

平成20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

脊椎変形に関連する遺伝子多型性に関する研究

研究分担者 細井孝之
国立長寿医療センター先端医療部

脊柱の変形は姿勢の変化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。脊柱の変形は椎体の圧迫骨折、骨棘形成、椎間板変性、脊柱アラインメントの異常などさまざまな病態を背景としてもたらされる。これらの病態を疾患概念から整理すれば、骨粗鬆症と変形性脊椎症に集約される(図1)。骨粗鬆症および変形性脊椎症は、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、脊椎の変形やこれらの疾患の発症には複数の遺伝的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.)。初年度にあたる平成18年度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椎変形との関連を検討し、本研究班分担報告書において報告した。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 化に及ぼすことも見出し論文化した (J Nutritional Science and Vitaminology 53:419-425, 2007)。

平成20年度は先年度から引き続いて、骨粗鬆症と変形性脊椎症の両者に関連する遺伝子多型性を別の観点から探求する作業を続けた。この研究の背景としては、研究分担者(細井)が世界に先駆けて報告した、口腔外骨症と全身の骨量との関連がある。すなわち、口腔外骨症を有する閉経後女性の腰椎ならびに大腿骨頸部の骨量が、口腔外骨症を有さない対照に比較して有意に高い (J Bone Miner Metab 2002)。本研究では口腔外骨症を有する患者が特異的に有する遺伝

子多型性を検出することを通じて、脊椎変形に関連する遺伝子群を探索することを目的とした。新、今研究が立案された。

A. 研究目的

外骨症発症に関連する遺伝子多型性、特に CNV (copy number repeat) を検出する。

B. 研究方法

a. 対象：症例群は東京都老人医療センター歯科口腔外科に入院中または通院中の外骨症患者で、患部摘出予定の患者のうち文書による同意を得た成人とする。ただし除外基準にあてはまらない者。対照群は骨切手術患者、完全埋伏歯患者、歯槽整形術患者、歯科インプラント術患者のいずれかで、文書による同意を得た健常成人。

b. 解析方法

① 摘出した組織より骨芽細胞を選択的に培養し、培養細胞の各種刺激に対する RNA の発現を検討する。

② 培養細胞より抽出した DNA: 培養細胞から DNA を抽出する。抽出した DNA を用いて、全ゲノムの網羅的解析をお

こなう。とくに CNV 解析については当初予定されていた deCODE 社のものよりも高密度の解析が可能である Alilent アレイを用いることにした。

C. D. 結果と考察

現在、症例群 8 例と対照群 3 例についてサンプルが取得され、骨芽細胞の培養が進められた。チップ解析に要する DNA 量が確保され、CNV チップによる解析が進められている。CNV は 1 塩基置換である SNP とは異なり、genomic rearrangement による遺伝子多型性であり、遺伝子発現の量的差異に基づく形質の差異をもたらす可能性をもっている (図 2)。また、CNV の網羅的解析には現在アレイ法とチップ法があるが (図 3)、技術面の開発はなお進行している。網羅的解析によって口腔外骨症との有意な関連があるゲノム領域が見出されれば、その部位に候補 CNV 解析を行っていく。

図1 脊椎変形の病態

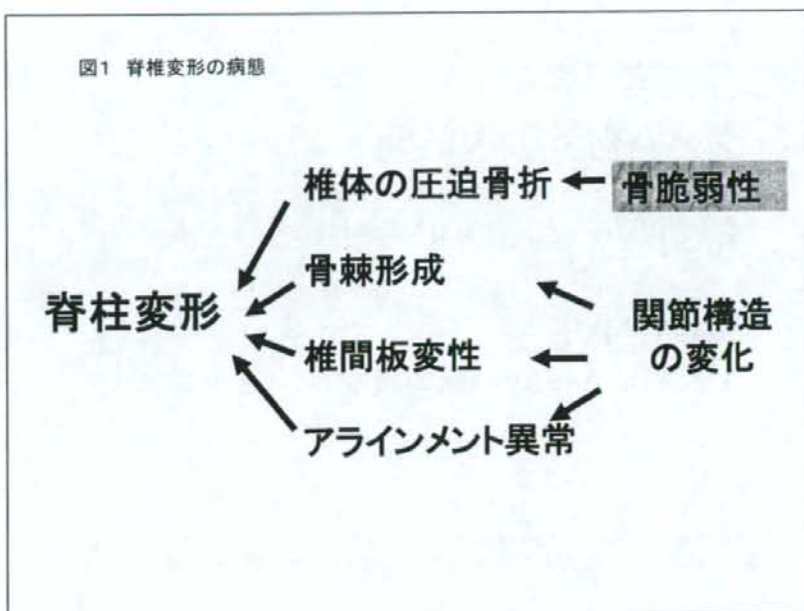


図2 SNPsとCNVsの比較

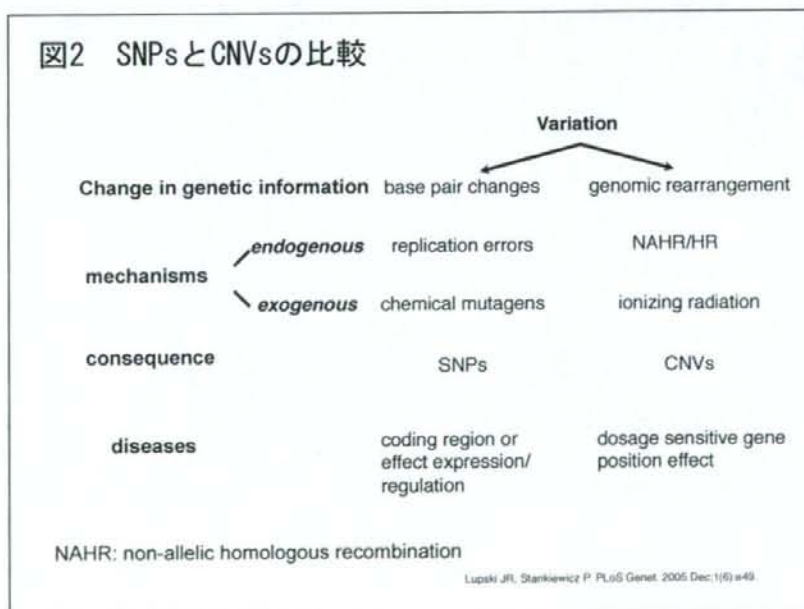


図3 網羅的CNVと候補CVV

- ・ ゲノム網羅CNV解析

- 1) CNVアレイ (アレイCGH法)

- 2) CNVチップ (DNAビーズチップ法)

- ・ 候補CNV解析

- 1) CNV assay (TaqManリアルタイムqPCR法)

Yang et al. Genome-wide copy-number-variation study identified a susceptibility Gene, UGT2B17, for osteoporosis. Am J Hum Genet 2008, 83:663-74

平成20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

脊柱変形と遺伝子の関連：長野コホート

研究分担者 井上 聡

東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座特任教授

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。そこで近年、高齢者における失明の原疾患である加齢性黄斑変性症の発症に寄与することが明らかにされ注目されている HTRA1 遺伝子のプロモーター領域に存在する一塩基置換遺伝子多型(SNP)と変形性脊椎症との関連に関して相関解析を行った。その結果、本 SNP が椎間板狭小化と有意に相関することを見出した。また、本研究において骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において重要な役割を担うビタミン D 受容体(VDR) 遺伝子と変形性脊椎症との関連についても SNP を用いた解析を行った。その結果、VDR 遺伝子多型の一つである TaqI 多型が脊柱変形のパラメーターの一つである椎間板狭小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シグナル伝達因子を標的とした変形性脊椎症の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。昨年までに我々は Wnt 経路の LRP5、WISP1 ならびに IGF1 経路と関連する IGF1R 遺伝子上に存在する SNP と脊柱変形の関連を調べて有意な結果を得てきた。本研究では高齢者の眼における変性疾患

として知られる加齢性黄斑変性症(AMD)の発症に寄与することが近年明らかにされ注目されている HTRA1 遺伝子のプロモーター領域に存在する一塩基置換遺伝子多型(SNP)と変形性脊椎症との関連についても検討を行った。さらに、骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において重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ビタミン D 受容体(VDR)と変形性脊椎症との関連に関して SNP を用いた解析を行った。

B. 方法

1. HTRA1 遺伝子多型と変形性腰椎症

ヒト膝関節由来初代培養軟骨細胞から mRNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法により HTRA1 の発現解析を行った。遺伝子多型と脊椎変形との相関解析においては、日本人非血縁閉経女性 513 名(平均年齢 66.6 ± 7.6 歳)を対象とした。末梢血より DNA を抽出し、TaqmanPCR 法により HTRA1 プロモーター遺伝子多型(rs11200638)を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症のパラメーター(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を Genant の方法に基づきスコア化を行い評価した。骨密度ならびに各種臨床データに関する同時測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

胸腰椎 X 線写真を撮影し、脊柱変性のパラメーター(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を Genant の方法に基づきスコア化を行い本遺伝子多型との相関解析を行った。

2. VDR 遺伝子多型と変形性腰椎症

日本人閉経後女性 606 名(平均年齢 \pm SD: 67.1 ± 7.8 歳)を対象とし、TaqMan PCR 法によりヒト VDR 遺伝子における SNP の中で TaqI 多型と知られる SNP の遺伝子型を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症の各指標(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)をスコア化し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。胸腰椎 X 線写真を撮影し、脊柱変性のパラメーター(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を Genant の方法に基づきスコア化を行い本遺伝子多型との相関解析を行った。

C. 結果

1. HTRA1 遺伝子多型と変形性腰椎症

定量的リアルタイム PCR 法により、ヒト軟骨細胞において HTRA1 の発現が確認され、その発現は分化マーカーである Col2a1 の上昇に伴って(Fig. 1A)、上昇した(Fig. 1B)。また、その発現は TGF β 添加により増加することが示された(Fig. 1C)。

次に AMD 発症のリスクとなる genotype として知られる、HTRA1 プロモーター遺伝子多型の AA 型(n=89)は、その他の群(GG + GA 型: n=424)と比べ、椎間板狭小化スコアが有意に高値であった(P=0.0292)(Fig. 2, Table 1)。HTRA1 プロモーター遺伝子多型の AA 型(n=89)は、その他の群(GG + GA 型: n=424)と比べ、身長が有意に低下していたが(P=0.0091)、それ以外のバックグラウンドならびに臨床データにおいて、有意差は存在しなかった(Table 1)。また、胸腰椎において椎間板狭小化を 4 椎体間以上有する群において、AA 型が有意に多く存在した(P=0.013; オッズ比 1.97; 95%信頼区間 1.15-3.37)(Table 2)。

2. VDR 遺伝子多型と変形性腰椎症

VDR 遺伝子 TaqI 多型を genotyping したところ、TT 型は 463 名(76.4%)、Tt 型は 134 名(22.1%)、tt 型は 9 名(1.5%)であり、過去の日本人集団における報告と同等であった。t アレルを有する Tt 型+tt 型(143 名)では TT 型(463 名)と比較し、椎間板狭小化スコアが有意に上昇していた(P=0.021)(Fig. 3)。

D. 考察

加齢性黄斑変性症(AMD)は高齢者の失明の主たる原因となる疾患である。AMD の発症に関与する SNP を探索した結果、

rs11200638 遺伝子多型が同定された。rs11200638 遺伝子多型は HTRA1 のプロモーター領域に存在する SNP である。この SNP の AA 型は HTRA1 が高発現することが示されている。今回、我々は rs11200638 の SNP が変形性脊椎症と有意に相関することを見出した。今回の報告は我々の知るところ、世界で初めての報告である。今回の報告より rs11200638 は AMD と変形性脊椎症という眼と脊椎といった異なる組織における加齢に伴う変性疾患を同時に制御する SNP である可能性が示された。また、今回我々は HTRA1 の mRNA での発現が TGFβにより発現誘導されることを見出した。HTRA1 はセリンプロテアーゼであり、TGFβはその基質であることから、HTRA1 は TGFβシグナルを遮断することが知られている。今回の発見は、TGFβは HTRA1 を誘導し、誘導された HTRA1 は TGFβシグナルを遮断する negative feed back loop を形成することが示唆された。また、HTRA1 は変形性関節症患者由来の滑膜液で高発現していることが示唆されており、今回の HTRA1 の高発現を誘導することが示されている AA 型で変形性脊椎症のリスクが高いデータと合わせ考えると HTRA1 の発現を抑制する因子が脊椎変形予防の創薬へとつながる可能性が示唆された。

さらに今回、我々は VDR 遺伝子の TaqI 多型が脊椎変形のパラメーターの一つである椎間板狭小と相関することを見出した。過去に MRI による脊椎変形での検討において VDR 遺伝子における TaqI 多型との相関が報告されており、その結果は、今回の我々の報告と一致した。このことは VDR 遺伝子における TaqI 多型が再現性を有しており、TaqI 多型は脊椎変形を予測する遺伝子マーカーとして有用であることと同時に、我々が行っている単純レントゲン写真を用いたスコア化システ

ムが有用であることが示唆された。

現在、我々は 55-83 歳の閉経後女性約 250 名の DNA を用いて、ヒト遺伝子上の 5 万-25 万 SNP について遺伝子型を決定しつつある。これら SNP と変形性脊椎症の指標(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)との相関解析を行い、脊椎変形を制御する候補遺伝子を現在探索している。本解析によって着目された候補遺伝子については、対象者数を増やし再解析を行うことで脊椎変形規定遺伝子の候補遺伝子選定を行う予定としている。今後、これらの解析により変形性脊椎症における Wnt-LRP5 シグナル、IGF-I シグナル、HTRA1 シグナル、VDR シグナルに加えて、新たな高齢者の脊椎変形を規定す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. 研究発表

1. 論文発表

1. 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 insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal disc degeneration in postmenopausal Japanese women. *Spine* 33, 1256-1261, 2008.
2. Shiraki, M., Urano, T., Kuroda, T., Saito, M., Tanaka, S., Miyao-Koshizuka, M., Inoue, S.: The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *J Bone Miner Metab* 26, 595-602, 2008.
3. Takayama, K., Tsutsumi, T., Suzuki, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Kaneshiro, K., Fujimura, T., Kumagai, J., Urano, T., Sakaki, Y., Shirahige, K., Sasano, H.,

- Takahashi, S., Kitamura, T., Ouchi, Y., Aburatani, H., Inoue, S.: Amyloid precursor protein is a primary androgen target gene that promotes prostate cancer growth. *Cancer Res* 69, 137-142, 2009.
4. Kubo, M., Ijichi, N., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S.: Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation. *Biochim Biophys Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (in press)
 5. Furuya, T., Urano, T., Ikari, K., Kotake, S., Inoue, S., Hara, M., Momohara, S., Kamatani, N., Yamanaka, H.: A1330V polymorphism of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and self-reported incident fractures in Japanese female patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol* (in press)
 6. Urano, T., Shiraki, M., Usui, T., Sasaki, N., Ouchi, Y., Inoue, S.: Bone mass effects of a Smad6 gene polymorphism in Japanese postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* (in press)
 7. Urano, W., Furuya, T., Inoue, E., Taniguchi, A., Urano, T., Kotake, S., Sekita, C., Inoue, S., Hara, M., Momohara, S., Kamatani, N., Yamanaka, H.: Associations between methotrexate treatment and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms with incident fractures in Japanese female rheumatoid arthritis patients. *J Bone Miner Metab* (in press)
2. 学会発表
【国際学会】
1. Inoue, S.: [Invited Talk] New Target Genes for Steroid Hormones (2008.10.22-24) CBI Annual Meeting 2008 International Symposium, Tokyo, Japan.
 2. Inoue, S.: [Symposium, Invited Talk] New estrogen target gene (2008.11.8-12) 13th International Congress of Endocrinology, Rio de Janeiro, Brazil.
- 【国内学会】
1. 田北博保、森圭介、樺沢昌、土橋尊志、上山数弘、飯塚裕幸、栗田卓也、堀江公仁子、井上聡、米谷新：日本人加齢黄斑変性(AMD)とポリープ状脈絡膜血管症(PCV)の発生関連遺伝子と眼底病変の関連 (2008.4.17-20) 第112回日本眼科学会総会 (横浜)
 2. 井上聡:[シンポジウム] アンチエイジングとサクセスフルエイジングの望ましい関係ー健康な老年期を送るための更年期医学 (Pre-Geriatric Medicine)を考える:サクセスフルエイジング達成を目標に (2008.6.6-7) 第8回日本抗加齢医学会総会 (東京)
 3. 浦野友彦、成澤研一郎、白木正孝、白井貴彦、大内尉義、中村利孝、井上聡:[最優秀奨励賞] 加齢に伴う脊椎変形を規定する遺伝子多型群の探索と同定 (2008.6.6-7) 第8回日本抗加齢医学会総会 (東京)
 4. 伊地知暢広、窪麻由美、池田和博、堀江公仁子、井上聡:エストロゲン関連受容体ファミリーの脂肪細胞分化における役割 (2008.8.22) 第13回アイポサイエンス研究会シンポジウム (大阪)
 5. 井上聡:[特別講演] 女性ホルモンの作用機構とホルモン補充療法 (2008.8.30-31) 第26回日本美容皮膚科学会総会 (大阪)
 6. 窪麻由美、伊地知暢広、池田和博、堀江公仁子、竹田省、井上聡:脂肪細胞分化モデルとマウス高脂肪食モデル

7. を用いたエストロゲン関連受容体 $ERR\gamma$ の機能解析 (2008.10.17-18) 第 29 回日本肥満学会 (大分)
8. 東浩太郎、Stephanie Casey、浦野友彦、堀江公仁子、大内尉義、Bruce Blumberg、井上聡：核内受容体 PXR ノックアウトマウスは海綿骨および皮質骨の骨量減少を呈する (2008.10.29-31) 第 26 回日本骨代謝学会 (大阪)
9. 古谷武文、小竹茂、八子徹、南谷由紀、浦野友彦、井上聡、鎌谷直之：関節リウマチにおける骨折リスクの検討：大規模前向き観察コホート(IORRA)から分かったこと (2008.10.29-31) 第 26 回日本骨代謝学会 (大阪)
10. 浦野友彦、白井貴彦、白木正孝、大内尉義、井上聡：TGF β シグナル伝達関連遺伝子における遺伝子多型と骨量との相関解析 (2008.10.31-11.2) 第 10 回日本骨粗鬆症学会 (大阪)
11. 伊地知暢広、池田和博、堀江公仁子、井上聡：EPAS1/HIF2 α はグルココルチコイドにより発現が誘導され、骨芽細胞分化を抑制する (2008.11.22) 第 16 回日本ステロイドホルモン学会 (福井)
12. 井上聡：[シンポジウム] エストロゲンレセプターとエネルギー代謝 (2008.12.9-12) BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会) (神戸)
13. 井上聡：[特別講演] 性ホルモンの作用機構とホルモン補充療法について (2008.12.13) 第 32 回日本臨床検査医学会東北支部例会 (秋田)

Table 1. HTRA1遺伝子のプロモーター領域に存在する遺伝子多型(rs1120638)の遺伝子型と臨床データとの相関解析

Items	Genotype (mean \pm SD)		P value
	GG+GA	AA	
Number of subjects	424	89	
Age (years)	66.6 \pm 7.6	66.7 \pm 7.7	NS
Height (cm)	150.6 \pm 5.8	148.9 \pm 5.5	0.0091
Body weight (kg)	50.4 \pm 7.6	51.0 \pm 7.4	NS
Osteophyte	5.70 \pm 3.50	5.81 \pm 3.57	NS
Endplate sclerosis	0.33 \pm 0.80	0.37 \pm 0.80	NS
Disc space narrowing	1.89 \pm 1.72	2.35 \pm 2.20	0.0292

NS; not significant

Table 2. 椎間板狭小化とHTRA1 rs1120638 SNPとの相関解析(AA (n=89) vs. GG and GA (n=424))

Severity of disc narrowing	OR	95%CI	P value
Four or more disc narrowing (n=91) versus less (\leq 3) disc space narrowing (n=422)	1.97	1.15-3.37	0.013
Five or more disc narrowing (n=45) versus less (\leq 4) disc space narrowing (n=468)	2.66	1.37-5.18	0.004
Six or more disc narrowing (n=25) versus less (\leq 5) disc space narrowing (n=488)	3.45	1.50-7.94	0.004

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

Fig. 1. 初代培養ヒト軟骨細胞におけるHTRA1遺伝子の発現

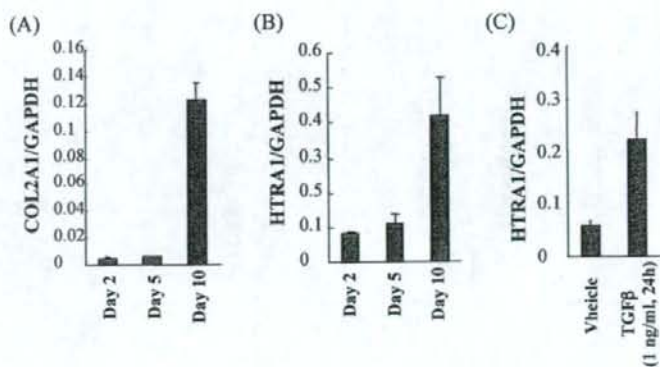


Fig. 2. HTRA1遺伝子のプロモーター領域に存在する遺伝子多型 (rs1120638)と脊椎変形パラメーターとの相関解析

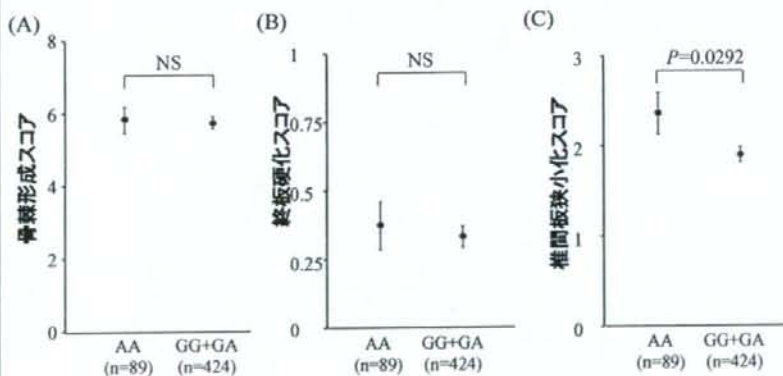
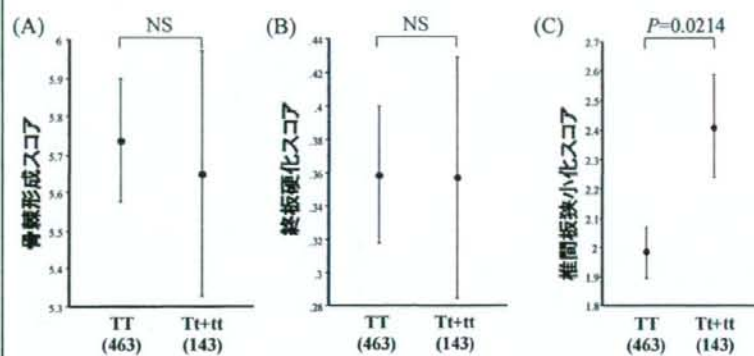


Fig. 3. VDR遺伝子のTaqI多型と脊椎変形パラメーターとの相関解析



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

高ホモシステインに合併する骨質低下メカニズムの解明

研究分担者 斎藤 充
東京慈恵会医科大学整形外科講師

【A 研究目的】

骨粗鬆症治療薬に対する大規模臨床試験などの結果から、骨折リスクは骨密度の増減のみでは説明できないことが明らかにされ、骨密度以外の骨強度因子である「骨質」の重要性が指摘されている。2000年にはNIH consensus statementにおいて「骨粗鬆症は骨強度が低下して骨折リスクが高まる疾患で、骨強度には骨密度と骨質が関与する」と新たに定義され、骨質への関心が高まっている。

著者らは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、骨質を規定する因子であることを見いだしている(1,2)。

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)1-3)、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(1,2)。

著者らは、大腿骨頸部骨折をきたした骨粗鬆症例では、骨形成の早期に悪玉架橋であるペントシジンの過形成と、善玉架橋である生理的架橋の低形成が骨脆弱化の原因となることを初めて明らかにした(4)。さらに、骨における架橋異常を反映するように、尿中のペントシジンの高値が骨リスクとなることを白木らとの共同研究で明らかにし、骨質マーカーとしての有用性を報告している(5)。

さらに、このようなコラーゲン架橋の異常による骨質低下の原因として、動脈硬化や心血管イベントのリスク因子である血中のホモシステイン高値、ビタミンB6低値や酸化ストレスの増大の関与を指摘してきた(6)。遺伝性のホモシステイン尿症では若年期から著

しい動脈硬化と脆弱性骨折を合併することから、血中のホモシステイン濃度の上昇は骨や血管に共通した悪影響因子と考えられている。近年、大規模コホート研究から一般住民においても血中のホモシステイン濃度の上昇が低骨密度とは独立した骨折リスクであることが報告され、骨質の低下をもたらす可能性が指摘されている 7)。すなわち、生活習慣病である血管異常と骨質低下は、血中ホモシステイン濃度の上昇という共通した病態の上になりたっているとの仮説を立てている 6)。

一言で原発性骨粗鬆症といっても骨脆弱化にいたる病態は様々である。骨強度は骨密度と骨質によって規定される。また、白木らとの共同研究から、ホモシステイン代謝の異常が骨質劣化(コラーゲン異常)をもたらすという仮定した場合、骨粗鬆症における骨脆弱化のパターンは、大きく3つに分けることができる 8)。すなわち、骨密度が若年成人平均値(YAM 値)の70%以上であっても、ホモシステイン代謝異常が存在すると、それだけで骨折リスクが上昇する「骨質低下型」と、ホモシステイン代謝が良くても低骨密度により骨折リスクが高まる(骨密度低下型)、さらには骨密度低下とホモシステイン代謝が共に低下している「骨密度低下+骨質劣化型」である。この調査では、骨質低下型の骨折リスクは1.5倍、骨密度低下型は3.64倍、骨密度低下+骨質低下型は

7.21倍であった 8)。こうした骨密度とホモシステイン代謝の異常の交互作用を見る限り、一般的に考えられている骨強度の70%は骨密度に、残りの30%は骨質に依存するという骨強度の概念が妥当であることが理解できる。

しかし、これまでに、ヒト骨質劣化型に特徴的な「高ホモシステイン血症」を併せ持つ「骨質低下動物モデル」は確立されていない。このため臨床的に骨質改善効果があるとされている骨粗鬆症治療薬の作用メカニズムを解明する手段も無く、骨質改善を目指した創薬も円滑に行えないのが現状である。

そこで、本研究の目的は、ヒトに近い骨代謝動態(リモデリング骨)を示す家兎に卵巣摘除を行った上に、高ホモシステイン血症を誘導することで、ヒト骨質劣化型の病態を反映する新たな動物モデルの確立が可能か否かを検証することにある。こうした動物モデルが確立できれば、骨質治療という新たな治療体系の確立にもつながると考えている。

【B 研究方法】

雌性ニュージーランド白色家兎(生後20週:成熟期)に卵巣摘除(OVX)を行い、術後5日目よりTakagiらの方法により持続的な高ホモシステイン血症を誘導する目的でTakagiらの方法(1%メチオニン食100g/日を

連日混餌投与)に準じてメチオニン負荷を行う (Takagi S, J Atherosclerosis Thrombosis, 1998). 巣摘出もしくはSham手術を行い, 以下の4群に分けた(各群 $n=6-9$). 1) Sham手術群, 2) 1%メチオニン負荷群, 3) OVX群, 4) OVX+1%メチオニン負荷群. メチオニン負荷は術直後より開始した. 投与終了後, 血液, 尿, 大腿骨を採取し以下の検討をおこなった.

1) 骨コラーゲン分析: 採取した骨は, 液体窒素で粉碎後にコラーゲンを抽出し, 著者らが独自に確立した網羅的コラーゲン架橋分析装置を用いて, 架橋を分離定量し, 単位コラーゲン量当たりで算出した⁹⁾. 解析した架橋は, 生理的架橋(未熟型の架橋であるリジノルロイシン架橋とその成熟型であるピリジニウム架橋)と AGEs 架橋 (Pentosidine; Pen) である. また, 同システムを用いて, ハイドロキシプロリンを定量し, 単位重量当たりの骨コラーゲン含有量を算出した⁹⁾.

2) 骨密度測定: pQCT 法により大腿骨中央部を測定した.

3) 骨強度試験: 大腿骨3転曲げ試験を行い, pre-, post- yield properties を求めた.

【C研究結果】

1%メチオニン負荷群でのみ, 血中ホモシステイン濃度は有意に上昇した. 1%メチオニン負荷を加えた2群では, 生理的架橋の

低形成(20%減少)と, ペントシジンが有意な増加が認められ, ヒト骨質劣化型と類似した架橋異常が誘導された(図1). また, 1%メチオニン負荷にOVXを加えた群では, 上記の架橋異常のみならず, コラーゲン含有量が有意に低下した. 骨密度は各群間に差は認められなかった. 骨強度は, 各群間に有意な差は認められなかったが, 架橋の変化と骨強度との相関を解析してみると, 生理的架橋は骨強度にプラスの効果をもたらすのに対し (Pre-yield energy absorption, $r=0.335$, $p<0.05$), ペントシジンの増加は骨強度に対して負の相関をもつことが明らかとなった (Toughness, $r=-0.430$, $p<0.01$, Post-yield toughness, $r=-0.404$, $p<0.05$).

【D考察】

以上の結果から, メチオニン負荷によって誘導される高ホモシステイン血症は, 骨密度に影響を及ぼすことなく, 骨の材質特性を低下させることが明らかとなった. 家兎は他の動物種にくらべて, 血中のカルシウムが高値であること, また, 交尾排卵のため, 卵巣摘出のみでは, 骨密度の低下をきたさないことから骨粗鬆症モデルとしては適切ではないとされてきた. しかし, 家兎に対する選択的卵巣摘出術の検討から, 卵巣摘出により女性ホルモン産生が有意に低下することが報告されており, エストロゲン不足の状態にあることが確認されている. 今回の

検討でも、骨密度に関してはSham群と比べて有意な差が観察されなかったものの、コラーゲンの架橋形成に関しては、卵巣摘出単独であって生理的架橋の低形成という骨質異常が誘導された。これまでに、エストロゲンは、生理的架橋の形成を高めることが報告されていることから、エストロゲン不足は、生理的架橋の形成には負の影響をもたらす可能性があると言える。

【E結論】

今回の結果に、ホモシステインは生理的架橋の形成に関わる酵素リジロキシダーゼの作用を遺伝子および蛋白レベルで多段

階に阻害することや、AGEs架橋の増加を促す酸化ストレスを高めるといった報告をあわせてみると、血中のホモシステインの高値や卵巣摘出は、それぞれ単独でも、骨コラーゲンの異常をもたらす原因となるといえる(図2)。

今後は、骨質低下型の動物モデルを用いて種々の薬剤がコラーゲン架橋の形成に及ぼす影響を検討していく予定である。

【F健康危険度情報】 特になし

図説明

図1 骨コラーゲン架橋。a) 生理的架橋の形成量、b) AGEs架橋(ペントシジン)の形成量: 架橋数は単位コラーゲン量当たりで換算した。

1% Met: 1%メチオニン混餌投与。OVX: 卵巣摘出群。Sham群との比較

図2 原発性骨粗鬆症における骨質低下のメカニズム

ビタミンB群・葉酸不足、MTHFR酵素(TT型)により、血中のホモシステインが高値となる。これらの因子は、生理的架橋の形成に関わる酵素リジロキシダーゼの活性を低下させるのに対し、AGEsの形成を促進する酸化ストレスを高めてしまう。(著者作成)

【参考文献】

- 1) Saito M, Fujii K, Mori Y, et al, Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in the spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int* 2006;17:1514-23.
- 2) Saito M, Mori S, Mashiba T, et al. Collagen maturity, glycation induced pentosidine, and mineralization are increased following 3-years treatment of incadronate in dogs. *Osteoporos Int* 2008;19:1343-54
- 3) Saito M, Soshi S, Fujii K : Effect of hyper- and microgravity on collagen post-translational controls of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res* 2003;18: 1695-705.

- 4) Saito M, Fujii K, Soshi S et al : 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. *Osteoporos Int* 2006;17:986-95.
- 5) Shraki M, Kuroda T, Tanaka S, Saito M, et al. Non-enzymatic collagen cross-links induced by glycooxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *J Bone Miner Metab*, 2008;26:93-100.
- 6) Saito M, Fujii K, Marumo K : Degree of mineralization-related collagen crosslinking in the femoral neck cancellous bone in cases of hip fracture and controls. *Calcif Tissue Int* 2006;79:160-8.
- 7) McLean RR, Hannan MT. B vitamins, homocysteine, and bone disease: epidemiology and pathophysiology. *Curr Osteoporos Rep* 2007; 5:112-9
- 8) Shiraki M, Urano T, Kuroda T et al. The synergistic effect of bone mineral density and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *J Bone Miner Metab*. in press
- 9) Saito M, Marumo K, Fujii K, et al, Single column high - performance liquid chromatographic - fluorescence detection of immature, mature and senescent cross-links of collagen. *Anal Biochem* 1997;253:26-32
- incadronate in dogs. *Osteoporos Int* 2008;19:1343-54
- 2) Shraki M, Kuroda T, Tanaka S, Saito M, Fukunaga M, Nakamura T. Non-enzymatic collagen cross-links induced by glycooxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *J Bone Miner Metab*, 2008;26:93-100
- 3) Shraki M, Urano T, Kuroda T, Saito M, Tanaka S, Miyao M, Inoue S. The synergistic effect of bone mineral density and Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *J Bone Miner Metab*. 2008;26:595-602
- 4) Shimazaki M, Nakamura K, Kii I, Kashima T, Amizuka N, Li M, Saito M, Fukuda K, Nishiyama T, Kitajima S, Saga Y, Fukayama M, Sata M, Kudo A. Periositin is essential for cardiac healing after acute myocardial infarction. *Journal of Experimental Medicine*, 2008;205:295-30
- 5) Tanaka T, Kumagai Y, Saito M, Chazono M, Komaki H, Kikuchi T, Kitasato S, Marumo K. Bone formation and resorption in patients after implantation of beta-tricalcium phosphate blocks with 60% and 75% porosity in opening wedge high tibial osteotomy. *Journal of Biomedical Material Research B Applied Biomaterials*, 2008;86B:453-9

【G 研究発表】

1. 論文発表

- 1) Saito M, Mori S, Mashiba T, et al. Collagen maturity, glycation induced pentosidine, and mineralization are increased following 3-years treatment of
- 6) 斎藤充. 特集「ビタミンと骨」-ビタミンBと骨- *THE BONE*, 2008, 22, 47-52
- 7) 斎藤充. 特集「骨質評価」-骨粗鬆症治療薬の骨材質特性への影響- *CLINICAL CALCIUM*, 2008;18:84-92

8) 斎藤充. 特集「骨粗鬆症治療の最近の話題」コラーゲン架橋による骨強度の評価 *Progress in Medicine* 2008;28, 913-920

9) 斎藤充. 特集「骨粗鬆症」-骨折危険性におよぼすミネラルとコラーゲンの役割- *治療学*, 2008;42:847-852

10) 斎藤充. ガイドラインにみる骨質の日常診療への応用 *CLINICAL CALCIUM*, 2008;18:1104-1113

11) 斎藤充. コラーゲン架橋と骨質 -骨質改善への治療戦略- リウマチ科, 2008;40:196-203

12) 斎藤充. 骨質に影響を与えるビタミン類 内分泌・糖尿病科, 2008;27:198-208

13) 斎藤充. 骨粗鬆症治療の新しい展開 -ペントシジン及びホモシステイン測定の意義 老年医学 *Geriatric Medicine*, 2008;46:875-879

14) 斎藤充. 骨の材質を反映するマーカーの骨折危険性評価への応用と課題 腎と骨代謝, 2008;21(4):325-334

15) 斎藤充. 骨質マーカーとしてのホモシステイン・ペントシジン測定の意義 *医薬ジャーナル*, 2008;44,123-125

16) 前田和洋, 斎藤充, 丸毛啓史 巻頭連載「目で見える Bone Biology」-コラーゲン架橋と骨質- *骨粗鬆症治療*, 2008;7,1-5

学会発表. シンポジウム

1) Saito M Bone architecture and mechanical stress: Roles of collagen cross-links in bone 第3回 International Symposium of Fracture Repair 国際シンポジウム 2008年11月26日, 京都

2) 斎藤充, 丸毛啓史.

シンポジウムテーマ: 靭帯骨接合部・移植腱癒合とLIPUSの効果. ヒト再建 ACL 由来細胞のコラーゲン架橋形成に対するLIPUSの効果

第11回 超音波骨折治療研究会
2008年1月19日, 大阪

3) 斎藤充, 丸毛啓史.

シンポジウムテーマ: 骨粗鬆症における骨折予防の最前線

骨折リスクとしての骨質劣化と動脈硬化関連因子の接点

第81回 日本整形外科学会総会
2008年5月25日, 札幌

4) 斎藤充.

シンポジウムテーマ: 骨粗鬆症 up data 新たな潮流

骨質向上のための栄養摂取 -特に葉酸・ビタミンBについて-

第8回 日本抗加齢医学会総会
2008年6月7日, 東京

5) 斎藤充.

シンポジウムテーマ: 骨質因子の相互作用 -アパタイト vs. 基質蛋白-

石灰化過程におけるコラーゲンの架橋変化とマイクロダメージの相互作用

第28回 日本骨形態計測学会
2008年7月26日, 東京

6) 斎藤充, 丸毛啓史.

シンポジウムテーマ: 骨のマイクロバイオメカニクス 骨強度を規定する骨質因子の相互作用: コラーゲン・石灰化度・マイクロダメージ

第35回 日本臨床バイオメカニクス学会
2008年11月14日, 東京

学会発表・一般演題(海外)

1) Saito M, Marumo K, Soshi S, Kida Y, Ushiku C, Shinohara A.
Raloxifene ameliorates detrimental collagen cross-link formation in bone from an

ovariectomized rabbits with or without
hyperhomocysteinemia

The 30th annual meeting of The American
Society for Bone and Mineral Research
2008年9月13日, Montreal, Canada

