

平成 18 年度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

高齢者の腰痛に及ぼす脊柱変形、生活習慣要因および生活習慣病の影響と
相互作用の解明

低骨量と脊柱変形に関連する機能的 SNP としての GGCX 遺伝子多型性について

分担研究者 細井孝之 国立長寿医療センター先端医療部 部長

骨粗鬆症および変形性関節症は、高齢者、特に閉経後女性に多く見られる骨代謝疾患であり、脊椎の変形や腰背痛を引き起こすことによって罹患者の ADL および QOL を損なうばかりでなく、社会的にも大きな損失をもたらす。これらの疾患の発症には複数の遺伝要因と環境要因が関連している。われわれは候補遺伝子の多型性を用いて疾患の遺伝的素因を検討してきたが、その中で γ -glutamylcarboxylase(GGCX)遺伝子におけるアミノ酸置換を起こす一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism, SNP)である R325Q (CGA>CAA, dbSNP:rs699664) が高齢女性の骨密度と関連があることを見出し報告した(Bone. 2007 Feb;40(2):451-6.)。今回はこの遺伝子多型性と骨量との関連を確認するとともに脊柱変形との関連を検討した。さらに GGCX の活性に必要なビタミンであるビタミン K の摂取状況が、骨代謝関連ビタミン K 依存性蛋白質であるオステオカルシンの gla 化に及ぼす影響を検討した。補正大腿骨頸部 Z スコアを AA 群と AG+GG 群で比較検討したところ、それぞれ 1.059 ± 0.604 (AA), 0.548 ± 0.819 (AG+GG)であり、群間に有意な差を認めた。補正椎体終板硬化スコアは $c.8762=AA$ において特に低値であった。AA 群と AG+GG 群で比較すると、補正椎体終板硬化スコアはそれぞれ 0.314 ± 0.678 (AA), 1.682 ± 2.369 (AG+GG) であり群間に有意差を認めた ($p=0.0186$)。食生活との関連では遺伝子多型別に納豆からの VK 摂取量および血中 MK-7 と ucOC/ intact OC 比の相関を検討し、GG 型では有意な負の相関が認められたのに対し、AA 型では相関が認められなかった。

I. GGCX 遺伝子多型性と骨量ならびに脊椎変形との関連

A. 研究目的

遺伝子多型性と骨量との関連を確認するとともに脊椎変形との関連を検討する。

B. 研究方法

検診のために東京都老人医療センターを訪れた70歳以上の健康な閉経後女性113人(年齢 75.07 ± 3.81)を対象とした。骨密度は大腿骨近位部をDXA法で測定した。この測定値をもとに得たZスコアをbody mass index (BMI)で補正した。脊椎変形は胸椎および腰椎(Th4-L4)の正面および側面X線写真を用いて評価した。Genantの方法に修正を加えて椎間腔狭小化、椎体終板硬化および骨棘形成について評価した。評価結果はスコア化され、回帰分析にて年齢とBMIで補正した。

c.8762 G>A GGCX 遺伝子多型タイピングは既報のとおり、degenerative HPLC法を用いて行った。

C. 研究結果

補正大腿骨頸部ZスコアをAA群とAG+GG群で比較検討したところ、それぞれ 1.059 ± 0.604 (AA), 0.548 ± 0.819 (AG+GG)であり、p値は0.0315と群間に有意な差を認めた。この結果は既報と一致するものである(図1)。

補正椎体終板硬化スコアはc.8762=AAにおいて特に低値であった。補正スコアをAA群とAG+GG群で比較検討したところ、椎間腔狭小化スコアおよび補正骨棘形成スコアについては有意な相関は見られなかったが、補正椎体終板硬化スコアは、それぞれ 0.314 ± 0.678 (AA), 1.682 ± 2.369 (AG+GG)であり群間に有意差を認めた(p=0.0186)(図2)。

D. 考察

GGCX c.8762=AAのアレル型は、骨粗鬆症と脊椎変形性関節症の両者に対して予防的効果を持つことが示唆された。またわれわれはc.8762=Aに対応する325Gln-GGCXのカルボキシラーゼ活性が、c.8762=Gに対応する325Argよりも高いことを見出したおり、GGCXアレル型の両疾患に対する影響は、カルボキシラーゼ活性の差異を介したものである可能性が示唆された。これらの結果は骨粗鬆症や脊椎変形性関節症の予防と治療におけるビタミンKの重要性と個人の特性に合わせた栄養指導の有用性を示唆する。

II. GGCX 遺伝子多型性と食生活との関連

A. 研究目的

GGCX 8762 G>A 遺伝子多型がビタミンK(VK)摂取量と血中VK濃度およびオステオカルシン(OC)との関連に及ぼす影響を若年男

性を対象として検討する。

B. 研究方法

男性 60 名(22.6±1.7 歳)を対象に、3 日間の食事調査、血中 VK 濃度、血中骨代謝マーカー[intact OC、undercarboxylated OC (ucOC)、骨型アルカリホスファターゼ (BAP)] 測定、GGCX 遺伝子多型タイピングを行った。

C. 研究結果

野菜からの VK 摂取量と血中フィロキノン (PK) は有意な正の相関 ($r=0.337$, $P=0.009$) が認められ、納豆からの VK 摂取量と血中メナキノン(MK)-7 についても、有意な正の相関がみられた ($r=0.663$, $P<0.001$)。また、総 VK 摂取量と ucOC/ intact OC 比は、負の相関がみられた ($r=-0.385$, $P=0.003$)。一方、GGCX 遺伝子多型の出現頻度は、GG 型 24 人 (40%)、GA 型 30 人 (50%)、AA 型 6 人 (10%) であった。遺伝子多型別に納豆からの VK 摂取量および血中 MK-7 と ucOC/ intact OC 比の相関を検討したところ、GG 型では有意な負の相関が認められたのに対し、GA 型ではやや傾向が認められたが有意ではなく、AA 型では相関が認められなかった。

D. 考察

骨粗鬆症の発症リスクが高いと考えられている GG 型において、納豆からの VK 摂取量

および血中 MK-7 濃度と ucOC/ intact OC 比の有意な負の相関が明らかとなり、個人に対応した望ましいビタミン K 摂取により、ucOC/ intact OC 比を低下させて骨折発症リスクを軽減できる可能性が示された。本研究より、骨粗鬆症予防における SNP タイプ別のテーラーメイド栄養教育の重要性が示唆された。

E. 結論

大腿骨頸部 Z スコアを比較したところ AA 群が AG+GG 群に比べ有意に高値であった。補正椎体終板硬化スコアは $c.8762=AA$ において特に低値であり、AA 群が AG+GG 群に比べ有意に低かった。血中 MK-7 と ucOC/ intact OC 比に関して GG 型では有意な負の相関が認められたのに対し、AA 型では相関が認められなかった。

F. 健康危険度情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kinoshita H, Nakagawa K, Narusawa K, Goseki-Sone M, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Yoshida H, Okano T, Nakamura T, Suzuki T, Inoue S, Orimo H, Ouchi Y, Hosoi T. A

functional single nucleotide polymorphism in the vitamin-K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Gln) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women. Bone. 2007 Feb;40(2):451-6.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

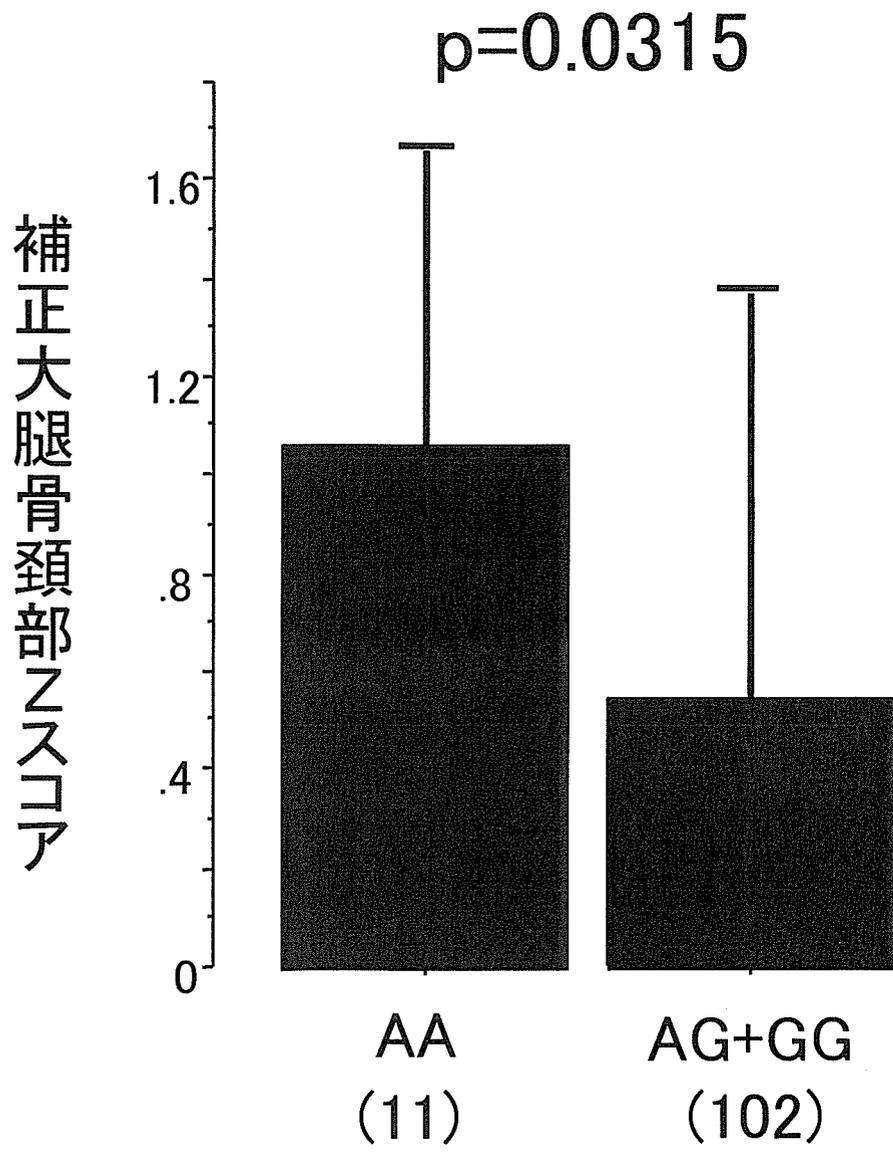


図1 GGCXのSNPと 補正大腿骨頸部Zスコアの関連。
 数字は平均±標準偏差。
 p値の計算はマン・ホイットニーのU検定を用いた。

補正
椎間狭小化
スコア
p=0.2297

補正
椎体終板硬化
スコア
p=0.0186

補正
骨棘形成
スコア
p=0.7128

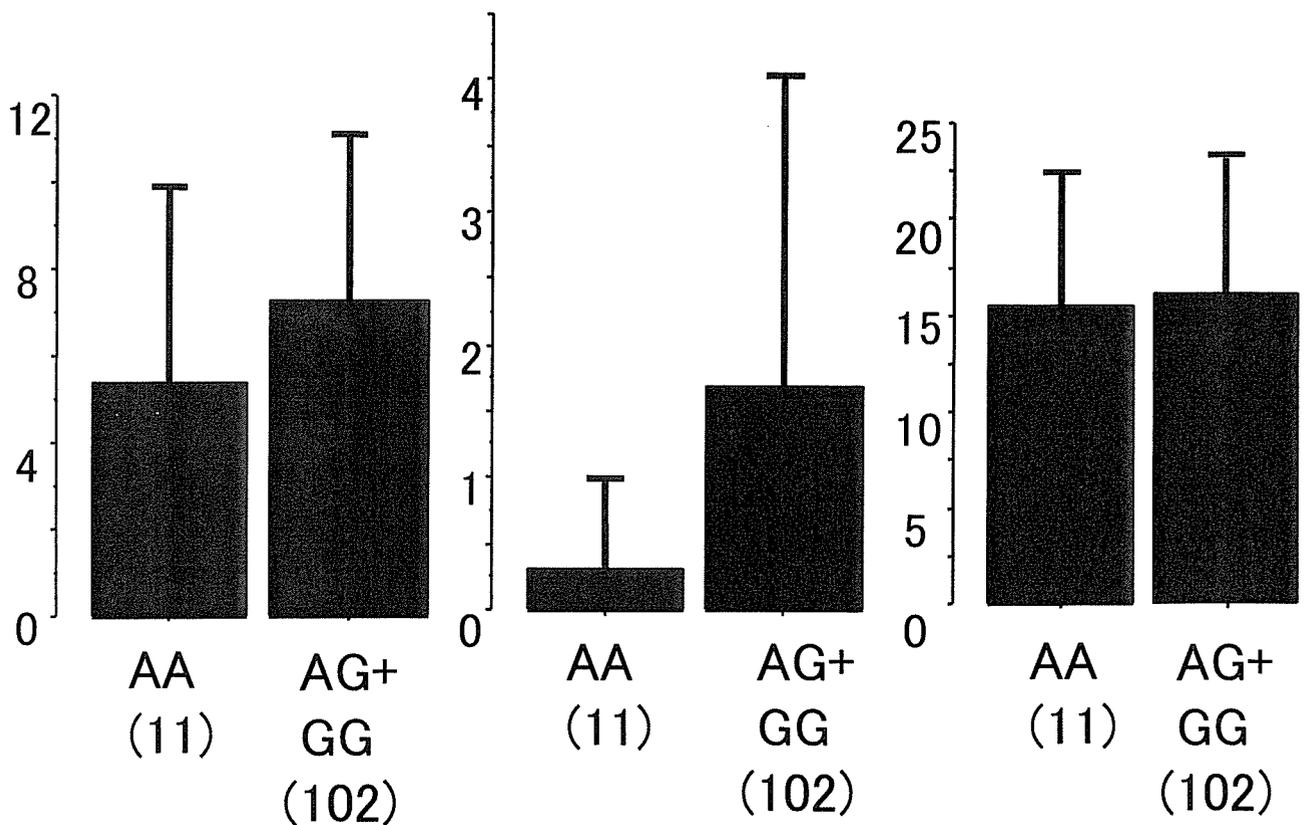


図2 GGCXのSNPと脊椎変形性関節症スコアの関係。
数字は平均±標準偏差。
p値の計算はマン・ホイットニーのU検定を用いた。

平成18年度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

高齢者の腰痛に及ぼす脊柱変形、生活習慣要因および生活習慣病の影響と
相互作用の解明

高齢者の脊柱変形と躯幹短縮における生活機能低下の実態解明と予防法の開発
（脊柱変形と遺伝子の関連：長野コホート）

分担研究者 井上 聡 東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座 客員教授

高齢者の脊柱変形発症に関与する遺伝的素因に関しては十分な理解がなされていない。そこで本研究では骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において主要な役割を担う Wnt- β カテニンシグナル伝達に関与する遺伝子群と骨量ならびに変形性腰椎症との関連に関して一塩基置換遺伝子多型 (SNP) を用いた解析を行った。その結果、Wnt- β カテニンシグナル伝達因子の WNT10b のエクソン 5 にある SNP は骨量と相関することを見出した。さらに Wnt10b 遺伝子の 5' 上流域から 3' 下流域までの SNP が連鎖不平衡の関係にあり Wnt10b 遺伝子が一つのハプロタイプブロックを形成している可能性が示唆された。さらに Wnt- β カテニンシグナル応答遺伝子の一つである WISP1 遺伝子の SNP が脊柱変形のパラメーターの一つである終板硬化と有意に相関することを発見した。今後これら遺伝子をはじめとする Wnt- β カテニンシグナル伝達因子を標的とした骨粗鬆症ならびに変形性脊椎症診断法ならびに治療薬が開発されることが期待される。

A. 研究目的

高齢者の脊柱変形とそれに伴う疼痛は高齢者の ADL ならびに QOL を大きく損なう。した

がって、本疾患の原因解明を行うことは老人医療において重要な意義を有する。その一方で、これらの遺伝的素因に関しては十分な理解がなされていない。そこで、本研究では近

年、骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において主要な役割を果たしていることが明らかにされた細胞内シグナルである Wnt- β カテニンシグナル伝達において重要な役割を果たす Wnt10b や WISP1 をはじめとする複数の遺伝子と変形性腰椎症ならびに骨量との関連に関して一塩基置換遺伝子多型 (SNP) を用いた解析を行った。

B. 方法

1. Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性腰椎症

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により Wnt-LRP5 シグナル伝達調節因子であるヒト Wnt10b 遺伝子における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行い、BMD との相関を検討した。

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により Wnt-LRP5 シグナル伝達調節因子である WISP1 における SNP を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症の指標 (椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化) を評価した。骨密度ならびに各種臨床データについても同時に測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

C. 結果

1. Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性腰椎症

LRP5/6 に対してリガンドとして働く Wnt10b のエクソン 5 に存在するアミノ酸置換を伴わない SNP (1059C/T, His353His, rs7470505) においては全身骨ならびに腰椎骨密度に関して有意差を呈していた (図 1A, B)。また、Wnt10b の 5' 上流域に存在する SNP (rs833840)、3' 非翻訳領域における SNP (rs3741627)、さらには 3' 下流領域における SNP (rs10875902) も同時に決定し (図 2)、これら遺伝子多型間の連鎖不平衡に関して検討を行った。その結果これら遺伝子多型は連鎖不平衡にあることが示された (Table 1)。

次に WISP1 遺伝子の 3' 非翻訳領域に存在する SNP と変形性脊椎症の各パラメーター (骨棘形成、終板硬化、椎間板狭小化) を検討した。その結果、この SNP は終板硬化と有意に相関した (Table 2)。脊椎変形は年齢の影響を受けることからさらに我々は年齢補正後に再解析を行なった (Table 3)。WISP1 遺伝子の本 SNP (2364A/G) において G アレルを有する群 (AG+GG) と G アレルを有さない群 (AA) との 2 群間での比較を行なった。終板硬化を複数有する群 (n=271) においては複数有さない群 (n=33) と比較し、AA 群の頻度が有意に高かった (P=0.0069, オッズ比=2.91)。終板硬化を有する群 (n=235) と有さない群 (n=69) との比較でも同様に、AA 群の頻度が有意に高かった (P=0.044, オッズ比=1.78)。

D. 考察

1. Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性関節症との関連

Wnt- β -catenin 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 LDL receptor-related protein 5 (LRP5) 遺伝子は、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。我々は今までに、LRP5 の一塩基置換遺伝子多型性 (SNP) と骨量との関連について検討してきた。その結果、LRP5 遺伝子イントロン 17 に存在する SNP は腰椎骨密度と有意に相関することを発見した (Urano et al, J Bone Miner Metab, 2004)。さらに、アミノ酸変異を伴う SNP に注目し解析を行った結果、エクソン 18 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP (A1330V) が腰椎骨密度と有意に相関することも見出した (Ezura et al, Bone, *in press*)。Wnt- β -catenin 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-LRP シグナル伝達因子である Wnt10b 遺伝子のエクソン 5 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 (Usui et al, Geriatric Gerontol Int, *in press*)。Wnt10b は哺乳動物に多数存在する Wnt シグナルのリガンドとして機能する因子の一つである。近年 Wnt10b 遺伝子のトランスジェニックマウスにおいて骨量増加を示し、ノッ

クアウトマウスでは骨量減少を示すことが報告されている。このマウスのデータと今回の我々の遺伝子多型での解析から、多数存在する Wnt-LRP シグナル制御因子の中で Wnt10b-LRP5 経路が骨形成においては他の Wnt シグナルでは代償できない重要な役割をはたしている可能性が示唆された。また、本 SNP を含む Wnt10b 遺伝子における 5'上流域、翻訳領域、3'非翻訳領域ならびに 3'下流域までの 4 種類の SNP 間での連鎖不平衡を検討したところ、これらはすべて連鎖不平衡にあることを見出した。したがって、Wnt10b 遺伝子全体はハプロタイプブロックを形成している可能性があり、このハプロタイプブロックが Wnt10b 遺伝子の発現や機能を調節し、骨代謝に影響を与えている可能性がある。

前述したように我々は 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てきた。その一方、我々は LRP5 のエクソン 2 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP (Q89R) が変形性脊椎症におけるパラメータ (骨棘形成、椎間板狭小、終板硬化) の中で骨棘形成と有意な相関があることを報告した (Urano et al, Spine, 2007)。したがって Wnt-LRP シグナル伝達因子は骨芽細胞の増殖や分化制御ばかりでなく、軟骨の変成にも関与することが示唆された。そこで、我々は Wnt-LRP5 シグナルの下流シグナルである WISP1 と変形性脊椎症におけるパラメーターとの相関を検討したところ、終板硬化との間に有意な相関を見出した。

以上より、Wnt-LRP5 シグナル伝達因子は脊椎変形を規定する遺伝子であることが示唆さ

れた。今後、LRP5 ならびにそのリガンドである Wnt10b さらには下流シグナルである WISPI が脊柱変形にはたす役割を探求することで、新たな骨粗鬆症や変形性脊椎症における遺伝子マーカーや治療薬の応用や開発が期待される。

E. 結論

LRP5/6 に対してリガンドとして働く Wnt10b のエクソン 5 に存在するアミノ酸置換を伴わない SNP (1059C/T, His353His, rs7470505) においては全身骨ならびに腰椎骨密度に有意差を認めた。Wnt10b の 5' 上流域に存在する SNP (rs833840)、3' 非翻訳領域における SNP (rs3741627)、さらには 3' 下流領域における SNP (rs10875902) を決定し、これら遺伝子多型は連鎖不平衡にあることを明らかにした。WISPI 遺伝子の 3' 非翻訳領域に存在する SNP (2364A/G) において G アレルを有する群 (AG+GG) に比べ、G アレルを有さない群 (AA) は終板硬化を有する頻度が有意に高かった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Usui T, Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in Wnt10b gene with bone mineral density. Geriatric Gerontol Int (in press)

2. Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the steroid and xenobiotic receptor (SXR) gene (IVS1-579A/G) with bone mineral density. Geriatric Gerontol Int (in press)

3. Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the WISPI gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. J Bone Miner Metab (in press)

4. Fujita M, Sugama S, Nakai M, Takenouchi T, Wei J, Urano T, Inoue S, Hashimoto M: Alpha-synuclein stimulates differentiation of osteosarcoma cells: Relevance to downregulation of proteasome activity. J Biol Chem (in press)

5. Takayama K, Kaneshiro K, Tsutsumi S, Horie-Inoue K, Ikeda K, Urano T, Ijichi N, Ouchi Y, Shirahige K, Aburatani H, Inoue S: Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. Oncogene (in press)

6. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Kumagai J, Ogushi T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue S: Increased expression of Estrogen-Related Receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int J Cancer* (in press)
7. Urano T, Shiraki M, Narusawa K, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *Spine* 32, 25-29, 2007
8. Kinoshita H, Nakagawa K, Narusawa K, Goseki-Sone M, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Yoshida H, Okano T, Nakamura T, Suzuki T, Inoue S, Orimo H, Ouchi Y, Hosoi T: A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Glu) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women. *Bone* 40, 451-456, 2007.
9. Nakasato N, Ikeda K, Urano T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 540-546, 2006.
10. Takeuchi T, Inoue S, Yokosawa H: Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 473-477, 2006.
11. Urata Y, Ihara Y, Murata H, Goto S, Koji T, Yodoi J, Inoue S, Kondo T: 17-beta-Estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardiac H9c2 cell. *J Biol Chem* 281, 13092-13102 (2006)
12. Ichikawa T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Blumberg B, Inoue S: Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 281, 16927-16934 (2006)
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Ezura Y, Nakajima T, Inoue S, Hosoi T, Suzuki T, Shiraki M, Emi M, Noda M: A genetic screening of osteoporosis susceptibility genes via 1315 common missense single nucleotide polymorphisms: a leader sequence variant (16-S) of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) had reproducibly associated with low bone mineral density among adult women. American Society of Bone and Mineral Research 28th Annual Meeting, Philadelphia, Pennsylvania, USA (2006.9.15-29)
2. Inoue S: Post-translational modification of 14-3-3sigma by E3 ligase Efp. (2006.8.27-9.1) 2006 GRC on Biology of 14-3-3 Protein, Gordon Research Conference (Oxford, UK)
3. Horie-Inoue K, Ichikawa T, Inoue S:

[President's Poster] Vitamin K2 activates the transcription of bone-related genes in osteoblastic cells by steroid and zenobiotic receptor and a novel pathway independent of gamma-carboxylation. (2006.10.21-26) 3rd IOF Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis, Port Douglas, Australia.

【国内学会】

1. 井上聡：[研究奨励賞受賞講演]エストロゲン標的遺伝子の同定とその機能の解明 (2006.5.19) 第79回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
2. 堀江公仁子、高山賢一、坊農秀雅、大内尉義、岡崎康司、井上聡：ヒトゲノム応答配列に基づいた新規ステロイドホルモン応答遺伝子の同定 (2006.5.19) 第79回日本内分泌学会学術総会 (神戸)
3. 浦野友彦、白木正孝、細井孝之、中村利孝、大内尉義、井上聡：Wnt/beta-catenin シグナル伝達因子における遺伝子多型が変形性脊椎症に与える影響 (2006.6.7-9) 第48回日本老年医学会学術集会 (金沢)
4. 塩之入温、井上聡、大内尉義：高齢骨粗鬆症女性患者における転倒者と非転倒者の重心動揺計による評価 (2006.6.7-9) 第48回日本老年医学会学術集会 (金沢)
5. 井上聡：[シンポジウム] 骨のアンチエイジング-骨粗鬆症の診断、治療とその予防 (2006.6.16-18) 第1回アンチエイジング国際シンポジウム&エキスポ東京 (東京)
6. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：骨芽細胞における新規ビタミン K 標的分子の探索とその発現制御機構の解析 (2006.7.6-8) 第24回日本骨代謝学会 (東京)
7. 江面陽一、中島敏明、鈴木隆雄、細井孝之、井上聡、白木正孝、江見充、野田政樹：原発性骨粗鬆症発症に関わる遺伝的素因の網羅的解析における再現性の検討：ゴナドトロピン遊離ホルモン遺伝子のシグナルペプチド多型 (2006.7.6-8) 第24回日本骨代謝学会 (東京)
8. 井上聡：[学術賞受賞講演] 骨代謝疾患の治療薬作用機構ならびに疾患遺伝子の探索 (2006.7.6-8) 第24回日本骨代謝学会 (東京)
9. 井上聡：[シンポジウム] 核内受容体と代謝・血管機能調節 エストロゲンならびにエストロゲン関連受容体 (ER/ERR) とエネルギー代謝 (2006.7.13-14) 第38回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (東京)
10. 井上聡：[シンポジウム] エストロゲン標的因子群の同定とそれらの癌ならびに脳神経系における役割 (Identification of estrogen receptor target genes and role of their gene products in cancer and nervous system) (2006.7.19-21) 第29回日本神経科学大会 (京都)
11. 浦野友彦、臼井貴彦、白木正孝、大内尉義、井上聡：脂肪細胞分化に関わる遺伝子多型と骨粗鬆症との関連解析 (2006.10.12-14) 第8回日本骨粗鬆症学会 (東京)
12. 東浩太郎、浦野友彦、藤田雅代、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるグルココルチコイド標的遺伝子の網羅的解析 (2006.10.12-14) 第8回日本骨粗鬆症学会 (東京)
13. 堀江公仁子、市川智恵、井上聡：[日本骨

代謝学会・日本骨粗鬆症学会ジョイントシンポジウム] 骨芽細胞におけるビタミン K 作用の新展開－新規標的分子の探索とその発現制御機構の解析 (2006.10.12-14) 第 8 回日本骨粗鬆症学会 (東京)

14. 伊地知暢広、池田和博、八木研、岡崎康司、井上聡：脂肪細胞分化・形成におけるエストロゲン受容体の発現調節 (2006.10.27-28) 日本肥満学会 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

Table 1. Wnt10b 遺伝子における各遺伝子多型間における連鎖不平衡に関する解析(D')

| SNP ID | rs833840 | rs1051886 | rs3741627 |
|-----------|----------|-----------|-----------|
| rs1051886 | 0.893 | | |
| rs3741627 | 0.910 | 0.994 | |
| rs2023825 | 0.917 | 0.994 | 1.000 |

Table 2. WISP1 遺伝子 3'非翻訳領域での遺伝子多型(2364A/G)における遺伝子型(AA, AG, GG)と各臨床パラメーターとの相関解析

| Items | Genotype (mean \pm SD) | | | P value (ANOVA) | P value (Kruskal-Wallis) |
|--------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------------------|
| | AA | AG | GG | | |
| Number of subjects | 120 | 149 | 35 | | |
| Age (years) | 66.1 \pm 9.2 | 66.3 \pm 8.5 | 67.1 \pm 10.6 | NS | NS |
| Height (cm) | 150.7 \pm 5.6 | 150.2 \pm 6.8 | 150.0 \pm 5.0 | NS | NS |
| Body weight (kg) | 50.3 \pm 7.6 | 50.2 \pm 8.3 | 48.0 \pm 5.4 | NS | NS |
| BMI | 22.1 \pm 2.9 | 22.2 \pm 2.9 | 21.3 \pm 3.3 | NS | NS |
| Endplate sclerosis | 0.58 \pm 1.09 | 0.34 \pm 0.74 | 0.09 \pm 0.28 | 0.0062 | 0.024 |
| Osteophyte | 5.89 \pm 3.93 | 5.72 \pm 3.40 | 5.57 \pm 4.08 | NS | NS |
| Disk narrowing | 2.21 \pm 1.79 | 2.09 \pm 2.00 | 2.03 \pm 1.86 | NS | NS |

BMI; body mass index, NS; not significant

Table 3. WISP1 遺伝子 3'非翻訳領域での遺伝子多型(2364A/G)における遺伝子型(AA, AG, GG)と年齢補正後の終板硬化との相関解析

| Group compared | AA vs. AG+GG | | |
|---|--------------|---------|-----------|
| | OR | P value | 95%CI |
| Endplate sclerosis (≥ 1)(n=235) versus no endplate sclerosis (=0)(n=69) | 1.78 | 0.044 | 1.01-3.13 |
| Higher endplate sclerosis (≥ 2)(n=271) versus Lower endplate sclerosis (≤ 0)(n=33) | 2.91 | 0.0069 | 1.34-6.30 |

OR; Odds ratio, 95%CI; 95% confidence intervals

図1, Wnt10b遺伝子多型(1059C/T, rs7470505)と全身骨ならびに腰椎骨量との相関

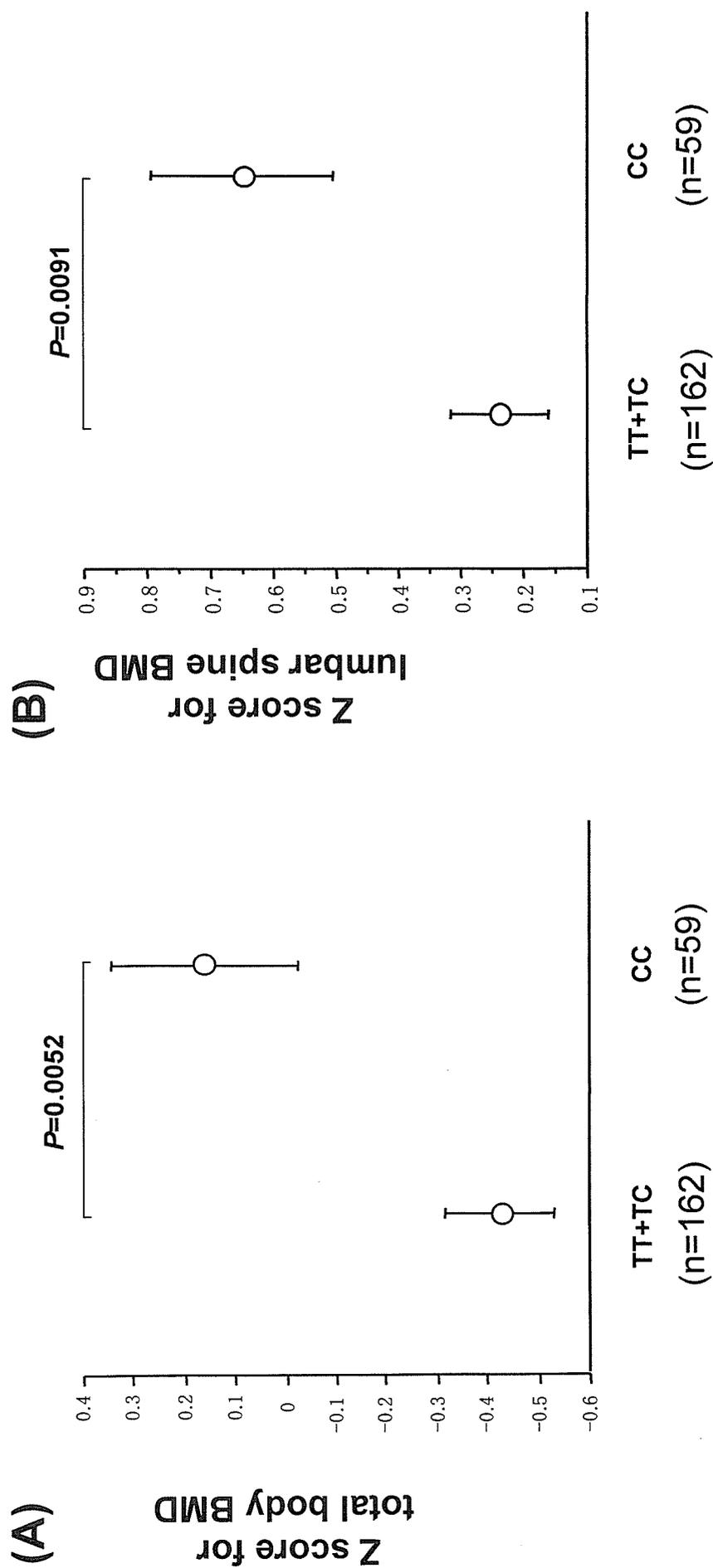
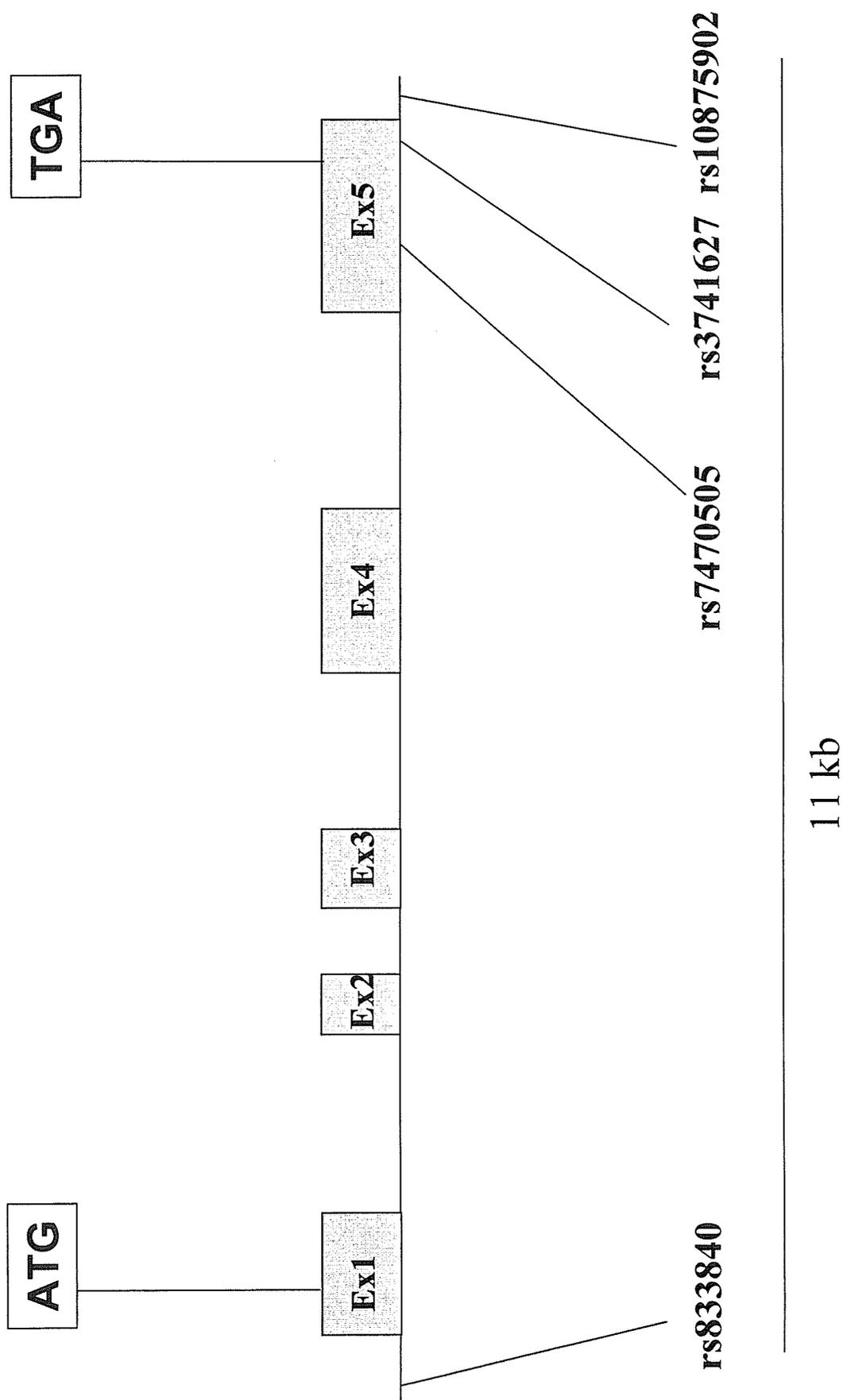


図2, 本研究にて遺伝子型を決定したWnt10b遺伝子におけるSNPの位置
ヒトWnt10b遺伝子



平成 18 年度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

高齢者の腰痛に及ぼす脊柱変形、生活習慣要因および生活習慣病の影響と
相互作用の解明

骨粗鬆症における骨コラーゲンの異常と動脈硬化関連因子との関連

分担研究者 齋藤 充 東京慈恵会医科大学整形外科 講師

近年、骨粗鬆症に伴う骨強度の低下には骨密度低下のみならず骨質の低下が関与していることが明らかにされてきている。骨質を規定する因子として、骨の単位体積当たり半分を占めるコラーゲンの強度発現に関与している分子間架橋は重要な役割を演じているとされているが骨脆弱性との関連は十分には解明されていない。そこで、我々はコラーゲン架橋を網羅的に解析する手法を独自に確立し、骨粗鬆症性的大腿骨頸部骨折患者（25名）から採取した骨のコラーゲン架橋の状態を解析した（症例対照研究）。その結果、骨強度の発現にプラスに作用する生理的架橋（善玉架橋）の減少と、マイナスに作用する非生理的架橋（Advanced glycation end products, 悪玉架橋）の過形成が生じていることを明らかにした。さらに、こうした架橋異常をもつ疾患群では、動脈硬化、心血管イベントのリスク因子として報告されているホモシステインの高値とビタミン B6 の低値が認められた。ホモシステイン高値やビタミン B6 低値はそれぞれ、コラーゲン架橋の調節因子でもあることから、これらの要因により骨質の低下がもたらされる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、骨の強度に影響を及ぼす骨質の重要が指摘され、それを規定する因子として石灰化

度、微細損傷、コラーゲンの質的特性が重要であるとされている。近年、血中ホモシステインの高値やその代謝に関わるビタミン B 群の不足が骨密度の低下を伴わない骨折リスク

となること諸外国のコホート研究から明らかにされ、骨質低下との関連が注目されている。興味深いことにホモシステインおよびビタミン B6 は骨質因子であるコラーゲンの強度を規定している分子間架橋の形成にも関与している。そこで、本研究では、今回は大腿骨頸部骨折患者の骨組織を新旧の骨単位に分けてた後にそれぞれの分画におけるコラーゲン架橋の状態を解析し、同患者群における血中ホモシステイン値とビタミン B6 値との関連を調べた。

B. 研究方法

1) 新たな骨コラーゲン評価法の確立

インフォームドコンセントを得た上で、大腿骨頸部から皮質骨、海綿骨および血液を同時に採取し得た大腿骨頸部骨折患者 25 名(78±6 歳)と屍体 25 例(老年期非骨折群 76±6 歳, 壮年期非骨折群 58±8 歳)を解析の対象とした。骨コラーゲン分析にはコラーゲンの成熟と老化度を評価するため以下のごとく新たな骨質評価系を確立した。すなわち、ヒト骨は若い骨単位(低石灰化度)と古い骨単位(高石灰化度)が混在している。そこでこれらの領域における固有のコラーゲン代謝を解析するため、骨は密度勾配分画法を用いて石灰化度別に分画した。得られた各分画について、すでに我々が確立した高速液体クロマトグラフィー法でコラーゲンの分子間に酵素反応を介して形成される生理的架橋(未熟架橋, 成熟架橋)および、さらに酵素反応を介さずに酸化

や糖化反応により形成される老化架橋である Advanced glycation end products 架橋(ペントシジン)も分離定量し、単位コラーゲン当たりで算出した。これらの架橋パラメータをもとにして、コラーゲンの成熟指数(成熟架橋/未熟架橋)と老化脆弱指数(ペントシジン/生理的架橋)を定義し評価に加えた。また、採取した血液から血清を分離し常法に従い血中のホモシステイン濃度とビタミン B6 濃度を求めた。

C. 研究結果

1) 血中ホモシステイン値、ビタミン B6 値

骨折群における血中 Hcy 値は他群に比べ高値(12.9±3.4nmol/l, p=0.037)であったのに対し血中 Vit.B6 値は低値(6.5±4.2ng/ml, p=0.035)を示した(図1)。

2) コラーゲン架橋

コラーゲンの生理的架橋量(未熟架橋+成熟架橋)は、骨折群では対照群に比べて新旧の骨単位共に有意に低値を示したのに対し(p<0.0001)、AGEs 架橋量(ペントシジン)は高値を示した(p<0.0001)。

また、ペントシジン量を同一個体ごとに新旧の骨単位ごとに比較すると、対照群では新しい骨単位に比べて古い骨単位により多く形成されていたのに対し(p=0.0071)、骨折群では、新しい骨単位に過剰のペントシジン形成が生じていた(図2)。

さらに、これらの個々の架橋量から、コラ

ーゲン成熟度と老化脆弱度を算出したところ、骨折群では老化脆弱度が著しく高値を示していた ($p < 0.0001$)。また、骨折群では新しい骨単位においても古い骨単位と同程度に高値を示した (図2)。

D. 考察

我々はこれまでに、骨密度の低下を伴わずに骨強度低下をきたす糖尿病の動物モデルの解析から、骨の単位体積当たり50%を占めるコラーゲンの分子間をつなぎ止める構造体である架橋構造が骨の強度発現に重要な役割を演じていることを明らかにしている。コラーゲン架橋は、骨の力学機能や石灰化にプラスに作用する生理的架橋 (善玉架橋)、マイナスに作用する Advanced glycation end products (AGEs 架橋ペントシジン) (悪玉架橋) に分類される。

本調査から、骨粗鬆症性的大腿骨頸部骨折患者においては、骨コラーゲン架橋に異常が生じているのと同時に血中のホモシステイン値は高値であるのに対し、ビタミン B6 値は低値を示すことが明らかとなった。コラーゲン架橋の異常として、善玉である生理的架橋の低形成と、悪玉であるペントシジン架橋の過形成が明らかになった。特に骨折群においては、生まれて間もない新しい骨単位においても過剰の老化架橋であるペントシジンが形成されており、生理的な老化過程を逸脱した過剰な老化が生じていることを初めて明らかにした。

ホモシステインは生理的架橋の形成に関わる酵素 lysyl oxidase の発現を遺伝子、蛋白レベルで阻害するのに対し、ビタミン B6 は同酵素の必須の補酵素である。すなわちホモシステイン高値、ビタミン B6 低値は、生理的架橋の形成には抑制的に作用すると考えられる。さらにホモシステイン高値やビタミン B 群の不足は、酸化ストレスを高める要因としても作用し、ペントシジン架橋などに代表される Advanced glycation end products の形成を促進する可能性がある。このような環境下におかれる骨コラーゲンは、例え生まれて間もない若い骨単位の時期にコラーゲンの老化が早期に誘導されてしまうと推察される。

興味深いことに、近年、オランダ、米国のコホート研究から血中のホモシステイン高値は、骨密度とは独立した骨折リスク因子となることが報告され、骨質低下による骨脆弱化がその原因と考えられていることから、今回の調査結果から、こうした general population においてもホモシステイン高値やその代謝に関わるビタミン B 群の不足が骨コラーゲン架橋の異常を惹起し骨密度とは独立した骨脆弱化の原因となる可能性が明らかになった。

参考文献

1. McLean RR, Jacques PF, Selhub J, Tucker KL, Samelson EJ, Broe KE, Hannan MT, Cupples LA, Kiel DP (2004) Homocysteine as a predictive factor for hip fracture in older persons, *N Engl J Med* 350:2042-2049
2. van Meurs JB, Dhonukshe-Rutten RA, Pluijm SM, van der Klift M, de Jonge R,

Lindemans J, de Groot LC, Hofman A, Witteman JC, van Leeuwen JP, Breteler MM, Lips P, Pols HA, Uitterlinden AG (2004) Uitterlinden, Homocysteine levels and the risk of osteoporotic fracture. N Engl J Med 35:2033-2041

3. Reynolds TM, Marshall PD, Brain AM (1992) Hip fracture patients may be vitamin B6 deficient. Controlled study of serum pyridoxal 5 phosphate. Acta Orthop Scand 63:635-638

E. 結論.

骨粗鬆症性の大腿骨頸部骨折患者から骨コラーゲンを抽出し架橋分析を行ったところ、骨強度にはプラスに作用する生理的架橋の減少と、マイナスに作用する非生理的架橋の過形成が認められた。こうしたコラーゲン架橋の異常は、骨形成早期の若い骨単位にも生じており生理的な老化過程を逸脱した過度の老化が生じており、コラーゲン架橋の異常からみた骨質の低下が、骨脆弱性の原因となるものと推察される。さらに、こうした架橋異常の原因として、血中のホモシステインの高値やビタミン B6 の低値が関与している可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Saito M, Soshi S, Fujii K. Effect of hyper- and microgravity on collagen post-translational controls of MC3T3-E1 osteoblasts.

Journal of Bone and Mineral Research 2003;18:1695-1705.

2) Saito M, Soshi S, Tanaka T, Fujii K. Intensity-related differences in collagen post-translational modification in MC3T3-E1 osteoblasts after exposure to low and high intensity pulsed ultrasound.

Bone 2004;35:644-655

3) Saito M, Fujii K, Tanaka T, Soshi S. Effect of low- and high-intensity pulsed ultrasound on collagen post-translational modifications in MC3T3-E1 Osteoblasts.

Calcified Tissue International 2004;75:384-385.

4) Saito M, Fujii K, Soshi S, Tanaka K. Reductions in degree of mineralization and enzymatic collagen cross-links and increases in glycation induced pentosidine in the femoral neck cortex in cases of femoral neck fracture.

Osteoporosis International, 2006;17:986-995.

5) Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K. Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality