

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02885

研究課題名(和文) 骨質劣化による骨折に対する新たな予防法の開発

研究課題名(英文) Establishment of a new approach to prevent fracture caused by loss of bone quality

研究代表者

矢野 友啓 (YANO, TOMOHIRO)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：50239828

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,600,000円

研究成果の概要(和文)：メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)の遺伝子多型が原因で血中濃度が上昇するホモシステイン(HCY)が引き起こす骨質劣化による骨折予防の新たな方法を構築するために、小規模ヒト介入試験でHCYレベルの上昇を防ぐ有効なビタミン類を特定すると同時に、骨芽細胞培養系を用いて、HCYにより引き起こされる骨質劣化による骨折を予防できる新たな食品機能性素材のスクリーニングを行った。その結果、ビタミンB2とビタミンEの組み合わせがHCYレベルの上昇抑制に有効であること、また、delta-トコトリエノールとヒドロキシチロソールがHCYにより引き起こされる骨質劣化予防成分として特定された。

研究成果の概要(英文)：In order to prevent deterioration of bone quality caused by the increase of blood level in homocysteine (HCY) based on genetic polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), we tried to pick up new vitamins which was effective for suppression of the HCY level in clinical trials with small scale. As well, we screened new functional food components which could prevent bone fracture caused by HCY-induced deterioration of bone quality. As a result, it was identified that combination of vitamin B2 and vitamin E might be effective to suppress the rise in blood level of HCY and that delta-tocotrienol and hydroxytyrosol could act as promising functional food ingredients for prevention of the HCY-induced deterioration of bone quality.

研究分野：分子病態栄養学

キーワード：骨質劣化 骨折 MTHFR遺伝子多型 リジルオキシダーゼ ホモシステイン ペントシジン 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた日本において、解決すべき重要課題として健康寿命と平均寿命の差（現在はおよそ10年程度の差が存在）を短縮して、医療費を極力削減し、如何に健全な社会を築くかが大切である。特に女性の方は健康寿命と平均寿命の差が男性に比べて大きく、女性の健康寿命を延伸することが特に重要視される。女性特有の健康寿命を損なう主な要因として、閉経後の骨の劣化（老化）に伴う骨粗鬆症による骨折が挙げられる。特に、大腿骨骨折となった高齢者の約2割は寝たきりの状態となり、骨折を契機に健康寿命が損なわれる事例は少なくない。この骨折リスクの増大は、低骨密度・低骨量だけでは説明できず、それ以外の骨強度を規定する因子として、骨質（骨のしなやかさ）の劣化が指摘されている。しかし、現在骨粗鬆症の診断に使われているDXAによる骨量の低下評価では、骨質の劣化は診断できず、高齢者における原因不明の骨折の主要因とされている。この骨粗鬆症の骨質の劣化には、コラーゲンの分子間架橋の異常が関与していることが報告され、架橋異常の原因としては、動脈硬化等のリスク因子である血中の高ホモシステインレベル、その代謝に関するビタミンB6、葉酸代謝の中心酵素であるメチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素(MTHFR)の遺伝子多型、これらに起因する酸化ストレスの増大等が関与していることが明らかにされた。そして、これらの骨質の劣化の要因を改善するいくつかのアプローチが行われてきたが、現状では骨質の劣化を改善する効果的な方法は構築されていない。従って、この骨折を予防する新たな有効な方法を構築することは女性の健康寿命を延伸する見地からも、解決すべき緊急の課題である。

2. 研究の目的

骨質劣化に伴う骨折予防のための1つの新

たなアプローチとして、骨質劣化に伴う骨折のハイリスクグループであるMTHFRの遺伝子多型保持者に対して、安全性が確認されている最大用量のビタミンB2およびビタミンEサプリメントの併用投与により、骨折のリスクを低下できるか、女子長距離選手のMTHFRの遺伝子多型保持者を対象に介入試験で検証する。

MTHFR 遺伝子多型の有無に関係なく高ホモシステイン血症の患者も骨質劣化に伴う骨折のハイリスクグループに分類される。しかし、現状ではこれらの患者に対する有効な骨折予防法は構築されていない。そこで、以下のアプローチで新たな骨折予防法の構築を目指す。骨質劣化につながるコラーゲンの架橋異常は、主に骨芽細胞において、コラーゲンの生理的架橋を形成する律速酵素であるリジロキシダーゼ(LOX)の発現抑制により起きることが報告されている。したがって、ホモシステイン(HCY)によるLOXの発現抑制機構を明らかにし、そのLOXの発現を回復・維持する食素材を特定し、臨床応用できれば、高ホモシステイン血症が原因で起きる骨質劣化による骨折リスクを低下できる。そこで本研究では、MTHFR 遺伝子多型に無関係に骨質劣化が引き起こされる症例の予防を念頭において、HCYによるLOXの発現抑制機構を明らかにし、そのLOXの発現を回復・維持する新規食素材について、骨芽細胞培養系を用いてスクリーニングする。

3. 研究の方法

1) ヒト介入試験の予備的検討

本研究(東洋大学における人を対象とする医学系研究に関する倫理委員会の承認済み)に同意いただいた女子長距離選手10数名を対象にした介入研究を行う。各自の口腔粘膜よりDNAを抽出し、MTHFRの遺伝子多型を含む領域を増幅させ、HinfIを使用したPCR-RFLPを行い、遺伝子多型(C677T)の有無、多型が

ある場合にはその型（ホモ型かヘテロ型）を特定した。その上で、遺伝子多型が確認されたサンプルについては、DNA 配列を検討し、MTHFR 遺伝子多型を確認した。MTHFR 遺伝子多型別の血中の各ビタミン類を HPLC 等で測定すると同時に、DHQ による各ビタミン類の摂取状況と血液中の各ビタミン類レベルの相関を検討し、これらのデータを総合的に解析し、介入に使用するビタミン類、摂取量や介入期間等を決定した。また、MTHFR 遺伝子多型が骨質劣化による骨折の主要因子であるかを過去の骨折歴、骨質劣化の指標である血中ペントシジンおよび HCY レベル等を用いた主成分分析を行い、その骨折への寄与度を検討した。さらに、酸化ストレスマーカーである血中及び尿中 8-OHdG 測定法の条件を検討した。

2) ヒト介入試験

1) の予備的検討で摂取量と正の相関が認められたビタミン B2 を 1 日あたり 42mg、3 か月間、各 MTHFR 遺伝子多型保有者に摂取してもらい、摂取前後での血中ビタミン B2 レベルと HCY レベルの変動を測定し、ビタミン B2 摂取の効果を判定した。さらに、HCY 上昇による酸化ストレスを軽減するために、ビタミン B2(1 日あたり 30mg)とビタミン E (1 日あたり 300mg)を 14 日間併用摂取し、摂取前後の血中各ビタミンと HCY レベルの変化を検討した。

3) 細胞レベルでの検討

ヒト骨肉腫由来である MG-63 細胞株を使用し、骨質劣化予防成分の候補として、ビタミン E 同族体 4 種類（ α -トコフェロールと γ -トコトリエノール）とオリーブポリフェノール（オレウロペイン、ヒドロキシチロソール、チロソール）を用いて実験を行った。また、骨質改善作用の作用機序を明らかにするために、この食品機能性成分を細胞に処理

し、LOX 発現や LOX 発現に関与する上流因子として、DNA トランスフェラーゼ (DNMT) の転写因子 Friend leukemia virus integration 1 (Flil1) と DNMTs の mRNA 発現への影響を RT real time PCR 法で検証した。

4. 研究成果

PCR-RFLP 法で MTHFR 遺伝子多型の野生型、ヘテロ型、ホモ型に分類し、血中の各パラメーターを定量し、骨折との関係を解析した。その結果、骨折歴と密接に関係している第一主成分因子として、MTHFR 遺伝子多型がピックアップされた。したがって、今回解析したグループにおいて、MTHFR 遺伝子多型に依存した骨質劣化に伴う骨折予防には、この遺伝子多型により血中レベルが上昇する HCY を低下させるサプリメント特定することが、骨折予防につながることを推測された。この結果に基づき、MTHFR 遺伝子多型に依存した HCY レベルに影響する各ビタミン類を検討したところ、野生型に比べてホモ型で、ビタミン B2 とビタミン B6 の血中レベルが顕著に減少していた。一方、DHQ を使ったこの 2 つのビタミン類の摂取量と血中レベルの相関を検証したところ、ビタミン B2 に正の相関が認められ、ビタミン B2 サプリメントの摂取が血中 HCY レベルの低下につながることを推測された。そこで、ヒト介入試験として、各 MTHFR 遺伝子多型別の被験者にビタミン B2(1 日あたり 42mg)を 3 か月間毎日摂取してもらい、摂取前後のビタミン B2 及び HCY レベルを検証したところ、ヘテロ型においてのみ、ビタミン B2 レベルの有為な上昇と HCY レベルの有為な低下が認められた、しかし、ホモ型においてはビタミン B2 摂取の影響は認められなかった。この結果を受けて、HCY レベルを低下させるために、酸化ストレスを軽減することが 1 つの有効な方法と考え、次にビタミン B2 (1 日あたり 30mg、14 日間)に加えて、代表的抗酸化ビタミンであるビタミン E

(1日あたり300mg、14日間)を同時摂取することによるHCYレベルへの影響を各遺伝子多型別に検証した。その結果、すべての遺伝子多型のグループにおいてHCYレベルの低下が認められた。しかしながら、ホモ型において、摂取後のHCYレベルは依然我々が報告した骨質劣化に伴う骨折リスクが高まるカットオフ値より高いレベルにあった。したがって、ビタミンB2とビタミンEの併用摂取はMTHFR遺伝子多型によるHCYレベル上昇による骨折のリスクを軽減するが、完全な効果を得るためには、正確な摂取量と摂取期間を決定する必要がある。

骨芽細胞培養系を用いた系(MTHFR遺伝子多型とは無関係)において、ビタミンE同族体ではトコフェロール処理群よりもトコトリエノール処理群においてLOX発現が有意に増加し、その中でもトコトリエノール処理群においてLOX発現は顕著に増加した。オリーブポリフェノール類では、ヒドロキシチロソールのみLOX発現が有意に増加した。この結果より、有意にLOX発現を増加させるトコトリエノールとヒドロキシチロソールを用いてLOX発現に対する作用機序の検討をおこなった。

2つの食品機能性成分におけるLOX発現の作用機序の確認として、Fli1とDNMT1, 3A, 3BのmRNA発現への影響を検証した。その結果、トコトリエノール処理群ではFli1発現とDNMT3A, 3BにおいてmRNA発現が有意に減少した。DNMT1においては、発現に変化がなかった。この結果から、DNMT3A, 3Bは新規のDNAメチル化を阻害することが報告されているため、Fli1の活性を抑制し、新規のDNAメチル化を阻害することによってLOX発現を増加させている可能性があることが示唆された。また、ヒドロキシチロソール処理においては、DNMT3BのmRNA発現を有意に減少させ、Fli1, DNMT1, DNMT3Aにおいても減少傾向を示した。DNMT1は、DNAの維持メチル化酵素

と言われているため、ヒドロキシチロソールには、Fli1の活性とそれ以外の別の未特定な転写因子群を抑制し、新規・維持両方のDNAメチル化を阻害してLOX mRNA発現を増加させている可能性が示唆された。したがって、2つの食品機能性成分の作用点が異なる可能性が考えられたので、最大限の効果を得るために、併用効果も含めてさらなる検証が必要である。

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)

1. 河野翔、矢野友啓、ヒト時計遺伝子(hCLOCK)によるホモシステインの日周期変動の制御、ビタミン、2016、90(11) 562-563. 査読有
https://doi.org/10.20632/vso.90.11_562

[学会発表](計13件)

1. 山田和佳奈、河野翔、石塚綾、太田昌子、矢野友啓、骨芽細胞培養系を用いたオリーブポリフェノールにおけるリジロオキシダーゼ mRNA レベルに及ぼす影響、第15回日本機能性食品医用学会 2017.12.9 東京
2. 石塚綾、河野翔、山田和佳奈、宮西伸光、矢野友啓、終末糖化産物のリジロオキシダーゼを標的とした骨質劣化作用に対するトコトリエノールの予防効果、第15回日本機能性食品医用学会 2017.12.9 東京
3. Minematsu A, Miyakoshi Y, Yano T, Ota M, Examination of risk factors related to stress fractures in female long-distance runners, 10th APCCN, 2017.11.28 Adelaide, Australia

4. Yamada W, Miyakoshi Y, Ota M, Yano T, Effects of olive polyphenol on prevention of deterioration of bone quality, 10th APCCN, 2017.11.28 Adelaide, Australia
5. Ishitsuka A, Ota M, Yano T, The effect of AGEs on bone-quality deterioration and possible prevention with tocotrienol, 10th APCCN, 2017.11.28 Adelaide, Australia
6. 石塚綾、河野翔、山田和佳奈、宮西伸光、太田昌子、矢野友啓、終末糖化産物の骨質劣化への影響とトコトリエノールによる予防効果、日本ビタミン学会第69回大会、2017.6.9 横浜
7. 石塚綾、河野翔、山田和佳奈、宮西伸光、太田昌子、矢野友啓、終末糖化産物の骨質劣化への影響とトコトリエノールによる予防効果、日本薬学会第137年会、2017.3.26 仙台
8. 山田和佳奈、河野翔、太田昌子、矢野友啓、ビタミンE同族体における骨質改善作用としての可能性の検証、第28回ビタミンE研究会、2017.1.20 東京
9. 河野翔、山田和佳奈、太田昌子、矢野友啓、骨芽細胞培養系を用いたアナトー由来トコトリエノールの骨質改善作用の検討、日本ビタミン学会第68回大会、2016.6.17 富山
10. 河野翔、山田和佳奈、太田昌子、矢野友啓、Tocotrienol-rich fractionの骨質劣化予防成分としての可能性の検討、第27回ビタミンE研究会、2016.1.8 香川
11. 河野翔、太田昌子、矢野友啓、骨質劣化予防におけるトコトリエノールの有効性の検討、第62回栄養改善学会、2015.9.25 福岡
12. 河野翔、松谷紀枝子、関根美季、太田昌子、矢野友啓、女子長距離陸上選手の骨質維持に対するリボフラビンの効果、日

本ビタミン学会第67回大会、2015.6.5 奈良

13. Kohno K, Ota M, Yano T, Investigating the possibility of tocotrienol-rich fraction in the maintenance of bone quality - preliminary study, 10th ACN, 2015.5.18 Yokohama

〔図書〕(計 1 件)

1. 河野翔、山田和佳奈、石塚綾、関根美季、太田昌子、矢野友啓、Tocotrienol-rich fractionの骨質劣化予防成分としての可能性の検討、ビタミン研究の進歩XVII、148頁(131-136頁)、2016.12 ビタミンE研究会

〔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

<https://nutritionscience.web.fc2.com/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢野 友啓 (YANO Tomohiro)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：50239828

(2)研究分担者

宮越 雄一 (MIYAKOSHI Yuichi)

東洋大学・食環境科学部・教授

研究者番号：00343533

(2)研究分担者

太田 昌子 (OTA Masako)

東洋大学・食環境科学部・准教授

研究者番号：40442058

(3)研究協力者

河野 翔 (KOHNO Kakeru)

峰松 明也子 (MINEMATSU Ayako)