

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：84408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461558

研究課題名(和文)概日リズムによる骨格形成制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of bone metabolism by circadian clock system

研究代表者

川井 正信(カワイマサノブ)(Kawai, Masanobu)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・環境影響部門・主任研究員

研究者番号：50598117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生物時計による骨代謝制御機構の検討を行った。腸管の生物時計に注目し解析を行ったところ、腸管において時計遺伝子であるBmal1を欠損するマウスではカルシウムの能動輸送が低下していた。その機序としては、VDRの時間依存性転写活性化が消失しているためと考えられた。この変異マウスでは、カルシウム能動輸送の低下により、PTHが上昇していた。その結果、骨吸収が亢進し、骨量が減少していた。この変化は、高カルシウム食下では認めなかった。これらの結果は、腸管における生物時計は、カルシウム吸収を制御することで、骨代謝恒常性を維持していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The effects of circadian clock system in the regulation of bone metabolism was investigated using mice lacking Bmal1, a core clock gene, in the intestine (cKO mice). cKO mice displayed impaired Calcium (Ca) absorption associated with elevations in PTH levels. Mechanistically, VDR showed rhythmic transcriptional pattern in the intestine, and this was disappeared in cKO mice. Skeletal phenotyping of cKO mice revealed decreases in bone mass associated with enhanced bone resorption. Additionally, decreased bone mass was not observed when mice were fed with high Ca diet. Collectively, these findings suggest that circadian clock system in the intestine regulates bone metabolism by fine-tuning Ca absorption.

研究分野：小児内分泌学

キーワード：生物時計 Bmal1 VDR カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、生物時計の破綻が、種々の代謝異常の原因となることが報告されている。例えば、シフトワーカーでは、肥満、動脈硬化の罹患頻度が高いことが疫学的に証明されている。一方、骨代謝マーカーや骨代謝の重要な要素であるミネラル(カルシウム、リン)の血中濃度には日内変動が存在することが知られており、このことは骨代謝もまた生物時計により制御を受けている可能性があることを示唆している。しかし、生物時計と骨代謝の関連性はほとんど研究が行われてこなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、生物時計による骨代謝制御機構を解明するために、骨代謝の重要な要素であるカルシウム(Ca)代謝に注目し、生物時計によるCa、骨代謝制御機構の検討を行った。

## 3. 研究の方法

### A. モデルマウスの作出

生物時計によるCa制御機構を解明するにあたり、時計遺伝子であるBmal1を腸管特異的に欠損するマウスを用いて検討を行った。腸管特異的Bmal1欠損マウス(cKOマウス)は、Bmal1-floxマウスとVillin-Creマウスを交配することにより作出した。

### B. cKOマウスの表現型の解析

十二指腸における遺伝子発現を定量RT-PCR法を用いて解析した。サンプルは4時間ごとに十二指腸の絨毛から採取した。十二指腸におけるCa能動輸送を腸管反転法を用いて解析した。血清を4時間ごとに採取し、血清カルシウム、PTH、CTXの濃度を測定した。骨表現型に関しては、16週令の雄マウスから大腿骨を回収し、マイクロCTに供した。また、カルセインの二重ラベリングを実施し、骨形態計測も行った。

### C. 時計遺伝子によるVDR機能制御の解析

時計遺伝子ClockおよびBmal1とVdrの関連性の検討を行った。共免疫沈降法、ルシフェラーゼアッセイ、クロマチン免疫沈降法を行い、Clock/Bmal1とVDRの機能的、物理的関連性の検討を行った。

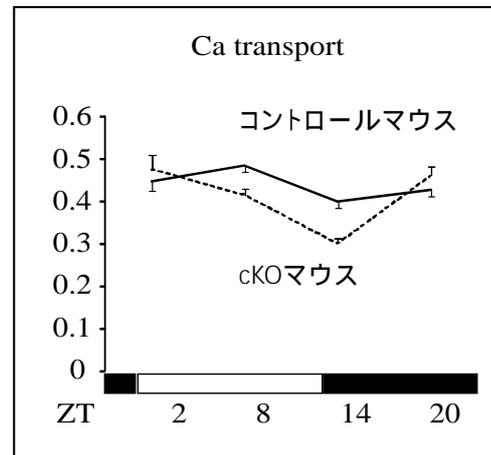
## 4. 研究成果

### A. 腸管特異的Bmal1欠損マウスでは、Ca吸収が低下している。

cKOマウスにおける腸管でのCa吸収機構を検討した。まず、時計遺伝子の発現パターンを検討したところ、cKOマウスではBmal1、Per1、Dbp、Rev-erbaなどのリズム性発現パターン

が消失していた。

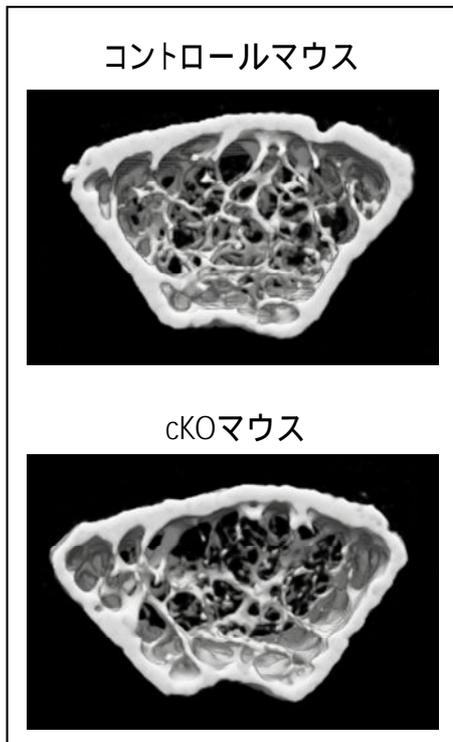
次に、Caの吸収に関わる遺伝子群の発現を十二指腸で検討したところ、Trpv6、Calbindin D9kなどの遺伝子は、コントロールマウスでは明暗移行期にピークを有していたが、cKOマウスではそのピークが減弱していた。これらの遺伝子は、Vdrにより制御されているため、Vdrの発現も併せて検討したところ、同様の発現パターンであった。これらの結果から、cKOマウスではCaの能動輸送が低下していると考えられたため、腸管反転法を用いて十二指腸におけるCaの能動輸送を検討したところ、下図のように、cKOマウスではCa能動輸送の低下を認めた。



B. 腸管特異的Bmal1欠損マウスでは、Ca吸収が低下に伴う代償性機構が働いている。上記の通り、cKOマウスではCa能動輸送の減少を認めたが、血液中Ca濃度は維持されていた。この結果から、代償性機構によりCa濃度が維持されていると考えられた。実際、尿中Ca排泄は減少し、活性型ビタミンD濃度、PTH濃度も上昇していた。

### C. 腸管特異的Bmal1欠損マウスでは骨吸収亢進に伴い、骨量が減少している。

cKOマウスでPTHが上昇していたことから、代償性骨吸収機構により、血液中Ca濃度を維持していると考えられた。実際、骨吸収マーカーである血液CTX濃度はcKOマウスで増加していた。そこで、骨表現型をマイクロCTで検討したところ、cKOマウスでは海綿骨量が減少していることが判明した(下図)。骨形態計測から、cKOマウスでは、破骨細胞数の増加、骨吸収面の増加を認めた。これらの結果は、腸管でBmal1が欠損すると、Ca能動輸送が減少し、血液中Ca濃度を維持するために、骨吸収が亢進し、その結果骨量が減少すると考えられた。



#### D. 時計遺伝子による Vdr 制御機構

時計遺伝子による Vdr およびその標的遺伝子の制御機構の解析を行った。共免疫沈降法およびレポーターアッセイから時計遺伝子 Clock は Vdr と結合し、Vdr の転写活性を増強する作用を有することが分かった。また、ChIP アッセイから、Clock は Vdr、Cyp24a1、Trpv6 の VDRE と時間依存性に結合することも判明した。そして Bmal1 非存在下では、Clock そのものが核内へと移行できないために、Clock による Vdr の機能促進作用が消失すると考えられた。

#### 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8件)

- 1, Kawai M (Corr Author), Kinoshita S, Shimba S, Ozono K, Michigami T: Sympathetic Activation Induces Skeletal Fgf23 Expression in a Circadian Rhythm-dependent Manner. *J Biol Chem.* 17;289(3):1457-66, 2014
- 2, Ohata Y, Yamazaki M, Kawai M, Tsugawa N, Tachikawa K, Koinuma T, Miyagawa K, Kimoto A, Nakayama M, Namba N, Yamamoto H, Okano T, Ozono K, Michigami T: Elevated

Fibroblast Growth Factor 23 Exerts Its Effects on Placenta and Regulates Vitamin D Metabolism in Pregnancy of Hyp Mice. *J Bone Miner Res.* 29(7):1627-3, 2014

3, Miyagawa K, Yamazaki M, Kawai M, Nishino J, Koshimizu T, Ohata Y, Tachikawa K, Mikuni-Takagaki Y, Kogo M, Ozono K, Michigami T.

Dysregulated gene expression in the primary osteoblasts and osteocytes isolated from hypophosphatemic hyp mice. *PLoS One.* 2014 Apr 7;9(4):e93840, 2014.

4, Yamazaki M, Kawai M, Miyagawa K, Ohata Y, Tachikawa K, Kinoshita S, Nishino J, Ozono K, Michigami T. Interleukin-1-induced acute bone resorption facilitates the secretion of fibroblast growth factor 23 into the circulation. *J Bone Miner Metab.* 33:342-54, 2015

5, Kawai M (Corr Author): The FGF23/Klotho axis in the regulation of mineral and metabolic homeostasis *Horm Mol Biol Clin Invest.* 1;28:55-67, 2016

6, Kinoshita S and Kawai M (Corr Author): The FGF23/KLOTHO regulatory network and its roles in human disorders. *Vitam Horm.* 101:151-174, 2016

7, Kawai M (Corr Author), Kinoshita S, Ozono K, Michigami T: Inorganic Phosphate Activates the AKT/mTORC1 Pathway and Shortens the Life Span of an -Klotho-Deficient Model. *J Am Soc Nephrol.* 27(9):2810-24, 2016.

8, Nishino J, Yamazaki M, Kawai M, Tachikawa K, Yamamoto K, Miyagawa K, Kogo M, Ozono K, Michigami T: Extracellular Phosphate Induces the Expression of Dentin Matrix Protein 1 Through the FGF Receptor

in Osteoblasts. J Cell Biochem.

118(5):1151-1163, 2017.

〔学会発表〕(計2件)

1. シンポジウム 若手シンポジウム内科系  
生物時計による骨ミネラル代謝制御機構  
第34回日本骨代謝学会学術集会 2016年  
7月20日-7月23日、大阪国際会議場
2. 一般演題 第1回 Neo Vitamin D  
Workshop 学術集会、生物時計による骨カ  
ルシウム代謝制御機構の解明、2015年8  
月28日-8月29日、大津プリンスホテル

〔図書〕(計0件)

〔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

川井正信 (KAWAI MASANOBU)  
大阪府立母子保健総合医療センター研究  
所 環境影響部門 主任研究員  
研究者番号：50598117