

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15360

研究課題名(和文) 骨形成指標のオステオカルシンで糖尿病の発症を予測できるか 大規模コホート研究

研究課題名(英文) Does osteocalcin, a bone formation marker, predict future development of diabetes mellitus? A large-scale cohort study

研究代表者

伊木 雅之 (IKI, Masayuki)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：50184388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：過去の動物実験ではオステオカルシン(OC)欠乏は耐糖能異常を発症させ、OCの添加がそれを正常化し、人の断面研究でも血清OC値と血糖指標との間に負の相関が認められている。本研究では血清OC値と糖尿病発症との関連を前向きに検討した。その結果、血清OC値の1SD上昇当たり10%程度の糖尿病発症リスクの減少が見られた。しかし、統計的に有意には至らなかった。統計的パワーが不足しており、今後より大きな規模での検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Impaired glucose tolerance was observed in osteocalcin(OC)-deficient mice and was prevented by administration of osteocalcin to the animal. Inversed association between serum OC levels and glycemic indices were reported from cross-sectional studies of humans. We investigated the relationship of serum OC levels to subsequent risk of developing diabetes mellitus (DM). We observed decreased risk of DM by 10% per 1 SD increase in OC levels at baseline, but this decrease in risk was not statistically significant. The statistical power was not sufficient to find this small change in risk to be significant in this study. Studies in a larger scale would be necessary.

研究分野：疫学、公衆衛生学

キーワード：オステオカルシン 低カルボキシル化オステオカルシン 糖尿病 コホート研究 リスク予測

## 1. 研究開始当初の背景

OCは成熟した骨芽細胞で産生され、3つのグルタミン酸残基がカルボキシル化されてヒドロキシアパタイトとの親和性を獲得し、活性型として骨基質内に蓄積する。血中にはカルボキシル化OCとその程度の低い低カルボキシル化OC(undercarboxylated OC, ucOC)が存在するが、これまではこの両方を含む intact OCが特異性の高い骨形成マーカーとして多用されてきた<sup>1)</sup>。

ところが、OC遺伝子のKOマウスでも骨は形成されることが証明され、OCは骨形成に必須でないことが明らかになった<sup>2)</sup>。OCの骨形成マーカーとしての地位が揺らいでいる。

OCが他の骨代謝マーカーと異なる挙動をとるのは糖尿病だ。糖尿病患者の血中OCは一貫して低値で、血糖管理が達成されると、OC以外の骨代謝マーカーは低下するのに対し、OCは上昇する<sup>3)</sup>。この現象は高血糖によって成熟期の骨芽細胞が機能不全に陥り、OCの合成が低下するため、血糖の改善に伴って骨芽細胞機能が回復し、血中OC濃度も上昇すると解釈されてきた。しかし、これは原因と結果が逆ではないかとする実験結果が報告された。

Leeら<sup>4)</sup>はOC遺伝子をKOしたOC欠乏マウスでは、野生型より膵β細胞の増殖が低調で、血中insulin濃度が低く、高血糖を来し、これらはOCの投与で改善することを示した。OCは糖代謝を制御するホルモン作用を持つわけである。興味深いことに、このOCの作用は骨代謝で活性型とされるカルボキシル化OCではなく、ucOCで認められた。糖代謝での活性型は骨代謝とは逆であるかもしれない。

血中OC濃度と空腹時血糖値やHbA1c値が逆相関することはヒトでも報告されていたが、逆相関の本体がカルボキシル化OCかucOCかは明らかではなかった。申請者ら<sup>5)</sup>は地域在住高齢男性の調査から、ucOCはカルボキシル化OCとucOCの両方を含む intact OCを調整しても空腹時血糖値、HbA1c値、HOMA-IR値と逆相関するが、intact OCはucOCを調整すると無相関となること、同様に糖尿病と診断されるオッズ比はucOCが高いほど低くなるが、intact OCではそのような現象は見られないことを示し、ヒトでも糖代謝と関連するのはucOCである可能性を報告した。

これまでのOCとグルコース代謝指標との関連は、申請者らの研究を含め、すべて断面研究で検討されてきた。しかし、断面研究では、OCが低下したから血糖値が上がったのか、従来の考え通り、血糖値が上がったからOCが低下したのか証明できない。これを明らかにするには、前向きコホート研究が必要である。

## 2. 研究の目的

申請者らは追跡開始から20年になる前向きコホート研究を用いて、ベースラインでの低ucOCが糖尿病の新規発症リスクを上げるかどうかを世界に先駆けて明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 調査対象

Japanese Population-based Osteoporosis (JPOS) Cohort Study<sup>6)</sup>は1996年に開始されたコホート研究で、全国の7地域から各650人の女性を層化無作為抽出し、内、5地域を追跡しているものである。本研究の対象者はJPOS baseline研究を完遂した者の内、4つの調査地域に在住の40歳以上の者1569人とした。

### (2) 調査のデザインと調査内容

#### 調査のデザイン

調査のアウトラインを図1に示した。1996年の初回調査をBaselineとし、15年次追跡調査での新規糖尿病発症をoutcomeにしてOCの影響を評価する解析と、15年次追跡調査をBaselineとし、20年次追跡調査での新規糖尿病発症をoutcomeにしてOCの影響を評価する解析を実施した。初回調査ではOCは測定済みだったので、凍結血清を用いてucOCを測定し、15年次調査の凍結血清ではOCとucOCの両方を測定した。

#### OC、ucOCの測定

OCはtwo-site immunoradiometric assay (BGP IRMA kit Mitsubishi, Mitsubishi Kagaku Iatron Inc., Tokyo, Japan)で測定し、感度は1 ng/ml、intra-assay coefficient of variation (CV)は4.9%、inter-assay CVは3.7%、全CVは6.1%であった。ucOCはelectrochemiluminescence immunoassay (ng/ml; Picolumi ucOC, Sanko Junyaku Co. Ltd., Tokyo, Japan)で測定し、感度は0.39 ng/ml、intra-assay CVは4.1%、inter-assay CVは3.5%、全CVは5.4%であった。

#### 糖尿病の診断

15年次、並びに20年次追跡調査時に空腹時血糖(FPG)とヘモグロビンA1c(HbA1c)を測定し、FPG 126 mg/dl、またはHbA1c 6.5%、または医師による糖尿病の新規診断とした。Baselineで糖尿病の基準に当てはまった者は除外した。ただし、初回調査ではFPGとHbA1cを測定しておらず、またこれらを測定できる全血検体を保存していないので、初回の糖尿病の除外は既往歴のみによった。

#### 統計解析

BaselineでのOC、ucOC濃度をpredictor、15年次、あるいは20年次追跡調査時の糖尿病の新規発症をoutcome、Baseline次の年齢、BMIを調整要因としたLogistic回帰モデルを用いた。統計解析はSAS(9.4)を用いた。

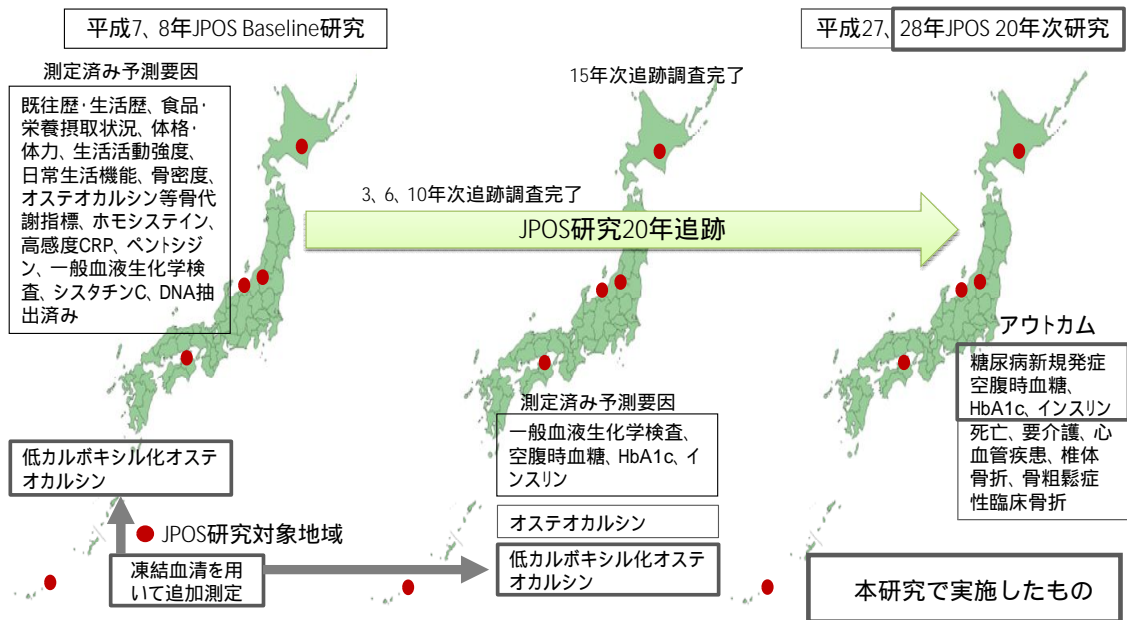


図1．調査のアウトライン

#### 4．研究成果

##### (1) 対象者の受診とDM発症状況

対象者の受診状況を図2に示す。BaselineでDMの既往があった者は71人あり、これを除く1498人を対象にした。その内、866

人が15年次追跡調査を受診し、その内、75人が新規にDMを発症した。発症しなかった791人を対象に20年次追跡調査を行ったところ、601人が受診し、内、30人が新規にDMを発症した。

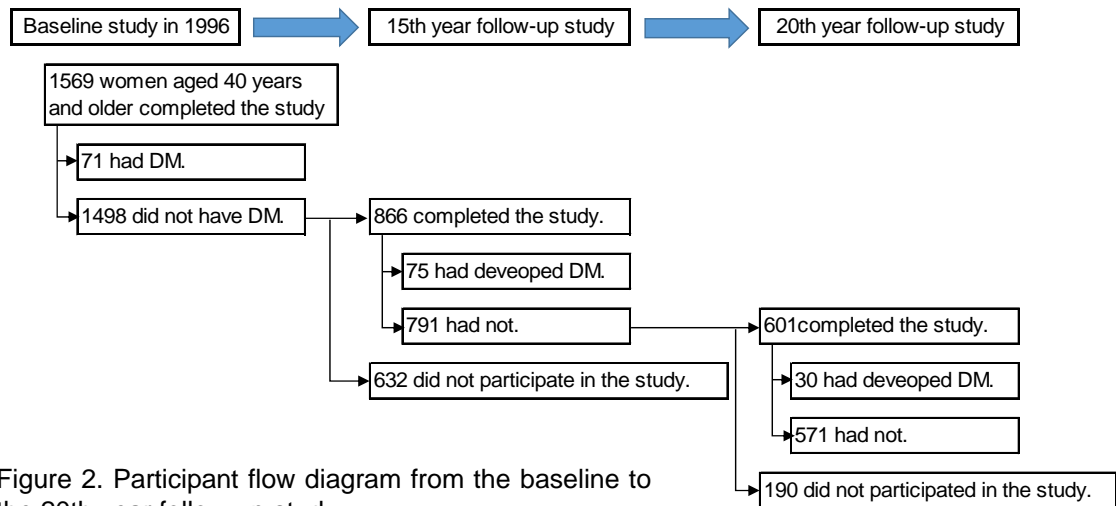


Figure 2. Participant flow diagram from the baseline to the 20th year follow-up study.

##### (2) 対象者の基本的特性

Table 1に1996年のBaselineですでにDMを発症していた71人、その後15年間にDMを新規に発症した75人、同期間に発症しなかった791人、引き続き5年間にDMを新規に発症した30人、同期間に発症しなかった571人のそれぞれのBaseline時点での基本的特性を示す。15年追跡時にDMを発症した群は発症しなかった群に比べて、有意に体重が重く、BMIが高く、大腿骨近位部骨密度が高かった。一方、OCはDM発症群で低値ではあったが、有意差はなかった。Baseline時点でのucOCは一部の凍結血清を用いたサンプル測定で、いずれも測定限界以下となった。

現在、日本国内で利用できるucOCの測定法は本研究で用いているもの以外になく、-80とは言い、20年間の保存期間中に蛋白の分解が進んでしまっていたと考え、測定を断念した。

15年追跡調査からの5年間にDMを発症した群では、発症しなかった群に比べて、BMIが有意に高かったが、それ以外に有意差は認められなかった。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

Table 1. Basic characteristics of participants at baseline with and without newly developed DM in the first 15-year follow-up and the following 5-year follow-up

	At baseline		During 15 years of follow-up				Following 5 years of follow-up			
	Prevalent DM N=71		DM developed N=75		DM not developed N=791		DM developed N=30		DM not developed N=571	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Age (year)	64.7	9.8	55.8	8.7	55.2	9.4	70.0	9.1	68.5	8.1
Height (cm)	148.8	6.6	152.0	5.1	152.1	5.7	150.7	6.9	150.7	6.4
Weight (kg)	53.5	9.2	59.0*	10.0	54.2	7.8	55.4	10.5	51.7	8.1
BMI	24.1	3.5	25.5*	4.1	23.4	3.1	24.4*	4.2	22.7	3.3
OC (ng/ml)	6.8	1.6	6.7	1.4	7.0	1.6	7.4	1.3	7.7	1.4
ucOC (ng/ml)	-	-	-	-	-	-	5.0	1.7	5.0	1.9
BAP (ng/ml)	15.2	6.9	13.8	6.4	13.4	6.3	18.2	6.4	16.1	6.0
uCTX (ng/mmolCr)	282.2	2.0	259.2	2.0	281.5	2.0	-	-	-	-
fDPD (nmol/mmolCr)	5.6	1.4	5.8	1.4	5.9	1.4	-	-	-	-
tDPD (nmol/mmolCr)	11.2	1.5	10.4	1.6	11.1	1.5	-	-	-	-
LS-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.886	0.179	0.941	0.173	0.918	0.169	0.833	0.156	0.848	0.151
Hip BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.771	0.145	0.862*	0.139	0.823	0.127	0.758	0.120	0.743	0.119
FN-BMD (g/cm <sup>2</sup> )	0.671	0.126	0.750	0.121	0.725	0.118	0.633	0.098	0.624	0.104

DM: diabetes mellitus, OC: osteocalcin, ucOC: undercarboxylated OC, BAP: bone-specific alkaline phosphatase, uCTX: urinary type 1 collagen cross-linked C-terminal telopeptide, fDPD: free deoxypyridinoline, tDPD: total DPD, LS: lumbar spine, FN: femoral neck, BMD: bone mineral density, \*: p<0.05 compared with non-DM, -: data not available

(3) OC、ucOC の DM 発症への影響

Table 2 に、15 年追跡中の DM の発症に対する OC の OR と、その後の 5 年追跡における DM の発症に対する OC と ucOC の OR を示した。いずれも Baseline 時点の年齢と BMI を調整した。OC、ucOC 共、1 行目は連続変量として投入し、1 SD 上昇当たりの OR を、2 行目以降は三分位毎の OR を示してある。OC は 15 年間、その後 5 年間とも 1 SD 上昇あたり 10%、あるいは 12% の DM 発症リスクの低下を示したが、いずれも有意には到らなかった。三分位に分けた解析では、もっとも高い場合に DM の OR が 25% と 55%、それぞれ低下したが、これも有意には届かなかった。

また、ucOC についてはさらに影響は弱かった。

Lee ら<sup>4)</sup> の動物実験では OC、中でも ucOC の欠損は DM を発症させ、OC の添加がそれを正常化した。本結果は OC については高値が DM の新規発症を抑制する方向には作用していたが、統計的に有意にはならなかった。これは、人間では動物のような OC と DM の関連は見られないためと考えられるが、一方、1 SD 上昇あたり 10% 程度のリスク減少はあるが、統計的パワーが不足しているために有意差として検出できなかったことも考えられる。今後より大きな規模での検討が必要である。

Table 2. Age and BMI-adjusted odds ratio (OR) of developing DM for OC during the first 15-year follow-up or during the following 5-year follow-up

		15-year follow-up			following 5-year follow-up		
		OR	95%CI	95%CI	OR	95%CI	95%CI
OC	SD increase	0.90	0.68	1.19	0.88	0.61	1.27
	T1 reference	1					
	T2	1.25	0.68	2.29	1.38	0.61	3.15
	T3	0.75	0.37	1.53	0.45	0.15	1.34
ucOC	SD increase	-	-	-	1.00	0.70	1.44
	T1 reference	-	-	-	1		
	T2	-	-	-	0.75	0.29	1.95
	T3	-	-	-	1.19	0.50	2.85

DM: diabetes mellitus, OC: osteocalcin, ucOC: undercarboxylated OC, 95% CI: 95% confidence interval, T1: lowest tertile, T2: middle tertile, T3: highest tertile

[引用文献]

- 1) 伊木雅之. 骨粗鬆症治療 2012;11:52-6
- 2) Ducy P, et al. Nature 1996;382:448-52
- 3) Okazaki R, et al. Clin Endocrinol Metab 82:2915-2920
- 4) Lee NK, et al. Cell 130:456-469

- 5) Iki M, et al. Osteoporos Int 2012;23:761-70
- 6) Iki M, et al. Int J Epidemiol 2015;44:405-14

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ：The JPOS Study

<http://www.med.kindai.ac.jp/pubheal/jpos/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊木 雅之 (IKI, Masayuki)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：5 0 1 8 4 3 8 8

### (2) 研究分担者

玉置 淳子 (TAMAKI, Junko)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：9 0 3 2 6 3 5 6

由良 晶子 (YURA, Akiko)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：8 0 1 4 2 5 9 5