

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590879

研究課題名(和文) レニン・アンジオテンシンを基盤とした糖尿病と骨代謝の相関関係の解析

研究課題名(英文) Cross link between diabetes mellitus and bone metabolism in the aspect of renin angiotensin system

研究代表者

志水 秀郎 (Shimizu, Hideo)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：50388378

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：10週齢のラットに卵巣摘出術を施し高フルクトース食を1ヶ月間与えて2型糖尿病モデルを作成し、糖尿の進展と骨代謝との相関関係を検証した。その結果、耐糖能異常を伴って骨代謝の亢進が確認され、レニン・アンジオテンシン系(RAS)の亢進と糖化最終産物(AGEs)の蓄積および3点曲げ試験において骨の脆弱性が確認された。これらの症状はアンジオテンシン受容体拮抗薬(ARB)で阻害・防止されることから、糖尿病の進展においてはRASが亢進してAGEsと骨の脆弱性を惹起しており、ARBは副次効果としてこれらの随伴病変の進展を防止しうる可能性が指摘された。

研究成果の概要(英文)：10 weeks-old rats were ovariectomised and fed with high-fructose diet for 1M to develop type 2 diabetes mellitus. These animals demonstrated high turnover in bone metabolisms, glucose- and insulin- tolerance accompanying activation of renin angiotensin system. They also revealed accumulation of advanced glycation-endo products with fragility of bone assessed by 3-point bending test. Angiotensin type 1 receptor blockers ameliorated these parameters with its beneficial pleiotropic effects.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般

キーワード：骨代謝 糖尿病 レニン アンジオテンシン 降圧薬

1. 研究開始当初の背景

古くより血圧の高い人ほど骨折の頻度が高いことが知られおり、収縮期血圧と尿中カルシウム排泄量が相関して多いことや、骨密度が逆相関して低いことが報告されている。血圧を調整しているレニン・アンジオテン系 (RAS) は骨代謝においても深く関わっており、RAS の産物であるアンジオテンシンは骨芽細胞を介して破骨細胞分化因子 (RANKL) の発現を亢進させて、骨粗鬆症を増悪させている。これらに共有する基盤背景について一連の研究を通じて発表してきた。この RAS を抑制するアンジオテンシ受容体拮抗薬 (ARB) はその多様性から糖尿病性網膜症、腎症などの改善効果が報告されているが、糖尿における骨代謝への関与は殆ど報告されていない。

2. 研究の目的

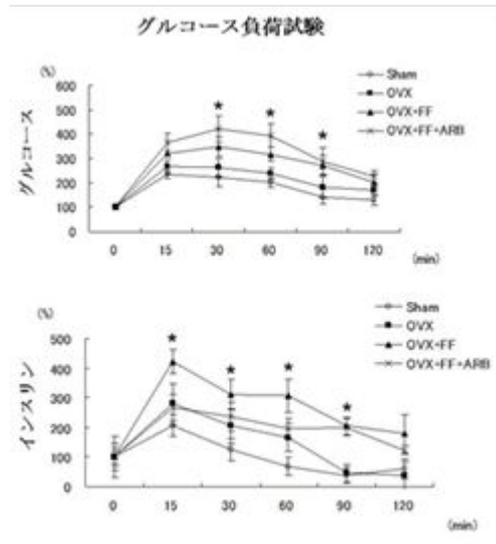
RAS が骨代謝、糖代謝に及ぼす影響について、型糖尿病発症動物モデルを作成して、その基盤背景を検証する。

3. 研究の方法

10週齢の雌ラット (対照群: Con or Sham 群) に卵巣摘出術 (Ovariectomy: OVX 群) を施すとともに、高フルクトース食 (F2HFrD: オリエンタル酵母) 負荷 (Fructose-feeding: FF 群) をかけて型糖尿病を発症させ、糖代謝、骨代謝のパラメータ評価を行う。また糖化最終産物 (Advanced glycation endproducts; AGSs) の蓄積を血清学的、病理組織学的に検索するとともに骨の脆弱性との相関関係を3点曲げ試験にて検証する。一方で骨吸収抑制作用を副次的に有する RAS 抑制系降圧薬のアンジオテン受容体拮抗薬 (Angiotensin Type 1 receptor blocker; ARB) の糖代謝に及ぼす効用について検索して、糖尿病と骨代謝に内在する共通基盤背景について検証する。

4. 研究成果

卵巣摘出術に1ヶ月間高フルクトース負荷 (FF 負荷) を行った動物実験モデル (Wistar rat) において、高回転型の骨代謝をとまない尿中 Ca 排泄量の増加、骨密度の減少を惹起してヒトの2型糖尿病に類似した病態を確認することが出来た。

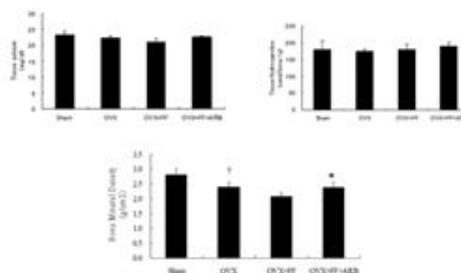


この系において血清 Ca、P は Con (Sham)、OVX、OVX+FF の3群間に有意差をみなかったが、尿中 Ca、DPD 排泄量の測定など骨吸収指標において、Cont<OVX<FFR の順に有意に上昇していた。また脛骨の病理組織において、ALP、TRAP 活性はともに Cont<OVX<FFR の順に上昇をみたが、上昇率において ALP<TRAP であったため、ALP/TRAP 石灰化係数は Cont>OVX>FFR の順に低下していた。この系において血漿レニン活性は OVX、FFR において同等に上昇していた。

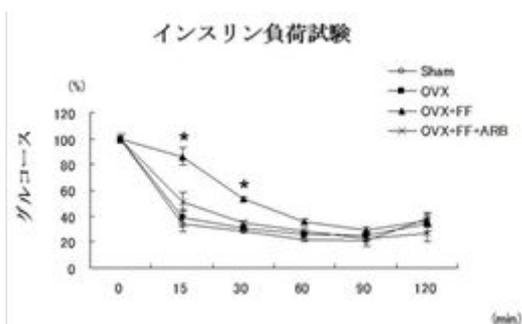
血清、尿中 骨代謝マーカー

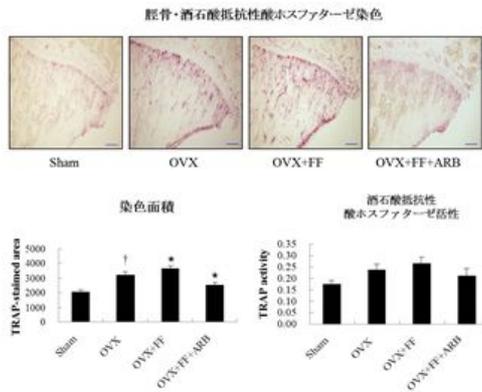
	血清 Ca	血清 P	尿中 Ca	尿中 P
Sham	10.1 ± 0.3	7.8 ± 1.0	1.4 ± 0.6	98.5 ± 16.8
OVX	10.2 ± 0.4	7.3 ± 0.8	1.8 ± 0.8*	80.5 ± 12.5*
OVX+FF	10.3 ± 0.2	7.2 ± 0.8	2.0 ± 0.1*	96.8 ± 13.8*
OVX+FF+ARB	10.4 ± 0.3	7.4 ± 0.5	1.7 ± 0.0	85.5 ± 11.5

脛骨近位端部における、Ca、ヒドロキシプロリン含有量ならびに DEXAによる骨密度

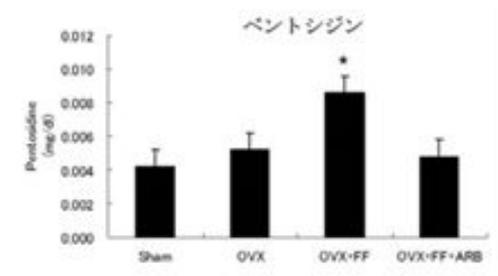
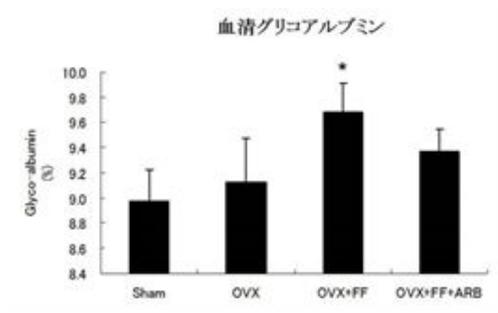


脛骨の病理組織標本においては、酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色 (TRAP 染色) において同様 (Cont<OVX<FFR) に有意な破骨細胞数の増加を認めた。





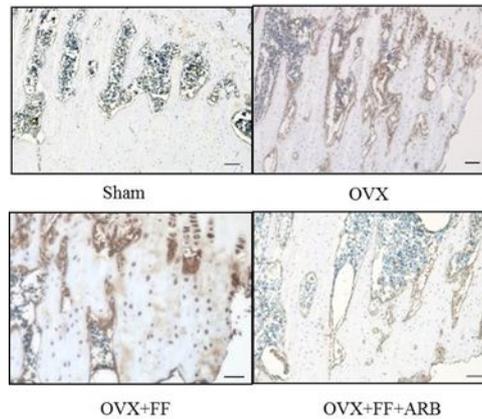
また、糖化指標として血清グリコアルブミン、血漿ペントシジン濃度において、Cont<OVX<FFRの上昇をみた。



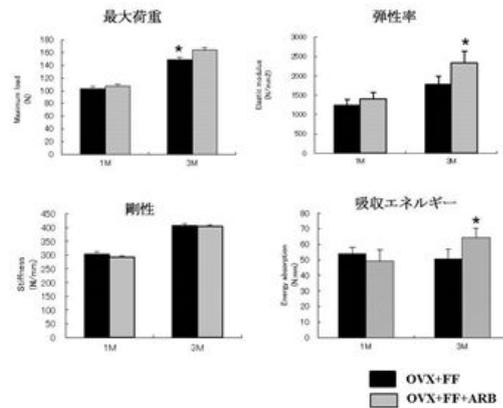
この系においてRASの亢進が確認されたのでARBを併用してRASの抑制を行ったところ、FFによって惹起された骨吸収の進展を抑制することが確認された。また、糖代謝においてもARBの併用によりFFによって惹起された耐糖能異常を改善するとともにAGEsであるペントシジンやグリコアルブミンの上昇を抑制することが確認された。

また脛骨の病理組織においては、免疫染色によりペントシジンの蓄積が確認されたがARBの併用により骨梁での減少が確認された。

ペントシジン免疫染色



これらの糖代謝と骨代謝の相関のメカニズムを解析するにあたり、骨の脆弱性を検証するために、骨を構成するコラーゲン架橋の糖化、酸化を3点曲げ試験による評価を行ったところ、1カ月後の測定値において、最大荷重(N)、硬性(stiffness; N/mm)、曲げ弾性(N/mm<sup>2</sup>) and 吸収エネルギー(N.mm)の各パラメータにおいて有意差は認められなかった。そこで糖化産物が骨の脆弱性に影響を与えるには相応の期間を要すると考えて現在3ヶ月モデルを作成して検証したところ、最大荷重、弾性率、吸収エネルギーの指標において有意な骨質の温存、改善が認められた。



以上のことから、高フルクトース食負荷により高回転型の骨代謝を惹起すると考えられ、尿中へのCa排泄増加にともなう骨量の減少が確認され、ヒトの糖尿病に類似したモデルであることが証明された。またこのような病態では、RASが活性化されて、破骨細胞の分化誘導が上昇していること、糖化、酸化の産物であるグリコヘモグロビンやペントシジンの産生亢進とペントシジンの骨組織への蓄積が確認された。これらの系においてARB併用におけるRASの抑制は、AGEsの産生を抑制すると共に骨質の温存と改善をもた

らせて骨梁の保存に効果があることが確認された。これらの結果から、高血圧を合併する糖尿病疾患においてはRASを抑制する投薬が降圧作用とは独立して糖尿に合併する骨代謝を温存、改善する可能性が示唆され、今後の臨床応用に向けた基盤を構築できたと考える。

#### 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2件)

1. Shimizu H, Nakagami H, Yasumasa N, Osako MK, Morishita R. Olmesartan Reduces Pentosidine Production and Ameliorates Fragility of Bone in Ovariectomized Fructose-Fed Rats. Immun Endoc and Metab Agents in Med Chem 2013, 13(2), 150-158.

2. Shimizu H, Nakagami H, Yasumasa N, Osako MK, Kyutoku M, Koriyama H, Nakagami F, Shimamura M, Rakugi H, Morishita R. Screening of Antihypertensive Drugs for Osteoclastic Acid Secretion and Bone Resorption by Acridine Orange. Immun Endoc and Metab Agents in Med Chem 2012, 12(3), 161-167.

DOI: 10.2174/187152212802001857

〔学会発表〕(計4件)

1. 志水秀郎、中神啓徳、森下竜一;血管石灰化と骨代謝の共通分子基盤としてのレニンアンジオテンシン系 第19回 アンジオテンシンカンファレンス 2014.02.01 豊中市 千里ライフサイエンスセンター
2. 志水秀郎、中神啓徳、森下竜一;糖代謝におけるレニン・アンジオテンシン系の役割. 脳心血管抗加齢研究会 2013. 2013.12.14 大阪市 梅田スカイビル
3. 志水秀郎、中神啓徳、尾崎和成、楠博、森下竜一;アクリジン・オレンジを用いた破骨細胞産生能評価による各種降圧剤のスクリーニング 第13回抗加齢医学会総会 2013.6.28 横浜市
4. 志水秀郎、中神啓徳、楽木宏実、森下隆一;降圧薬の多面的効果、骨代謝改善作用について アンチエイジングフェスタ 2012 2012.11.17 大阪市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等:

[http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/vme/research\\_06.html](http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/vme/research_06.html)

[http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/vme/research\\_03.html](http://www.cgt.med.osaka-u.ac.jp/vme/research_03.html)

#### 5. 研究組織：医学(系)研究科(研究院)

(1)研究代表者:志水秀郎(SHIMIZU HIDEO)  
大阪大学大学院・医学系研究科・臨床遺伝子治療・特任准教授  
研究者番号:50388378

(2)研究分担者:楽木宏実(RAKUGI HIROMI)  
大阪大学大学院・医学系研究科・老年腎臓内科・教授  
研究者番号:20252679

(3)連携研究者:なし