

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591920

研究課題名（和文） 骨の細胞外マトリックス研究

糖鎖の変化は骨脆弱性のイニシエーターか

研究課題名（英文） A study of the extracellular matrix of bone

- A possibility that changes of proteoglycans is the initiator of bone weakness-

研究代表者

樋口 毅 (HIGUCHI TSUYOSHI)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60238285

## 研究成果の概要：

「骨粗鬆症モデルラットにおいて骨組織内細胞外マトリックスで生じている変化はコラーゲンに比べてプロテオグリカンの方が著しい」ことが我々の以前のパイロットスタディで認められていた。本研究では骨粗鬆症モデルラットを用いた同じ実験系で1)プロテオグリカンの著明な変化に再現性があること。2)骨粗鬆症となるまでの途中の段階でも同様な傾向があること。3)プロテオグリカンを投与することで骨強度の低下が予防される可能性があることを確認した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：プロテオグリカン，骨粗鬆症，細胞外マトリックス，骨脆弱性，コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

本研究前にパイロットスタディとして卵巣摘出ラット（骨粗鬆症モデル）と卵巣摘出無しのラット（コントロール）において、その骨組織内のコラーゲン、プロテオグリカン、ヒアルロン酸および骨密度、骨強度をパラメータとして比較する実験を行った。その結果からは

- (1) 骨粗鬆症モデルでは各パラメータはコントロールに比べ有意に低下していた。
- (2) 特に骨組織内のある種のプロテオグリカンの低下が他のパラメータに比べ著しかった。

などのことが判明した。

## 2. 研究の目的

上記の結果を踏まえ、

- (1) 骨粗鬆症モデルでの各パラメータの変化を個体数を増やして確認する。
- (2) 骨粗鬆症の発症途中段階のモデルラットを作成し、骨粗鬆症の発症から完成にいたるまでの間のプロテオグリカンの経時的な変化を検討する。
- (3) 骨粗鬆症モデルの作成時（骨粗鬆症発症の病因導入時、つまり卵巣摘出時）からプロテオグリカンの投与を行い、骨粗鬆症の完成された病態に対する予防効果の有無を検討する。

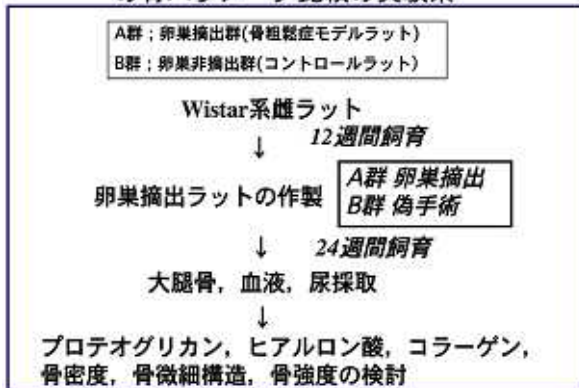
を行い、骨粗鬆症発症におけるプロテオグリ

カンの関与と疾患に対する予防効果を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

上記(1)の研究方法を図1に示す。

図1 骨粗鬆症ラットとコントロールラットの骨パラメータ比較の実験系



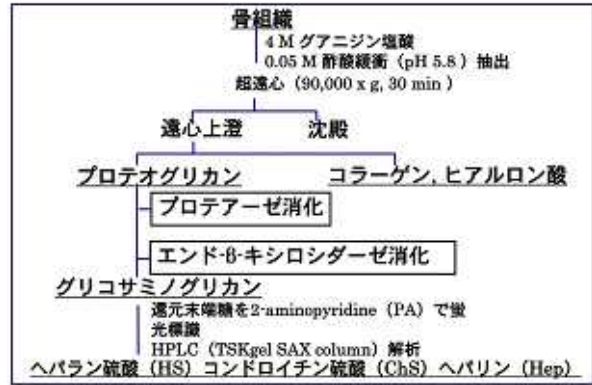
個体数はA群9匹，B群8匹で解析した。

上記(2)の研究方法は，基本的には，図1と同様である。骨粗鬆症の発症段階を調べるために卵巣摘出後8,16週にもラットから大腿骨，血液，尿を採取し分析した（各群個体数は8-10匹を解析した）。

上記(3)の研究方法は骨粗鬆症モデルラット作成のため，週齢12週で卵巣摘出を行うが，その後，飼料として，精製プロテオグリカン溶液を1%(High PG群，個体数8匹)，及び0.01%(Low PG群，個体数8匹)の濃度で連日，24週間飲水させる実験系である。陰性，及び陽性コントロールとして卵巣摘出後プロテオグリカンを飲水させない群(Free PG群，個体数9匹)，または偽手術後プロテオグリカンを飲水させない群(Free PG(偽手術)群，個体数8匹)も作成した。サンプルの分析等については図1と同様に行った。

各パラメータの分析は，プロテオグリカン，ヒアルロン酸，コラーゲンについては図2の様に生化学的分析を行った。

図2.生化学的分析法



プロテオグリカンについては段階的酵素消化法でプロテオグリカンの機能的ドメインである糖鎖，グリコサミノグリカンが無傷で切り出し，蛍光標識し，高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析，定量している。

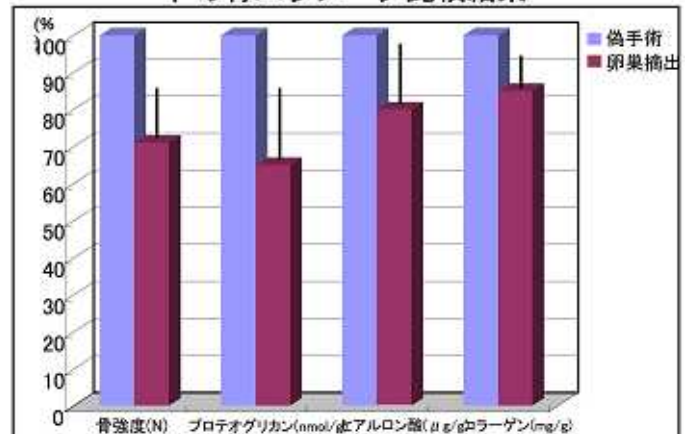
他のパラメータについては，ヒアルロン酸は法で，可溶性コラーゲンは法で測定した。

また，骨密度はDXA(dual energy X-ray absorptiometry)法，骨強度は3点折曲げ法でそれぞれ測定した。

### 4. 研究成果

(1)骨粗鬆症モデルラット群とコントロールラット群における各パラメータの比較を図3に示す。

図3 骨粗鬆症モデルラットとコントロールラットの骨パラメータ比較結果



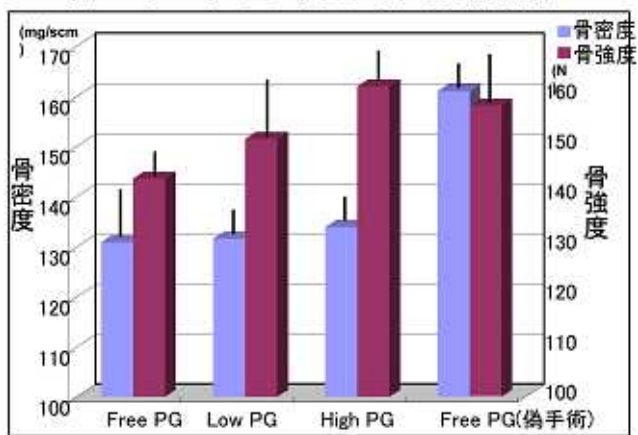
グラフにおいて，骨粗鬆症モデルラット（卵巣摘出）群，コントロールラット（偽手術）群はともに手術後24週経過時点での解析である。それぞれの個体数は9，8匹である。骨強度，骨組織中のプロテオグリカン，ヒアルロン酸，コラーゲンは卵巣摘出群で有意に低下していた（骨密度も卵巣摘出群で有意に低下したことを確認しているが図示していない）。生化学的パラメータの中では

プロテオグリカンの低下が顕著であった。

(2)骨粗鬆症の発症段階における各パラメータの推移については、卵巣摘出後早期（卵巣摘出後8週）より骨組織中のプロテオグリカンはコラーゲンに先んじて低下を始めるが、現段階では傾向を認めるだけで有意な差は認めていない。今後も解析を進めてゆく予定である。

(3)卵巣摘出と同時にプロテオグリカンを投与し24週間の後、骨粗鬆症モデルラット（卵巣摘出後プロテオグリカノン投与群）と比較した結果を図4に示す。

図4 プロテオグリカノン投与実験結果



グラフには各群の骨密度と骨強度の測定値を示している。骨密度については卵巣摘出もせず、プロテオグリカノンも与えない、Free PG(偽手術)群では、それ以外の群に比べて有意に高値を示した。

骨強度についてはLow PG、High PG群ではFree PG群よりも有意に強く、Free PG(偽手術)群と同程度の骨強度が認められた。

全体の考察として、骨密度や骨強度の減少、つまり骨が脆弱化する時にはプロテオグリカノン、ヒアルロン酸などが骨組織中のコラーゲンに比べて早期に、しかも著しく低下してゆくという観察結果が得られた。このことからプロテオグリカノンが骨脆弱化のイニシエーターとなっている可能性はある。しかし、既存の骨代謝関連マーカーや骨組織中のコラーゲン等との比較でその差異を鮮明にするためには骨粗鬆症の発症段階でももう少し細かい間隔でプロテオグリカノン、コラーゲン等の変化を確認できるような実験系が必要であると考えられる。これに関しては実験系を計画中である。

また、図4に示されるように、プロテオグリカノン投与によりもたらされる、骨への効果は、骨密度をあまり増加させないが、骨強度は増加させるという結果であった。プロテオグリカノン投与が骨密度に依存しない骨強度

規定因子（より骨質に関与したもの）に作用して骨の脆弱化を抑制している可能性を示唆させるものであるが、どのような機序であるか、今後も研究を重ねてゆく必要があると思われる。

#### 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)

樋口 毅、水沼 英樹

論文名 骨粗鬆症における長期の服薬コンプライアンスを維持するために  
掲載誌名 Osteoporosis Japan, 16巻,  
413-414, 2008

査読無し

樋口 毅、柞木田礼子、阿部和弘、

谷口綾亮、水沼英樹

論文名 服用時間を変えたりセドロネート投与の骨密度、骨代謝への影響についての検討

掲載誌名 Osteoporosis Japan, 16巻,  
470-472, 2008

査読無し

柞木田礼子、阿部和弘、谷口綾亮、

樋口毅、水沼英樹、中路重之

論文名 一般女性における脂質系と音響的骨評価値の相関に関する検討

掲載誌名 Osteoporosis Japan, 16巻,  
432-435, 2008

査読無し

Tanaka K, Taniguchi R, Higuchi T, Ozaki T, Mizunuma H, Takagaki K.

論文名: 4-Methylumbelliferone inhibits hyaluronate synthesis in human uterine cervical fibroblasts.

掲載誌名: J. Obstet. Gynaecol. Res.  
33,6,772-776, 2007

査読有り

樋口毅、谷口綾亮、田中幹二、水沼英樹

論文名: 選択的エストロゲン受容体モジュ

レーターの血液凝固腺溶系への影響についての検討(第2報)

掲載誌名:Osteoporosis Japan 15, 3, 47-51, 2007

査読無し

谷口綾亮, 樋口毅, 松倉大輔, 田中幹二, 高垣啓一, 水沼英樹

論文名: 骨細胞外マトリックスにおけるグリコサミノグリカン糖鎖の変化と骨の脆弱化- 両側卵巣摘出ラットにおける検討-

掲載誌: Osteoporosis Japan, 15, 3, 7-9, 2007

査読無し

[学会発表](計 11 件)

柞木田礼子, 阿部和弘, 谷口綾亮, 樋口毅, 水沼英樹

発表テーマ 骨密度とアディポサイトカインの相関について

・学会名等 第29回東北骨代謝研究会

・発表日 2008.2.2

柞木田礼子, 阿部和弘, 谷口綾亮, 樋口毅, 水沼英樹

発表テーマ 一般女性における脂質系と音響的骨評価値の相関に対する検討

・学会名等 第60回日本産科婦人科学会学術講演会

・発表日 2008.4.12

柞木田礼子, 阿部和弘, 谷口綾亮, 樋口毅, 水沼英樹

発表テーマ 音響的骨評価値とホモシステインの相関について

・学会名等 第125回日本産科婦人科学会東北連合地方部会総会・学術講演会

・発表日 2008.6.7

柞木田礼子, 阿部和弘, 谷口綾亮, 樋口毅, 水沼英樹

発表テーマ 一般女性における脂質系と音響的骨評価値の相関に対する検討

・学会名等 第12回青森県骨粗鬆症研究会

・発表日 2008.9.19

白木正孝, 青木長寿, 白木由美子, 黒田龍彦, 樋口毅, 斎藤充

発表テーマ Homocysteineを用いた骨粗鬆症の治療効果の予測について

・学会名等 第26回日本骨代謝学会学術集会

・発表日 2008.4.12

Higuchi T, Taniguchi R, Tarakida A, Abe K, Mizunuma H

発表テーマ The relationship between bone quality and glycosaminoglycans changes in an ovariectomized rat model of postmenopausal osteoporosis

・学会名等 12<sup>th</sup> World Congress on the Menopause

・発表日 2008.5.19

発表者名 Taniguchi R, Higuchi T, Tarakida A, Abe K, Mizunuma H

発表テーマ A comparison of effects to the bone by oral risedronate for postmenopausal osteoporosis varied the time taking medicine

・学会名等 12<sup>th</sup> World Congress on the Menopause

・発表日 2008.5.19

発表者 Tanaka K, Matsukura D, Taniguchi R, Yamamoto Y, Higuchi T, Ozaki T, Mizunuma H

発表テーマ Development of a novel therapeutic drug for treatment of preterm delivery

学会名 The XX<sup>th</sup> Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynaecology

発表日 2007.9.21-25

発表者 Higuchi T, Tarakida A, Abe K, Taniguchi R, Mizunuma H

Retrospective observation of post menopausal osteopenia without medicine.

学会名 The XXth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics and Gynaecology 2007 . 9.21-25

発表者名 田中幹二 , 松倉大輔 , 谷口綾亮 , 山本善光 , 樋口毅 , 尾崎浩士 , 水沼英樹

発表テーマ プロテオグリカンを用いた切迫早産新規治療薬開発のための基礎的研究

学会名 第59回日本産科婦人科学会

発表日 2007 .4.14-17

発表者名 谷口綾亮 , 樋口毅 , 松倉大輔 , 田中幹二 , 水沼英樹

発表テーマ 卵巣摘出ラットにおける骨の脆弱化と骨細胞外マトリックスの関連について

学会名 第59回日本産科婦人科学会  
2007.4.14-17

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 毅 (HIGUCHI TSUYOSHI)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 60238285

(2) 研究分担者

谷口綾亮 (TANIGUCHI RYOUSUKE)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 00455750

水沼英樹 (MIZUNUMA HIDEKI)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 10125875

(4) 連携研究者

( )

研究者番号: