

表1 1年間の全身骨密度(BMD)、骨塩量(BMC)の変動

(n=41)

		開始時 (18.7歳)	1年後 (19.7歳)	
BMD	(g/cm ²)	1.155±0.075	1.152±0.074	p=0.013
BMC	(g)	2311±284	2321±290	NS
Ca intake	(mg/day)	501±178	700±243	p<0.0001

表2 骨量が増加した群と減少した群の比較

		減少群 n=16	増加群 n=25	
Ca intake	(mg/day)	653±265	730±229	NS
ΔBF%	(%)	-0.9±2.6	0.9±2.1	NS
ΔBMD	(g/cm ²)	-0.011±0.002	0.001±0.002	p<0.0001
ΔBMC	(g)	-34±21	38±28	p<0.0001
尿中 NTX	(nmolBEC/mmol.CRE)	62±24	47±13	p<0.016
血清 25(OH)D	(ng/ml)	26±5	22±5	p=0.03

表3 Ca摂取量が700mg以上であるにも関わらず
骨量が減少した対象者の特徴

		700mg 以上 n=7	700mg 未満 n=9		
Ca intake	(g/day)	858±188	493±198	p=0.02	
PTH	(pg/ml)	34±7	40±9	NS	
OC	(ng/ml)	5.9±1.7	8.2±2.6	p=0.064	
NTX	(nmolBEC/mmol.CRE)	44±15	76±19	p=0.003	
DPD	(nmol/mmol.CRE)	6.3±2.1	8.5±1.2	p=0.021	
25(OH)D	(ng/ml)	29±5	24±5	p=0.094	
1,25(OH) ₂ D	(pg/ml)	59±14	50±10	NS	
尿中 44Ca	4h	(mg)	0.599±0.262	0.802±0.125	p=0.058
	8h	(mg)	0.586±0.269	0.795±0.170	p=0.078
	4h+8h	(mg)	1.185±0.505	1.597±0.218	p=0.044

若年女性における各種栄養摂取量・身体活動量・リスクファクターと骨密度に関する研究

分担研究者 太田 博明 東京女子医科大学産婦人科学教室

研究要旨

現在、高齢女性を中心として増加している骨粗鬆症は、骨折および骨密度によって診断される疾患である。この骨密度に関しては、若年において高い値を獲得することでその cut-off 値への到達を遅らせることができ、その結果、治療の開始を延期しうる。そのため若年層での高骨密度の獲得は治療対象者の減少に大きな効果をもたらすものと考えられる。一方で高い骨密度を獲得するためには、適度の運動や各種の必要な栄養素を適量摂取すること等、いわゆるライフスタイルの管理が重要とされている。しかしながらこれまでの研究報告では、明確な因子の選別が行われていない。

本研究は、若年女性における各種栄養素の摂取量および身体活動量と骨密度を横断的に調査し高骨密度獲得の方法論を明確化することを目的としている。

本報告書ではその途中経過を報告する。

A. 研究目的

日本人若年女性におけるカルシウムなどのミネラルと D や K などのビタミンおよび各種栄養素の摂取量・身体活動量・骨粗鬆症のリスクファクターをアンケート調査によって把握し、背景や採血情報、身体活動計測値とあわせ、骨密度との関連を横断研究的手法によって明らかにし、高骨密度獲得の因子を明確化すること、また、年齢別の骨密度から最高骨密度(peak bone mass)獲得年齢を明確化することを目的とする。

B. 研究方法

1. 対象

以下の適格条件に合致し、除外規準を除く症例を対象とした。

適格条件

- 1) 18 歳以上 25 歳以下の女性(健常人)ボランティアであること
- 2) 研究に関する文章同意を取得しうること

除外規準

- 1) 骨量に影響を及ぼす疾患を有し治療中であること
- 2) 食事・運動療法を実施中であること
- 3) 質問への回答が不可能であること

2. 同意の取得

適格条件に合致し、除外基準を含まない対象者に対し、調査開始前に文章にて同意を取得した。なお未成年者の場合、保護者からも同意を取得した。

3. 調査

以下の項目に関する調査票を作成し、対象者自身による記入を行うとともに各検査値の集合測定を行った。

1) 背景情報

年齢、出生時体重・週数、初経年齢、現在の月経の状況の記入を依頼した。

2) 検査値

以下の項目を測定した。

①身体測定:身長、体重、ウエスト・ヒップ径

②骨密度

使用機器として QDR4500 を用い、腰椎 L2-4 骨密度、大腿骨近位 total 骨密度を測定した。

③運動量

使用機器として SUZUKEN LIFECORDER EX を用い、1 週間の装着によって歩数・運動強度を測定した。

④採血

採血を実施し SRL によって Ca、P、ALB、intact/Glu-OC、NTX、BAP を測定した。また OPG、sRANKL は大学内の ELISA 測定系により測定した。

3) 対象者へのアンケート調査

以下の調査票を配布し、記入を依頼した。回収後未記入項目に対し、再調査を行った。

- ①食習慣調査:「自記式食事歴法質問表」¹⁾ (DHQ: (self-administered diet history questionnaire)) を用い、総エネルギーおよび各種栄養素の含有量を調査した。
- ②身体活動量調査: Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study (JALS) Physical Activity Working Group が作成した「身体活動量質問紙」を一部改変し、種目別および総エネルギー量、過去の運動歴を調査した。
- ③リスクファクター: これまである各種の報告から骨粗鬆症への関与が予想される項目を抽出し、独自の「リスクファクター質問表」を作成し、yes/no の調査を行った。質問は 10 項目とし、その内容を以下に示す。
 - ・骨粗鬆症の家族歴あり
 - ・ダイエットの経験がある
 - ・乳製品嫌い
 - ・やせ型である
 - ・低身長である
 - ・運動が嫌い
 - ・喫煙習慣がある
 - ・飲酒習慣がある
 - ・コーヒーを多く飲む
 - ・ステロイド薬を服用している

4. 解析方法

1) 背景・検査値と骨密度の関係

対象の腰椎 L2-4 骨密度を 4 分位法によって 4 等分し、最高値から 3/4 を High-group (H-group)、最低値から 1/4 を Low-group (L-group) とし、H/L-group 別の背景情報比較を行った (t 検定)。

2) リスクファクターと骨密度の関係

回答 yes/no 別の腰椎 L2-4 骨密度を t 検定により比較した。

3) L-group をケースとし、ロジスティック回帰 (ステップワイズ法) によって低骨密度に対する因子分析を行った。

5. 倫理的事項

1) インフォームド・コンセント

登録に先立って、施設の倫理審査委員会で承認が得られた説明文章を対象者に渡し、以下の内容を口頭にて説明した上で、文章による同意を得た。

- ①この調査研究の目的は、摂取栄養素・日常活動量・リスクファクターと骨密度の関係に関し確認するものであること
- ②調査研究における依頼事項は質問票への記入・採血・身体測定であること
- ③参加されなくてもなんら不利益を受けないこと
- ④プライバシーは保護されること

2) プライバシーの保護と対象者識別

施設外への情報のやりとりは、郵送あるいは直接手渡しすることを原則とした。情報管理者の指示の下、集計担当者は集積された情報を連結可能匿名化し、作成した対応表は外部記憶装置に保存し、鍵のかかるキャビネットに保管した。鍵は情報管理者が管理した。上記の対応表や情報を廃棄する場合は、連結不可能匿名化し、焼却処分することとした。

C. 研究結果

1. 対象者の背景

2003 年 10 月から 2004 年 2 月の間に東京女子医科大学看護学部、同専門学校において研究説明を行った。ボランティアとして同意が取得され、調査に参加した対象者数は 139 例であった。対象者の背景情報を表 1 に示す。

対象の平均年齢および標準偏差は 21.1 ± 1.3

歳であり、20 歳を中心とする調査対象が得られたことが確認された。出生時体重の平均は 3101g、初経年齢平均は 12.0 歳であった。身長に比べ体重の分布の幅は広がった。また、月経の異常を訴える対象は 28 例(20.0%)であった。

腰椎 L2-4 および大腿骨 total の平均骨密度はそれぞれ 0.90 および 0.99g/cm² であった。腰椎 L2-4 の測定値を用い、骨密度に関する 4 分位解析を行ったところ下方 1/4 区分値として 0.92g/cm² が得られ、これ以下の値を有する対象を L-group として規定した。

2. 各因子と骨密度の関係

骨密度 H/L-group 別の各因子の測定値を表 2 に示した。

これらのうち、H/L-group 別で有意な差を示した項目は身長、体重、BMI、出生時体重、身体活動調査における総エネルギー、ライフコーダーによる消費エネルギー、栄養調査におけるコレステロール、P であった。例えば、L-group では身長が有意に低く(p<0.01)、体重が軽く(p<0.01)、出生時体重が軽い(p<0.05)ことが分かった。

3. リスクファクター

リスクファクターと想定される質問項目に対する回答結果(yes/no)別の骨密度を表 3 に示した。これらの項目のうち、ダイエットの経験がある対象群はない対象と比較して骨密度が有意に低かった(p<0.05)。また低身長である、と回答した対象群は、そうでない、と回答した群に比較し有意に骨密度が低かった(p<0.01)。

4. 低骨密度に関する要因の解析

低骨密度の規定因子を明確化するために、L-group をケースとするロジスティック回帰分析を行った。なお分析に供する説明因子の中で、同じ意味を持つ項目がある場合、実数を持つ結果を選択した(例)リスクファクター調査における「低身長である」の結果は身長の測定値のみを選択する)。また、ステップワイズ法を用い、独立した説明変数のみを抽出した。結果を表 4 に示す。

L-group をケースとする解析から、背景情報のう

ち、BMI、初経年齢、出生時体重が選ばれた。また身体活動調査項目からは、アンケート結果に基づく総エネルギーおよび過去の運動歴が選ばれた。食習慣調査からは総エネルギー量、Ca 摂取量、海草の摂取量が選ばれた。これらはそれぞれ独立して骨密度に影響を与えることが判明した。

5. 骨密度の年齢別分布

腰椎 L2-4 骨密度および大腿骨 total 骨密度と年齢の関係を図 1, 2 に示す。

対象の年齢範囲内では特定の極大値は認められなかった。

D. 考察

骨粗鬆症とは骨強度が著明に低下し、骨折リスクが増大する骨疾患であり、骨強度は骨密度と骨質の両側面を総合的に反映して現れるものである^{2,3)}。そして最終的な治療の endpoint は骨折の防止にあることは周知のこととなっている。しかしながら、高齢者における骨折の発生頻度は低く、年間あたり 5~10%の発生しか認められない。そのため surrogate の endpoint として骨密度が診断や治療の指標に用いられ⁴⁾、さらに最近の研究によって、新規に発生する骨折に対し年齢、既存骨折、骨代謝マーカーも独立して影響していることが判明している⁵⁾。

近年開発された治療薬によって、骨密度および骨代謝マーカー値は有意に改善することが可能な時代となった。その結果、高い骨折の可能性を有する患者を未然に救う手段が見出されつつある。

一方で骨粗鬆症は生活習慣病であり、生活の是正・改善によってその予防が可能である、との考えがある。この考えの基になる見解は、「骨密度は 20 歳前後まで経時的に増加し、その後 44 歳まで一定の値を保つ」、「若年者の間に高い骨密度を得ることで将来の急激な骨密度低下が予防できる」、「骨密度の獲得には適度の運動と栄養摂取が必要である」の 3 点にある。しかしながらこれらに対する明確な根拠は数が少ない⁶⁾。そこで、

本研究では以下の 2 点に関し焦点を絞り調査を実施した。

- ①最高骨密度はいつ得られるか？
- ②高い骨密度獲得のための因子は何か？
生活習慣による予防の可能性はあるか？

本研究の結果、骨密度に対する影響因子が明確化された。その中で自身の努力によって骨密度を変化しうるものとして以下のものが存在した。

- ・BMI:体重を調整する
- ・活動の総エネルギー:普段の運動習慣を身につける
- ・過去の運動歴:学生時代に運動を行う
- ・摂取総エネルギー量:食事のカロリー量をコントロールする
- ・Ca 摂取量・海藻の摂取量:食事のバリエーションを考える

また、初経年齢、出生時体重は自身による調整は行い得ないものの、補助的な情報として重要なものと考えられた。一方で、血液から得られる情報からは明確な影響因子は見出せなかった。

今後これらの情報を活用することで、高骨密度獲得の方法論が構築できるものと推測する。

今回の研究では骨密度と年齢の関係は調査対象年齢の幅が十分でなく、今後の調査年齢幅の拡大が必要と考えられたものの、20歳前後での明確な最高骨密度は見出せず、過去の見解と相違する可能性が示唆された。

今後、対象数を増加することでさらなる裏づけを確認するとともに、対象の年齢幅を広げることで最高骨密度の得られる年齢を明確化し、両者をあわせた生活指導に関する方法論を構築する予定である。

E. 結論

骨密度の規定因子を調査するため、若年者を対象に、身体活動・栄養摂取量およびその他の背景情報に関する調査を行った。

その結果、低骨密度は BMI、初経年齢、出生時体重、活動総エネルギー、過去の運動歴、摂取

総エネルギー量、Ca 摂取量、海藻の摂取量に影響を受けていることが判明した。

F. 健康危険情報
特になし

G. 研究発表
未定

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

*参考文献

- 1) Sasaki S, Ushio F, Amano K, Morihara M, Todoriki T, Uehara Y, Toyooka T: Serum biomarker-based validation of a self-administered diet history questionnaire for Japanese subjects. *J Nutr Sci Vitaminol* 59: 285-96, 2000
- 2) Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94: 646-650, 1993
- 3) NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis. *JAMA* 285: 785-795, 2001
- 4) 折茂 肇, 太田博明, 岸本英彰, 白木正孝, 鈴木隆雄, 高岡邦夫, 中村利孝, 西沢良記, 萩野 浩, 林 泰史, 広田孝子, 福永仁夫, 細井孝之, 松本俊夫, 三木隆己, 楊 鴻生, 和田誠基: 骨粗鬆症の治療(薬物療法)に関するガイドライン 2002 年度改訂版. *Osteoporosis Japan* 10(4):637-709, 2002
- 5) 西山 智, 白木正孝, 中村利孝: 骨密度階層別にみた新規椎体骨折発生率. *Osteoporosis Japan* 11(2): 2215-218, 2003
- 6) Sasaki S, Yanagibori R: Association between current nutrient intakes and bone mineral density at calcaneus in pre-and post-menopausal Japanese women. *J Nutr Sci Vitaminol* 47: 289-94, 2001

表1 対象の背景

背景-1

項目		mean	±	SD
年齢		21.1	±	1.3
出生時体重	(g)	3101.3	±	476.9
初経年齢		12.0	±	1.2
身長	(cm)	158.8	±	4.9
体重	(kg)	53.9	±	7.8
BMI		21.3	±	2.7
W/H		0.79	±	0.05
月経の異常	あり			28 case
	なし			111 case

背景-2

項目		mean	±	SD
大腿骨近位total BMD	(g/cm ²)	0.90	±	0.10
腰椎L2-4BMD	(g/cm ²)	0.99	±	0.10
Ca	(mg/ml)	9.6	±	0.3
P	(mg/dl)	3.7	±	0.4
ALB	(g/dl)	4.8	±	0.3
IOC	(ng/ml)	9.0	±	2.8
NTX	(nMBCE/L)	13.5	±	4.1
BAP	(U/l)	22.1	±	7.1
OPG*	(pmol/l)	2.91	±	1.05
sRANKL**	(pmol/l)	0.14	±	0.13

*n=69. **n=59

表2

各因子と骨密度の関係-1

	H-group (n=102)		L-group (n=36)		p
	mean	SD	mean	SD	
背景					
年齢	21.1	0.1	21.0	1.2	0.84
身長	159.6	0.5	156.6	5.0	0.00
体重	55.8	0.7	48.8	6.4	<.0001
BMI	21.9	0.3	19.9	2.4	0.00
初経年齢	11.9	0.1	12.4	1.0	0.06
出生時体重	3158.1	49.6	2932.0	422.1	0.03
血液					
Ca	9.6	0.0	9.6	0.3	0.95
P	3.8	0.0	3.7	0.4	0.13
IOC	8.8	0.3	9.4	2.3	0.30
NTX	13.5	0.4	13.5	3.6	0.98
BAP	21.9	0.7	22.1	5.8	0.88
ALB	4.8	0.0	4.8	0.2	0.52
OPG	2.9	1.0	3.0	1.1	0.87
sRANKL	0.14	0.12	0.18	0.18	0.36

各因子と骨密度の関係-2

	H-group (n=102)		L-group (n=36)		p
	mean	SD	mean	SD	
PA					
総エネルギー (mets)	33.9	0.3	32.5	3.1	0.02
ライフコーダー (kcal)	1875.0	18.1	1693.0	159.6	<.0001
DHQ					
Protein (g)	64.8	1.2	60.3	11.5	0.05
Ca (mg)	538.9	18.1	473.4	147.6	0.06
VD (IU)	12.7	0.7	12.3	8.2	0.78
Bean (g)	46.5	3.1	40.4	29.5	0.31
Seaweed (g)	12.6	1.1	9.1	7.8	0.09
VK (μ g)	288.7	13.6	265.7	131.9	0.38
VA (IU)	767.0	34.7	653.0	266.3	0.09
VB2 (mg)	1.5	0.0	1.3	0.3	0.05
Cholesterol (mg)	295.3	8.9	252.0	70.8	0.01
P (mg)	1013.9	22.4	906.6	168.9	0.01

表3

リスクファクター-回答別骨密度 (g/cm²)

	no			yes			P
	mean	SD	n	mean	SD	n	
家族歴あり	0.99	0.10	125	0.98	0.11	10	0.94
ダイエット	1.00	0.11	77	0.97	0.08	58	0.04
乳製品嫌い	0.99	0.10	113	0.98	0.10	22	0.73
やせ型	0.99	0.10	125	0.95	0.11	10	0.21
低身長	1.00	0.10	103	0.93	0.10	32	0.00
不活動	1.00	0.10	46	0.98	0.10	89	0.40
喫煙習慣	0.99	0.10	114	0.96	0.10	21	0.26
飲酒	0.98	0.10	119	1.01	0.08	16	0.33
コーヒー	0.98	0.10	90	0.99	0.12	45	0.61
ST薬の服用	0.99	0.10	132	1.05	0.08	3	0.28

表4

ロジスティック（ステップワイズ）解析

要 因		p	odds	95%CI	
背景	BMI vs1	0.03	0.74	0.55	0.96
	初経年齢(歳) vs1	0.01	1.89	1.19	3.19
	出生時体重(g) vs100	0.08	0.65	0.44	0.89
PA	総エネルギー-(mets) vs1	0.01	1.01	38.51	4.35
	過去の運動歴 yes/no	0.01	3.65	1.47	11.04
DHQ	Energy (kcal) vs100	0.07	0.90	0.79	1.01
	Ca (mg) vs100	0.03	0.66	0.45	0.93
	Seaweed (g) vs1	0.05	0.93	0.86	1.00

年齢補正済み

図1

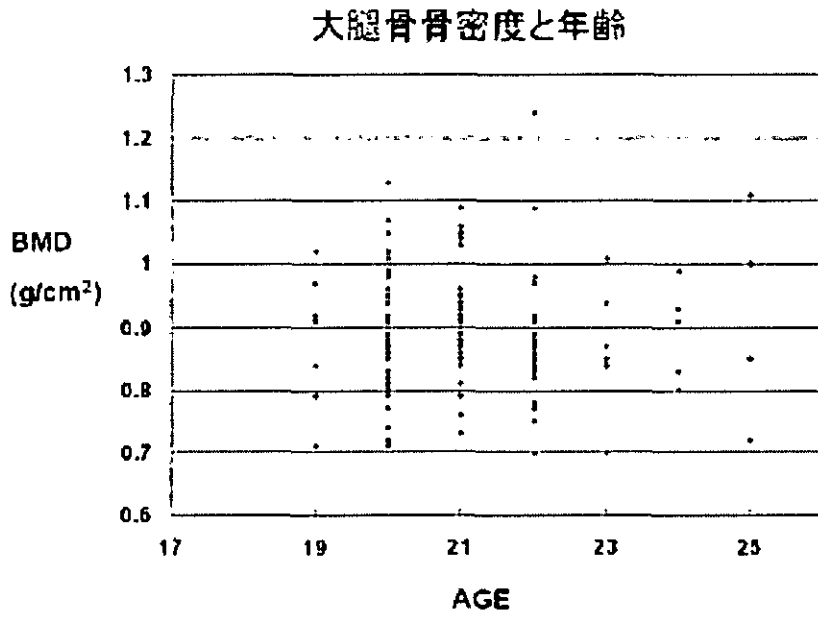
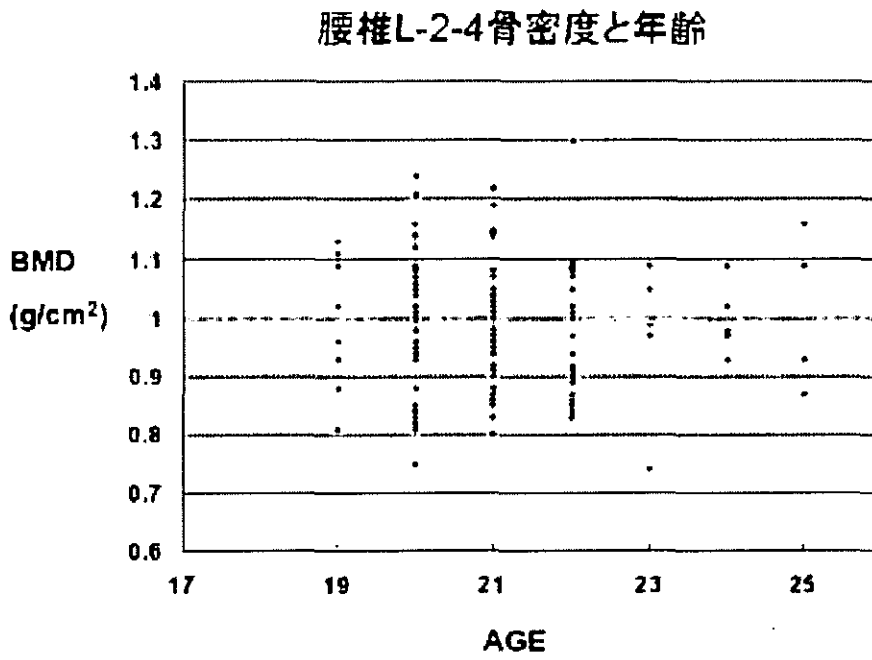


図2



厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定

分担研究者 浦野友彦 東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座助手

研究要旨 骨粗鬆症の治療においては積極的な骨形成促進薬は存在せず、また骨形成を制御し骨粗鬆症発症へと関与する原因遺伝子群に関しても十分な解明はなされていない。このことは骨粗鬆症治療の多様性を制限しておりテーラーメイド医療の確立において重要な問題である。骨芽細胞における骨形成のシグナル伝達においては Wnt- β -カテニンシグナルにおけるレセプターとして機能する LDL receptor-related protein 5(LRP5)が近年、注目されてきた。昨年度の研究報告書において、我々はこの LRP5 のイントロン 17 における一塩基置換遺伝子多型(single nucleotide polymorphisms: SNPs)が骨量に与える影響に対して検討を行い、閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーとして有用である可能性を示した。近年、Wnt- β -カテニンシグナル伝達を制御する因子が哺乳動物において多数同定されているにもかかわらず Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の骨代謝に与える影響に関しては LRP5 遺伝子以外に検討、報告がなされていない。本年度、Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子である Kremen1 ならびに sFRP4 に存在する SNP を骨量を規定する新たな遺伝子マーカーとして同定した。来年度以降、これら Wnt- β -カテニンシグナル遺伝子群を遺伝子マーカーとして発展させ、骨形成に主眼をおいた骨粗鬆症でのテーラーメイド医療の確立を目指す。

A. 研究目的

骨粗鬆症とそれに伴う骨折は高齢者が寝たきりとなる主要な原因であり、老人医療において重要な問題として知られている。骨粗鬆症の大きな原因は、以下の二つである。

- 1) エストロゲン欠乏による骨吸収の上昇(閉経後骨粗鬆症)
- 2) 骨芽細胞老化による骨形成の低下(老人性骨粗鬆症)

このような骨量減少は骨吸収量に骨形成能が追いつかない非共役状態が原因と考えられている。この治療においては積極的に骨形成を亢進させて骨量増加作用をおこす

ことが理想ではあるが現在まで強力な骨形成促進薬は存在していない。しかしながら、*in vitro* で骨芽細胞の分化を誘導する内分泌ホルモンやサイトカインは複数存在することから、これらの下流シグナルを詳細に検討、解明することが骨形成を主眼においた骨粗鬆症の病態解明、ひいては骨形成に主眼をおいたテーラーメイド医療の確立において最も重要なステップであると考えた。

脊椎動物のシグナル伝達においては Wnt- β -カテニンシグナル伝達経路が様々な細胞の増殖と分化を制御していることが多くのグループにより明らかにされ、重要視されてきた。特に骨芽細胞における骨形成

のシグナル伝達においては Wnt に対するレセプターとして機能する LDL receptor-related protein 5(LRP5)が注目されてきた。昨年度の研究報告書において、我々はこの LRP5 のイントロン 17 における一塩基置換遺伝子多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs)が骨量に与える影響に対して検討を行い、閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーとして有用である可能性を示した。近年、Wnt- β -カテニンシグナル伝達を制御する因子が哺乳動物において多数同定されている。しかしながら骨における Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の発現や骨代謝に与える影響に関しては LRP5 遺伝子以外に検討、報告がなされていない。そこで本年度においては Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の遺伝子多型が骨量にあたる影響ならびに Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の骨芽細胞や破骨細胞における発現パターンに関して検討を行った。

B. 研究方法

1, Kremen1 ならびに sFRP4 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響

JSNP に報告のある Kremen1 遺伝子イントロン 1 における遺伝子多型ならびに、sFRP4 遺伝子エクソン内における Arg262 の SNP(CGC→CGT)に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 379 人を対象として BMD との関連を検討した。

2, 初代培養破骨細胞、骨芽細胞における Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の発現パターンに関する検討

ラット由来骨髄細胞に M-CSF と RANKL を添加し、破骨細胞に分化誘導させ RNA

を採取した。

ラット頭蓋骨を酵素処理することにより初代培養骨芽細胞を作製した。 β -グリセロリン酸ならびにアスコルビン酸を添加し骨芽細胞分化を誘導した。培養後 2 日、4 日、6 日、9 日、16 日、19 日、24 日、30 日後の RNA を採取した。

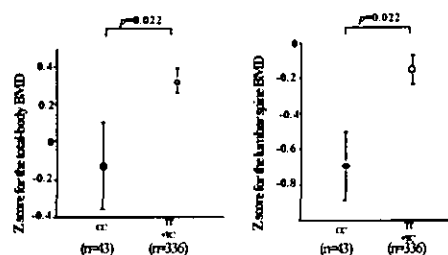
それぞれの時点での LRP5、sFRP4、Kremen1、さらに骨芽細胞の分化マーカーとしてアルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

C. 研究結果

1, Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子 Kremen1 ならびに sFRP4 の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響

Kremen1 のイントロン 1 に存在する SNP に関して、T アレルを持つ群(TT+CT; n=336)では持たない群(CC; n=43)に比べ有意に全身骨ならびに腰椎骨密度が高いことを見出した (Total BMD Z score; 0.33 vs -0.13; p=0.022, Lumbar Spine BMD Z score; -0.14 vs -0.69; p=0.022) (図 1)。

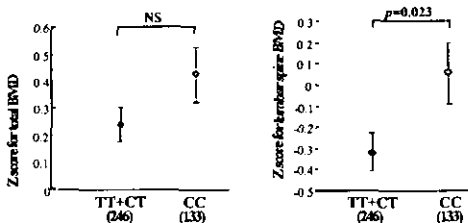
図 1. Kremen1 イントロン 1 における遺伝子多型と骨量との相関



Secreted Frizzled Related Protein 4 (sFRP4) エクソン内の Arg262 の SNP (CGC→CGT) に関して、同様の検討を行ったところ、T

アレルを持つ群(CT+TT; n=246)では持たない群(CC; n=133)に比べ有意に腰椎骨密度が低いことを認めた(Z score; -0.33 vs 0.03;

図2. sFRP4 Arg262 での多型における 遺伝子多型と骨量との相関



p=0.023) (図2)。

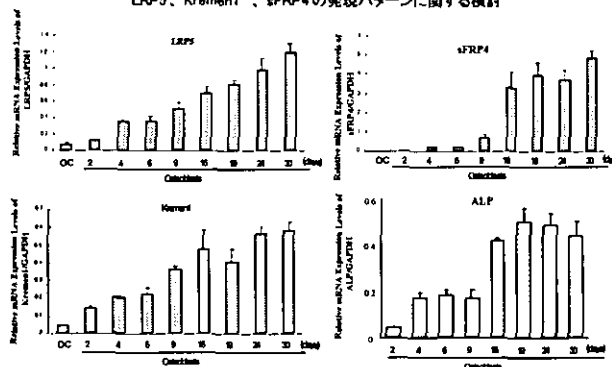
2. 初代培養破骨細胞、骨芽細胞における Wnt-β-カテニンシグナル伝達因子の発現パターンに関する検討

昨年度報告した遺伝子多型と骨量との間に相関があった LRP5 遺伝子と今回、骨量との相関が明らかになった Kremen1 ならびに sFRP4 の骨芽細胞(osteoblasts)分化に伴う mRNA レベルでの発現変化に関して検討を行った。その結果 LRP5、sFRP4 ならびに Kremen1 はともにその発現が培養開始後 16 日以降でピークを迎えることが明らかとなった。これは骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子の発現ピークとほぼ一致していた (図3)。一方、破骨細胞(osteoclasts: OC)での LRP5、Kremen1 ならびに sFRP4 遺伝子の発現は骨芽細胞に比して劇的に低下していた (図3)。

D. 考察

Wnt-β-カテニンシグナル伝達経路は哺乳動物での細胞増殖や分化の制御において重要な役割を果たす。近年このシグナル伝達系の構成因子のひとつである LRP5 遺伝子

図3. 初代培養破骨細胞、骨芽細胞における LRP5、Kremen1、sFRP4 の発現パターンに関する検討



は、ヒトでの遺伝子変異やノックアウトマウスの解析から骨芽細胞による骨形成において中心的な役割を果たしていることが明らかにされた。我々は昨年度の研究報告書に示したように、LRP5 の SNP と骨量との関連について検討し、LRP5 が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーである可能性を示した(Urano et al. J. Bone Miner. Metab. in press)。Wnt-β-カテニンシグナル伝達因子は多数同定されており LRP5 のみならず、他の因子に関しても骨量を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。そこで今回、我々は Wnt-β-カテニンシグナル伝達因子における SNP と骨量との関連について検討した。今回 Kremen1 と sFRP4 における SNP が骨量と有意に相関することを明らかとした。Kremen1 は Wnt-β-カテニンシグナルを負に制御する因子である DKK1 のレセプターとして作用し、DKK1 と協調して Wnt-β-カテニンシグナルの伝達を抑制する因子として同定された。また、sFRP4 は、Wnt のレセプターのデコイレセプターとして機能すると考えられ、Kremen1 と同様に Wnt-β-カテニンシグナルの抑制に関与することが示唆される遺伝子である。近年、LRP5 の研究により Wnt-β-カテニンシグナルの骨形成における重要性が注目されるよ

うになってきているが、多数存在する Wnt- β -カテニンシグナル制御因子の中でどの因子が骨形成を制御しているのかという疑問に関しては LRP5 以外には未だ重要な因子は同定されていない。さらにこのシグナルが骨芽細胞成熟のどの段階において、機能しているかという問いに対してもその詳細は明らかにされていない現状である。今回の解析から Kremen1 や sFRP4 といった Wnt- β -カテニンシグナルを負に制御する因子が骨形成に大きく関与している可能性が考えられる。またこれら因子が初代培養骨芽細胞の系において ALP の発現がピークをむかえる分化中期以降に一致して発現亢進していることから分化のステージによって Wnt- β -カテニンシグナルの活性が変化していることが示唆された。今後、これら遺伝子が骨形成ならびに骨代謝においてはたす役割に関してさらなる検討を行うことが骨形成の分子機構の解明に大いに役立つと考える。

他のグループから LRP5 遺伝子の発現は破骨細胞には無く、骨芽細胞に優位に発現していることが示されていたが、今回の我々の検討において、LRP5 以外の Wnt- β -カテニンシグナルを制御する Kremen1 や sFRP4 といった遺伝子も骨芽細胞特異的に発現することが示唆された。したがって Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子は骨形成特異的な遺伝子マーカーを開発するにあたって有用な遺伝子群であることが示唆され、今後の骨粗鬆症のテーラーメイド医療の発展において重要な因子であることが示唆される。今回の遺伝子多型による解析から Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子には閉経後女性の骨量ならびに骨粗鬆症発症を規定

する候補遺伝子が複数含まれていることが示唆された。今後これら制御因子に関してさらなる検索を重ね、骨量を予測する遺伝子マーカー群を確立していく予定である。

E. 結論

骨形成を特異的に制御する遺伝子群である Wnt- β -カテニンシグナル制御因子のなかからその遺伝子多型が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子として、昨年報告した LRP5 に加え新たに Kremen1 ならびに sFRP4 を見出した。来年度以降、これら遺伝子群の骨粗鬆症診断における遺伝子マーカーとしての有用性を検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J. Bone Miner. Metab.* (in press)
2. Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. *Int. J. Cancer* 2003; 106: 310-315.
3. Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S. Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003; 85: 101-104.
4. Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi

T, Ouchi Y, Makuuchi M. EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur. J. Cancer* 2003; 39: 1552-1561.

2. 学会発表

1. Urano T, Fujita M, Hoshino S, Shiraki M, Ezura Y, Hosoi T, Emi M, Ouchi Y, Inoue S: Association of Single Nucleotide Polymorphisms in *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5* Gene with Bone Mineral Density (2003. 11. 24-28) The 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology (Tokyo, Japan)
2. 浦野友彦、星野真二郎、白木正孝、江面陽一、江見充、細井孝之、大内尉義、井上聡：骨粗鬆症における LRP5 遺伝子の関与(2003. 6. 18-20) 第45回日本老年医学会 (名古屋)
3. Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen Activates Cyclin-Dependent

Kinases 4 AND 6 through Induction of Cyclin D in Rat Primary Osteoblasts (2003. 6. 3-7) 1st Joint Meeting of International bone and mineral society (IBMS) and the Japanese society for bone and mineral Research (JSBMR) 2003 (Osaka, Japan)

4. 藤田雅代、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、津久井通、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるエストロゲンの分子標的の探索と機能解析 (2003. 12. 10-13) 第26回日本分子生物学会年会 (神戸)

G. 知的所有権の取得情報

なし

H. 健康危険情報

今年度の研究においては健康危険情報は得られなかった。

厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

骨粗鬆症の生化学マーカーの開発に関する研究

分担研究者 池田恭治 (国立長寿医療センター 研究所 運動器疾患研究部長)

研究要旨

尿中 γ -GTP 排泄量が生体内の骨吸収活性を反映することが示唆された。まず、OPG を欠損することで骨吸収が亢進したマウスにおいて、尿中 DPD の排泄増加とともに、尿中 γ -GTP の排泄も増加していた。骨吸収の選択的な抑制薬であるアレンドロネートを投与すると、尿中 DPD 排泄とともに尿中 γ -GTP 排泄もほぼ対照群レベルにまで減少した。骨粗鬆症患者においても、尿中 γ -GTP 排泄量と DPD あるいは NTx 排泄量に有意な正の相関が認められ、アレンドロネートによる治療によって、DPD あるいは NTx と並行して尿中 γ -GTP 排泄量も減少した。

キーワード： 骨粗鬆症、骨吸収、 γ -GTP

A. 研究目的

骨粗鬆症は、さまざまな遺伝要因に加えて、食事や運動などの生活習慣を背景に発症する多因子疾患であり、予防および治療においてもこれら先天的・後天的要因の個人差に配慮してテーラーメイド医療を推進する必要がある。骨の老化は万人に訪れる生理現象であり、60 歳以上の女性の多くは骨粗鬆症と診断される域にまで骨密度が低下する。寝たきりの原因となる大腿骨頸部骨折の発生件数も、2002 年には 10 万人を超えて増加の一途にあり、効果的な医療の実現には高リスク群の効果的な抽出が重要である。骨折の要因には、転倒と骨の脆弱性が含まれ、後者には骨密度で評価される骨量に加えて、骨の質的な加齢変化が注目されている。骨質を規定する因子はいまだ不明であるが、骨代謝回転の亢進そのものが、骨密度の低下とは独立に、骨折のリスクを高めるという調査結果もあり、骨吸収の亢進が持続することが、単に骨量を低下させるだけではなく、骨の脆弱性に大きく寄与するものと考えられる。

我々は、最近 γ -GTP が破骨細胞の形成因子であることを見いだした (J Biol Chem

2004)。本研究では、尿中への γ -GTP の排泄動態を解析し、骨吸収の指標になりうるか否かについて、動物実験および臨床研究の両面から検討した。

B. 研究方法

Osteoprotegerin (OPG) 遺伝子を欠損したマウスのホモおよびヘテロマウスを飼育し、定期的に 24 時間尿を採取し、尿中 DPD (デオキシピリジノリン)、 γ -GTP 活性およびクレアチニン (Cr) 濃度を測定した。OPG KO マウスにアレンドロネートを投与し、尿中 DPD および γ -GTP 排泄の変化を経時的に追跡調査した。

骨粗鬆症患者の尿を採取し、 γ -GTP 活性 (IU/L) を測定した。尿中 γ -GTP は Cr 濃度で補正し、IU/g Cr で計算した。尿中 γ -GTP 排泄と DPD あるいは NTx との相関について解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、実験動物委員会において承認されており、動物愛護の精神に則って行った。ヒト血液・尿を用いた研究に関しては、すでに当該施設の倫理委員会に提出しており、承認された後、患者からの

書面による同意を得た上で行った。ヒト DNA を用いた研究は含まれない。

C. 研究結果および考察

OPG を欠損し、RANKL-RANK シグナルの亢進から骨吸収の亢進を示すホモのノックアウトマウスにおいて、対照のヘテロマウスと比較して、尿中 DPD 排泄の増加が認められた。これに伴って尿中 γ -GTP の排泄も増加していた。骨吸収の選択的な抑制薬であるアレンドロネートを投与すると、尿中 DPD 排泄は投与後数日以内に減少した。尿中 γ -GTP 排泄も、数日から 1 週間以内にほぼ対照群レベルにまで減少した。以上から、尿中 γ -GTP は生体内の骨吸収活性と相関するものと考えられた。

数十例の検討であるが、骨粗鬆症患者においても、尿中 γ -GTP 排泄量と DPD あるいは NTx 排泄量に有意な正の相関が認められた。またアレンドロネートによる治療によって、DPD あるいは NTx と並行して、尿中 γ -GTP 排泄量も減少したことから、ヒトにおいても尿中 γ -GTP 排泄量が骨吸収活性を反映するものと考えられた。尿中 DPD あるいは NTx 排泄の増加によって診断される骨吸収の亢進状態を、尿中 γ -GTP 排泄量によって診断する場合の感度と特異度を勘案した場合、48 IU/g Cr がひとつの cut-off 値になることがうかがわれた。

γ -GTP は、腎臓や肝臓に発現する細胞外酵素で、重鎖と軽鎖から成り、細胞外においてグルタチオンなどの γ -glutamyl 基を他のアミノ酸に転移する活性を有する。腎臓では近位尿細管に発現しており、細胞膜を 1 回貫通するが、大部分は尿細管側に露出している。骨吸収が亢進した際の尿中 γ -GTP の由来と排泄増加のメカニズムは現在のところまったく不明である。 γ -GTP が 55 kDa と比較的大型のタンパク質であり、糸球体から容易に濾過されにくいことから、骨吸収の亢進に伴って近位尿細管からの γ -GTP の shedding が促進された結果、尿中に遊離型の γ -GTP 分子が流出してく

るのではないかと考えている。予備的な実験であるが、 γ -GTP を発現する細胞に破骨細胞の培養液を添加すると培養液中の γ -GTP 活性が対照群に比較して増加するとの結果も得られており、破骨細胞が分泌する何らかの因子が γ -GTP の shedding を促進する可能性が示唆される。今後、尿中における γ -GTP 活性の本体の証明とともに、 γ -GTP の shedding を促す因子の探索を含めて、骨吸収に伴って尿中 γ -GTP 排泄が増加するメカニズムの解明が必要である。

D. 結論

尿中 γ -GTP 排泄は、骨粗鬆症に対するテーラーメイド医療を施すにあたって、一次スクリーニングに応用できる可能性がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K, Taniguchi N: γ -Glutamyltraspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. J Biol Chem 279: 5752-5756, 2004

2. 学会発表

Niida S, Kondo T, Ishizuka Y. and Ikeda K.: γ -Glutamyl transpeptidase as a novel bone resorbing factor 第 1 回国際骨代謝学会—日本骨代謝学会合同会議 6 月 6 日、大阪

池田恭治：骨粗鬆症の病態と治療、第 23 回日本老年学会総会、6 月 19 日、名古屋

Takasu H, Okazaki M, Sugita A, Uchiyama Y, Makishima F, Kubodera N, Ogata E, Ikeda K: c-Fos protein as a target of vitamin D receptor-mediated suppression of osteoclast

development and bone resorption. 12th
Workshop on Vitamin D, July 6-10, Maastricht,
The Netherlands

Ikeda K: Bone resorption as a target of
osteoporosis therapy. UK-Japan Conference:
Horizons in Ageing and Health- New targets
for therapies. July 14-16, New Castle, UK

Niida S, Kondo T, Hibi T. and Ikeda K.:
Gamma-glutamyl transpeptidase as a novel
bone resorbing factor 第25回米国骨代謝学
会 9月21日、ミネアポリス、ミネソタ州、
USA.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

骨粗鬆症における遺伝子マーカーの開発
— γ -glutamyl carboxylase の遺伝子多型性と高齢女性における骨量との関連—

分担研究者 細井孝之 東京都老人医療センター医長

研究要旨 骨粗鬆症はその発症に生活習慣因子のみならず、複数の遺伝的素因とが関与することが知られている。さらにその治療に対する反応性の個人差も遺伝的に決定されることが予想される。本研究では、骨粗鬆症の治療、とくに薬物療法における個人差を決定する遺伝子多型性を見出すことにより、本疾患のテーラーメイド医療確立に寄与することを目指している。本年度は GGCX 遺伝子のアミノ酸置換を伴う SNP と高齢女性における骨量との関連を解析した。

A. 研究目的

骨粗鬆症は多因子遺伝病のひとつとして考えられており、その遺伝的背景の解明が待たれている。これまで我々は多数の候補遺伝子についてそれらの多型性と骨量との関連を解析し、報告してきた。しかしながら未だ、骨粗鬆症の予防や治療に直接的に応用できる多型性は見出されていない。その理由の一つは蛋白質としての機能の多様性に結びつく遺伝子多型性と骨量との関連に関する情報が乏しいことが挙げられる。

本研究ではビタミンK依存性 γ グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)のエクソン8にあるアミノ酸残基の置換をともなう遺伝子多型性と骨量との関連を検討した。ビタミンK依存性蛋白質であるオステオカルシン(BGP)やマトリックスグラ蛋白質(MGP)は骨代謝において重要な役割を果たしていると考えられており、これらの蛋白質のグラ化に必要なGGCXの多型性が骨量

の個人差に結びついているか否かを検討した。

B. 方法

- ①対象: 東京都老人医療センター骨粗鬆症外来受診を希望し、遺伝子解析を含む研究に、文書によって同意を得た女性。骨代謝に影響をもたらす疾患や薬剤を使用している者は除外した。
- ②骨量測定: DXA(DPX-L IQ)によって大腿骨近位部を測定した(原則として右側)。
- ③GGCXの遺伝子多型性解析: 静脈血から分離したDNAを用いて、exon 8の missense SNP(Gln325 → A r g) を degenerative HPLC法でタイピングした。

C. 結果と考察

対象は113名であり、アレル型に従って、AA11名、AG54名、GG48名の3群に分けられ、平均年齢、身長、体重、BMIには有意差がなかった(Table 1)。 femoral neck のBMD

は%young adult mean (YAM)、T score、Z score においてAA群で有意に高く、絶対値についても高い傾向が認められた(Table 2)。同様の結果はfemoralのtotal scanでも認められ、AA型が高骨密度に関連することが示唆された(data not shown)。これらの関連はAアレルについて、gene-dosage effectが見られるようであった。

GGCXの375番目のアミノ酸をGlnからArgに置換するSNPが高齢女性において骨量との関連が認められた。今回の対象症例数は少ないものの、年齢分布幅が極めて狭い高齢者の集団であり、意味のある結果が得られたと考える。このSNPによってもたらされる2種類のGGCXが酵素化学的にどのような特性をもっているかに興味をそそがれ、現在in vitroで産生したGGCXの酵素活性を測定するシステムを共同研究者とともに立ち上げ、比較検討することになっている。

今回の研究結果は骨量決定においてビタミンK依存性蛋白質が重要な役割を果たしていることをも示している。BGPやMGPなど既知のものに加えて、骨代謝において機能している未知のビタミンK依存性蛋白質を探索することも必要であろう。

Table 1 Background data of the subjects

genotypes	AA	AG	GG	p value
number	11	54	48	
age	74.3±3.7	74.9±3.3	75.5±4.3	0.56
height	148.5±5.9	148.6±5.3	147.5±6.2	0.59
weight	54.0±8.27	51.2±8.3	50.1±7.4	0.33
BMI	24.4±3.1	23.1±3.3	23.0±3.1	0.43

Table 2 GGCX polymorphism and femoral neck BMD

	AA	AG	GG
number	11	54	48
BMD	0.742±0.087	0.697±0.091	0.670±0.101
%YAM*	85.4±10.2	77.5±12.6	73.7±13.4
Tscore*	-1.08±0.77	-1.68±0.94	-1.98±1.00
%age*	122.1±12.1	112.4±15.4	107.7±17.
Zscore*	1.16±0.67	0.650±0.82	0.408±0.90

* p<0.05

D. 結論

GGCXの遺伝子多型性と骨量との関連が認められた。

E. 健康危険情報

今年度の研究においては健康危険情報は得られなかった。

F. 研究発表

①著書

1. 細井孝之 骨代謝マーカーによる治療効果のモニター ビタミンK 「実践・骨代謝マーカー」—骨疾患の診療に役立つ骨代謝マーカーの使用法— 福永仁夫 メディカルレビュー社 269-273, 2003
2. 細井孝之 骨粗鬆症—その予防と食生活指導・日常生活指導 エキスパートから学ぶ健康教育・栄養相談・生活習慣改善指導 生活習慣病の予防と管理 日野原茂雄, 和田高士 ライフサイエンスセンター 149-154, 2003
3. 細井孝之 Ca, P異常 老年医学 荻原俊男 朝倉書店 189-192, 2003
4. 細井孝之 遺伝子からみた骨代謝 骨の事典 鈴木隆雄, 林泰史 朝倉書店 297-302, 2003
5. 細井孝之 骨粗鬆症の治療 長寿科学事典 祖父江逸郎 医学書院

- 616-617, 2003
6. 細井孝之 骨粗鬆症の予防 長寿科学事典 祖父江逸郎 医学書院 617, 2003
 7. 細井孝之 骨検診 長寿科学事典 祖父江逸郎 医学書院 618, 2003
 8. 細井孝之 骨粗鬆症の遺伝的背景 整形外科の最新医療 平澤泰介, 井上一, 高岡邦夫 先端医療技術研究所 66-69, 2003
 9. 細井孝之 骨粗鬆症 高齢者診療ポケットメモ 折茂肇 南江堂 273-275, 2003
 10. 細井孝之 ビタミンK 骨粗鬆症診療実践マニュアル 松本俊夫 文光堂 122-125, 2003
 11. 細井孝之 骨粗鬆症 高齢者の病態生理と麻酔の臨床 花岡一雄, 大内尉義真興交易(株)医書出版部 42-45, 2003
 12. 細井孝之 骨粗しょう症の最新治療 講談社 2003
- ②原著論文
1. Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Hosoi T, et al. Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR typing. *Bone* 32 · 185-90, 2003
 2. Kazama H, Usui S, Okazaki M, Hosoi T, et al. Effects of bezafibrate and pravastatin on remnant-like lipoprotein particles and lipoprotein subclasses in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 59 · 181-9, 2003
 3. Araki A, Ito H, Majima Y, Hosoi T, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and asymptomatic cerebral infarction or leukoaraiosis in elderly diabetic patients *Geriatrics and Gerontology International* 3 · 15-23, 2003
 4. Honma N, Sakamoto G, Akiyama F, Hosoi T et al. Breast carcinoma in women over the age of 85: distinct histological pattern and androgen, oestrogen, and progesterone receptor status. *Histopathology* 42 · 120-127, 2003 N. Honma
 5. Hosoi T, Yoda T, Yamaguchi M et al. Elderly women with oral exostoses had higher bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 21 · 120-2, 2003
 6. Feng D, Ishibashi H, Yamamoto S, Hosoi T, et al. Association between bone loss and promoter polymorphism in the IL-6 gene in elderly Japanese women with hip fracture *J Bone Miner Metab.* 21 · 225-228, 2003 Y. Koshihara
 7. Ishida R, Emi M, Ezura Y, Hosoi T, et al. Association of a haplotype (196Phe/532Ser) in the interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK1) gene with low radial bone mineral density in two independent populations. *J Bone Miner Res* 18 · 419-23, 2003
 8. Hirano H, Ezura Y, Ishiyama N,