

スポーツによる相対的エネルギー不足 (RED-S) による 骨髄間葉系幹細胞機能変容の解明

池 戸 葵*

THE FUNCTIONAL CHANGE OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS BY RELATIVE ENERGY DEFICIENCY IN SPORT (RED-S)

Aoi Ikedo

Key words: Cxcl12 abundant reticular (CAR) cells, bone marrow fat, Foxc1, Runx2.

緒 言

Relative energy deficiency in sport (RED-S) とは、相対的なエネルギー不足によって引き起こされる生理機能障害で、代謝率、月経機能、骨代謝、免疫、タンパク質合成、心血管機能等の障害を含むが、これらに限定されないと定義付けられた症候群である⁶⁾。なかでもエストロゲン分泌異常による骨量減少や、免疫機能の低下、貧血等はアスリートのパフォーマンス低下に直結するため、RED-S の予防・改善はスポーツ界における重要課題である。

RED-S を模倣したエネルギー制限状態で自発運動をさせるマウスの実験では、エネルギー制限のみの条件より、更に骨量が減少することが報告されている³⁾。また、エネルギー不足状態では骨髄脂肪が増加し、骨髄脂肪量は骨量と負の相関を示す⁹⁾。エネルギー制限による骨髄脂肪量の増加は、運動を加えると軽減されるものの、骨量の増加はみられないことも示されている⁵⁾。更に、骨は体の支持組織としてだけでなく、骨髄で起こ

る造血や免疫細胞の分化・成熟に必須の臓器である。先行研究において、エネルギー不足状態の骨髄では、メモリー T 細胞が集積し、免疫記憶を保護する役割をもつことが示唆されている¹⁾。このように、エネルギー不足下では、骨量減少だけでなく、免疫防御機構を維持するための骨髄環境も大きく変化する。

骨髄中に存在する Cxcl12 abundant reticular cells (CAR 細胞) は、造血幹細胞・前駆細胞ニッチ形成と維持に必須であるだけでなく、骨芽細胞や脂肪細胞に分化可能な骨髄間葉系幹細胞である⁷⁾。そこで筆者は、エネルギー不足状態での運動による CAR 細胞の機能変容が、RED-S による生理機能の変化の一部を説明する可能性を考えた。しかし、エネルギー制限や運動によって CAR 細胞の機能が変化するかどうかは不明である。以上のことから、本研究では、CAR 細胞の機能がエネルギー制限下における運動で、どのように変化するかをマウスモデルを用いて明らかにすることを目的とした。

* 愛媛大学プロテオサイエンスセンター病態生理解析部門 Division of Integrative Pathophysiology, Proteo-Science Center, Ehime University, Ehime, Japan.

方 法

A. 実験動物

本研究は、愛媛大学動物実験規則に基づき、愛媛大学動物実験委員会の承認を得て、実施された（承認番号：37A1-1・16）。本実験は、4週齢のC57BL/6Jc1雌マウスを1週間の予備飼育をした後に実施した。

B. 食餌制限および運動介入

予備飼育後、5週齢の雌マウスを①通常飼育群（CON, $n = 10$ ）、②食餌制限群（DR, $n = 10$ ）、③通常食 + 運動群（CON+ex, $n = 10$ ）、④食餌制限 + 運動群（DR+ex, $n = 10$ ）の4群に分けた。DRおよびDR+ex群には、CONおよびCON+ex群の摂餌量の60%を与えた。また、CON+exおよびDR+ex群のケージ内には、ランニングホイールを設置し自由にアクセスできるようにした。これらの介入を5週間実施した（図1A）。

C. 骨密度および骨構造解析

骨密度（BMD）の評価をDual-energy X-ray Absorptiometry（DXA）（DCS-600EX, ALOKA）を用いて実施した。骨密度は骨全体および、骨全体を20分割した各部位を評価した。骨微細構造の測定を μ CT（SCANCO Medical）を用いて実施し、海綿骨および皮質骨に分けて評価した。

D. 血液検査

血液検査は、白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン（HGB）、ヘマトクリット（HCT）を評価した。これらの検査は、岡山理科大学生物医科学検査研究センターに委託した。

E. CAR細胞の単離および遺伝子発現解析

骨サンプルから骨髓を採取し、フローサイトメトリー法を用いてCAR細胞を単離した。CAR細胞を標識する抗体には、CD31（102406, BioLegend）、CD45（103108, BioLegend）、Sca1（122508, BioLegend）、PDGFR β （BAF1042, R&D Systems）を用いた。単離したCAR細胞からRNAを抽出し、逆転写酵素を用いてcDNAに合成した。これを用いてRT-qPCRを行い、遺伝子発現を評価した。

F. オスミウム染色

骨髓中の脂肪量を評価するために、オスミウム染色を実施した。脛骨を採取し、4% PFAで一

晩固定した後、0.1 M EDTAに2週間浸漬し、脱灰を行った。脱灰された脛骨を5%重クロム酸カリウムと2%四酸化オスミウムを1:1で混合した溶液に48時間浸漬し染色した。染色した脛骨は μ CTを用いて撮影し、骨髓脂肪量を評価した。

G. 統計解析

すべてのデータは、平均 $\pm$ 標準偏差で示した。統計解析は、GraphPad Prism 9を用いて、2群間の比較にはUnpaired t test with Welch's correctionを、3群間の比較にはBrown-Forsythe and Welch ANOVA testを行い、post-hocはDunnett T3を実施した。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

A. 体重、組織重量、血液指標の変化

5週間の介入期間中、CONおよびCON+exは体重増加を続ける一方で、DRおよびDR+exの体重は1週目で急激に減少し、2週目以降は維持された（図1B）。DR+exの走行距離は、CON+exと比較して、有意に少なかった（図1C）。各組織重量は、CONおよびCON+exと比較して、DRおよびDR+exで有意な減少を認めた（図1D-F）。また、血液検査の結果、WBCは、CONおよびCON+exと比較して、DRおよびDR+exで有意な減少を認め、DR+exは、DRより、更に有意な低下を認めた。RBC、HGB、HCTは、DRおよびDR+exで増加が認められた（図1G）。

B. 骨長、骨密度、骨髓脂肪量、骨構造の変化

骨長および骨密度は、CONおよびCON+exと比較して、DRおよびDR+exで有意な減少を認めた（図2A-C）。骨髓脂肪量（AV/TV）は、CONおよびCON+exと比較して、DRおよびDR+exで有意な増加を認めた（図2D）。骨構造解析では、皮質骨における、骨量（BA/TA）、骨密度（Ct. BMD）、皮質骨幅（Ct. Th）は、CONおよびCON+exと比較して、DRおよびDR+exで有意な減少を認めた。一方で、DRおよびDR+exは、CONおよびCON+exと比較して、海綿骨における骨量（BV/TV）および連結性密度（Conn-Dens.）は有意に増加し、Structure model index（SMI）は有意に低下した。骨密度（Tb. BMD）は、CONと比較して、DRおよびDR+exで有意に増加した。

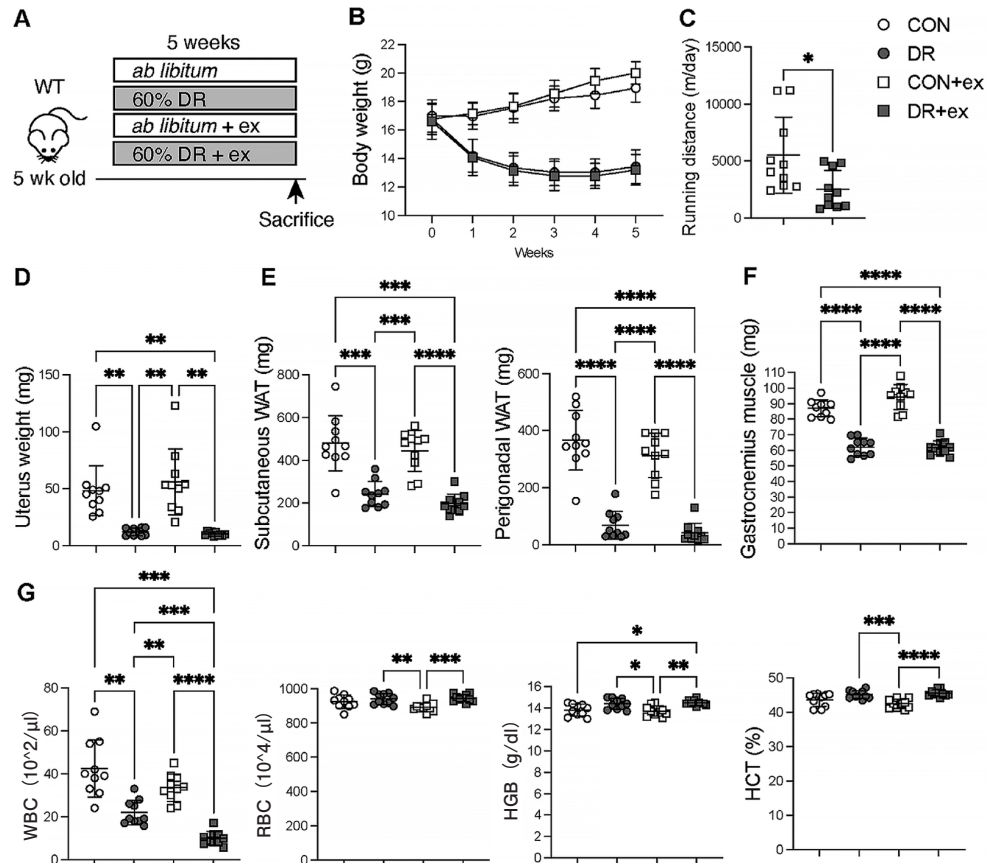


図1. 体重、走行距離、組織重量、血液指標の変化

Fig.1. The change of body weight, running distance, tissue volume, and blood parameters.

A: Study protocol. B: Body weight during study period. C: Running distance. D-F: Tissues volume of uterus, subcutaneous and perigonadal white adipose tissue (WAT), and gastrocnemius muscle. G: Blood parameters.

WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, HGB; hemoglobin, HCT; hematocrit.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

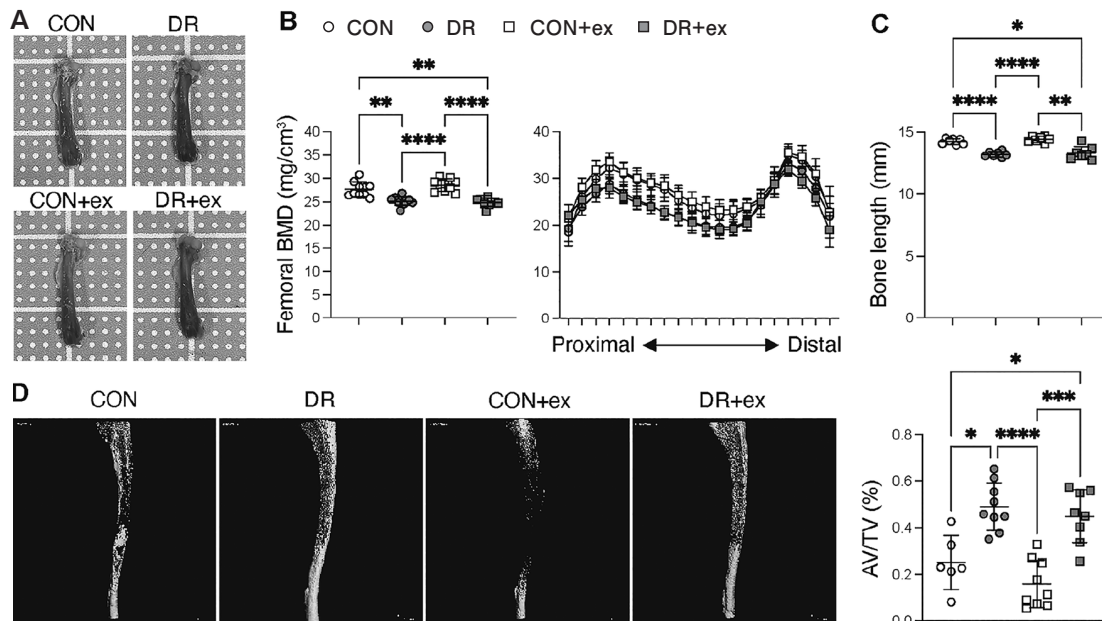


図2. 骨長、骨密度、骨髄脂肪量の変化

Fig.2. The change of bone length, bone mineral density (BMD), bone marrow fat.

A: Representative image of the bones of each group. B: Total femoral BMD (left) and BMD at each site when the bone is divided into 20 sections. C: Bone length. D: Representative image of the bone marrow fat of each group (left) and quantitative data (right).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

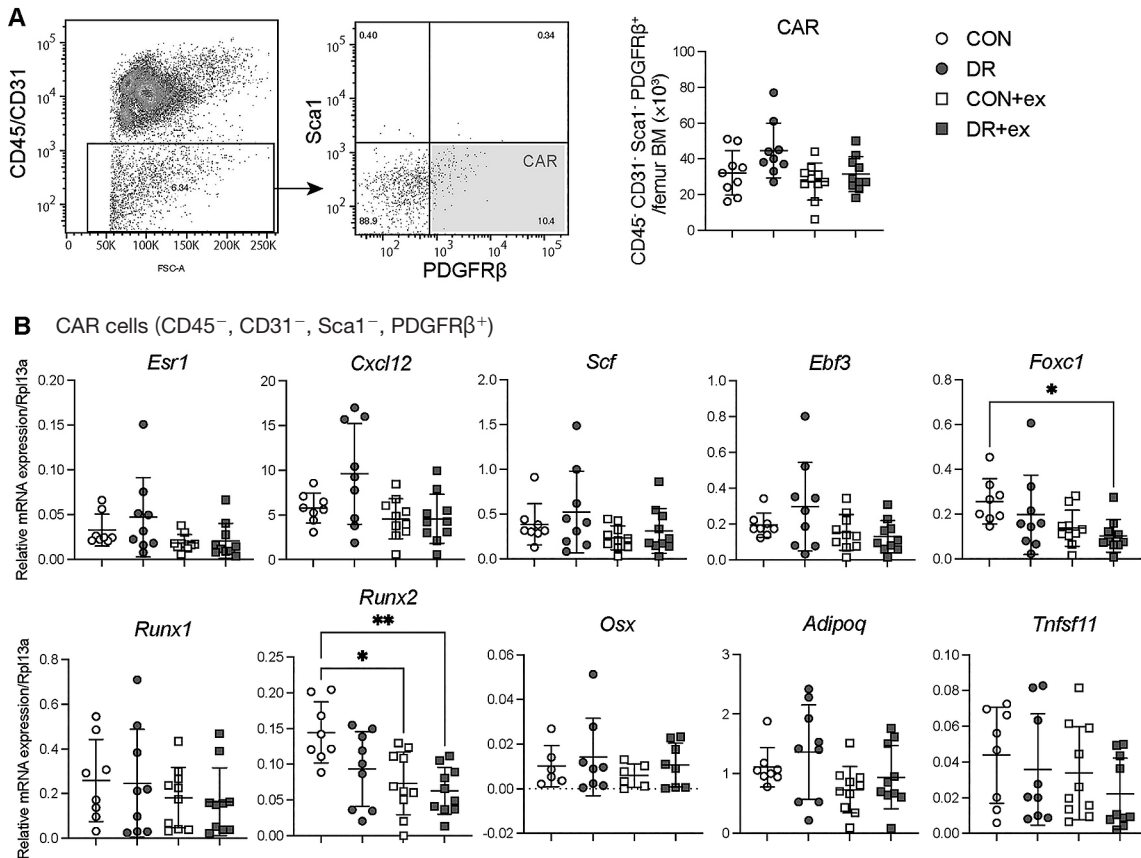


図3. 骨髄中の CAR 細胞数および CAR 細胞の遺伝子発現

Fig.3. CAR cells number in bone marrow and gene expression in CAR cells.

A: FACS gate for isolation of CAR cells (left) and quantitative data (right). B: Gene expression level in CAR cells.

* P < 0.05, ** P < 0.01.

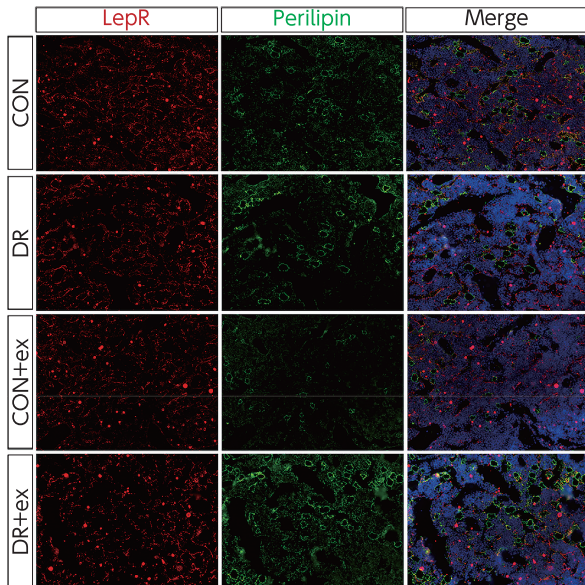


図4. 骨髄の免疫組織化学染色

Fig.4. Immunofluorescent staining of bone marrow.

LepR: CAR cells, Perilipin: adipocyte, blue is DAPI (nuclei).

これらの結果は、全体の骨密度および皮質骨量が減っていることから、皮質骨が海綿骨化し、海綿骨量が増加したと考えられる。

C. CAR 細胞の遺伝子発現変化

各条件における CAR 細胞の遺伝子発現変化を確認するために、セルソーターを用いて、CAR 細胞を単離した。骨髄中の CAR 細胞数に、群間で有意な差は認められなかった (図 3 A)。CAR 細胞の主要なマーカーおよび、骨芽細胞および脂肪細胞への分化を調節する遺伝子について、発現変化を確認した。その結果、CON と比較して、DR+ex では、CAR 細胞の脂肪分化を抑制する *Foxc1* および骨芽細胞分化を促進する *Runx2* の有意な減少が認められた (図 3 B)。

D. 免疫組織化学染色

各条件における骨髄中の変化を免疫組織化学染色により観察した。LepR 陽性細胞 (CAR 細胞: 赤) の割合に群間で大きな変化はみられないものの、Perilipin 陽性細胞 (脂肪細胞: 緑) の割合は、DR および DR+ex で増加しており、オスミウム染色の結果と類似していた (図 4)。

考 察

本研究では、エネルギー制限下における自発走運動により、CAR 細胞の機能がどのように変容するのかを検証した。その結果、DR+ex において、CAR 細胞の脂肪細胞への分化を抑制する *Foxc1* 遺伝子発現および、骨芽細胞への分化を促進する *Runx2* 遺伝子発現の減少により、CAR 細胞の骨髄脂肪への分化が促進し、骨芽細胞への分化が抑制される可能性が考えられた。

DR+ex では、DR よりも更に末梢血における WBC が減少した。先行研究において、閉経前女性の血中 WBC 数と骨髄脂肪量の間に負の相関を認めることが報告されている⁸⁾。また、絶食やエネルギー制限下では、造血細胞の血液循環量が減り、骨髄に戻ることが観察されており、これは、エネルギー不足時に免疫防御機構を保つための免疫代謝反応であると考えられている。更に、エネルギー不足時の骨髄脂肪細胞の増加は、造血細胞の維持に寄与する可能性が示唆されている²⁾。したがって、本研究で認められた DR+ex の WBC の減少は、運動によりエネルギー消費量が増えることで、DR よりもエネルギー不足状態が深刻になり、造血細胞の免疫防御機構が強く働いた可能性が考えられた。加えて、DR+ex にみられた CAR 細胞の *Foxc1* 遺伝子の発現減少は、骨髄中の脂肪細胞を増やし、免疫防御機構を維持するための反応である可能性も考えられた。

CON および CON+ex と比較して、DR および DR+ex の骨密度および皮質骨量は減少し、骨髄脂肪は増加することが認められた。しかし、DR および DR+ex の間に有意な差は認められなかった。これは先行研究の結果と一部一致していない^{3,5)}。この理由として、DR+ex の走行距離が CON+ex と比較して短かったことや、使用した実験機器の影響等が考えられた。一方で、DR および DR+ex において、海綿骨量の増加が認められた。これは、エネルギー不足により皮質骨の多孔化が進み、皮質骨が海綿骨化している可能性が考えられた。詳細については、今後更なる検証が必要である。

CAR 細胞は、DR+ex において、*Foxc1* および

Runx2 遺伝子の発現減少が認められた。*Foxc1* は、CAR 細胞特異的な転写因子であり、骨髄中の造血幹細胞および造血幹細胞前駆細胞を維持し、CAR 細胞が脂肪細胞に分化するのを抑制する働きをもっている⁷⁾。したがって、本研究における DR+ex の CAR 細胞は、*Foxc1* 遺伝子の発現減少により、脂肪細胞への分化が容易であることが示唆された。また、*Runx2* は、骨芽細胞分化に必須の転写因子である⁴⁾。CAR 細胞における *Runx2* の役割については、いまだ不明な点も残されているが、DR+ex の CAR 細胞では、*Runx2* 遺伝子の発現減少により、CAR 細胞の骨芽細胞への分化が損なわれ、骨量低下に繋がっている可能性が考えられた。

総 括

本研究の結果から、エネルギー制限下における運動は、CAR 細胞の分化を制御する遺伝子発現を変化させ、骨量減少および骨髄脂肪の増加を引き起こす可能性が考えられた。今後は、CAR 細胞を始めとした骨髄間葉系細胞の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、エネルギー制限下における運動が骨髄ニッチおよび生理機能に及ぼす影響を明らかにする。

謝 辞

本研究は、公益財団法人明治安田厚生事業団のご支援を賜り実施いたしました。関係者の皆さまに厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Collins N, et al. (2019): The bone marrow protects and optimizes immunological memory during dietary restriction. *Cell*, **178**(5), 1088-1101. e15.
- 2) Goldberg EL, et al. (2019): Bone marrow: an immunometabolic refuge during energy depletion. *Cell Metab*, **30**(4), 621-623.
- 3) Ito E, et al. (2021): Food restriction reduces cortical bone mass and serum insulin-like growth factor-1 levels and promotes uterine atrophy in mice. *Biochem Biophys Res Commun*, **534**, 165-171.
- 4) Komori T, et al. (1997): Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, **89**(5), 755-764.
- 5) McGrath C, et al. (2020): Exercise degrades bone in

- caloric restriction, despite suppression of marrow adipose tissue (MAT). *J Bone Miner Res*, **35**(1), 106-115.
- 6) Mountjoy M, et al. (2014): The IOC consensus statement: beyond the Female Athlete Triad - Relative Energy Deficiency in Sport (RED-S). *Br J Sports Med*, **48**(7), 491-497.
- 7) Omatsu Y, et al. (2021): Identification of microenvironmental niches for hematopoietic stem cells and lymphoid progenitors-bone marrow fibroblastic reticular cells with salient features. *Int Immunol*, **33**(12), 821-826.
- 8) Polineni S, et al. (2020): Red and white blood cell counts are associated with bone marrow adipose tissue, bone mineral density, and bone microarchitecture in premenopausal women. *J Bone Miner Res*, **35**(6), 1031-1039.
- 9) Shen W, et al. (2007): MRI-measured bone marrow adipose tissue is inversely related to DXA-measured bone mineral in Caucasian women. *Osteoporos Int*, **18**(5), 641-647.