

一方チアゾリジン系薬剤は、とくに閉経後女性において骨密度を低下させ、骨折危険度を増加させる可能性が示唆されている。ADOPT 試験は単剤の糖尿病治療薬が無効となる期間を主要観察項目にした臨床研究であるが、観察期間中に生じた有害事象として、女性の Rosiglitazone (本邦未発売) 群では、メトホルミンやスルホニルウレア群と比較して有意に骨折の相対危険度が高かったことを初めて報告した¹³⁾。最近1年以上チアゾリジン系薬剤治療を受けた T2DM を対象にメタ解析がなされ、女性の同薬群では対照群と比較して全骨折の相対危険度が有意に高く¹⁴⁾ (図1)、また性別に関わらず腰椎および大腿骨頸部の BMD が低下することが明らかとなった¹⁴⁾¹⁵⁾。この報告で観察された骨折部位は主に足部や下肢長幹骨であり、骨粗鬆症で増加する典型的な骨折部位ではない。しかし高齢者を多く含む臨床研究では、チアゾリジン長期服用者で大腿骨頸部骨折が4.54倍増加することが示されている¹⁶⁾。

実験系においてチアゾリジン系薬剤は、核内受容体型転写因子(peroxisome proliferator-activated receptor gamma: PPAR γ)を刺激して、未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化を促進するマ

スター遺伝子である Runx2発現を低下させることにより¹⁷⁾、骨形成低下を招き、骨密度を低下させると考えられている。チアゾリジン系薬剤による骨折の増加が、骨強度低下による骨的因子に基づくものか、転倒などの骨外因子によるものかは今後の報告を慎重に解釈して判断する必要がある。

おわりに

T2DM では対照群よりも BMD が高いにもかかわらず、大腿骨頸部および椎体骨折の相対骨折危険度が高いことが明らかとなった。米国糖尿病協会および欧州糖尿病研究協会は、2型糖尿病患者の血糖管理においてセカンドラインの糖尿病治療薬として Pioglitazone を推挙しているが、治療に際し骨量減少のない患者に対して処方するよう推奨している¹⁸⁾。本邦では高齢化が進み、また糖尿病の有病率も増加していることから、今後糖尿病に起因する骨折者の増加が予測される。骨への影響を考慮して、患者別に糖尿病治療薬を選択または骨折予防を講じる時代がくることが予想される。

文 献

- 1) Vestergaard P: Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int* 18(4): 427-444, 2007.
- 2) Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, et al: Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 166(5): 495-505, 2007.
- 3) Thraillkill KM, Lumpkin CK Jr, Bunn RC, et al: Is insulin an anabolic agent in bone? Dissecting the diabetic bone for clues. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(5): E735-745, 2005.
- 4) Liu EY, Wactawski-Wende J, Donahue RP, et al: Does low bone mineral density start in post-teenage years in women with type 1 diabetes? *Diabetes Care* 26(8): 2365-2369, 2003.
- 5) Bouillon R, Bex M, Van Herck E, et al: Influence of age, sex, and insulin on osteoblast function: osteoblast dysfunction in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 80(4): 1194-1202, 1995.
- 6) Kemink SA, Hermus AR, Swinkels LM, et al: Osteopenia in insulin-dependent diabetes mellitus; prevalence and aspects of pathophysiology. *J Endocrinol Invest* 23(5): 295-303, 2000.
- 7) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, et al: Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of bone mineral density or diabetic complications. *J Bone Miner Res*, (in press), 2008.
- 8) Anonymous: Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *JAMA* 285(6): 785-795, 2001.
- 9) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, et al: Serum pentosidine levels are positively associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93(3): 1013-1019, 2008.

- 10) Schwartz AV, Garnero P, Hillier TA, et al : Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94 (7) : 2380-2386, 2009.
- 11) Vestergaard P, Rejnmark L, Mosekilde L : Relative fracture risk in patients with diabetes mellitus, and the impact of insulin and oral antidiabetic medication on relative fracture risk. *Diabetologia* 48 (7) : 1292-1299, 2005.
- 12) Monami M, Cresci B, Colombini A, et al : Bone fractures and hypoglycemic treatment in type 2 diabetic patients : a case-control study. *Diabetes Care* 31 (2) : 199-203, 2008.
- 13) Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, et al : Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 355 (23) : 2427-2443, 2006.
- 14) Loke YK, Singh S, Furberg CD : Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes : a meta-analysis. *Cmaj* 180 (1) : 32-39, 2009.
- 15) Yaturu S, Bryant B, Jain SK : Thiazolidinedione treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men. *Diabetes Care* 30 (6) : 1574-1576, 2007.
- 16) Meier C, Kraenzlin ME, Bodmer M, et al : Use of thiazolidinediones and fracture risk. *Arch Intern Med* 168 (8) : 820-825, 2008.
- 17) Jeon MJ, Kim JA, Kwon SH, et al : Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits the Runx2-mediated transcription of osteocalcin in osteoblasts. *J Biol Chem* 278 (26) : 23270-23277, 2003.
- 18) Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, et al : Management of hyperglycemia in type 2 diabetes : a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy : update regarding thiazolidinediones : a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 31 (1) : 173-175, 2008.

3

糖尿病における骨折危険性とその評価

山本 昌弘*

要旨 メタ解析により、1型糖尿病では骨密度が低値で骨折相対危険度が高いことが示された。一方2型糖尿病では骨密度が高いにもかかわらず骨折相対危険度が高いことが明らかとなり、骨密度よりも骨質の影響を強く受けることが示唆されている。その機序として、骨基質のコラーゲンの材質特性を変化させ、骨強度低下と関係する終末糖化物質である pentosidine およびその内因性分泌型終末糖化物質受容体 (esRAGE) が、骨密度とは独立した2型糖尿病の椎体骨折評価に有用である可能性が示唆されている。また近年チアゾリジン系薬剤と骨折増加の関係が報告されており、糖尿病治療薬の骨への影響を考慮する必要がある。

〈Key point〉

はじめに

1948年 Albright により、長期に血糖コントロールが不良の糖尿病患者では骨粗鬆症に至ることが報告された。糖尿病はインスリン分泌能の低下に起因する1型糖尿病 (type 1 diabetes mellitus ; T1DM) と、インスリン抵抗性を背景とする2型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus ; T2DM) に大別される。メタ解析により糖尿病の病型を問わず骨折の相対危険度が高いことが明らかとなったが、その骨折をもたらす骨脆弱性の病態は同一ではない。本稿では T2DM を中心に、糖尿病の病型別に骨脆弱性の特徴を筆者らのデータを交えて概説する。

I. 1型糖尿病と骨折

骨密度低値

骨折相対危険度

メタ解析により T1DM では、対照群より dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) 法による骨密度 (bone mineral density ; BMD) が低値で、骨折相対

Key words : 2型糖尿病, 椎体骨折, 骨質, ペントシジン, 内因性分泌型終末糖化物質受容体 (esRAGE)

* 島根大学医学部内科学講座内科学第一 (〒693-8501 島根県出雲市塩冶町 89-1)

危険度が高いことが確認された^{1),2)}。実験動物においてインスリン分泌を枯渇させると骨形成が低下すること³⁾、insulin receptor substrate-1 (IRS-1) や IRS-2 欠損マウスでは骨芽細胞機能が障害されることから、インスリン作用の低下は骨量低下を招くと考えられる。T1DM の骨折相対危険度の増加には、その糖尿病の病型の特徴であるインスリン分泌低下を反映した BMD の低下が関わっていると考えられる。

インスリン分泌低下

II. 2型糖尿病と骨折

BMD 非依存性の骨脆弱性

T2DM 患者の大腿骨頸部および椎体の推定 BMD Z 値は、T1DM と異なり、非糖尿病患者よりも高値であるにもかかわらず、大腿骨頸部骨折の相対危険度が 1.38~1.7 倍高いことがメタ解析により明らかとなった^{1),2)}。われわれは椎体骨折に対して検討を行い、T2DM の存在は年齢、BMI、腰椎 BMD とは独立した椎体骨折の危険因子であること、対照群とは異なり BMD では椎体骨折が予測できないことを明らかにした⁴⁾。これらの結果は、T2DM には BMD 非依存性の骨脆弱性が存在することを示唆している。

骨質

2000 年の米国国立衛生研究所 (NIH) のコンセンサス会議において、骨粗鬆症は「骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患」であり、その骨強度は「骨密度」と「骨質」の要因から構成されると定義された。実験系では高血糖状態では骨芽細胞の分化や石灰化が低下することから^{5),6)}、高血糖状態は骨量低下に作用すると考えられる。しかし臨床的には T2DM は肥満に基づくインスリン抵抗性を背景に有していることが多く、相対的インスリン過分泌状態による骨同化作用と BMI 高値による加重の作用が、高血糖による骨代謝に対する負の作用よりも強く働き、総合的に BMD 高値をもたらしていると考えられる。しかし骨折の相対危険度が高いことを考慮すると、T2DM の骨強度は BMD よりも骨質の影響をより強く受けることが示唆される。

インスリン抵抗性

III. 糖尿病患者における骨折危険性の評価法

1. 終末糖化物質 (advanced glycation end-products ; AGEs) と椎体骨折
このように、糖尿病では病型にかかわらず骨折相対危険度が高いことが明らかとなった。糖尿病患者の骨強度評価には、BMD 測定に加えて、とくに T2DM では骨質を評価することが有用と思われる。

pentosidine

骨質は骨の構造特性と材質特性から構成される。近年糖尿病で増加することが知られている AGEs の一つである pentosidine が、骨の材質特性を反映した骨脆弱性の指標として有用であることを示す報告が増加している。AGEs はタ

材質特性

ンパク質のアミノ基が非酵素的に不可逆的な糖化により生成される物質で⁷⁾、蛋白質間の架橋形成能を有する。高血糖および酸化ストレスにより増加してさまざまな組織に沈着する。Saitoらは、大腿骨頸部骨折患者において、骨内 pentosidine 含有量が対照群より有意に高いことから^{8),9)}、骨内 pentosidine 含有量は骨強度に対し負に影響することを示した。さらに Saito らは、自然糖尿病発症ラットにおいて、糖尿病発症後から骨内 pentosidine 含有量が増加し、BMD の低下がないにもかかわらず 3 点曲げ試験において骨強度が低下することを明らかにした¹⁰⁾。骨内 pentosidine 含有量の増加が骨強度を低下させる機序については他稿に譲るが、これらの結果は骨内 pentosidine 含有量が BMD とは独立した骨強度に影響する因子、すなわち骨質のなかでも材質特性を反映する因子であることを示唆している。とくに自然糖尿病発症ラットの結果は、臨床における T2DM の骨折相対危険度の増加の病態を説明しうると考えられた。

血液中 pentosidine 濃度

しかし骨内 pentosidine 含有量の測定は、骨生検などの侵襲的検査を必要とするため、日常臨床での利用は困難である。近年血液中の pentosidine 濃度が骨内含有量と正相関することが報告された¹¹⁾。そこでわれわれは T2DM 患者の血液中の pentosidine 濃度を測定し、椎体骨折との関係を検討した。その結果閉経後女性において、HbA_{1c} や腎機能、糖尿病合併症の有無などとは独立して、血清 pentosidine 濃度の増加により椎体骨折の相対危険度が高まることを

表 1 閉経後 2 型糖尿病女性における pentosidine と骨折の関係

	OR (95% CI)	p
椎体骨折		
Yamamoto, et al ¹²⁾	2.50 ^a (1.09~5.73)	0.030
Schwartz, et al ¹³⁾	5.93 ^b (2.08~16.94)	0.001
臨床骨折		
Schwartz, et al ¹³⁾	1.42 ^b (1.10~1.83)	0.007

^a : 年齢, 身長, 体重, HbA_{1c}, eGFR, 糖尿病罹病期間, 糖尿病合併症の有無, 糖尿病治療薬の有無, 喫煙の有無, 飲酒の有無, 非椎体骨折の有無, 腰椎 BMD で調整後, 血清 pentosidine が 1SD 増加したときの骨折の相対危険度.

^b : 年齢, 人種, 性別, 現在の喫煙, 観察開始時の BMD, 体重, 体重減少歴, cystatin-C, HbA_{1c}, 骨代謝に影響する薬物の有無, 経口ステロイド薬の有無, 利尿薬の有無, 経口エストロゲン薬の有無, 糖尿病治療薬の有無で調整. log (pentosidine) が 1SD 増加したときの骨折増加の相対危険度.

OR : odds ratio, 95% CI : 95% 信頼区間

尿中pentosidine 濃度 見出した (表 1)¹²⁾。同様に Schwartz らは、前向き試験開始時の尿中 pentosidine 濃度が、多変量解析後において有意に臨床骨折および椎体骨折と関係することを報告している¹³⁾ (表 1)。これらの結果は、閉経後 T2DM 女性の椎体骨折予測において血中または尿中の pentosidine 濃度が骨質を反映した指標として利用できることを示唆している。

2. 内因性分泌型 AGE 受容体 (endogenous secretory receptor for AGE ; esRAGE) と椎体骨折

AGE 受容体 AGEs とともにその受容体 (receptor for AGE ; RAGE) の役割が注目されている。RAGE は免疫グロブリンの superfamily に属する 1 回膜貫通型の細胞表面の受容体で、AGEs を含む多様なリガンドと結合能を有する受容体である。RAGE ノックアウトマウスでは IL-6 や破骨細胞数が低下して骨量増加を認めることから¹⁴⁾、RAGE が骨代謝に対し負に関与することが示されている。一方 esRAGE は、細胞外ドメインをすべて有するが、細胞膜貫通部を欠く分泌型の splicing variant で¹⁵⁾、細胞外で AGEs と結合して細胞表面の RAGE に AGEs が結合するのを防ぐ「おとり受容体」として作用すると考えられている¹⁵⁾。糖尿病では AGEs が増加していることから、RAGE を介した生理作用により骨強度が低下する機序が存在する可能性が考えられる。

われわれは T2DM において、RAGE のリガンドである AGEs の代表として pentosidine を測定するとともに、「おとり受容体」である esRAGE を同時に測定して esRAGE/pentosidine 比を計算し、椎体骨折との関連を検討した。既報のように¹²⁾、pentosidine の増加は T2DM 女性のみ椎体骨折の相対危険度の増加と関連した。一方 esRAGE/pentosidine 比の低下は、T2DM の性別にかかわらず椎体骨折の相対危険度が増加する、すなわち RAGE のリガンドに対

表 2 2型糖尿病患者における esRAGE と椎体骨折の関係

	男 性		女 性	
	OR (95% CI)	p	OR (95% CI)	p
esRAGE	0.46 (0.25~0.84)	0.012	0.32 (0.16~0.67)	0.002
Pentosidine	1.49 (0.91~2.42)	0.111	1.82 (1.05~3.15)	0.034
esRAGE/Pentosidine	0.34 (0.15~0.76)	0.009	0.14 (0.04~0.43)	0.001

年齢, BMI, HbA_{1c}, 血清クレアチニン, 糖尿病罹病期間, 腰椎 BMD, 糖尿病治療薬の有無, 糖尿病合併症の有無, 喫煙の有無, 飲酒の有無で調整後, 血清 esRAGE が 1SD 増加したときの骨折の相対危険度。

OR : odds ratio, 95% CI : 95%信頼区間

(Yamamoto M, et al : Diabetes Care 2009¹⁶⁾ より改変)

RAGE を介する
骨強度低下

し「おとり受容体」数が相対的に不足すると、RAGE を介して骨強度が低下することが示唆された。またこの関係はBMDを含む因子で調整後においても保持されることから、esRAGE/pentosidine 比は骨質を反映しうる指標と考えられた¹⁶⁾ (表2)。しかし現在のところ、AGE-RAGE系がどのような機序により骨質と関連しているかは明らかではない。

IV. 糖尿病治療薬と骨折

近年糖尿病治療薬の骨代謝への影響が指摘されている。住民ベースの検討により、インスリン分泌刺激薬やメトホルミン投与は骨折に対し有意な骨折相対危険度の増加がない、または低値であると報告されている。インスリン使用者の骨折危険度が高いとの報告もあるが、交絡因子で未調整であることから、その結果の解釈には注意が必要と思われる。

チアゾリジン系薬
剤

一方チアゾリジン系薬剤は、とくに閉経後女性においてBMDを低下させ、骨折相対危険度を増加させる可能性が示唆されている。実験系においてチアゾリジン系薬剤は、核内受容体型転写因子 (peroxisome proliferator-activated receptor gamma : PPAR γ) を刺激して、未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化を促進するマスター遺伝子であるRunx2発現を低下させることにより、骨形成低下を招き、BMDを低下させると考えられている。

Runx2 発現低下

ADOPT試験は単剤の糖尿病治療薬が無効となる期間を主要観察項目にした臨床研究であるが、観察期間中に生じた有害事象として、女性のrosiglitazone (本邦未発売) 群では、メトホルミンやスルホニルウレア群と比較して有意に骨折の相対危険度が高く、チアゾリジン系薬剤が骨折に関係する可能性を初めて報告した¹⁷⁾。1年以上チアゾリジン系薬剤治療を受けたT2DMを対象としたメタ解析では、女性の同治療において対照群と比較して全骨折の相対危険度が有意に高く¹⁸⁾、また性別にかかわらず腰椎および大腿骨頸部のBMDが低下することが示された^{18),19)}。この報告では、比較的若年者に足部や下肢長幹骨の骨折が生じており、骨粗鬆症で増加する典型的な骨折ではなかった。しかし高齢者が多く含まれる臨床研究では、チアゾリジン系薬剤長期服用者で大腿骨頸部骨折が4.54倍増加することが示されている²⁰⁾。チアゾリジン系薬剤による骨折の増加が、骨強度低下のような骨的因子に基づくものか、転倒などの骨外因子によるものか、今後の報告を慎重に解釈して判断する必要があると思われる。

ま と め

糖尿病では病型にかかわらず骨折の相対危険度が高く、T2DMでは骨質低

下が骨強度に強く影響を及ぼしていることが明らかとなった。T2DMにおいて AGEs-RAGE 系である pentosidine と esRAGE が骨質を反映した骨強度の指標となりうることが示された。しかしこれらの検査はいずれも骨粗鬆症診療において利用が認可されておらず、糖尿病の骨脆弱評価に際し今後の重要な課題である。また糖尿病治療薬のうちチアゾリジン系薬剤は BMD の低下や骨折の増加が指摘されており、糖尿病治療に際し、骨への影響を考慮して糖尿病治療薬を選択する、または骨折予防を講じることが望まれる。

文 献

- 1) Vestergaard P : Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes — a meta-analysis. *Osteoporos Int* 18 : 427-444, 2007
- 2) Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, et al : Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 166 : 495-505, 2007
- 3) Reddy GK, Stehno-Bittel L, Hamade S, et al : The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 54 : 1-8, 2001
- 4) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, et al : Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of BMD or diabetic complications. *J Bone Miner Res* 24 : 702-709, 2009
- 5) Ogawa N, Yamaguchi T, Yano S, et al : The combination of high glucose and advanced glycation end-products (AGEs) inhibits the mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells through glucose-induced increase in the receptor for AGEs. *Horm Metab Res* 39 : 871-875, 2007
- 6) Inaba M, Terada M, Koyama H, et al : Influence of high glucose on 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced effect on human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res* 10 : 1050-1056, 1995
- 7) Brownlee M : Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46 : 223-234, 1995
- 8) 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* 17 : 986-995, 2006
- 9) 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* 79 : 160-168, 2006
- 10) Saito M, Fujii K, Mori Y, et al : Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int* 17 : 1514-1523, 2006
- 11) Odetti P, Rossi S, Monacelli F, et al : Advanced glycation end products and bone loss during aging. *Ann N Y Acad Sci* 1043 : 710-717, 2005
- 12) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, et al : Serum pentosidine levels are positively associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93 : 1013-1019, 2008
- 13) Schwartz AV, Garnero P, Hillier TA, et al : Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94 : 2380-2386, 2009
- 14) Ding KH, Wang ZZ, Hamrick MW, et al : Disordered osteoclast formation in RAGE-deficient mouse establishes an essential role for RAGE in diabetes related bone loss. *Biochem Biophys Res Commun* 340 : 1091-1097, 2006
- 15) Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, et al : Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and

their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 370 : 1097-1109, 2003

- 16) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, et al : Low serum level of the endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products (esRAGE) is a risk factor for prevalent vertebral fractures independent of bone mineral density in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009 Sep. 14 (Epub ahead of print)
- 17) Kahn SE, Haffner SM, Heise MA, et al : Glycemic durability of rosiglitazone, metformin, or glyburide monotherapy. *N Engl J Med* 355 : 2427-2443, 2006
- 18) Loke YK, Singh S, Furberg CD : Long-term use of thiazolidinediones and fractures in type 2 diabetes : a meta-analysis. *CMAJ* 180 : 32-39, 2009
- 19) Yaturu S, Bryant B, Jain SK : Thiazolidinedione treatment decreases bone mineral density in type 2 diabetic men. *Diabetes Care* 30 : 1574-1576, 2007
- 20) Meier C, Kraenzlin ME, Bodmer M, et al : Use of thiazolidinediones and fracture risk. *Arch Intern Med* 168 : 820-825, 2008

Summary

Assessment of fracture risk in diabetic patients

Masahiro Yamamoto*

Recent meta-analyses show that type 1 diabetes mellitus is associated with low bone mineral density (BMD) as well as increased fracture risk. In contrast, type 2 diabetes mellitus have an increased risk of femoral and vertebral fractures in spite of higher BMD than those of control subjects. This suggests that the bone strength of patients with type 2 diabetes is more impacted by bone quality than by BMD. Several studies suggest that pentosidine, which is one of well-known advanced glycation end-products (AGEs) and influences decreased bone-strength caused by the changing property of collagen fibers in the bone matrix, and endogenous secretory receptor for AGE (esRAGE) may possibly be useful in predicting vertebral fractures independent of BMD in patients with type 2 diabetes. From another perspective, meta-analysis reveals that thiazolidinediones are associated with increased bone fracture risk. When treating for diabetes, we need to take into account the negative aspects of these therapeutic agents on bone metabolism.

Key words : type 2 diabetes mellitus, vertebral fracture, bone quality, pentosidine advanced glycation end-products (AGEs), receptor for AGE (RAGE), esRAGE

* *Internal Medicine 1, Shimane University Faculty of Medicine*

日本骨粗鬆症学会 平成 20 年度 研究奨励賞

2 型糖尿病における内因性分泌型終末糖化物質受容体 (esRAGE) と骨脆弱性との関連の検討

山本昌弘 山口 徹 山内美香 杉本利嗣

はじめに

メタ解析により 2 型糖尿病 (2DM) では骨密度 (BMD) が高いにもかかわらず、大腿骨頸部骨折の相対危険度が高いことが明らかとなった^{1,2)}。また、われわれの検討により、2DM の存在が椎体骨折 (VF) に対する独立した危険因子であり、その骨折危険度は BMD では表せないことを明らかにした³⁾。骨強度は BMD と骨質で構成されることから、2DM の骨強度は骨質の影響を強く受けていることが示唆される。われわれは骨基質を構成するコラーゲンに影響を及ぼし、骨強度を低下させることが知られている終末糖化物質 (advanced glycation end-products : AGEs) の一つである pentosidine (PEN) の血清濃度が増加すると、2DM 女性において VF の相対危険度が高くなることを見いだした⁴⁾。これらの所見は 2DM の骨質低下に AGEs が関与していることを示唆している。

一方、AGEs 受容体 (receptor for AGEs : RAGE) は細胞膜表面に存在する免疫グロブリン superfamily に属する受容体で、AGEs を含む多くのリガンドと結合しうる受容体である⁵⁾。糖尿病性腎症など糖尿病合併症の進展に RAGE が関与していることが知られている⁶⁾。内因性分泌型 RAGE (endogenous secretory RAGE : esRAGE) は細胞膜貫通部を欠き細胞外へ分泌される splicing variant で、AGEs との結合能を有することから、AGEs が RAGE に結合することを阻害して RAGE を介する作用を中和する「おとり受容体」である⁷⁾。RAGE knockout マウスでは IL-6 が

低下して BMD が増加することから、RAGE は骨代謝に関与していることが示唆されている⁸⁾。糖尿病では AGEs が増加しており、おとり受容体である esRAGE の低下は RAGE を介して骨強度が低下する可能性が考えられるが詳細は不明である。そこで今回、われわれは AGEs として PEN を測定して esRAGE/PEN 比を計算し、esRAGE および esRAGE/PEN 比と VF との関連を検討した。

1 対象と方法

血清クレアチニン (Cr) が正常範囲内の 2DM 男性 137 名 (M 群) と、閉経後女性 140 名 (F 群) (各平均年齢 65.0, 66.9 歳) を対象とした。単純エックス線撮影で VF の有無を判定し、第 2-4 腰椎、大腿骨頸部および橈骨遠位端 1/3 の BMD を DXA (QDR-4500, Hologic 社) で測定した。HbA_{1c}、骨代謝マーカー (BAP および尿中 NTX) などとともに血清 PEN (FSK ELISA kit, 伏見製薬所) および esRAGE (esRAGE ELISA kit, 第一ファインケミカル) を ELISA 法で測定した。骨折の有無で各指標を unpaired *t* test で比較し、ロジスティック回帰分析で PEN, esRAGE および esRAGE/PEN の VF に対する Odds 比を計算した。

2 結 果

背景を表 1 に示す。VF は M 群 52 名 (38.0%)、F 群 41 名 (29.3%) であった。BMI はそれぞれ 23.3, 24.5kg/m² と肥満傾向のある者が対象であった。両群とも空腹時血糖が 168mg/dL 前後、

Key words : 内因性分泌型終末糖化物質, esRAGE, 2 型糖尿病, 椎体骨折, 骨質

島根大学医学部内科学第一

表1 患者背景

	男性	女性
人数 (名)	137	140
椎体骨折者数 (名)	52 (38.0)	41 (29.3)
年齢 (歳)	65.0±7.9	66.9±10.1
BMI (kg/m ²)	23.3±3.3	24.5±4.5
腰椎 BMD (g/cm ²)	1.047±0.198	0.883±0.201
T score	-0.02±1.65	-1.18±1.80
Z score	0.53±1.14	0.65±1.38
大腿骨頸部 BMD (g/cm ²)	0.765±0.128	0.646±0.130
T score	-0.78±0.95	-1.29±1.19
Z score	0.31±1.10	0.51±1.23
橈骨遠位端 1/3BMD (g/cm ²)	0.691±0.062	0.529±0.088
T score	-1.66±1.34	-2.57±1.71
Z score	-0.51±1.25	0.52±1.56
血清クレアチニン (mg/dL)	0.75±0.15	0.60±0.15
尿中 Alb (mg/g・Cr)	39.7±54.4	30.4±41.6
空腹時血糖 (mg/dL)	167±62	168±59
HbA _{1c} (%)	8.9±2.4	8.7±2.1
糖尿病罹病期間 (年)	11.8±9.0	12.5±9.8
Pentosidine (μg/mL)	0.0413±0.0194	0.0400±0.0159
esRAGE (ng/mL)	0.294±0.102	0.257±0.161
esRAGE/pentosidine	8.5±5.3	7.2±5.1
BAP (U/L)	26.0±7.6	31.6±12.9
尿中 NTX (nmol BCE/mmol・Cr)	31.6±15.5	52.6±34.2
インスリン分泌刺激薬使用者数	50 (36)	51 (36)
メトホルミン使用者数	28 (20)	38 (27)
ピオグリタゾン使用者数	18 (13)	14 (10)
インスリン使用者数	25 (18)	38 (27)
糖尿病網膜症あり	48 (35)	61 (44)
糖尿病神経障害あり	83 (61)	93 (66)
喫煙あり	95 (69)	6 (4)
飲酒あり	83 (61)	12 (9)

数値は平均±標準偏差を示す。()内は%を示す。

BMI: body mass index, Alb: アルブミン, esRAGE: endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products, BAP: bone-specific alkaline phosphatase, NTX: type I collagen cross-linked N-telopeptides

HbA_{1c} が 8.8%前後と血糖状態は不良であった。BAP は両群とも基準値内であったが、尿中 NTX は F 群で高値であった。糖尿病罹病期間は約 12 年であった。M 群および F 群の PEN 濃度は各 0.0413±0.0194, 0.0400±0.0159μg/mL と既報の

正常人の濃度 (0.0261±0.0007μg/mL)⁹⁾より高値であった。一方, esRAGE は各 0.294±0.102, 0.257±0.161 ng/mL と正常人 (0.436±0.121ng/mL)¹⁰⁾より低値であった。

表 2 2 型糖尿病患者における esRAGE と各因子の単相関

	男性		女性	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
年齢 (歳)	0.164	0.053	-0.003	0.976
BMI (kg/m ²)	-0.086	0.323	-0.046	0.590
腰椎 BMD (g/cm ²)	-0.023	0.791	0.044	0.615
T score	-0.016	0.849	0.040	0.647
Z score	-0.015	0.864	0.042	0.627
大腿骨頸部 BMD (g/cm ²)	-0.147	0.087	-0.085	0.325
T score	-0.136	0.113	-0.078	0.369
Z score	-0.064	0.459	0.068	0.466
橈骨遠位端 1/3BMD (g/cm ²)	-0.126	0.143	0.077	0.383
T score	-0.186	0.029*	0.069	0.435
Z score	-0.129	0.134	0.086	0.324
血清クレアチニン (mg/dL)	0.377	<0.001**	0.048	0.571
尿中 Alb (mg/g・Cr)	0.039	0.654	-0.104	0.257
空腹時血糖 (mg/dL)	-0.106	0.219	-0.109	0.199
HbA _{1c} (%)	-0.077	0.371	-0.119	0.162
糖尿病罹病期間 (年)	0.086	0.319	0.093	0.278
Pentosidine (μg/mL)	0.102	0.235	0.097	0.255
BAP (U/L)	0.101	0.242	-0.033	0.699
尿中 NTX (nmol BCE/mmol・Cr)	0.026	0.766	-0.077	0.371

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

BMI : body mass index, Alb, : アルブミン, esRAGE : endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products, BAP : bone-specific alkaline phosphatase, NTX : type I collagen cross-linked N-telopeptides

1) esRAGE と各指標との単相関

血清 esRAGE は M 群において Cr と有意な正相関 ($r=0.377$, $p<0.001$) および橈骨遠位端 1/3 の BMD T score と負の相関を認めた ($r=-0.186$, $p<0.029$) (表 2)。esRAGE は年齢や BMI, HbA_{1c}, 糖尿病罹病期間, PEN や他の部位の BMD と相関を認めなかった。

2) 椎体骨折の有無における各指標の比較

M 群では非骨折群と比較して骨折群が有意に高齢で (62.2 ± 8.0 vs 68.0 ± 6.8 歳, $p<0.001$), esRAGE/pentosidine 比が有意に低値であった (9.4 ± 6.2 vs 7.1 ± 2.8 , $p=0.013$) (表 3)。F 群では非骨折群と比較して骨折群において有意に高齢 (64.5 ± 9.5 vs 73.0 ± 3.7 歳, $p<0.001$), 橈骨遠位 1/3 の BMD T score が低値で (-2.39 ± 1.78 vs

-3.04 ± 1.45 , $p=0.047$), 糖尿病罹病期間が長かった (11.1 ± 9.0 vs 16.0 ± 10.6 年, $p=0.007$)。また M 群とは異なり PEN 値が有意に高値 (0.0377 ± 0.0145 vs $0.0458 \pm 0.0181 \mu\text{g/mL}$, $p=0.006$), esRAGE が低値 (0.282 ± 0.173 vs $0.202 \pm 0.109 \text{ng/mL}$, $p=0.007$), esRAGE/pentosidine 比が低値であった (8.2 ± 5.5 vs 4.7 ± 2.7 , $p<0.001$)。

3) 椎体骨折に対する血清 esRAGE 値, PEN 値 および esRAGE/pentosidine 比の影響

VF に関与する因子を明らかにするために, 血清 esRAGE 値, PEN 値, esRAGE/pentosidine 比 および各部位の BMD を独立変数とする logistic 解析を行った。交絡因子で未調整の検討において, M 群では esRAGE/pentosidine 比は VF と有意に負に関係した (1SD 増加に対する Odds

表3 2型糖尿病患者における椎体骨折有無での各因子の比較

	男性				女性			
	椎体骨折		p	あり	椎体骨折		p	あり
	なし	あり			なし	あり		
人数 (名)	85	52	<0.001**	41	99		41	
年齢 (歳)	62.2±8.0	68.0±6.8		73.0±3.7	64.5±9.5		73.0±3.7	
BMI (kg/m ²)	23.1±3.5	23.5±3.2	0.514	25.2±5.6	24.3±3.9		25.2±5.6	
腰椎BMD (g/cm ²)	1.072±0.217	1.006±0.155	0.056	0.853±0.207	0.892±0.197		0.853±0.207	
T score	0.19±1.81	-0.35±1.30	0.062	-1.43±1.86	-1.10±1.78		-1.43±1.86	
Z score	0.64±1.28	0.35±0.86	0.142	0.65±1.40	0.62±1.38		0.65±1.40	
大腿骨頸部BMD (g/cm ²)	0.772±0.127	0.754±0.101	0.383	0.616±0.104	0.657±0.138		0.616±0.104	
T score	-0.73±1.04	-0.85±0.80	0.473	-1.56±0.96	-1.19±1.24		-1.56±0.96	
Z score	0.28±1.21	0.40±0.90	0.690	0.48±1.22	0.52±1.25		0.48±1.22	
橈骨遠位端1/3BMD (g/cm ²)	0.697±0.062	0.682±0.063	0.180	0.507±0.074	0.537±0.092		0.507±0.074	
T score	-1.52±1.36	-1.88±1.28	0.123	-3.04±1.45	-2.39±1.78		-3.04±1.45	
Z score	-0.48±1.30	-0.57±1.19	0.682	0.58±1.50	0.50±1.60		0.58±1.50	
血清クレアチニン (mg/dL)	0.75±0.16	0.77±0.14	0.396	0.64±0.15	0.59±0.14		0.64±0.15	
尿中Alb (mg/g・Cr)	34.3±46.7	48.0±64.2	0.161	33.1±40.0	29.4±41.2		33.1±40.0	
空腹時血糖 (mg/dL)	172±68	158±49	0.214	173±64	166±57		173±64	
HbA _{1c} (%)	9.1±2.5	8.5±2.0	0.144	8.5±2.1	8.8±2.1		8.5±2.1	
糖尿病罹病期間 (年)	12.0±9.0	11.5±9.1	0.757	16.0±10.6	11.1±9.0		16.0±10.6	
Pentosidine (μg/mL)	0.0388±0.0162	0.0453±0.0233	0.059	0.0458±0.0181	0.0377±0.0145		0.0458±0.0181	
esRAGE (ng/mL)	0.303±0.112	0.280±0.083	0.205	0.202±0.109	0.282±0.173		0.202±0.109	
esRAGE/pentosidine	9.4±6.2	7.1±2.8	0.013*	4.7±2.7	8.2±5.5		4.7±2.7	
BAP (U/L)	26.3±7.7	25.6±7.5	0.635	31.9±12.8	31.4±13.1		31.9±12.8	
尿中NTX (nmol BCE/mmol・Cr)	32.5±17.6	30.3±11.3	0.428	56.1±41.3	50.3±29.8		56.1±41.3	

Unpaired t test : *p<0.05, **p<0.01

数値は平均±標準偏差を示す。

BMI : body mass index, Alb : アルブミン, esRAGE : endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products, BAP : bone-specific alkaline phosphatase,

NTX : NTX : type I collagen cross-linked N-telopeptides

表 3 2 型糖尿病患者における椎体骨折有無での各因子の比較 (つづき)

	男性		女性		p
	椎体骨折		椎体骨折		
	なし	あり	なし	あり	
インスリン分泌刺激薬使用者数	27 (32)	23 (44)	34 (34)	17 (41)	0.573
メトホルミン使用者数	17 (20)	11 (21)	28 (28)	10 (24)	0.766
ピオグリタゾン使用者数	12 (14)	6 (12)	8 (8)	6 (15)	0.423
インスリン使用者数	17 (20)	8 (15)	27 (27)	11 (27)	0.999
糖尿病網膜症あり	30 (35)	18 (35)	43 (43)	18 (44)	0.718
糖尿病神経障害あり	50 (59)	33 (63)	64 (65)	39 (95)	0.627
喫煙あり	62 (73)	33 (63)	4 (4)	2 (5)	0.999
飲酒あり	49 (58)	34 (65)	10 (10)	2 (5)	0.490

Unpaired t test : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

() 内は%を示す。カテゴリー変数は χ^2 検定を用いた。

比 (OR) 0.53, [95%信頼区間 (CI) 0.31-0.88], $p=0.02$ (表 4, model 1)。F 群では esRAGE が負に (OR 0.53 [CI 0.33-0.85], $p < 0.01$), pentosidine が正に (OR 1.65 [CI 1.13-2.41], $p=0.01$), esRAGE/pentosidine 比が負に関係した (OR 0.34 [CI 0.19-0.62], $p < 0.01$)。一方, BMD はどの部位も VF と有意な関係を認めなかった。

続いて年齢, BMI, HbA_{1c} および血清 Cr で調整後において, M 群では esRAGE が VF と有意な負の関係を認めた (OR 0.61 [CI 0.38 - 0.96], $p=0.03$) (表 4, model 2)。さらに骨代謝マーカー, 糖尿病罹病期間, 糖尿病治療薬, 糖尿病合併症の有無, 喫煙や飲酒の有無および腰椎 BMD で調整を行ったが, VF に対する M 群の esRAGE および esRAGE/pentosidine 比の関係, F 群の esRAGE, pentosidine および esRAGE/pentosidine との有意な関係は保持された (表 4, model 3)。

3 考 察

今回, われわれは性別にかかわらず esRAGE および esRAGE/pentosidine 比が 2DM において VF と関係することを, はじめて臨床的に明らかにした。esRAGE は BMD, 骨代謝回転, 糖尿病治療薬, 糖尿病合併症とは独立して VF に影響する因子と考えられる。esRAGE は細胞間腔で AGEs を含むさまざまなリガンドと結合し, これらのリガンドが細胞表面の RAGE と結合することを防ぐ作用がある⁷⁾。われわれの結果は, リガンドに対し esRAGE 量が不足すると RAGE を介して骨に有害な影響を与えることを示唆している。 p 値を考慮すると, esRAGE 単独よりはリガンドとデコイ受容体の比である esRAGE/pentosidine 比が, 2DM における VF の相対危険度の評価に際してより有用と考えられた。

おわりに

この研究結果により, 2DM では AGE-RAGE 系が BMD とは独立して骨強度に影響する因子であり, 骨質と関係することが示唆された。2DM

表4 2型糖尿病患者における esRAGE 値, pentosidine 値, esRAGE/pentosidine 比, および BMD と椎体骨折の関係

独立変数	男性		女性	
	OR (95%信頼区間)	p	OR (95%信頼区間)	p
Model 1				
esRAGE	0.79 (0.55-1.14)	0.206	0.53 (0.33-0.85)	0.009**
Pentosidine	1.39 (0.98-1.99)	0.067	1.65 (1.13-2.41)	0.010*
esRAGE/pentosidine	0.53 (0.31-0.88)	0.015*	0.34 (0.19-0.62)	<0.001**
腰椎 BMD	0.70 (0.49-1.01)	0.059	0.81 (0.55-1.21)	0.304
大腿骨頸部 BMD	0.85 (0.59-1.22)	0.381	0.72 (0.48-1.07)	0.099
橈骨遠位端 1/3BMD	0.79 (0.55-1.12)	0.181	0.70 (0.47-1.03)	0.069
Model 2				
esRAGE	0.61 (0.38-0.96)	0.032*	0.47 (0.27-0.80)	0.006**
Pentosidine	1.34 (0.89-2.03)	0.164	1.80 (1.08-2.98)	0.023*
esRAGE/pentosidine	0.47 (0.25-0.85)	0.013*	0.28 (0.13-0.60)	0.001**
Model 3				
esRAGE	0.46 (0.25-0.84)	0.012*	0.32 (0.16-0.67)	0.002**
Pentosidine	1.49 (0.91-2.42)	0.111	1.82 (1.05-3.15)	0.034*
esRAGE/pentosidine	0.34 (0.15-0.76)	0.009**	0.14 (0.04-0.43)	0.001**

Model 1 : 調整なし。

Model 2 : 年齢, BMI, HbA_{1c}, 血清クレアチニンで調整。

Model 3 : 年齢, BMI, HbA_{1c}, 血清クレアチニン, 糖尿病罹病期間, 腰椎 BMD, 糖尿病治療薬, 糖尿病合併症, 喫煙歴および飲酒歴で調整。

1 標準偏差増加あたりの OR で示す。

OR : odds ratio, BMI : body mass index, * : p < 0.05, ** : p < 0.01

では BMD による椎体骨折リスク評価が困難であり³⁾, esRAGE や esRAGE/pentosidine 比が骨質を反映した骨強度のサロゲートマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

文 献

1) Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes—a meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007;18:427-44.
 2) Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB. Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 2007;166:495-505.
 3) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Kaji H, Sugimoto T. Diabetic patients have an increased risk of vertebral fractures independent of BMD or

diabetic complications. *J Bone Miner Res* 2009;24:702-9.
 4) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T. Serum pentosidine levels are positively associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1013-9.
 5) Kislinger T, Fu C, Huber B, Qu W, Taguchi A, Du Yan S, et al. N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligands for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:31740-9.
 6) Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, et al. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-over-expressing mice. *J Clin Invest* 2001;108:261-8.
 7) Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG,

- Abedin MJ, Li H, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 2003;370:1097-109.
- 8) Ding KH, Wang ZZ, Hamrick MW, Deng ZB, Zhou L, Kang B, et al. Disordered osteoclast formation in RAGE-deficient mouse establishes an essential role for RAGE in diabetes related bone loss. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340:1091-7.
- 9) Yoshida N, Okumura K, Aso Y. High serum pentosidine concentrations are associated with increased arterial stiffness and thickness in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2005;54:345-50.
- 10) Katakami N, Matsuhisa M, Kaneto H, Matsuoka TA, Sakamoto K, Nakatani Y, et al. Decreased endogenous secretory advanced glycation end product receptor in type 1 diabetic patients: its possible association with diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 2005;28:2716-21.

Baseline atherosclerosis parameter could assess the risk of bone loss during pioglitazone treatment in type 2 diabetes mellitus

I. Kanazawa · T. Yamaguchi · S. Yano · M. Yamamoto · M. Yamauchi · S. Kurioka · T. Sugimoto

Received: 12 August 2009 / Accepted: 7 December 2009 / Published online: 4 February 2010
© International Osteoporosis Foundation and National Osteoporosis Foundation 2010

Abstract

Summary We found that serum osteocalcin, femoral bone mineral density (F-BMD), and 1/3R-BMD were decreased during pioglitazone treatment in patients with type 2 diabetes. Moreover, baseline atherosclerosis parameter, serum insulin-like growth factor-I (IGF-I), and urinary N-terminal cross-linked telopeptide of type I collagen (uNTX) values were associated with changes in bone mineral density (BMD). Therefore, these parameters could assess the risk of BMD reduction in patients treated with pioglitazone.

Introduction The aim of this study was to investigate the effects of pioglitazone or metformin on bone mass and atherosclerosis in patients with type 2 diabetes.

Methods A total of 55 Japanese patients were enrolled in this 1-year open-label study and randomized to either pioglitazone ($n=22$, 15–30 mg/day) or metformin ($n=23$, 500–750 mg/day) groups. BMD at the lumbar spine, femoral neck (F), and one third of the radius (1/3R), bone markers, and atherosclerosis parameters were measured.

Results In the pioglitazone group, serum osteocalcin significantly decreased at 6 months ($p<0.05$), although it almost recovered to baseline level at 12 months. F-BMD

significantly decreased at 6 months ($p<0.05$), and 1/3R-BMD significantly decreased at 6 and 12 months ($p<0.05$), while bone markers or BMD at any site were not changed in the metformin group. Although atherosclerosis parameters were not changed in the pioglitazone group, intima-media thickness (IMT)-mean significantly increased at 6 months ($p<0.05$) and plaque score significantly increased at 6 and 12 months ($p<0.01$) in the metformin group. In the pioglitazone group, %changes in F-BMD were significantly and negatively correlated with baseline IMT-Max, IMT-mean, and plaque scores ($r=-0.61$, $p<0.01$; $r=-0.71$, $p<0.01$; and $r=-0.68$, $p<0.01$, respectively), and %changes in 1/3R-BMD were significantly and negatively correlated with baseline uNTX and IMT-Max ($r=-0.57$, $p<0.01$ and $r=-0.48$, $p<0.05$, respectively) and positively with IGF-I ($r=0.45$, $p<0.05$).

Conclusions Baseline IMT, uNTX, and IGF-I could assess the risk of BMD reduction in diabetic patients treated with pioglitazone.

Keywords Atherosclerosis · Bone mineral density · Metformin · Pioglitazone · Type 2 diabetes mellitus

Introduction

Thiazolidinediones (TZDs) such as pioglitazone and rosiglitazone are peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR- γ) agonists and are widely used for the treatment of type 2 diabetes [1, 2]. PPAR- γ is known to be expressed in bone marrow cells. It acts as a molecular switch that regulates the fate of pluripotent mesenchymal stem cells, and PPAR- γ activation induces bone loss characterized by deficient osteoblast function [3, 4]. Clinically, a meta-analysis has shown that long-term use of TZDs causes bone

This manuscript has been registered with an approved ICMJE clinical trial registry (UMIN 000001997).

I. Kanazawa (✉) · T. Yamaguchi · S. Yano · M. Yamamoto · M. Yamauchi · S. Kurioka · T. Sugimoto
Department of Internal Medicine 1,
Shimane University Faculty of Medicine,
89-1 Enya-cho,
Izumo, Shimane, 693-8501, Japan
e-mail: ippei.k@med.shimane-u.ac.jp

mineral density (BMD) reduction and raises fracture risk in women with type 2 diabetes [5]. On the other hand, only a few prospective studies on the adverse effects of TZDs on bone were conducted [6, 7]. To our knowledge, there are no prospective randomized studies with longer duration than a few months in patients with type 2 diabetes. It is also unknown what parameters, if any, could predict the TZDs-induced BMD reduction in the population.

Although experiments with cultured cells indicated that metformin, another drug increasing insulin sensitivity, stimulated the differentiation and mineralization of osteoblasts [8], it is unclear whether or not metformin affects bone markers or BMD in humans.

In this study, we examined the long-term effects of pioglitazone or metformin on bone markers and BMD as well as atherosclerosis parameters up to 12 months in Japanese patients with type 2 diabetes and performed an exploratory analysis to determine if any of the measured parameters could assess the risk of the pioglitazone-induced bone loss in the population.

Research design and methods

Subjects

This study was approved by the ethical review board of our institution and complied with the Helsinki Declaration. From November 1, 2006 to January 1, 2008, patients with type 2 diabetes were enrolled if informed consent was obtained after a detailed explanation of the study purpose and methods. The participants in this study were 55 patients who visited Shimane University Hospital for treatment of type 2 diabetes. All women had been without spontaneous menstrual cycle for more than 1 year. We excluded patients from this study (1) with hepatic or renal dysfunction or nutritional derangements, (2) who had taken TZDs or metformin, and (3) who had taken drugs known to influence bone and calcium metabolism, such as vitamin D, bisphosphonate, or estrogen up until the time of the study. In this 1-year open-label study, participants were randomized to either pioglitazone or metformin groups. Pioglitazone (15–30 mg) was orally administered once daily, and metformin (250 mg) was two or three times after meal (500–750 mg/day). The numbers of patients who had been taking insulin, sulfonylurea, and alpha-glucosidase inhibitors, respectively, were 12, 6, and 3 in the pioglitazone group and 13, 5, and 2 in the metformin group. Chi-square tests showed that there were no significant differences in premedication between the two groups (data not shown). All prescription medications of each patient were not changed during the study. The Brinkmann index was calculated by daily cigarette numbers multiplied by

smoking years. All patients suffered no new fractures during this study.

Radiography and biochemical measurements

BMD values of the lumbar spine (L), femoral neck (F), and one third of the radius (1/3R) were measured by dual-energy X-ray absorptiometry (QDR-4500; Hologic, Waltham, MA, USA) as previously described [9, 10].

After overnight fasting, serum and urine were collected. Biochemical markers were measured by standard biochemical methods as previously described [9–12]. Serum osteocalcin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) were measured by radioimmunoassay, and urinary N-terminal cross-linked telopeptide of type-I collagen (uNTX) was measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

Arterial stiffness measurement and ultrasonographic measurement of carotid intima-media thickness

Brachial ankle pulse wave velocity (baPWV) measurement and B-mode ultrasonographic imaging of the carotid artery were performed using the VaSera VS-1000 (Fukuda Denshi, Tokyo, Japan) and HDI 5000 (Philips, Tokyo, Japan), a high-resolution, real-time ultrasonograph with a 7.5-MHz transducer, respectively, as previously described [11, 12].

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SD. Student's *t* tests were used for comparison between two groups, paired *t* tests for comparison of mean values within groups, χ^2 tests for nominal scale, and correlation and multiple regression analysis for the relationships between two parameters. All analyses were carried out using the statistical computer program StatView (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). A value of *p* < 0.05 was considered to be significant.

Results

Baseline characteristics of patients and comparison of parameters between the pioglitazone and the metformin groups

A total of 55 patients were enrolled, with none of them withdrawing from the study (Table 1). Body mass index (BMI) was significantly lower in the pioglitazone group than in the metformin group. BMD, T score, and Z score at the lumbar spine were significantly higher in the pioglitazone group than in the metformin group.

Table 1 Baseline characteristics of patients and comparison of parameters between the pioglitazone and the metformin groups

	Pioglitazone 22 (14/8)	Metformin 23 (13/10)	<i>p</i>
Number of subjects (male/female)			
Age (years)	67±10	66±10	0.649
Duration of diabetes (years)	14±9	12±11	0.547
Body height (cm)	161.7±9.6	158.1±9.5	0.213
Body weight (kg)	57.6±8.4	62.2±10.9	0.124
BMI (kg/m ²)	22.0±2.3	24.9±3.7	0.003
Systolic blood pressure (mmHg)	128±15	130±12	0.556
Diastolic blood pressure (mmHg)	80±9	80±11	0.975
Brinkmann index	243±375	192±424	0.670
LDL-C (mg/dl)	107±21	104±24	0.694
HDL-C (mg/dl)	61±20	63±23	0.693
Serum creatinine (mg/dl)	0.77±0.20	0.76±0.20	0.768
Serum albumin (g/dl)	4.1±0.5	4.2±0.4	0.358
Serum calcium (mg/dl)	9.4±0.4	9.4±0.4	0.755
HbA _{1c} (%)	7.9±1.7	7.9±1.3	0.944
IGF-I (ng/ml)	116±14	132±35	0.172
L BMD (g/cm ²)	1.072±0.187	0.911±0.138	0.002
T score	0.3±1.5	-1.0±1.2	0.002
Z score	1.1±0.9	0.1±1.1	0.003
F BMD (g/cm ²)	0.727±0.119	0.681±0.113	0.192
T score	-0.9±0.9	-1.3±0.9	0.238
Z score	0.5±1.1	0.1±1.2	0.204
1/3 BMD (g/cm ²)	0.645±0.098	0.603±0.117	0.201
T score	-1.4±1.4	-2.1±2.0	0.188
Z score	0.6±1.2	-0.2±1.7	0.080
Osteocalcin (ng/ml)	8.0±3.5	7.1±3.1	0.377
uNTX (nMBCE/mM-Cr)	41.6±29.2	39.0±28.4	0.763
Right-baPWV (m/s)	16.5±4.1	15.4±2.5	0.258
Left-baPWV (m/s)	15.9±3.2	15.3±2.7	0.487
IMT-Max (mm)	2.1±0.9	2.3±1.0	0.656
IMT-Mean (mm)	1.26±0.35	1.38±0.48	0.334
Plaque score	6.9±4.1	7.2±5.3	0.837

Data are means ± SD

BMI body mass index, *IGF-I* insulin-like growth factor-I, *LDL* low-density lipoprotein cholesterol, *HDL* high-density lipoprotein cholesterol, *HbA_{1c}* hemoglobin A_{1c}, *L* Lumbar, *F* femoral neck, *1/3R* one third of radius, *BMD* bone mineral density, *uNTX* urinary N-terminal cross-linked telopeptide of type-I collagen, *baPWV* branchial ankle pulse wave velocity, *IMT* intima-media thickness

Chronological changes in body weight, glycemic control, insulin-like growth factor-I, BMD, bone markers, and parameters of atherosclerosis

Chronological changes in body weight, glycemic control, IGF-I, BMD, bone markers, and atherosclerosis parameters were shown in Table 2. Body weight and BMI were significantly and consecutively increased at 3, 6, and 12 months in the pioglitazone group, while they were not significantly changed in the metformin group. HbA_{1c} was significantly decreased at 3, 6, and 12 months in both the pioglitazone group and the metformin group, with no significant differences in HbA_{1c} improvements at any time points between the two groups (data not shown).

In the pioglitazone group, F-BMD was significantly decreased at 6 months (%change, $-2.41 \pm 5.72\%$), and 1/

3R-BMD was significantly decreased at 6 and 12 months (%change, $-1.75 \pm 2.56\%$ and $-1.65 \pm 3.31\%$, respectively). Changes in 1/3R-BMD in the pioglitazone group were significantly different from those in the metformin group at 6 months ($p=0.038$). Serum osteocalcin level was significantly decreased at 6 months, while uNTX was not significantly changed. In contrast, BMD at any site or bone markers were not significantly changed in the metformin group.

In the pioglitazone group, baPWV or intima-media thickness (IMT) were stable and not significantly changed up to 12 months. In contrast, significant deterioration was observed in IMT-mean at 6 months and in plaque scores at 6 and 12 months in the metformin group. Changes in plaque score in the metformin group were significantly greater than those in the pioglitazone group at 6 and 12 months ($p=0.030$ and $p=0.033$, respectively).

Table 2 Chronological changes in body weight, glycemic control, insulin-like growth factor-I, BMD, bone markers, and parameters of atherosclerosis

Variables	Baseline	3months	6months	12months
Pioglitazone				
Body weight (kg)	57.6 (8.4)	58.9 (8.4)**	60.2 (8.7)***	61.2 (8.8)***
BMI (kg/m ²)	22.0 (2.3)	22.5 (2.2)**	23.0 (2.3)***	23.4 (2.6)***
HbA1c (%)	7.9 (1.7)	7.4 (1.7)**	7.2 (1.2)**	7.1 (1.2)***
IGF-I (ng/ml)	116 (41)		117 (30)	114 (29)
L BMD (g/cm ²)	1.072 (0.187)		1.078 (0.202)	1.070 (0.187)
F BMD (g/cm ²)	0.727 (0.119)		0.708 (0.115)*	0.715 (0.116)
1/3R BMD (g/cm ²)	0.645 (0.098)		0.634 (0.101)**	0.635 (0.107)*
Osteocalcin (ng/ml)	8.0 (3.5)	7.4 (3.6)	6.8 (3.0)*	7.7 (3.8)
uNTX (nMBCE/mM-Cr)	41.6 (29.2)	37.9 (28.9)	41.7 (32.8)	39.5 (28.3)
Right-baPWV (m/s)	16.5 (4.1)		15.5 (2.8)	15.9 (3.8)
Left-baPWV (m/s)	15.9 (3.2)		15.6 (2.5)	15.5 (2.7)
IMT-Max (mm)	2.1 (0.9)		2.2 (1.2)	2.1 (1.1)
IMT-Mean (mm)	1.26 (0.35)		1.28 (0.40)	1.25 (0.47)
Plaque score	6.9 (4.1)		7.3 (4.7)	6.4 (5.7)
Metformin				
Body weight (kg)	62.2 (10.9)	61.8 (9.6)	62.3 (10.2)	62.7 (10.8)
BMI (kg/m ²)	24.9 (3.7)	24.7 (3.2)	24.9 (3.4)	25.1 (3.6)
HbA1c (%)	7.9 (1.3)	7.1 (1.0)**	7.1 (1.0)*	7.1 (1.1)*
IGF-I (ng/ml)	132 (35)		135 (37)	136 (38)
L BMD (g/cm ²)	0.911 (0.138)		0.922 (0.154)	0.920 (0.142)
F BMD (g/cm ²)	0.681 (0.113)		0.673 (0.096)	0.666 (0.108)
1/3R BMD (g/cm ²)	0.603 (0.117)		0.609 (0.127)	0.604 (0.121)
Osteocalcin (ng/ml)	7.1 (3.1)	6.8 (2.9)	6.6 (2.6)	7.0 (3.2)
uNTX (nMBCE/mM-Cr)	39.0 (28.4)	34.9 (18.8)	35.0 (16.7)	38.9 (24.5)
Right-baPWV (m/s)	15.4 (2.5)		15.5 (2.4)	15.9 (3.0)
Left-baPWV (m/s)	15.3 (2.7)		15.5 (2.5)	15.9 (3.4)
IMT-Max (mm)	2.3 (1.0)		2.4 (0.9)	2.3 (0.7)
IMT-Mean (mm)	1.38 (0.48)		1.46 (0.41)*	1.44 (0.42)
Plaque score	7.2 (5.3)		9.3 (5.0)***	8.9 (5.0)**

Data are means (SD)

BMI body mass index, HbA1c hemoglobin A1c, IGF-I insulin-like growth factor-I, L lumbar, F femoral neck, 1/3R one third of radius, BMD bone mineral density, uNTX urinary N-terminal cross-linked telopeptide of type-I collagen, baPWV brachial ankle pulse wave velocity, IMT intima-media thickness

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$;*** $p < 0.001$

Correlations between baseline values of each parameter versus %changes in BMD at each skeletal site in the pioglitazone group

We performed correlation analysis between baseline values of each parameter versus %changes in BMD at each skeletal site at 6 months in order to investigate which parameters could predict BMD reduction in patients treated with pioglitazone. In the pioglitazone group, %changes in F-BMD were significantly and negatively correlated with baseline values of IMT-Max, IMT-mean, and plaque scores ($r = -0.61$, $p = 0.002$; $r = -0.71$, $p < 0.001$; and $r = -0.68$, $p = 0.001$, respectively). %Changes in 1/3R-BMD were significantly and positively correlated with baseline serum IGF-I level ($r = 0.45$, $p = 0.038$) and negatively correlated with baseline uNTX and IMT-Max ($r = -0.57$, $p = 0.006$ and $r = -0.48$, $p = 0.024$, respectively).

Multiple regression analyses adjusted for age, gender, BMI, duration of diabetes, initial HbA_{1c}, and serum

creatinine showed that %changes in F-BMD were still significantly and negatively correlated with baseline IMT-mean and plaque score in the pioglitazone group ($r = -0.66$, $p = 0.019$ and $r = -0.65$, $p = 0.027$, respectively) and tended to be negatively correlated with baseline IMT-Max ($r = -0.51$, $p = 0.057$). Percent changes in 1/3R-BMD were still significantly and positively correlated with baseline serum IGF-I level ($r = 0.68$, $p = 0.036$) and negatively correlated with baseline uNTX and IMT-Max ($r = -0.77$, $p = 0.007$ and $r = -0.51$, $p = 0.014$, respectively).

Discussion

Many clinical studies have shown that osteoporosis is associated with atherosclerosis or the cardiovascular disease [13, 14]. On the other hand, pioglitazone is considered to be unique in its ability to reduce a progression of atherosclerosis and to prevent an occurrence of cardiovascular events