

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462384

研究課題名(和文) 新たな骨粗鬆症モデルの確立-肥満に合併する骨脆弱化の機序の解明-

研究課題名(英文) Bone weakness in obesity:Explanation of the pathomechanism based on a newly established model of osteoporosis

研究代表者

木田 吉城 (KIDA, YOSHIKUNI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90328310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに近い骨代謝動態(リモデリング骨)を示す家兔に、脂肪肝およびNASHを誘発する条件の高脂肪食を負荷し、肥満を伴うヒト骨質劣化型骨粗鬆症の病態を反映するモデルを作製した結果、本条件で家兔にNASHが誘発できること、また動脈にはアテローム型の動脈硬化も併発することや、さらに骨密度の低下と材質特性を規定するコラーゲンの劣化により骨強度が低下することが示された。

研究成果の概要(英文)：We established a new rabbit model of osteoporosis, which closely resembles obesity-induced reduced bone quality-type osteoporosis in humans. Domestic rabbits showing similar bone metabolism characteristics (bone remodeling) to humans were used and the osteoporotic changes were induced by feeding the animals with high fat-containing diet under conditions similar to those used for induction of liver cirrhosis or NASH. In the established model, NASH was successfully induced as well as atherosclerosis with atheromatous plaque formation. Additionally, we demonstrated obesity-induced reduction of bone strength due to decreased bone density and degradation of collagen, a tissue-specific component determining bone quality.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨粗鬆症 非アルコール性脂肪性肝炎 骨脆弱化 コラーゲン 終末糖化産物 ペントシジン 骨質  
動物モデル

## 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する症例があることや、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(JAMA 285: 786-795, 2001)。

既に我々は、動脈硬化因子のホモシステインの高値や、糖尿病罹患が、酸化ストレスを高めて骨コラーゲンの架橋異常を惹起し、骨密度非依存性に骨折リスクを高めることを、動物モデルやヒト骨生検の検討、およびコホート研究から明らかにしてきた(Saito M, Osteoporos Int, Review, 2010)。さらに最近、壮年期以降の肥満が骨密度とは独立した骨折リスクになることを、1614人の長野コホートから明らかにした(Tanaka S, Saito M, Osteoporos Int, in press)。これまで「痩せ」は骨密度の低下をまねき、骨折リスクを高めることはコンセンサスが得られている。しかし、肥満が骨密度とは関係なく骨強度を低下させる機序は明らかにされていない。近年、壮年期以降の肥満人口は著しく増加している。これを反映するように脂肪肝や、その亜系である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の罹患率が増加している。これらの疾患の病態に酸化ストレスの増大が指摘されていることから、肥満にともなう脂肪肝やNASHの存在が、骨密度以外の骨強度因子である骨コラーゲンの量的・質的な異常をもたらす、骨強度を低下させ、骨折リスクを高めている可能性がある。しかし、これまでに肥満と、脂肪肝、NASHを合併した「骨質低下動物

モデル」は、確立されていない。このため肥満を伴う骨質劣化型骨粗鬆症に対する病態は不明であり、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

近年、壮年期以降の肥満人口は著しく増加している。これを反映するように脂肪肝や、その亜系である非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)の罹患率が増加している。これらの疾患の病態に酸化ストレスの増大が指摘されていることから、肥満にともなう脂肪肝やNASHの存在が、骨密度以外の骨強度因子である骨コラーゲンの量的・質的な異常をもたらす、骨強度を低下させ、骨折リスクを高めている可能性がある。

そこで、本研究の目的は、ヒトに近い骨代謝動態(リモデリング骨)を示す家兎に、脂肪肝およびNASHを誘発する条件の高脂肪食を負荷し、肥満を伴うヒト骨質劣化型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・肥満関連からみた骨質治療」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

**家兎 NASH モデル:** Ogawa らの方法に準じた(Ogawa T, Am J Pathol 2010)。20週齢のニュージーランド白色家兎30頭を用い、10頭はベースラインとして投与前に標本を採取した。残り20頭に対して正常食群と0.75%コレステロール/12%コーンオイル含、有飼料群に分け、自由摂取させ、脂肪肝・NASH(非アルコール性脂肪性肝炎)を誘発させた。被験物質投与前のベースライン群、投与20週目の給餌群は、血液、肝臓、大動脈、腰椎および大腿骨を採取した。

また、家兎は骨密度の低下が起こりにくい

ことから、これまで骨粗鬆症モデルとして不適とされていた。しかし、我々のコホート研究から、肥満によりもたらされる骨折リスクの増大は、骨密度の低下は必ずしも伴わないことから、肥満を特徴とする本家兎モデルは、コホート研究から明らかとなった病型、病態を解明するには適正なモデルと考えられる。

#### (1)血液生化学検査

骨代謝マーカー：インタクト型プロコラーゲン-N-プロペプチド(Intact PINP), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTx)

骨マトリックスマーカー：ペントシジン, ホモシステイン, スクレロスチン

#### (2)肝臓および大動脈

摘出した肝臓はHE染色に加え, Oil redによる脂肪染色を行い, 大動脈はHE染色でアテローム変化の有無を確認した。

#### (3)腰椎および大腿骨

Quantitative computed tomography(QCT)を用いて骨密度測定と圧縮試験, 3点曲げ試験による骨強度測定を行った後に, 骨コラーゲンへの終末糖化産物(Advanced glycation end products, AGEs)を測定し, 単位コラーゲン量当たりで算出した。3群間の有意差検定はANOVA法で行い,  $p < 0.05$ を有意差ありとした。

### 4. 研究成果

#### (1)研究成果

脂肪負荷群(以下, NASH群)では, 肝臓に脂肪沈着, 炎症細胞浸潤, 線維化がみられた。また, 大動脈にはアテローム型の動脈硬化が生じており, NASHに伴うものと考えられた。血中PINPおよびNTx値は, 対照群とNASH群との間に差は認めなかった。骨マトリックスマーカーであるホモシステインは両群間に差を認めなかったが, ペントシジンおよびスク

レロスチンはNASH群で有意に高値であった。大腿骨骨幹部および腰椎の骨密度は, 対照群に比べてNASH群で有意に低値であった。さらにNASH群における骨コラーゲンの総AGEs量は, 大腿骨骨幹部, 腰椎皮質部および海綿骨部ともに, 対照群に比べて有意に高値であった。大腿骨および腰椎の骨強度試験の結果, NASH群は対照群に比べて, 有意に低下していた。特に大腿骨では, 材質強度の指標となる靱性も有意に低下していた。

これらのことから, 本条件で家兎にNASHが誘発できること, さらには動脈にはアテローム型の動脈硬化も併発することや, 骨密度の低下と材質特性を規定するコラーゲンの劣化により骨強度が低下することが示された。また, NASH群では, 臨床研究でも報告されているように血中ホモシステインは高値とならないことから, 他の要因による酸化ストレスの増大が骨コラーゲンからみた骨質を劣化させると考える。また, 骨形成抑制にかかわるスクレロスチンの血中濃度がNASH群では高値であったことから, 酸化ストレスのみならずスクレロスチンが骨コラーゲン産生細胞に何らかの悪影響を及ぼしている可能性があると言える。さらにNASH群では, 血中ペントシジンが高値であったことから, NASHにおける骨コラーゲンの劣化を反映するマーカーとしてペントシジンは有用である可能性がある。

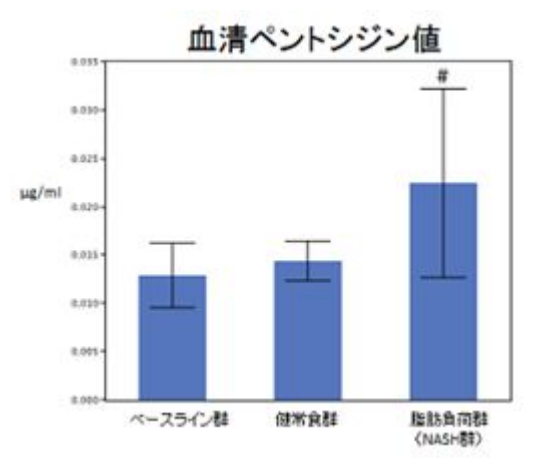


図1. 血清ペントシジン値  
(#  $p < 0.05$ , vs. 健常食群)

## (2)国内外における位置づけ・今後の展望

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でき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、生活習慣病による酸化ストレスや糖化ストレスの増大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。我々は、アジア人初となる骨粗鬆症トップジャーナルである Osteoporosis International に invited review を掲載し、過去3年間で最も引用された論文として受賞を受けている。この分野において基礎的、臨床的エビデンスの発信では世界をリードしている。我々の概念は、国内外のコホート研究 (WHI, ABC, OFFELY) で相次いで追試がなされ、その妥当性が追認されている。さらに、骨質劣化型骨粗鬆症例では、骨密度を薬剤によって高めても新規の骨折リスクが低減できないことを、長野コホートの縦断研究から明らかにした。こうした事実は骨質劣化型には骨質改善効果のある薬剤を使用するテラメイド治療という概念を提唱している。

## 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 1 件)

Saito M, Marumo K, Kida Y, et al.  
Effects of 18-month treatment with bazedoxifene on enzymatic immature and mature cross-links and non-enzymatic advanced glycation end products, mineralization, and trabecular microarchitecture of vertebra in ovariectomized monkeys.  
Bone, 査読有, 2015; 81: 573-580.

齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史.  
実地医家のための抗加齢医学の臨床 - 骨粗鬆症とアンチエイジング -  
Medical Practice, 査読有, 2014; 31: 1117-1122.

〔学会発表〕(計 1 件)

齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史.  
生活習慣病と運動器疾患 (特に骨と生活習慣病)  
第44回日本総合健診医学会総会  
2016.1.29, 東京

〔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

木田 吉城 (KIDA YOSHIKUNI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 90328310

### (2)研究分担者

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