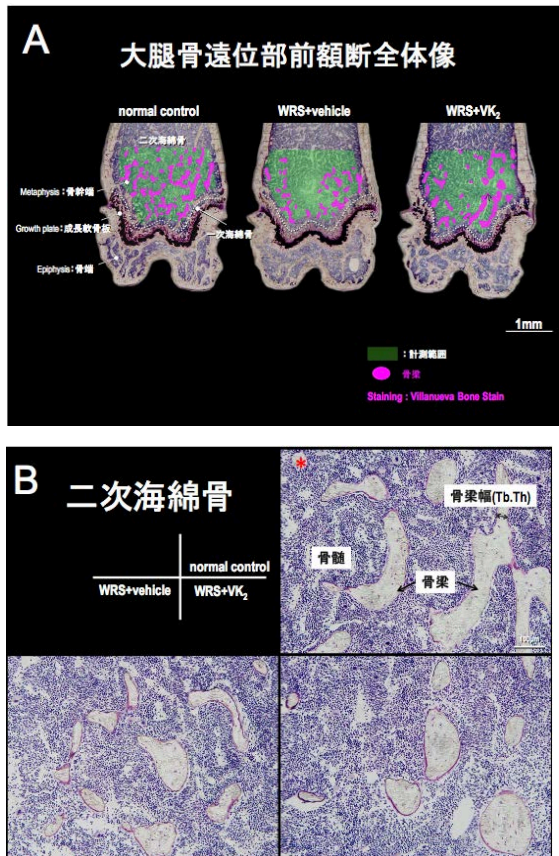


図3 骨構造の変化

骨吸収パラメーターでは、コントロール群と比較して WRS 群で大型の多核破骨細胞と広い吸収窩を認めた。VK₂により多核破骨細胞は減少し、吸収窩も縮小した。骨形成パラメーターでは WRS による骨芽細胞の増加と類骨形成及び石灰化速度の亢進を認めた。VK₂はさらに骨芽細胞を増加させ、骨形成を促進した。以上より、WRSは骨吸収と骨形成が亢進する高代謝回転型の骨量減少を誘発するが、VK₂は骨吸収を抑制して、骨形成を亢進する形成優位の高代謝回転となり、骨量減少を抑制す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1件)

(1) Tomita M, Katsuyama H, Watanabe Y, Hidaka K, Yoshitome K, Miyaisi S, Ishikawa T, Shinone K, Nata M. Water-restraint stress enhances methamphetamine-induced cardiotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* 2011; 190: 54-61 査読有

〔学会発表〕(計4件)

(1) 第83回日本衛生学会総会

伏見滋子、富田正文、奥山敏子、渡辺洋子、山根一和、日根野谷一、秋山祐治、西條清史、勝山碧、勝山博信

ビタミン K₂ がストレスモデルマウスの骨形態におよぼす影響

H25. 3. 24-26 金沢大学 石川県

(2) Katsuyama H, Fushimi S, Yamane K,

Hinenoya H, Akiyama Y, Tomita M, Okuyama T, Watanabe Y, Katsuyama M, Ngoc Anh L, Saijoh K. Vitamin K₂ administration and bone mineral density in Senescence Accelerated Mice P-6 (SAMP6). *EXPERIMENTAL BIOLOGY '12* (San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA, Apr 21-25, 2012)

(3) 第82回日本衛生学会学術総会

伏見滋子、富田正文、奥山敏子、渡辺洋子、山根一和、日根野谷一、秋山祐治、西條清史、勝山碧、勝山博信

マウス骨密度に及ぼす水浸拘束ストレスの影響

H24. 3. 24-26 京都大学 京都府

(4) 第11回分子予防環境医学研究

勝山博信、伏見滋子、山根一和、日根野谷一、秋山祐治、富田正文、奥山敏子、勝山碧、西條清史

老化促進マウスを用いた骨密度減少モデルの作成

H24. 1. 27-28 倉敷市民会館 岡山県

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勝山 博信 (Katsuyama Hironobu)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00289175

(2) 研究分担者

富田 正文 (Tomita Masafumi)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50113197