

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 21日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591962

研究課題名（和文） 原発性骨粗鬆症に対する骨密度・骨質同時評価によるテーラーメイド治療の確立

研究課題名（英文） Importance of tailor-made treatment for primary osteoporosis: Evaluation based on measurements of bone density and bone quality.

研究代表者 齋藤充 (SAITO MITSURU)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50301528

研究成果の概要（和文）：家兔高ホモシステイン血症モデル（ヒト型骨質劣化モデル）を作製し、各種薬剤投与と骨質マーカー測定を施行した結果、我々が報告したヒト骨質劣化型骨粗鬆症と同様にホモシステインがコラーゲンの架橋異常を惹起し、骨密度とは独立した機序で骨脆弱化をもたらすことが明らかになった。従って、骨質低下型の骨粗鬆症に対してはエストロゲン受容体モジュレーターの効果により優れていることから、症例に応じた使い分けが必要と考える。

研究成果の概要（英文）：

Biochemical markers of bone quality following administration of different pharmacological agents were measured in a rabbit hyperhomocysteinemia model (an experimental model of reduced human bone quality) developed in our laboratory. The results clearly indicated, similarly to our previously reported findings on human reduced-bone-quality-type osteoporosis that by incurring direct detrimental changes on collagen cross-links homocysteine reduces bone strength; this mechanism is independent of reduction in bone density.

Additionally, based on findings that estrogen receptor modulators are more effective in patients with reduced-bone-quality-type osteoporosis, we suggest subdividing patients accordingly with the type of osteoporosis upon diagnosis and treatment of the disease.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
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・整形外科学

キーワード：原発性骨粗鬆症、骨質、骨密度、動物モデル、テーラーメイド治療

1. 研究開始当初の背景

現在、日常診療の場において骨密度測定が

骨折リスクの評価に広く用いられているが、骨密度が高いにもかかわらず骨折をきたす症例があることや、骨粗鬆症治療薬の骨折リ

スクの低下に対する骨密度増加の寄与度は低い(4-30%)といった臨床的事実から、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。こうした背景により2000年のNIH consensus statementでは「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。さらに、「骨質劣化型」症例では、骨粗鬆症治療薬により骨密度を高めても新規骨折を生じるリスクが「低骨密度型」の症例に比べて1.6倍高いことを報告した。こうした事実は「骨質劣化型」症例に対しては、骨密度のみならず骨質を改善することが必要となることを示している。

2. 研究の目的

従来、骨粗鬆症治療の目標は骨密度を高めることに重きが置かれてきたため、骨密度の増加効果の強いビスフォスフォネート製剤が広く用いられてきた。しかし、骨脆弱化に至る機序は、低骨密度のみならず骨質の低下も関与していることから、その治療にあたっては骨密度と骨質を同時に評価し、個々の病態に応じたテーラーメイド治療を行う必要がある。しかし、既存の骨粗鬆症治療薬が骨質因子である骨コラーゲンに及ぼす影響は明らかにされていない。さらに、ヒト骨粗鬆症において明らかとなった骨質低下をもつ動物モデルが存在しないため、骨質改善に関する研究が立ち後れていた。

そこで、本研究の目的は、我々はヒトに近い骨代謝動態(リモデリング骨)を示す家兔のヒト型骨質劣化モデルを作製して、テーラーメイド治療の確立(薬剤の使い分け)を行うことにある。

3. 研究の方法

骨質は骨の骨単位毎の石灰化の程度や、コラーゲンの老化度により規定されている。我々は世界に先がけ、この両者の相互関係を明らかにする新たな分析手法を開発した。

ヒト骨は若い骨単位(低石灰化度)と古い骨単位(高石灰化度)が混在している。そこでこれらの領域における固有の架橋パターンを解析するため、骨は密度勾配分画法を用いて新旧骨単位を分画した。得られた骨分画

について、すでに我々が確立している高速液体クロマトグラフィー法で善玉の生理的架橋(未熟型,成熟型)の形成量と、そのパターンを規定するコラーゲンのリジン水酸化率を解析し、さらに悪玉である老化架橋ペントシジン(Advanced glycation end products: AGEs)も分離定量した。これらの架橋パラメータをもとにして、コラーゲンの成熟指数(成熟架橋/未熟架橋)と老化脆弱指数(老化架橋/生理的架橋)を定義し評価に加える手法を用いる。

家兔モデル

雌性ニュージーランド白色家兔(生後20週:成熟期)に持続的な高ホモシステイン血症を誘導する目的で1%メチオニン負荷を行う。メチオニン負荷により動脈硬化が誘導されることから生活習慣病としての骨粗鬆症と動脈硬化を合併するモデルである。また、同時に卵巣摘出(OVX)を行うと骨石灰化度が低下するため「低骨密度+骨質劣化型」のモデルを作出することが可能である。

具体的には以下のような4群(各群10匹)を設定する。

- 1) Sham手術群
- 2) 低骨密度型モデル: OVXのみ群
- 3) 骨質低下型モデル: メチオニン負荷群:
1%メチオニン食100g/日を連日混餌投与
- 4) 低骨密度+骨質低下型モデル:

OVX+メチオニン負荷

1)~4)群に対して、各々以下の薬剤を6ヵ月間投与する。

骨粗鬆症治療薬(臨床使用量と同等量)

- ・ビスフォスフォネート(alendronate):
0.2mg/kg/day 経口投与
- ・塩酸ラロキシフェン(raloxifene):
2mg/kg/day 経口投与

ホモシステイン代謝改善薬

- ・ビタミンB12+葉酸:
mecobalamine 0.63mg/kg/day,
folate 40mg/kg/day
- ・(塩酸ラロキシフェンも同様の効果を期待)

抗悪玉架橋(抗AGEs作用)薬

- ・ビタミンB6(pyridoxal 5-phosphate):
1.5mg/ml 100mg/day 経口投与
- ・スタチン(atorvastatin):
1.5mg/kg/day 経口投与

解析項目

血液生化学: 投与後、4,6ヵ月後の屠殺前に12時間絶食として全血採血を行い以下の項目について測定を行った。

・ホモシステイン, ビタミンB6, ビタミンB12, 葉酸, コレステロール, 中性脂肪, 低比重リポ蛋

白(LDL),酸化 LDL,高感度 CRP

- ・骨質マーカー：血中ペントシジン
- ・骨代謝マーカー：ピリジノリン,デオキシピリジノリン,I型コラーゲン N末端架橋テロペプチド(NTX),骨型アルカリフォスファターゼ

尿生化学：代謝ゲージを用いて 24 時間尿を採取し、骨代謝マーカーとペントシジンを解析し血中における値との相関をみた。

大動脈の善玉・悪玉架橋の生化学的・病理組織学的解析：高ホモシステインの持続により動脈硬化がおおると報告されている。さらに OVX による女性ホルモンの不足により動脈硬化は進行すると考えられる。そこで屠殺時に採取した大動脈にヘマトキシリン・エオジン染色を施し動脈硬化および石灰化について組織学的に解析すると共に、市販されている抗 AGEs 抗体、抗ペントシジン抗体を用いて血管における悪玉架橋の形成を観察した。同時に、血管基質における善玉架橋、悪玉架橋の定量的評価を行い、ここで得られたデータは以下に示す骨コラーゲン架橋と相関があるのか検証した。

骨分析

- ・骨密度測定：pQCT 法により大腿骨、腰椎の骨密度を皮質骨と海綿骨に分けて測定。
- ・骨強度試験：大腿骨 3 点曲げ試験、腰椎椎体圧縮試験から得られた最大点荷重、スティッフネス、吸収エネルギーを基にして骨サイズで補正した材質強度である靱性、弾性率を算出した。

骨コラーゲン・石灰化度分析

大腿骨、腰椎の皮質骨、海綿骨を屠殺時に採取する。

骨は若い骨単位（低石灰化度）と古い骨単位（高石灰化度）が混在している。そこでこれらの領域における固有のコラーゲン代謝を解析するため、骨は密度勾配分画法を用いて石灰化度別に分画した。さらに得られた各分画について、高速液体クロマトグラフィー法を用いて善玉架橋である生理的架橋（未熟型のリジノノルロイシン架橋、成熟型のピリジニウム架橋）の形成量と、そのパターンを規定するコラーゲンのリジン水酸化率を解析し、悪玉架橋であるペントシジン（老化架橋：Advanced glycation end products）も分離定量した。さらに、これらの架橋パラメータをもとにして、我々が新たに定義したコラーゲンの成熟指数と老化指数を評価に加えた。

骨質マーカーとしての尿中・血中ペントシジン動態の検証

骨質マーカーとして尿中および血中のペ

ントシジン値が骨コラーゲンのペントシジンの異常をどの程度反映するのか明らかにした。すなわち、骨のコラーゲン架橋分析のみならず、コラーゲンを含むその他の結合組織（大動脈、皮膚、アキレス腱、関節軟骨、椎間板）における善玉架橋およびペントシジンの定量を行った。

4. 研究成果

(1) 研究成果

解析の結果、メチオニン(Met)投与群では、血中ホモシステイン濃度は著しい高値を呈した。大腿骨の骨密度および骨強度試験の結果、Met 負荷群、OVX 群、共に骨密度の低下や骨吸収の亢進を伴わない骨強度の低下をきたしており、骨質の低下がもたらされたと考えられた。同モデルの骨コラーゲン分析を行ったところ、高ホモシステイン血症を誘導した群では、我々が報告したヒト骨質劣化型骨粗鬆症と同様の架橋異常、すなわち、善玉架橋の低形成と、悪玉 AGEs 架橋ペントシジンの過形成が誘導された。一方、OVX 単独群では善玉架橋の低形成のみが誘導された。このことから、同モデルは骨質低下モデルとして確立したことが明らかになった。

次に、OVX 群と OVX+1%Met 混餌投与群に、エストロゲン受容体モジュレーターモジュレーター(SERM)を 4 カ月間投与した結果、骨密度、骨代謝マーカーに明らかな変化は認められなかったが、血中ホモシステイン濃度は SERM 投与により約 40%減少した。またコラーゲン架橋分析を行ったところ、SERM 投与により、OVX 単独群、OVX+Met 群共に、善玉架橋の有意な増加と悪玉 AGEs 架橋の減少が認められた(図 1)。さらに架橋パラメータと骨強度との相関を解析したところ、SERM によるコラーゲン架橋の変化が骨密度とは独立した機序で骨強度を高めることが明らかとなった。

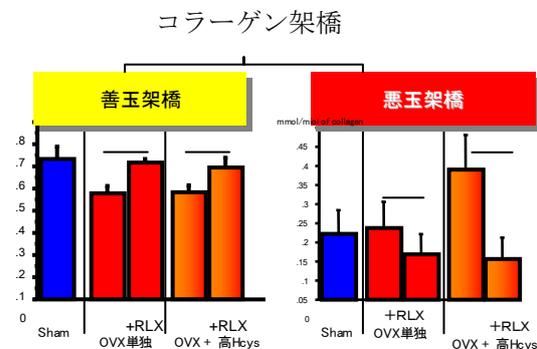


図 1. 卵巣摘出家兔を用いた骨質低下モデルの確立とラロキシフェンの骨質改善効果

以上の結果から、SERM はホモシステイン代謝を改善し、コラーゲンの架橋形成を適正に制御することで、骨強度を改善すると考えられる。興味深いことに、SERM 投与は血中ホモシステイン濃度が健常範囲内の OVX 単独群に対しても善玉架橋の総数を増加させたことから、ホモシステイン代謝の改善のみならず、これとは異なる機序により架橋形成を制御している可能性がある。

(2) 国内外における位置づけ・今後の展望

これまで骨密度と骨質を同時に評価することや、コラーゲンの架橋異常を改善する骨質治療といった概念は、国内外を通じて我々以外にない。我々は、世界で初めて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ホモシステイン代謝からみた骨粗鬆症に対するテーラーメイド治療の確立を目指している。

今回の検討から、SERM は骨質マーカーである血中ホモシステイン或いは尿中・血中ペントシジン高値群や、閉経後骨粗鬆症例で、著しい骨密度の低下を伴わない症例に対して骨質改善薬として良い適応があると考えられる。

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 20 件)

- ①Saito M, Marumo K, et al. Effects of alfacalcidol on mechanical properties and collagen cross-links of the femoral diaphysis in glucocorticoid-treated rats. *Calcified Tissue International*, 査読有, 88, 2011, 314-324.
- ②Saito M, Marumo K, et al. Changes in the contents of enzymatic immature, mature, and non-enzymatic senescent cross-links of collagen after once-weekly treatment with human parathyroid hormone(1-34) for 18 months contribute to improvement of bone strength in ovariectomized monkeys. *Osteoporosis International*, 査読有, 22, 2011, 2373-2383.
- ③Mitome J, Yamamoto H, Saito M, et al. Non-enzymatic crosslinking pentosidine increase in bone collagen and are associated with disorders of bone

mineralization in dialysis patients. *Calcified Tissue International*, 査読有, 88, 2011, 521-529.

- ④Tanaka S, Kuroda T, Saito M, et al. Urinary pentosidine improves risk classification using fracture risk assessment tools for postmenopausal women. *J Bone Miner Res*, 査読有, 26, 2011, 2778-84.
- ⑤Shiraki M, Kuroda T, Saito M, et al. Urinary pentosidine and plasma homocysteine levels at baseline predict future fractures in osteoporosis under bisphosphonate treatment. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 査読有, 29, 2011, 62-70.
- ⑥斎藤充, 丸毛啓史. 骨粗鬆症治療のテーラーメイド化と薬剤選択-骨強度の規定因子の多様性における骨密度と骨質の関与-. *THE BONE*, 査読有, 25, 2011, 25-32.
- ⑦Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporosis International (REVIEW)*, 査読有, 21, 2010, 195-214.
- ⑧Saito M, Marumo K, Soshi S, et al. Raloxifene ameliorates detrimental enzymatic and nonenzymatic collagen cross-links and bone strength in rabbits with hyperhomocysteinemia. *Osteoporosis International*, 査読有, 21, 2010, 655-666.
- ⑨Saito M, Shiraishi A, Ito M, et al. Comparison of effects of alfacalcidol and alendronate on mechanical properties and bone collagen cross-links of callus in the fracture repair rat model. *Bone*, 査読有, 46, 2010, 1170-1179.
- ⑩Shiraki M, Yamazaki Y, Saito M, et al. High level of serum undercarboxylated osteocalcin in patients with incident fractures during bisphosphonate treatment. *J Bone Miner Metab*, 査読有, 28, 2010, 578-584.

[学会発表] (計 27 件)

- ①斎藤充. 骨の材質劣化の原因と薬剤による改善作用 第 13 回日本骨粗鬆症学会, 2011.11.3, 神戸
- ②斎藤充, 丸毛啓史. (シンポジウム)骨粗鬆症:骨質の視点からの薬剤の適応と選択

第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会
2011.10.20, 前橋

③齋藤充

ヒト組織分析をもとにした骨脆弱化動物モデルの確立と薬効評価の pitfall -齧歯類・家兔・イヌ・サルでの検討-

第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会
2011.10.20, 前橋

④齋藤充

変形性関節症と骨粗鬆症の接点-病態からみたビスフォスフォネートおよび SERM の可能性-

第 38 回日本股関節学会, 2011.10.7, 鹿児島

⑤齋藤充

骨密度・骨質マーカー同時評価に基づく治療薬の使い分け-PTH 製剤の骨量・骨質改善効果

第 29 回日本骨代謝学会, 2011.7.29, 大阪.

⑥齋藤充

骨質因子の制御機構 -コラーゲンの架橋形成はリモデリングのみに規定されない

第 31 回日本骨形態計測学会, 2011.5.21, 岐阜

⑦齋藤充, 丸毛啓史.

(シンポジウム)骨質劣化型骨折の予防と治療: 骨質マーカーの可能性について

第 84 回日本整形外科学会学術総会,
2011.5.13, 横浜.

⑧齋藤充, 丸毛啓史 他.

尿中コラーゲン老化マーカー(ペントシジン)および血中ホモシステイン高値は変形性膝関節症の独立した危険因子である

第 84 回日本整形外科学会学術総会

2011.5.13, 横浜.

⑨齋藤充

テララーメド治療のエビデンス -骨質劣化型骨粗鬆症に対する新規 SERMs の可能性-

第 84 回日本整形外科学会学術総会

2011.5.13, 横浜.

⑩齋藤充

なぜ高い骨密度で骨折するのか?-ステロイド・AGEs・酸化ストレスによる骨質劣化の基礎からテララーメド治療まで-

第 84 回日本内分泌学会学術総会,

2011.4.22, 神戸.

[図書] (計 6 件)

①齋藤充

東京: メディカルレビュー社

酸化ストレスと糖尿病合併症: 骨粗鬆症

2011: 135-145.

②齋藤充

東京: メディカルレビュー社

相互に関連? 3 大疾患: 骨代謝における AEG の蓄積

2011: 177-186.

③齋藤充

東京: 医薬ジャーナル

マネジメントシリーズ. 材質特性と骨質

2010: 34-39.

④齋藤充

東京: シーエムシー出版

糖化による疾患と抗糖化食品・素材. 加齢に伴う骨への AGEs の蓄積と骨折リスク,

2010:56-65.

⑤齋藤充

東京: 医薬ジャーナル

骨代謝マーカー改訂版. 各種マーカーとその特徴, 2010:72-78.

⑥齋藤充

東京: 日本メディカルセンター

CKD-MBD 病態解明のトピックス - 骨質は何で決まるか-, 2009, 239-245.

[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・准教授

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