

今後CT装置の機能は著しく進歩することが予想され、それに伴って今以上の空間分解能の画像を得、かつ被曝線量を低下させることが可能となると期待される。今後本システムは、治療効果判定など長期経過観察において、骨密度測定法以上の感度で骨変化を捉えることができるか検討していく必要がある。さらに今後の研究課題として、三次元骨梁構造データを有限要素解析に適用することで、直接的に骨強度を算出することも可能となるであろう。

#### 研究発表

##### (1) 出版物

伊東昌子. 骨梁構造と骨力学特性についての最近の知見. 整形外科 55: 833-840, 2004

##### (2) 口頭発表

#### 国際学会

1) Masako Ito, Akifumi Nishida, Masataka Uetani, et al.

Assessment of bone quality using micro-CT and synchrotron CT. The 8<sup>th</sup> Asia-Pacific Conference on Electron Microscopy, 2004.6.7, Kanazawa

2) Masako Ito

Assessment of bone structure and biomechanical strength using micro-CT. The 1<sup>st</sup> Asian Pacific Congress of Bone Morphometry, 2004.6.26, Kagawa

3) Masako Ito, Kyoji Ikeda, Masahiko Nishiguchi, et al.

Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk. Second Joint Meeting of the European

Calcified Tissue Society and the International Bone and Mineral Society, 25-29 June 2005, Geneva, Switzerland (発表予定)

#### 国内学会

1) 伊東昌子

骨粗鬆症の画像診断

第23回日本画像医学会、  
2004.2.20、東京

2) 伊東昌子、西田暁史、河野順、ほか

骨折リスク評価における *in vivo* 骨梁構造計測の検討

第22回日本骨代謝学会学術集会、2004.8.6、大阪

#### 国内における一般講演

1) 伊東昌子

骨量・骨質からみた骨力学特性の研究

第4回岐阜骨粗鬆症フォーラム、  
2004.2.28、岐阜

2) 伊東昌子

骨粗鬆症における骨量と骨質とは  
第3回骨折予防とビスフォスフォネート研究会、2004.8.26、高知

3) 伊東昌子

骨粗鬆症治療からみた骨量と骨質  
について

第12回香川オステオポロシス研究会、2004.11.13、高松

知的財産権の出願・登録状況

特になし

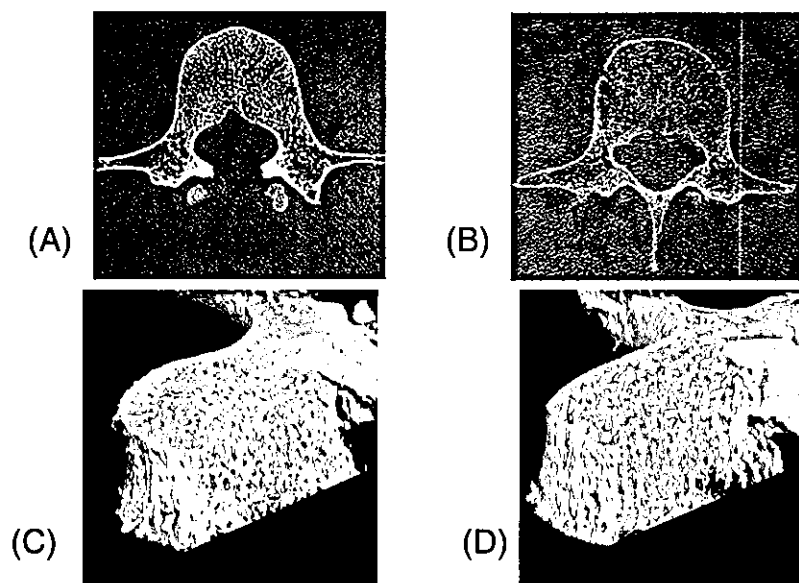


図1 MDCTで撮像したヒト第3腰椎二次元(A,B)・三次元画像(C,D)  
 左は骨折のない62歳女性(A,C)、右は胸椎圧迫骨折を有する62歳女性(B,D)  
 画像は200 X 200 X 300ミクロンの空間分解能を有する

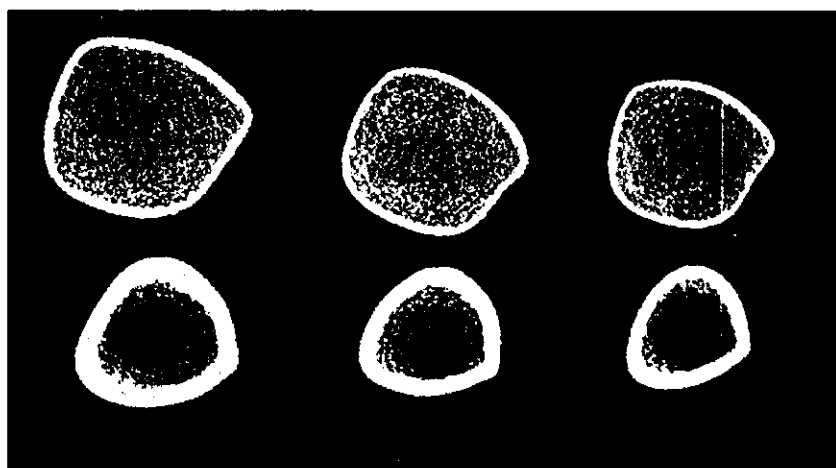


図2 バスケットボール選手、駅伝選手、対照群の脛骨CT画像  
 海綿骨ネットワーク・皮質骨幅・骨サイズが評価可能である

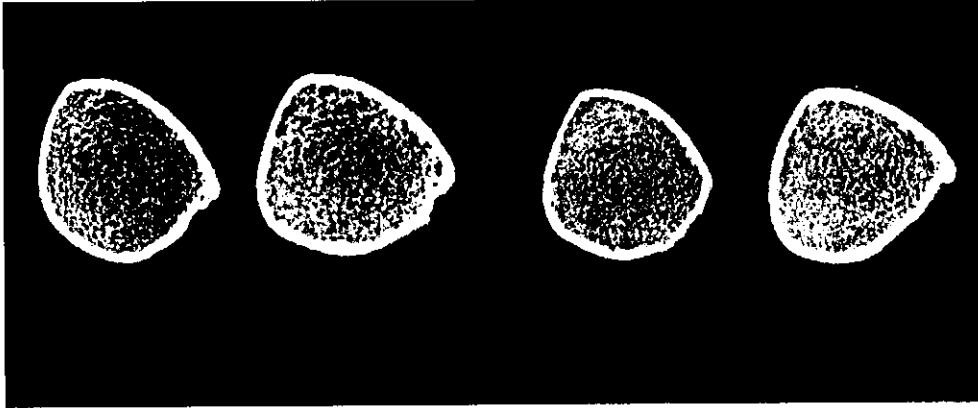


図3 閉経前、閉経早期女性のバレーボール選手とコントロールの脛骨CT画像

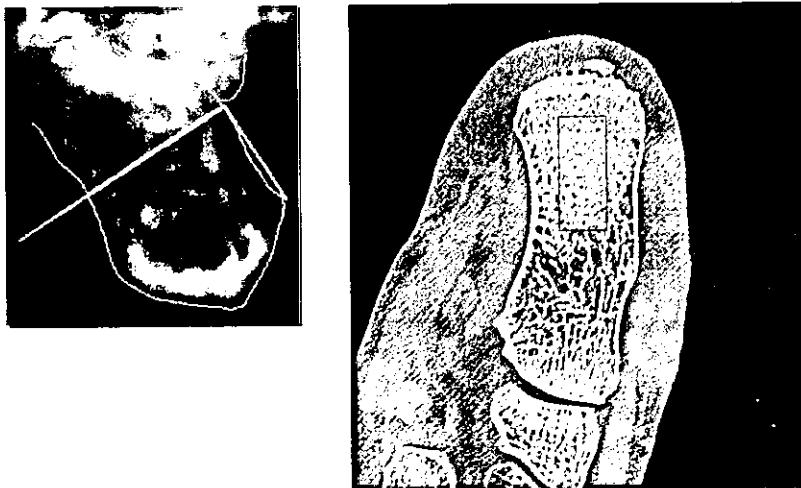


図4 踵骨DXAの測定領域（左）と踵骨CT測定領域（右）  
 踵骨DXAでは、踵骨中央骨密度を側面方向の投影として算出、踵骨CTでは水平断像として多スライス画像を得る

表1 骨折群・非骨折群における脊椎こつ両構造パラメーターの比較

	非骨折群 (n=33)	骨折群 (n=31)	P value	オッズ比 (95%CI)	P value	オッズ比 (95%CI)	P value	オッズ比 (95%CI)	P value
対象者背景									
年齢 (歳)	66.5 ± 14.3	68.1 ± 4.7	.15	-	-	-	-	-	-
閉経時年齢 (歳)	50.2 ± 3.1	49.5 (4.4)	.12	-	-	-	-	-	-
身長 (cm)	152.6 ± 4.4	149.8 (7.4)	.08	-	-	-	-	-	-
体重 (kg)	51.5 ± 7.2	50.4 (8.1)	.20	-	-	-	-	-	-
面積骨密度									
DXA (g/cm <sup>2</sup> )	0.935 (0.148)	0.781 (0.164)	<.0005	5.3 (1.6-17.2)	.010	-	-	-	-
MDCT データ									
容積骨密度									
QCT (mg/cm <sup>3</sup> )	101.8 (23.3)	64.9 (24.7)	<.0001	9.1 (2.9-28.4)	<.0005	-	-	-	-
骨梁構造パラメーター									
				骨梁構造パラメーター単独		骨梁構造パラメーター+QCT		骨梁構造パラメーター+DXA	
SMI	2.02 (0.52)	2.56 (0.40)	<.0001	13.9 (3.5-55.3)	<.0001	19.2 (5.4-68.4)	<.0001	19.2 (5.4-68.4)	<.0001
Euler's number	-995 (383)	-483 (427)	<.0001	13.7 (4.1-46.7)	<.0001	19.2 (5.4-68.4)	<.0001	13.7 (4.0-46.7)	<.0001
Tb.N (1/mm <sup>3</sup> )	0.97 (0.08)	0.78 (0.20)	<.0001	6.8 (2.2-20.5)	.003	13.2 (3.7-47.3)	<.0001	10.7 (3.4-34.0)	<.0001
Tb.Sp (micrometer)	676.8 (124.3)	1050.9 (443.7)	<.0001	6.8 (2.2-20.5)	.003	9.1 (2.9-28.4)	<.0005	6.8 (2.2-20.5)	.003
Tb.Th (micrometer)	366.4 (46.8)	331.7 (44.7)	.004	4.0 (1.1-14.3)	.06	13.7 (4.0-46.7)	<.0001	6.4 (1.6-26.0)	.01
DA	1.44 (0.14)	1.59 (0.39)	.04	4.0 (1.1-14.3)	.06	12.7 (3.9-41.7)	<.0001	4.0 (1.1-14.3)	.06

表2 バスケットボール選手群、駅伝選手群、対照群における骨密度・骨梁構造パラメーター、骨面積の比較

	バスケットボール選手群 (n=10)		駅伝選手群 (n=8)		対照群 (n=9)
		p		p	
	body height	166.1 ± 4.9	†	160.5 ± 4.2	156.2 ± 5.3
	body weight	60.4 ± 5.1	†	47.9 ± 3.4	49.3 ± 4.0
骨密度	DXA(L2-4)	1.280 ± 0.338		1.077 ± 0.170	1.141 ± 0.083
	DXA(heel)	1.037 ± 0.052	†	0.886 ± 0.039	0.840 ± 0.083
	Stiffness	120.2 ± 12.8	†	102.6 ± 11.6	95.5 ± 15.4
	pQCT trab.	340 ± 21		332 ± 40	305 ± 48
	pQCT cort.	1039 ± 84		1041 ± 113	1001 ± 87
骨梁構造パラメーター	BV/TV	69.9 ± 3.7		68.8 ± 3.2	70.8 ± 5.1
	Tb.Th	2525 ± 465		2711 ± 1328	3213 ± 1026
	Tb.N	0.284 ± 0.045		0.285 ± 0.077	0.236 ± 0.059
	Tb.Sp	1073 ± 164		1172 ± 362	1304 ± 404
	Fractal D.	1.307 ± 0.053	‡	1.295 ± 0.093	1.229 ± 0.079
	TBPF	-4.477 ± 0.556	†	-3.391 ± 1.275	-3.531 ± 0.937
CT断面 骨面積	Cortical bone area	165.6 ± 12.3	†	141.9 ± 8.0	122.0 ± 16.7
	Total bone area	582.7 ± 56.9	‡	517.8 ± 73.9	474.6 ± 76.6

‡ p < 0.05 vs. 対照群, † p < 0.05 vs. 駅伝選手群

表3 閉経前、閉経後のママさんバレー選手と対照群の背景・骨密度・骨梁構造パラメーター・骨面積の比較

	(A) 閉経前			(B) 閉経早期			
	対照群 (n=21)	バレーボール選手 (n=24)	p	対照群 (n=23)	p vs. (A)	バレーボール選手 (n=10)	p vs. (A) p
対象者背景							
age	45.2±6.1	46.1±4.4		53.0±3.8	†	52.7±5.5	†
age at menopause	—	—		50.0±2.9		48.2±5.4	
BW	54.6±6.4	58.9±7.6	‡	54.2±6.4		57.0±4.9	
BH	157.0±4.8	157.6±5.5		154.7±4.3		155.5±5.6	
骨密度							
DXA(L2-4)	1.183±0.175	1.351±0.203	‡	0.975±0.113	†	1.197±0.194	‡
DXA(heel)	0.832±0.085	0.936±0.075	‡	0.744±0.067	†	0.863±0.078	‡
Stiffness	87.3±10.7	98.1±12.1	‡	77.0±10.7	†	89.3±13.0	‡
pQCT trabecular BMD	207.1±57.8	230.5±53.5		188.8±39.4		231.6±67.9	‡
pQCT cortical BMD	1039.7±108.2	1081.0±128.6		983.8±138.7		1045.4±120.1	
骨梁構造パラメーター							
BV/TV	35.4±8.7	36.7±4.3		33.6±4.5		38.1±7.9	‡
Tb.Th	508.1±94.9	507.2±42.2		481.7±33.9		540.2±88.5	‡
Tb.N	0.693±0.079	0.723±0.063		0.697±0.080		0.703±0.085	
Tb.Sp	956.3±239.0	886.4±131.0		970.3±170.4		903.6±235.1	
fractal dimension	1.533±0.062	1.570±0.047	‡	1.515±0.049		1.553±0.057	‡
TBPf	-2.266±0.755	-2.444±0.633	‡	-1.759±0.610	†	-2.586±1.010	‡
骨面積							
Cortical area	136.1±11.4	159.6±17.6	‡	126.8±15.7	†	150.3±15.3	‡
Total area	297.1±37.8	324.3±38.3	‡	293.2±35.5		311.3±45.9	‡

‡p<0.05 vs. 対照群, †p<0.05 vs. 閉経前 (A)

表4 踵骨骨梁構造パラメーター、骨密度、超音波測定値の年齢・体重との相関

		vs. 年齢		vs. 体重	
		r	p	r	p
骨梁構造パラメーター	BV/TV	-0.44	0.0005	0.39	0.005
	Tb.N	0.10	ns	-0.11	ns
	Tb.Th	-0.33	0.01	0.33	0.01
	Tb.Sp	0.38	0.05	-0.30	0.05
	fractal dimension	-0.29	0.05	0.38	0.005
	Euler's number	-0.30	0.05	0.02	ns
	SMI	0.43	0.0005	-0.41	0.001
	DA	0.07	ns	-0.04	ns
骨密度	DXA	-0.57	0.0001	0.39	0.005
超音波測定値	stiffness	-0.48	0.0001	0.30	0.05

表5 各骨梁構造パラメーターと骨密度・超音波測定値との相関

parameters	BMD	stiffness	SOS	BUA
BV/TV	0.49 †	0.59 †	0.52 †	0.47 †
Tb.N	-0.14	-0.35 †	-0.27 †	-0.33 †
Tb.Th	0.41 †	0.61 †	0.54 †	0.50 †
Tb.Sp	-0.47 †	-0.41 †	-0.38 †	-0.32 †
fractal dimension	0.15	0.34 †	0.05	0.50 †
Euler's number	0.38 †	0.43 †	0.52 †	0.23
SMI	-0.46 †	-0.71 †	-0.54 †	-0.66 †
DA	-0.07	-0.07	0.03	-0.15

†p<0.05

## 骨吸収マーカーとしての尿中 $\gamma$ -GTP 測定の意義

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：骨吸収が亢進した動物モデルを用いて、尿中  $\gamma$ -GTP の排泄動態について検討した。尿中への排泄される  $\gamma$ -GTP の状態についても、尿を分画採取して調べた。結果は、尿中  $\gamma$ -GTP 排泄量が生体内の骨吸収活性を反映すること、 $\gamma$ -GTP が遊離型としてではなく、なんらかの構造物と会合して排泄される可能性を示唆している。

キーワード：骨粗鬆症、骨吸収、破骨細胞、 $\gamma$ -GTP

### A. 研究目的

骨粗鬆症は、骨強度が低下して骨折のリスクが高まった病態で、推定患者数は1,000万人を超す。我が国における骨折の発生件数は、年々増加の一途をたどっており、寝たきりの重大な原因のひとつとなっている。

骨の脆弱性は、骨量と骨質に規定される。骨量に関しては、3次元での真の意味の骨量測定は普及しておらず、2次元に投射してX線で測定する“骨密度 ( $\text{g}/\text{cm}^2$ )”が、骨粗鬆症の診断や治療効果の判定に広く用いられている。

骨密度測定は、骨折リスクを評価する手段として重要である。一方、骨密度のみでは、骨折リスクを総合的に評価するには十分でないとの認識も高

まっている。最近の米国からの報告では、骨折を起こした閉経後女性の大部分は、骨密度が“骨粗鬆症”と診断される域にまでは低下しておらず、骨密度測定のみで治療の必要性を決定するだけでは、骨折防止につながらないことが懸念される。また、薬物治療によって抑制される骨密度低下の程度と、骨折発生の抑制の度合いにはあまり相関がないことも、骨密度以外の要因が骨折の発生には関わっていることを示唆する証拠である。

骨の脆弱性を規定するもう一つの要素である骨質の重要性が認識されている。骨質には、骨の材料特性など狭義の意味に加えて、骨のサイズ・geometry・微細構造・骨の代謝回転などが含まれる。これらのうち、現在の

ところ診療レベルで用いられているのは、血液・尿の生化学マーカーのみであるが、高価な検査のため、治療方針決定の際と、治療後の効果判定の2回にしか保険適応が認められていない。

退行期骨粗鬆症、なかでもエストロゲンの欠乏を主因とする閉経後骨粗鬆症の発症には、骨吸収の亢進が大きく寄与する。骨吸収は、血球系の細胞から分化して形成される多核の破骨細胞によって営まれる。骨吸収を反映する生化学マーカーとして臨床で広く用いられているのは、破骨細胞により分解され、血液中へ放出もしくは尿へ排泄されるI型コラーゲンの分解産物である。

我々は、新規の骨吸収促進因子を探索する過程で $\gamma$ -GTPを同定した。 $\gamma$ -GTPは、本来腎臓でもっとも高発現する細胞外酵素であるが、腎臓から精製した $\gamma$ -GTP、あるいは遺伝子組み換え型ヒト $\gamma$ -GTPタンパク質は、破骨細胞の形成を促進する活性を有する。一方、骨吸収が高まった病態において、尿中への $\gamma$ -GTP排泄が増加することを発見した。本研究では、骨吸収マーカーとしての尿中 $\gamma$ -GTP測定の意義について検討を行った。

## B. 研究方法

国立長寿医療センター病院を2003年4月から2004年8月までに受診した閉経後骨粗鬆症患者において、アレンドロネート治療前後の尿中 $\gamma$ -GTP排泄とI型コラーゲンN端テロペプチ

ド (NTX) を測定した。

住民検診に参加した551人の閉経後女性 (50-89歳、平均66歳) から尿を採取した。 $\gamma$ -GTP活性は、 $\gamma$ -GTP C-テストワコー試薬 (和光純薬) を用いて、クレアチン濃度は、デタミナ-L CRE 試薬 (協和メデックス) を用いて測定した。 $\gamma$ -GTP活性は、クレアチニン濃度で補正後、データ解析を行った。NTXおよびデオキシピリジノリン濃度は、ELISA法 (オステオリクス・DPD、住友製薬) で測定した。研究計画は、国立長寿医療センターの倫理委員会で認められ、提供者から文書による同意を得て行った。

## C. 研究結果

閉経後骨粗鬆症患者10人において、アレンドロネートによる治療の前後で、尿中デオキシピリジノリンは、 $131.4 \pm 51.2$  から  $48.0 \pm 31.6$  nmo/mmol Crに63%減少するのに伴って、尿中 $\gamma$ -GTP排泄は、 $58.2 \pm 151.1$  から  $44.2 \pm 13.2$  IU/g Crまで24%減少した。

住民検診に参加した551人の閉経後女性において、確立された骨吸収のマーカーである尿中デオキシピリジノリンとクレアチニンで補正した尿中 $\gamma$ -GTP排泄との間に強い相関が認められた ( $p < 0.0001$ )。全体の尿中 $\gamma$ -GTPは  $35.1 \pm 51.1$  IU/g Cr、デオキシピリジノリンは  $6.5 \pm 8.7$  nmol/mmol Crであった。明らかな骨吸収亢進のカットオフ値として、デオキシピリジノリンの  $7.6$  nmol/mmol Crが定められている

が、これを超える群の尿中 $\gamma$ -GTP 排泄は、85.7 +/- 95.0 IU/g Crであり、デオキシピリジノリンがカットオフ値以内におさまっている群の 22.0 +/- 12.0 IU/g Cr より有意に高値を示した。

#### D. 考察

骨吸収の亢進病態を代表する閉経後骨粗鬆症の患者において、骨吸収抑制薬の投与によって、尿中 $\gamma$ -GTP 排泄が減少すること、また 551 人の閉経後女性の検診の結果、尿中 $\gamma$ -GTP 排泄が、確立された骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリンと強い相関を示すことから、尿中 $\gamma$ -GTP 排泄は、生体内の骨吸収活性を反映することが示唆される。まだ症例数が少ないが、アレンドロネート治療前後の低下の度合いが、NTX では従来の報告と一致して約 60%以上であるのに対して、尿中 $\gamma$ -GTP 排泄の減少の程度は 24%にとどまることから、治療の指標としては NTX ほど鋭敏ではないと考えられる。

しかしながら、NTX をはじめとする骨代謝マーカーの測定は高価であり、現在のところ、治療方針決定の際と、治療後の効果判定の 2 回にしか保険適応が認められていない。また測定は検査会社に外注する場合はほとんどで、結果の通知には 1 週間程度かかるのが通例である。一方、 $\gamma$ -GTP は、自動測定装置を用いて短時間に多数の検体を処理することが可能でコストも比較的安価である。住民検診などに利用して、骨吸収が高まることによ

り骨折のリスクが大きい集団を一次スクリーニングするのに適していると考えられる。 $\gamma$ -GTP 測定によって抽出した集団は、骨折の既往や家族歴・やせ・喫煙・身長低下など骨折のリスク評価を行った後、骨密度測定を行い、NTX などの精密検査で骨代謝の状態を評価し、生活習慣の見直し、骨折への対策や薬物治療を開始することで、これまで放置され骨折によってはじめて骨の脆弱性が露見する症例を少なくすることが可能と思われる。

尿中に検出される $\gamma$ -GTP 活性の由来については、現時点では糸球体を濾過してくる可能性も否定できないが、近位尿細管の管腔側の膜に存在する $\gamma$ -GTP が、骨吸収の亢進状態では管腔内への排泄が促進される可能性が高いと考える。骨吸収マーカーとしての臨床応用に向けて、今後、尿中 $\gamma$ -GTP の分子形態、骨由来の近位尿細管刺激物質と排泄促進のメカニズムの解明が必要である。

#### E. 結論

クレアチニン値で補正した尿中 $\gamma$ -GTP 排泄量は、生体内の骨吸収活性を反映し、住民検診などでのスクリーニングに応用できる可能性がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 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:  $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase stimulates RANKL expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor.

**J Biol Chem 279: 5752-5756, 2004**

Kondo K, Ikeda K, Matsuo K: Detection of osteoclastic cell-cell fusion through retroviral vector packaging.

**Bone 35:1120-1125, 2004**

## 2. 学会発表

平松聖史, 辰巳佐和子, 新飯田俊平, 伊東昌子, 仁村雄次, 池田恭治:  $\gamma$ -GTP と骨・カルシウム代謝、第41回日本臨床分子医学会、7月16、17日、福岡

平松聖史, 辰巳佐和子, 高須 尚、新飯田俊平, 伊東昌子, 仁村雄次, 池田恭治:  $\gamma$ -GTP を過剰発現するマウスにおける骨粗鬆症、第22回日本骨代謝学会、8月4-7日、大阪

Hiramatsu K, Tatsumi S, Nimura Y, Takasu H, Niida S, Ito M, Ikeda K: GGT (gamma-glutamyltranspeptidase) as a pathogenic factor of bone loss. The 26th Annual Meeting of the American Society for Bone & Mineral Research. 10月1日～10月5日 Seattle, Washington, USA.

池田恭治: 骨粗鬆症の病因を分子レベルから探る、第6回日本骨粗鬆症学会特別講演、大宮、11月20日、2004

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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- $\beta$ -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- $\beta$ -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- $\beta$ -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。本年度新たに、Kremen1 ならびに sFRP4 に存在する SNP を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- $\beta$ -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- $\beta$ -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- $\beta$ -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- $\beta$ -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- $\beta$ -カテニンシグナル伝達因子の遺伝子多型が骨量に与える影響ならびに Wnt- $\beta$ -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  $\rightarrow$  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- $\beta$ -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。 $\beta$ 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。

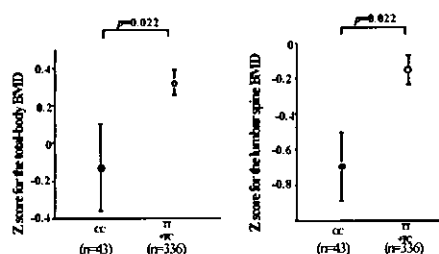
それぞれの時点での LRP5、sFRP4、Kremen1、さらに骨芽細胞の分化マーカーとしてアルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

## C. 研究結果

### 1, Wnt- $\beta$ カテニンシグナル伝達因子 sFRP4 ならびに Kremen1 の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響と骨芽細胞分化における発現変化に関する検討

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)。

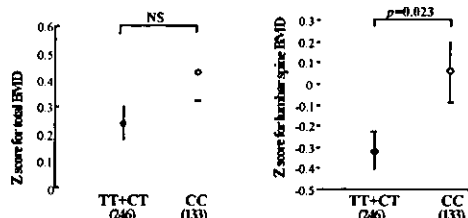
図 1, Kremen1 イントロン 1 における遺伝子多型と骨量との相関



また、Secreted Frizzled Related Protein 4 (sFRP4) エクソン内の Arg262 の SNP (CGC  $\rightarrow$  CGT) に関して、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; p=0.023) (図 2)。

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



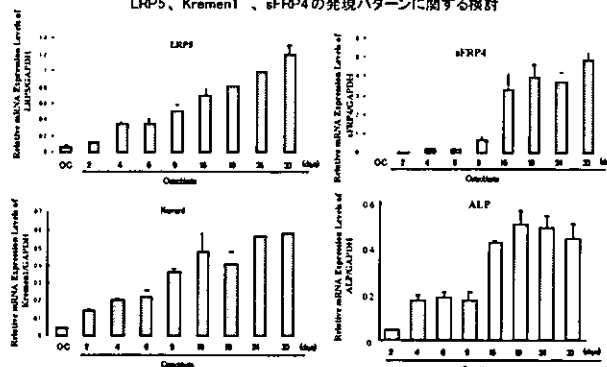
## 2. 初代培養破骨細胞、骨芽細胞における Wnt-β-カテニンシグナル伝達因子の発現パターンに関する検討

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 sFRP4 ならびに Kremen1 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、sFRP4 ならびに Kremen1 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

Wntβ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 遺伝子は、ヒトでの遺伝子変異やノックアウトマ

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



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)。Wntβ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 Wntβ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 Wntβ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 Wntβ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、構造から Wnt のレセプターのデコイレセプターとして働くと考えられ、Kremen1 と同様に Wntβ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 Wntβ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 Wntβ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 sFRP4 や Kremen1 といった Wnt $\beta$ 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 $\beta$ 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 $\beta$ カテニンシグナルを制御する sFRP4 や Kremen1 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 $\beta$ 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 $\beta$ 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おり、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 $\beta$ 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 7<sup>th</sup> 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。

# 骨量決定遺伝子に関する検討

分担研究者 細井孝之 東京都老人医療センター内分泌科部長

## 研究要旨

骨粗鬆症の遺伝的素因を候補遺伝子の多型性を用いた連関解析を、とくに遺伝子産物の蛋白質構造の多様性に結びつく codingSNP(cSNP)について行った。今回我々は骨代謝において基幹的な役割を果たすと考えられる tissue·non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)遺伝子を取りあげた。TNSALP は骨芽細胞の表面に存在し、石灰化部位へのリン酸、本遺伝子について、日本人集団における cSNP の探索、骨量との連関解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。

### A.研究目的

骨粗鬆症の発症には遺伝的素因と環境因子(生活習慣因子)の両方がかかわっている。我々は本疾患の遺伝的素因を候補遺伝子の多型性と臨床的指標との連関解析をおこなうことによって明らかにしようしてきた。遺伝子多型性にはいくつかの種類があるが、我々はとくに single nucleotide polymorphisms (SNPs)について検討している。なかでも、regulatory SNP(rSNP)と codingSNP(cSNP)は臨床に直結する生物学的意義を持つ可能性がある。rSNP は遺伝子の転写調節領域にあるもので、この多型性は転写量の多様性を介して、発現される蛋白質量の差をもたらす可能性がある。また、遺伝子産物中のアミノ置換をもたらす cSNP は蛋白質の質の差を介してその機能における多様性を発揮する可能性を秘めている。今回我々は骨代謝関連遺伝子のうち、 tissue·non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)遺伝子を取りあげた。TNSALP は骨芽細胞の表面に存在し、石灰化部位へのリン酸、本遺伝子について、

日本人集団における cSNP の探索、骨量との連関解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。

### B.方法

- ① TNSALP 遺伝子内の SNP 検索：変性 HPLC法をもちいて TNSALP 遺伝子の 12エクソンすべてについて SNPs の探索を行った。
- ② 対象：日本国内のある地域において、検診を目的に独歩で集合した高齢女性を対象とした。書面によるインフォームドコンセントを得たのち、DNAサンプルを目的とする採血を行った。
- ③ 骨量測定：骨量は dual energy X-ray absorptiometry (DXA)で前腕骨遠位端を測定した。
- ④ 遺伝子産物の酵素活性測定：TNSALP 遺伝子の多型性に対応する遺伝子産物を得るための発現ベクターを作成した。それぞれを COS7 細胞に遺伝子導入し、発現させた後に形質膜分画を得た。このマイクロゾームを用いて alkaline phosphatase 活性を測定した。

### C.結果

TNSALP 遺伝子のエクソン内について SNP 検索を行った結果、4つの SNP が検出された(表1)。このうちエクソン7のもの(787C>T)は246番目のアミノ酸である Tyr が His に置換する non-synonymous SNP であった。また、787C>T とエクソン8の876A>G との間の連鎖不平衡係数は高く、完全に連鎖していることも明らかとなった(表2)。787C>T の遺伝子型分布はにそれぞれのホモが全体の約4分の一を、ヘテロがほぼ半数を占めるかなり common な多型性である(図1)。

高齢女性集団(平均74才)において前腕骨の骨量と787C/T多型性との関連を検討したところ、この集団全体では、CC群で骨量が高い傾向にあったが統計的に有意ではなかった(図2)。ところが、この集団の平均年齢である74才を境に年齢で層別した上で解析すると、74才以上の集団では遺伝子型間で有意な骨量の差が見出された( $p<0.002$ )。これらのことから、この遺伝子多型性は後期高齢女性において影響を及ぼす遺伝的素因を反映していることが示唆された。

787C または 787T の TNSALP 遺伝子について発現ベクターを作成し、COS7細胞に遺伝子導入した。遺伝子発現を確認した後、それぞれの細胞から plasma membrane 分画を調製した。これを酵素サンプルとし TNSALP の酵素活性を測定した。その結果、それぞれのサンプルがもつ Vmax には差がないものの、787C の、Km 値は 787T に比較して有意に低いことが分かった(表3)。

### D.考察

エクソン7の787T/C SNP はいわゆる機

能的な SNP であり、その酵素としての特性の差を通して、高齢女性の骨量における個人差をもたらしていることが示唆された。Km 値が低いことは、より少ない基質においても効率よく反応が触媒されることを意味する。今回の結果は高齢女性の骨代謝におけるリン酸代謝の重要性を示唆するものでもあり、骨粗鬆症の予防と治療を目指した今後の研究に対して一つの方向性をしめすものとする。

### E.謝辞

本研究は日本女子大学五関正江博士、東京都老人総合研究所鈴木隆雄博士、吉田英世博士、日本医科大学折茂英夫博士、健康科学大学折茂肇博士らとの共同研究によって行われた。

### F.発表

1. Goseki-Sone M, Sogabe N, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Hideo Orimo, Suzuki T, Nakamura H, Orimo H and Hosoi T  
Functional analysis of the single-nucleotide polymorphism (787T>C) in tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with bone mineral density. J Bone Miner Res in press

2. Sawabe M, Arai T, Kasahara I, Esaki Y, Nakahara K, Hosoi T, Orimo H, Takubo K, Murayama S, Tanaka N; Tokyo Metropolitan Geriatric Medical Center; Japan Science and Technology Agency  
Developments of geriatric autopsy database and Internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). Mech Ageing Dev. 2004 Aug;125(8):547-52.



3. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004 Jul;63(7):742-9.
4. Ezura Y, Kajita M, Ishida R, Yoshida S, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M. Association of multiple nucleotide variations in the pituitary glutaminy cyclase gene (QPCT) with low radial BMD in adult women. *J Bone Miner Res.* 2004 Aug;19(8):1296-301.
5. 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.* 2004;22(4):341-5.
6. Kazama H, Ruberu NN, Murayama S, Saito Y, Nakahara K, Kanemaru K, Nagura H, Arai T, Sawabe M, Yamanouchi H, Orimo H, Hosoi T. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with neurofibrillary tangles. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004;18(2):145-50.
7. Horiuchi T, Kazama H, Araki A, Inoue J, Hosoi T, Onouchi T, Mizuno S, Ito H, Orimo H. Impaired gamma carboxylation of osteocalcin in elderly women with type II diabetes mellitus: relationship between increase in undercarboxylated osteocalcin levels and low bone mineral density. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(3):236-40.
8. Fukunaga M, Nakamura T, Shiraki M, Kuroda T, Ohta H, Hosoi T, Orimo H. Absolute height reduction and percent height ratio of the vertebral body in incident fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(2):104-10
9. Muraki S, Yamamoto S, Ishibashi H, Horiuchi T, Hosoi T, Orimo H, Nakamura K. Impact of degenerative spinal diseases on bone mineral density of the lumbar spine in elderly women. *Osteoporos Int.* 2004 Sep;15(9):724-8.

図1 TNSALP 787 C/T 遺伝型の分布

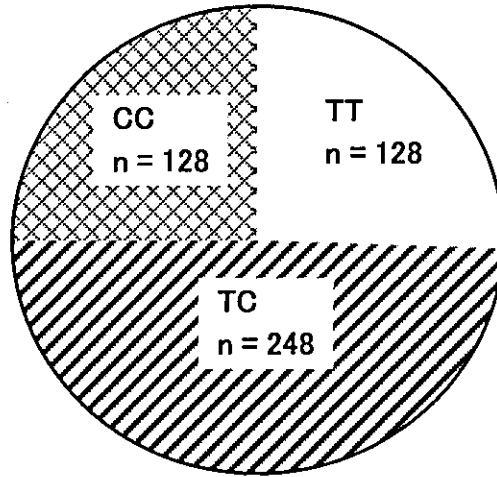


図2 TNSALP SNPs (787T, 787T>C)と高齢日本人女性の  
前腕骨骨量(Z score)との関連

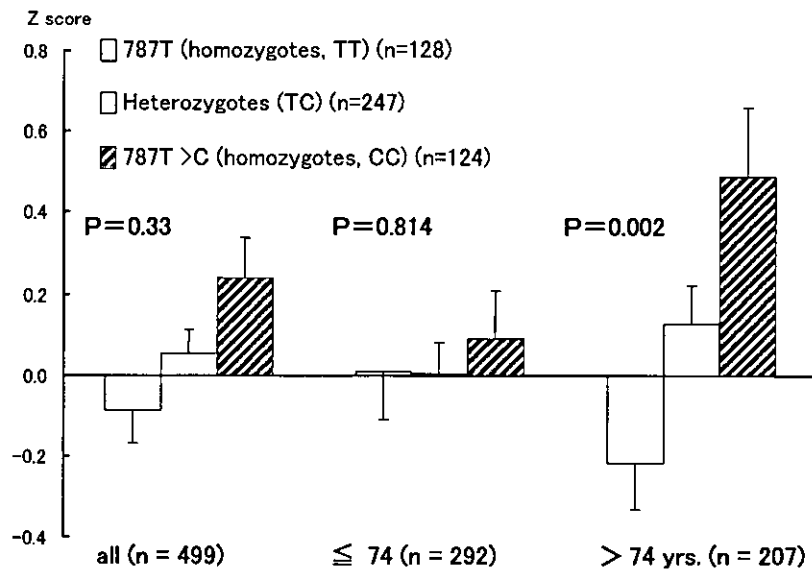


表1 日本人集団で認められたTNSALP遺伝子(NM 00478)のSNPs

Location	Nucleotide change	Amino acid substitution	Reference
Exon 5	330 (T>C)	Ser 93 Ser	Orimo et al.
Exon 6	534 (C>T)	Tyr 161 Tyr	In this study
Exon 7	787 (T>C)	Tyr 246 His	Henthorn et al.
Exon 9	876 (A>G)	Pro 275 Pro	Henthorn et al. rs 3200254 rs 3200255
Intron	862+20 (G>T)		Orimo et al.
Intron	862+51 (G>A)		Orimo et al.
Intron	862+58 (C>T)		Orimo et al.
Intron	1309+46 (G>T)		Orimo et al.

表2 連鎖不平衡の検討

787 C>T (Tyr246His)      876 A>G (Pro 275 Pro)

$D' = 1.0000$ ,  $r^2 = 1.0000$ ,  $\chi^2 = 1002.00$ ,  $p < 0.001$

表3 787Tと787T>C TNSALP遺伝子を導入されたCOS-1細胞におけるALP活性のKm値 (基質にp-NPPを使用)

TNSALPs	n	Km (mM)
787T (Tyr246Tyr)	15	$0.505 \pm 0.064$
787T>C (Tyr246His)	15	$0.290 \pm 0.002$ **

\*\* p < 0.01

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

成人女性における過去のカルシウム摂取と現在の骨密度、  
および若年女性のカルシウム摂取と骨量の経年変化 (2年間の介入研究)

分担研究者 上西一弘 女子栄養大学 助教授

研究要旨

骨量に対するカルシウム摂取の重要性を再検討する目的から、成人女性を対象に過去のカルシウム摂取と現在の骨量の関係を検討した。その結果、40歳代、50歳代ではOsteoporosisグループでは特に若年時のカルシウム摂取量が少なくなっており、60歳代以上では差は見られなかった。骨密度に対しては40歳～59歳までは若年時のカルシウム摂取量が影響を与えている可能性が強いが、60歳以降になるとカルシウム摂取よりも加齢の影響がより大きくなると考えられる。

次いで、最大骨量獲得年齢と考えられる18～21歳の健康な女子大学生96名を対象に、2年間のカルシウム付加試験を行った。平均のカルシウム摂取量が700mg/day以上にもかかわらず、骨密度が減少する者では、血清PTHが高値、IGF-1、T3が低値を示した。このことから若年時の骨量の増加、維持にはカルシウム代謝および骨代謝関連ホルモン以外にも、IGF-1やT3が関与している可能性が示された。

A. 目的

骨粗鬆症の予防、治療のためには食事や身体活動を含めた生活習慣全体を考慮することが重要である。なかでも骨量の獲得、維持のためには適切なカルシウム摂取が必要である。現在わが国のカルシウム所要量は成人期以降男女共に1日600mgと定められている(18～29歳の男性は700mg)。2005年4月から使用される新しい食事摂取基準では、成人の目安量としては550～900mgとなる。ところで、所要量や食事摂取基準は原則としては集団を対象とした数値であり、個人に適應する際には様々な個人差を考慮する必要がある。我々のこれまでの研究では、カルシウム吸収率の個人差

は大きく、当然必要量にも違いがあることが考えられる。

そこで今年度はまず、成人女性を対象に過去のカルシウム摂取と現在の骨量の関係を検討した。これは骨量に対するカルシウム摂取の重要性を再検討する目的からである。ついで、若年女性に2年間のカルシウム付加を行い、骨量の変化を観察した。

本研究により、カルシウム摂取の重要性と、その個人差についての検討が可能であり、骨粗鬆症のテーラーメイド医療に関わる重要な知見が得られることが期待できる。

以下、2つの研究についてそれぞれ報告する。