

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592208

研究課題名(和文) チューイングによるストレス性骨粗鬆症進行抑制機構の賦活

研究課題名(英文) Chewing ameliorates stress-induced osteoporosis in mouse

研究代表者

東 華岳 (AZUMA, Kagaku)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20273146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：老化促進モデルマウスSAMP8を用いて、咀嚼運動(チューイング)によるストレス性骨粗鬆症の改善効果を解析した。対照群に比べ、ストレス群では、血中ストレスホルモンが上昇し、骨形成の抑制と骨吸収の促進による骨量が有意に低下した。ストレス群に比べ、チューイング群では血中ストレスホルモン量および骨形成と骨吸収の動的バランスが改善され、骨量がある程度回復した。これらの結果より、ストレスは骨リモデリングに悪影響を与え骨形成の抑制と骨吸収の促進により骨量が低下し骨粗鬆症に陥る。チューイングが神経系におけるストレス反応を緩和し、骨形成と骨吸収を改善し、ストレス性骨粗鬆症の進行を抑制しているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of chewing on stress-induced bone loss in mice. SAMP8 was randomly divided into control, stress, and chewing groups. Mice in the stress and chewing groups were placed in a ventilated restraint tube for 60 minutes, twice a day for 4 weeks. Mice in the chewing group were allowed to chew a wooden stick during the experimental period. Bone response was evaluated using micro CT and biochemical markers. Exposure of SAMP8 mice to stress resulted in significant increase of the blood corticosterone and noradrenaline levels. The bone resorption was activated and the bone formation was suppressed. Trabecular bone volume was decreased in the stress group. Chewing under chronic stress prevented the increase in the blood corticosterone and noradrenaline levels, attenuated the reduced bone formation and increased bone resorption, improved the trabecular bone loss induced by chronic stress. These findings indicate that chewing can ameliorate stress-induced bone loss in mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

(1)日本における骨粗鬆症患者は中年以降の女性に圧倒的に多く、全国で1,300万人に及ぶと推計されている。高齢者における骨粗鬆症は運動機能の低下に留まらず転倒などのアクシデントから寝たきり状態になることが多く、医療費、介護の両面で大きな社会問題になっている。骨粗鬆症発症の要因には加齢、女性ホルモンの低下、喫煙、アルコールなどがあげられており、これらの要因が複合的に働いて骨粗鬆症が発症するといわれている。最近、これらの要因以外にもストレスが骨粗鬆症の発症・進行に関与していることが報告された。

(2)ストレスは自律神経系、内分泌系に作用し、ストレス反応を引き起こす。ストレスは交感神経を刺激しアドレナリンやノルアドレナリンの分泌を促したり、視床下部・下垂体・副腎皮質系を活性化させ、コルチコステロンの分泌を促進し、エストロゲンの分泌を抑制するといわれている。ストレスによる骨粗鬆症の発症・進行については研究され始めたばかりで、交感神経の関与の可能性が示唆されている程度である。一方、噛む動作(チューイング)にはストレス緩和作用があることが分かってきた。

2. 研究の目的

(1)我々はこれまでに骨粗鬆症の発生過程における骨の画像解析を行い、骨粗鬆症が骨の三次元微細構造に依存することを見出した。また、拘束ストレスを負荷したマウスに木製の棒を噛ませることによりストレス性に減衰した海馬の長期増強がよみがえることを示し、チューイングと記憶再生のカップリング機構の存在が明らかになった。

(2)本研究では、ストレス条件下でチューイングさせたマウスとチューイングさせなかったマウスにおいて骨量と骨質を三次元画像解析し、ストレス関連物質と骨代謝マーカの測定を行い、チューイングによるストレス性骨粗鬆症における骨強度の改善効果を世界に先駆けて解明し、チューイングによる骨粗鬆症の予防システムを社会にアピールすることをゴールとする。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、拘束ストレス条件下でチューイングさせたマウスとチュー

イングさせなかったマウスを用い、骨の三次元微細構造を解析する。ストレス負荷したマウスのストレス関連分子の血中濃度の計測、骨代謝マーカの測定、および骨組織における骨芽細胞と破骨細胞の機能形態解析を体系的に行う。これによって、ストレスによる骨粗鬆症の発症メカニズムを検討する。チューイングによるストレス緩和作用、およびストレス性骨粗鬆症の発症と進行抑制に果たすチューイングの有用性を神経科学的に解明する。

(1)実験モデルの作成:5カ月齢雄性老化促進マウス SAMP8 を使用した。ストレス負荷は、我々がこれまで行ってきた“いわゆる拘束ストレス法”を用いる。ストレスに対する順応を避けるため水浸、光刺激、飼育ケージを45度傾斜すること等を組み合わせたものを用い、1日に2時間のストレスを負荷し、これを4週間継続した。チューイング刺激は上述のストレス負荷中に木製の爪楊枝をマウスの前歯に近づける。マウスは自ら積極的に噛みつきチューイングを始める。

(2)マウス骨格のX線マイクロCTの観察と画像解析:マウスの第4腰椎と大腿骨をX線マイクロCTにより観察し、512×512ピクセル、スライス厚15ミクロンの条件で連続撮影した。第4腰椎の椎体と大腿骨遠位部における海綿骨の骨形態計測パラメータを三次元画像解析法により定量的に分析した。

(3)ストレス関連物質の測定:ストレスが負荷されると血中にストレス関連物質(ノルアドレナリン、グルココルチコイド)が分泌される。イムノアッセイ法を用いて、これらのストレス関連分子の血中濃度を計測することにより、拘束ストレス負荷に及ぼすチューイングの影響が血液学的に抽出できた。また副腎重量も測定した。

(4)骨代謝マーカの測定:骨形成マーカとしての血中オステオカルシン、骨吸収マーカとしての型コラーゲン架橋N-プロペプチドを測定した。

(5)骨形成と骨吸収の形態学的分析:カルセインの二重標識により骨形成速度の測定を行った。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ

(TRAP)染色キットを用いて、TRAP陽性破骨細胞の定量解析を行った。

4. 研究成果

(1)無処置の対照群と比較して、ストレス

群では、

- 1) 大腿骨と腰椎の骨量、骨梁幅、骨梁数が有意に低下し、骨梁間隙が有意に増加した。
 - 2) 骨芽細胞数、骨芽細胞面、骨形成速度および血中オステオカルシン濃度が有意に低下した。
 - 3) TRAP 陽性破骨細胞数、破骨細胞面、血中 I 型コラーゲン架橋 N - テロペプチド濃度が有意に上昇した。
 - 4) 副腎重量が有意に上昇し、血中コルチコステロンとノルエピネフリン濃度が有意に上昇した。
- (2) ストレス群に比較して、チューイング群では、
- 1) 大腿骨と腰椎の骨量、骨梁幅、骨梁数が有意な高値を示し、骨梁間隙が有意な低値を示した。
 - 2) 骨芽細胞数、骨芽細胞面、骨形成速度および血中オステオカルシン濃度が有意な高値を示した。
 - 3) TRAP 陽性破骨細胞数、破骨細胞面、血中 I 型コラーゲン架橋 N - テロペプチド濃度が有意に低下した。
 - 4) 副腎重量が有意に減少し、血中コルチコステロンとノルエピネフリン濃度が有意な低値を示した。

これらの結果より、慢性ストレスにおいて、視床下部 下垂体 副腎系および交感神経系が過剰に活動し、骨リモデリングに悪影響を与え骨形成の抑制と骨吸収の促進により骨量が低下し骨粗鬆症に陥る。チューイングが中枢神経系におけるストレス反応を緩和し、骨形成の抑制と骨吸収の促進を改善し、ストレス性骨粗鬆症の進行を抑制しているものと考えられる。

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 11 件)

- 1) Furuzawa M, Chen H, Fujiwara S, Yamada K, Kubo KY. Chewing ameliorate chronic mild stress-induced bone loss in senescence-accelerated mouse (SAMP8), a murine model of senile osteoporosis. *Exp Gerontol* 査読有 55:12-18, 2014.
- 2) Akazaki S, Takahashi T, Nakano Y, Nishida T, Mori H, Takaoka A, Aoki H, Chen H, Kunisada T, Koike K. Three-dimensional analysis of melanosomes isolated from B16 melanoma cells by using ultra high voltage electron microscopy. *Microscopy Research* 査読有 2:1-8,2014.
- 3) Ueda M, Li S, Itoh M, Hayakawa-Yano Y, Wang MX, Hayakawa M, Hasebe-Matsubara R, Ohta K, Ohta E, Mizuno A, Matsumoto M, Chen H, Hida Y, Nakagawa T. Polyglutamine expansion disturbs the endoplasmic reticulum formation, leading to caspase-7 activation through Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有 443: 1232-8,2014.
- 4) Chen H, Senda T, Emura S, Kubo KY. An update on the structure of the parathyroid gland. *The open Anatomy Journal* 査読有 5:1-9, 2013.
- 5) Chen H, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo KY. Age-related changes in trabecular and cortical bone microstructure. *Int J Endocrinol* 査読有 2013: 1-9, 2013.
- 6) Chen H, Wu M, Kubo K. Combined treatment with a traditional Chinese medicine, Hachimi-jio-gan (Ba-Wei-Di-Huang-Wan) and alendronate improves bone microstructure in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol* 査読有 142:80-85, 2012.
- 7) Chen H, Kubo K. Segmental variations in trabecular bone density and microstructure of the spine in senescence-accelerated mouse (SAMP6): A murine model for senile osteoporosis. *Exp Gerontol* 査読有 47:317-322, 2012.
- 8) Zhou X, Wang S, Chen H, Hara T, Yokoyama R, Kanematsu M, Fujita H. Automatic localization of solid organs on 3D CT images by a collaborative majority voting decision based on ensemble learning. *Computerized Medical Imaging and Graphics* 査読有 36:304-313, 2012.
- 9) Kamiya N, Zhou X, Chen H, Muramatsu C, Hara T, Yokoyama R, Kanematsu M, Hoshi H, Fujita H. Automated segmentation of psoas major muscle in X-ray CT images by use of a shape model: preliminary study. *Radiol Phys Technol* 査読有 5:5-14, 2012.
- 10) Chen H, Washimi Y, Kubo KY, Onozuka M. Gender-related changes in three-dimensional microstructure of trabecular bone at the human proximal tibia with aging. *Histol. Histopathol* 査読有 26: 563-570, 2011.
- 11) Hayashi T, Chen H, Miyamoto K, Zhou X,

Hara T, Yokoyama R, Kanematsu M, Hoshi H, Fujita H. Analysis of bone mineral density distribution at trabecular bones in thoracic and lumbar vertebrae using X-ray CT images. J Bone Miner Metab 査読有 29, 174-85, 2011.

〔学会発表〕(計 11 件)

- 1) 陳 華岳、久保金弥、千田隆夫：老化促進マウス SAMP6 における骨細胞・骨細管系の構造解析、第 119 回日本解剖学会・全国学術集会、2014 年 3 月 28 日、自治医科大学
- 2) Chen H, Senda T, Kubo KY: The effects of chewing on the chronic mild stress-induced bone loss in mice、IOF regionals 4th Asia-Pacific osteoporosis meeting、2013 年 12 月 13 日、Hong kong, Convention and ExhibitionCenter, China
- 3) 陳 華岳、千田隆夫、久保金弥：慢性ストレスおよびチューイングによるストレス緩和によるマウス骨の構造、第 73 回日本解剖学会中部支部学術集会、2013 年 10 月 15 日、山梨大学甲府キャンパス
- 4) 倉橋実里、市橋幸子、近藤裕子、大西見佳、鈴木あゆみ、村林知香、森大輔、飯沼光生、田村康夫、陳 華岳、久保金弥：歯の早期喪失が加齢による骨の脆弱に及ぼす影響、第 32 回日本小児歯科学会中部地方会、2013 年 11 月 4 日、朝日大学
- 5) 古澤 学、森 大輔、三宅秀和、片山祐、三村真一、小木曾明、藤原 周、陳 華岳、久保金弥：チューイングがストレス性骨粗鬆症に及ぼす影響、第122回日本補綴学会、2013年5月18日、福岡国際会議場
- 6) Furuzawa M, Mori D, Miyake H, Katayama T, Fujiwara S, Chen H, Kubo KY: Chewing during chronic stress ameliorates stress-induced bone loss. Annual meeting of the International Association for Dental Research. 2013年3月21日mSeattle, Washington, USA
- 7) 陳 華岳、久保金弥、千田隆夫：老化促進マウス SAMP6 における骨構造の変化、第 118 回日本解剖学会・全国学術集会、2013 年 3 月 30 日、かがわ国際会議場
- 8) 久保金弥、佐藤和彦、小萱康徳、陳 華岳：チューイングは母体ストレスの認知機能障害を抑制する、第 118 回日本解剖学会・全国学術集会、2013 年 3 月 29 日、

かがわ国際会議場

- 9) 陳 華岳、久保金弥、千田隆夫：加齢による骨量の減少は骨の種類によって異なる：マイクロ CT によるヒト海綿骨の三次元微細構造観察、第 117 回日本解剖学会・全国学術集会、2012 年 3 月 27 日、山梨大学
- 10) 久保金弥、大西見佳、森大輔、飯沼光生、田村康夫、陳 華岳、唐沢延行、小野塚実：チューイングは胎児ストレス性のカテコールアミンニューロンの発達障害を抑制する、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場
- 11) 陳 華岳、久保金弥、西村剛、高井正成、千田隆夫：椎骨の骨量の加齢変化に関するヒトとサルとの相違、第 72 回日本解剖学会中部支部学術集会、2012 年 10 月 14 日、岐阜じゅうろくプラザ

〔図書〕(計 6 件)

- 1) Hayashi T, Chen H, Miyamoto K, Zhou X, Hara T, Fujita H: Computational Intelligence in Biomedical Imaging. Springer, 159-184, 2014
- 2) Kubo KY, Chen H, Onozuka M: Senescence and senescence-related disorders. Intech Open Access Publisher, 115-132, 2013
- 3) Chen H, Shoumura S: The senescence-accelerated mouse (SAM): Achievements and future directions. Elsevier, 85-94, 2013
- 4) 千田隆夫、陳 華岳、清水洋二：組織細胞化学 2013、日本組織細胞化学会、1-16、2013
- 5) Chen H, Hayashi T, Zhou X, Fujita H, Onozuka M, Kubo KY: Osteoporosis. Intech Open Access Publisher, 181-194, 2012
- 6) 陳 華岳、正村静子：病気の分子形態学、学際企画株式会社、251-253, 2011

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 華岳 (AZUMA, Kagaku)
岐阜大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20273146

(2) 研究分担者

久保 金弥 (KUBO, Kinya)
星城大学・健康支援学研究科・教授
研究者番号：00329492
小野塚 実 (ONOZUKA, Minoru)
神奈川歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号：90084780

(3) 連携研究者

()

研究者番号：