

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591767

研究課題名（和文） 新たな骨粗鬆症モデルの確立

研究課題名（英文） Establishment of a new model of osteoporosis

研究代表者 斎藤 充 (SAITO MITSURU)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：50301528

研究成果の概要：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討したところ、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。従って、本モデルは、骨質評価ならびに治療を目指した創薬への応用に期待できる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨粗鬆症，高ホモシステイン血症，骨質低下，動物モデル

1. 研究開始当初の背景

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。

我々は、これまでに、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と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出している。また、大腿骨頸部骨折患者では、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。さらに、最近では、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が架橋形成の異常をもたらすことを明らかにしており、生活習慣病である血管異常と骨粗鬆症は共通した病態の上に成り立っているとの仮説を立てている。

しかし、これまでに、ヒト骨質劣化型の病態を反映する動物モデル、すなわち、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なく、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。

2. 研究の目的

齧歯類(モデリング類)、およびヒトに近い骨代謝動態(リモデリング骨)を示す家兔に卵巣摘除を行った上に、高ホモシステインやビタミン B6, B12、葉酸欠乏を負荷することによって、ヒト閉経後骨粗鬆症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、「骨血管相関からみた骨質治療」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。

3. 研究の方法

雌性ニュージーランド白色家兔(生後20週:成熟期)に卵巣摘除(OVX)を行い、術後5日目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。卵巣摘出もしくはSham手術を行い、4群:1) Sham手術群, 2) 1%

メチオニン負荷群, 3) OVX群, 4) OVX+1%メチオニン負荷群に分けた。メチオニン負荷は術直後より開始し、投与終了後、血液、尿、大腿骨を採取して、以下の検討を行った。

(1) コラーゲン分析

採取した骨は、液体窒素で粉砕後にコラーゲンを抽出し、我々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。解析した架橋は、生理的架橋(未熟型の架橋であるリジノ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。

(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。

4. 研究成果

(1) 研究成果

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, $r=-0.404$, $p<0.05$)。

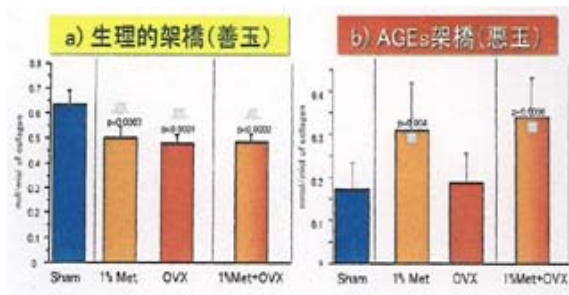
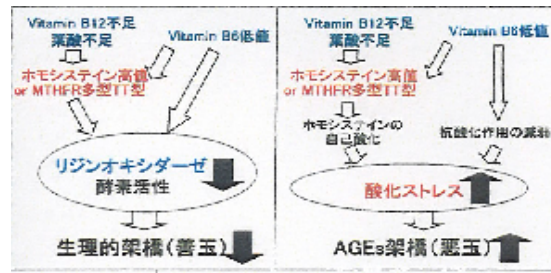


図 1. 骨コラーゲン架橋
 a) 生理的架橋の形成量
 b) AGEs 架橋(ペンとシジン)の形成量
 1%Met : 1%メチオニン混餌投与
 OVX: 卵巣摘出群, Sham 群との比較

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比べて、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。

今回の検討においても、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考えられる。

こうした事実、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示唆される(図2)。



骨質低下

図 2. 原発性骨粗鬆症における骨質低下のメカニズム

(2) 国内外における位置づけ・今後の展望

我々は、ヒト骨粗鬆症患者では、若い骨単位に過度の老化コラーゲンが形成されていることから、生理的な老化を逸脱した過老化を促進するような病態が存在することを見いだしている。このような骨コラーゲンの過老化の原因として、動脈硬化や心血管イベントのリスクファクターであるホモシステインの高値やビタミン B6 の低値、酸化ストレスの増大が関与していることを世界で初めてヒト骨粗鬆症の検体から明らかにした。

興味深いことにホモシステインやビタミン B6 は、善玉架橋および悪玉架橋の形成を制御する因子でもある。すなわち、これらの因子は、骨では骨強度を低下させる要因として架橋異常をもたらすのに対し、血管では内皮細胞を傷害し動脈硬化を惹起する骨血管に共通した悪影響因子と考えられる。しかし、これまでこうした着眼点で一つの組織内の骨コラーゲンの老化の程度を詳細に分析した研究は国内外を通じて我々以外に報告はない。

また、我々は、世界に先駆けて、新旧骨単位別に、全アミノ酸組成分析とコラーゲンの善玉架橋(未熟型, 成熟型)と悪玉架橋(老化型 Advanced glycation end products)をピコモルオーダーで解析可能な測定技術を開発している。この解析技術を活用し骨血管相関からみた骨粗鬆症の病態を解明することにより、新たな骨質治療の確立が可能になるものと考えている。

近年、原発性および続発性の骨粗鬆症に伴

う骨脆弱化は、骨密度の低下のみでは説明が出来ないことはコンセンサスが得られている。我々は骨の主要な構成成分であるコラーゲンの役割について、骨血管相関という概念でヒトや動物モデルを用いて、世界に先駆けその理論を実証してきた。

また、我々は最近、骨密度の低下を伴わずに骨折リスクが増大する糖尿病において、低ビタミン B6 や持続的な高血糖がコラーゲン架橋の異常ももたらし骨脆弱性の原因となることを初めて明らかにした。興味深いことに糖尿病でも高ホモシステイン、低ビタミン B6 は高率に存在し心血管イベントの原因となることが知られている。この事実からも高ホモシステイン、低ビタミンB、酸化ストレスの増大は、骨や血管におけるコラーゲン架橋の異常を惹起する共通した悪影響因子であると言え、今後の骨質医療への展開が期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Saito M, Mori S, Mashiba T, Komatsubara S, Marumo K.
Collagen maturity, glycation induced pentosidine, and mineralization are increased following 3-years treatment of incadronate in dogs.
Osteoporosis International 19:1343-54, 2008 有
- ② Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Saito M, Fukunaga M, Nakamura T.
Non-enzymatic collagen cross-links induced by glycooxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures.
Journal of Bone and Mineral Metabolism 26(1) : 93-100, 2008 有
- ③ 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 205(2) : 295-303, 2008 有
- ④ Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Saito M, Fukunaga M, Nakamura T.
Non-enzymatic collagen cross-links induced by glycooxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures.
Journal of Bone and Mineral Metabolism 26 : 93-100, 2008 有
- ⑤ Shiraki 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.
Journal of Bone and Mineral Metabolism 26 : 595-602, 2008 有
- ⑥ 斎藤充, 丸毛啓史
新たな骨粗鬆症モデルの確立-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-
Osteoporosis Japan 16 : 636-639, 2008 有

[総説] (計 12 件)

- ① 斎藤充
特集「ビタミンと骨」-ビタミンBと骨-
THE BONE 22 : 47-52, 2008
- ② 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 18:84-92, 2008
- ③ 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 7 : 1-5, 2008
- ④ 斎藤充
骨質と骨基質 -特集 : 骨質と骨粗鬆症-
骨粗鬆症治療 6 : 25-32, 2007
- ⑤ 斎藤充
特集「骨質」骨質関連因子. コラーゲン架橋

THE BONE 21 : 53-58, 2007

- ⑥ 齋藤充
ビタミンK 2 製剤の今日的意義と役割
-骨質 (コラーゲン代謝から) -
Pharma Medica 25 : 39-46, 2007
- ⑦ 齋藤充
特集「Bisphosphonate III」-骨ミネラル
とコラーゲン架橋に及ぼす影響-
THE BONE 21 : 39-42, 2007
- ⑧ 齋藤充
新しい骨疾患治療薬の骨粗鬆症治療への
応用-ビタミンB6 製剤-
骨粗鬆症治療 6 : 44-50, 2007
- ⑨ 齋藤充
骨粗鬆症治療のグローバルスタンダード
-骨基質からみた骨強度と骨質-
ホルモンと臨床 55 : 31-36, 2007
- ⑩ 齋藤充
特集「新時代の骨粗鬆症学」-コラーゲン
架橋構造-
日本臨床 増刊号 : 209-213, 2007
- ⑪ 齋藤充
骨質から見た骨粗鬆症ガイドライン
医薬ジャーナル 43 : 132-133, 2007
- ⑫ 齋藤充
代謝性骨疾患における「骨質」評価の最
前線-コラーゲン解析のアプローチ-
日本骨形態計測学会誌 17 : 53-58, 2007

[学会発表] (計 11 件)

- ① Saito M, Marumo K
Bone architecture and mechanical
stress: Roles of collagen cross-links
in bone.
第 3 回 International Symposium of
Fracture Repair 2008.11.26 京都
- ② 齋藤充, 丸毛啓史
低骨密度とは独立した骨折危険因子であ
る血中ホモシステイン高値が骨脆弱化を
きたす機序-ラット・家兎を用いた検討-
第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会
2008.10.23 京都
- ③ 齋藤充, 丸毛啓史
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 (シンポジウム)

第 28 回日本骨形態計測学会 2008.7.26
東京

- ④ 齋藤充, 丸毛啓史
骨粗鬆症 up date 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- (シンポジウム)
第 8 回日本抗加齢医学会総会 2008.6.7
東京
- ⑤ 齋藤充, 丸毛啓史
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 (シンポジウム)
第 81 回日本整形外科学会学術総会
2008.5.25 札幌
- ⑥ 齋藤充, 伊東昌子, 白石綾子, 三原昌彦,
丸毛啓史
OVX ラット骨折治癒過程の骨質 (材質・構
造特性) に及ぼすアルファカルシドール
とアレンドロネートの比較
第 29 回東北骨代謝研究会 2008.2.2 仙台
- ⑦ 齋藤充, 丸毛啓史
ホモシステイン (葉酸, ビタミン B12, ビ
タミン B6) の骨折リスクへの影響 (シン
ポジウム)
第 9 回日本骨粗鬆症学会 2007.11.14
東京
- ⑧ 齋藤充, 伊東昌子, 丸毛啓史
骨折治癒過程の骨質 (材質・構造特性)
に及ぼす活性型ビタミン D3 およびアレ
ンドロネートの効果-ラット卵巣摘出モ
デルの検討- (パネルディスカッション)
第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会
2007.10.25 浜松
- ⑨ Saito M, Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S,
Fukunaga M, Marumo K, Nakamura T.
Non-enzymatic collagen cross-link,
pentosidine, predicts vertebral
fractures.
6th Combined Meeting Orthopaedic
Research Societies 2007.10.19 Honolulu
- ⑩ Saito M
Bone research in Pacific rim : Roles of
collagen cross-links in bone. (シンポ
ジウム)

第 25 回日本骨代謝学会（国際シンポジウム） 2007.7.20 大阪

⑪ 齋藤充

骨コラーゲン代謝からみた生活習慣病と骨粗鬆症の接点（シンポジウム）

第 25 回日本骨代謝学会 2007.7.19 大阪

〔その他〕

ホームページ：

東京慈恵会医科大学整形外科学講座

<http://www.jikeiseikei.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 充 (SAITO MITSURU)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：50301528

(2) 研究分担者

西沢 哲郎 (NISHIZAWA TETSURO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50439791