

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390393
 研究課題名 (和文) 骨細胞特異的蛋白の血中濃度測定による経済的かつ簡便な骨強度評価法の新規開発
 研究課題名 (英文) The development of noninvasive and economical method to evaluate the bone quality using the measurement of serum levels of osteocyte-specific-proteins.
 研究代表者 橋本 淳 (HASHIMOTO JUN)
 大阪大学・医学系研究科・准教授
 研究者番号：40237938

研究成果の概要 (和文)：

骨粗鬆症による椎体骨折の多重化と血漿中骨細胞特異的蛋白 Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) 濃度の関連を明らかとした。MEPE 自体の測定系の臨床応用と普及に関しては夾雑物の存在が明らかとなり達していないが、この間の *in vitro* および臨床の検討から骨細胞特異的物質の測定の重要性和次のターゲットとすべき物質が明らかとなり、これらの測定系の開発を進めている。

研究成果の概要 (英文)：

It is revealed by our preliminary analysis that serum level of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) that is one of osteocyte-specific-proteins is correlated with the multiplicity of osteoporotic vertebral fracture. However, the amino sequence analysis of MEPE derived fragment present in serum using monoclonal antibodies against MEPE revealed that mAb also bind with the unknown peptide derived from some protein other than MEPE. Identification of this foreign peptide is unfortunately too difficult due to its small amount and the cross reactivity itself in mAb, so clinical application of ELISA using mAb against MEPE has not been established. However, our *in vitro* study confirmed that the possible importance of the measurement of osteocyte-specific protein and showed the next target protein for development of clinically applicable plasma concentration measurement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：MEPE 骨細胞 骨質 骨強度 酸素分圧 椎体骨折

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

まさに高齢化社会に直面し、寝たきりの防止や高齢者のQOL (Quality of Life) の向上・維持を目指して、骨粗鬆症の診断と治療の質の更なる向上が求められている。そのためには個々の患者ごとの正確な病態評価とそれに基づくタイミングのよい効果的な治療方針の決定が必要となっている。骨粗鬆症治療は必要な患者に必要なタイミングで治療を開始して、その治療の有効性の確認する手立てを持つことで、初めて最大の効果対費用比を達成することが可能となる。しかし、1000万人を超える骨粗鬆症患者を抱えた本邦において、患者ごとの正確な評価なく画一的な治療を行われることが多く、その結果生ずる経済的な不利益は大きい。骨粗鬆症治療の最終目的は“骨折の予防”であるが、現在骨粗鬆症に伴う個々の患者の骨折危険度の評価は、骨密度と骨代謝回転の評価のみが臨床的に行われるのみである。よりの確な時期からの治療をおこなう判断方法を持つことで、骨粗鬆症の予防治療の効果対費用比を格段に向上させるためには、新しい側面からの骨の評価法を持つことが必要であった。

2. 研究の目的

骨密度や骨代謝回転以外の骨の力学的強度を規定する骨の因子（包括的に骨質と呼ばれている）の評価が重要であることが明らかとなってきた。その骨質は、骨基質に埋包されてきわめて高密度に存在しかつ細胞突起による極めて密な細胞間ネットワークを形成している骨細胞の集団的機能が深く関与していると考えられている。それゆえ、侵襲なく簡便で且つ安価な普及性のある評価方法として、この骨細胞が特異的に分泌する蛋白の血中濃度を測定することの臨床的意義を明らかとすることで、実臨床への応用法を確立することを第一の目的とした。この際に、我々が既にmonoclonal抗体を用いて血中濃度の測定法を構築していた骨細胞特異的物質 MEPE(Matrix

Extracellular Phosphoglycoprotein) に、焦点をあて検討を開始した。第二の目的として、骨細胞特異的物質の血中濃度の臨床的な変化が細胞レベルでのどのような変化を反映するかを検討するために、培養細胞を用いた骨細胞分化に影響する因子の検討を行った。我々は、加齢とともに呼吸機能・循環機能の変化、酸化ストレスの変化がみられ、体内環境が年齢的に変化する中で骨の代謝も行われている点に着目して、酸素濃度環境が骨細胞の分化に与える影響に焦点をあてた。また骨細胞特異的蛋白の血中への放出には骨吸収も関与していると考え、酸素濃度環境が破骨細胞の分化に与える影響も検討を行った。

3. 研究の方法

- ①椎体骨折を有する骨粗鬆症患者群での血漿中MEPE濃度と骨密度、従来の骨代謝マーカー、骨折数などの骨粗鬆症の病態との関連を検討した。
- ②5種類の抗MEPE monoclonal抗体（抗MEPEmAb）とヒト血漿および recombinant MEPEを用いてMEPE免疫沈降、電気泳動、マススペクトロメトリーを行い、抗MEPEmAbを用いたELISAがとらえる血漿中の蛋白がMEPEの断片あるいは intact MEPEがどの程度であるかを検討するとともに、MEPE配列内に存在する生理活性部分と予想される AC100配列、ASARM配列をとらえるELISAの感度改善を検討した。
- ③抗MEPEmAbを用いたELISAでの男女、年齢別の正常値の検討。
- ④骨細胞特異的物質の血中濃度が持つ細胞レベルの意義の検討：骨細胞の機能および破骨細胞による骨基質の吸収に伴う骨細胞特異的物質の放出の両者が血中濃度に関与する。そこで加齢とともに変化する体内環境である酸素濃度がこれらの細胞に及ぼす影響を検討した。

(倫理面への配慮)

患者データなどの個人情報および解析結果は、施設内で厳重に管理保管し秘密を厳守した。疫学研究に関する倫理指針（平成14年文部科学省・厚生労働省告示第2号）臨床研究に関する倫理指針（平成15年厚生労働省告示255号）及び大阪大学の定めた倫理規定を遵守して行った。研究参加は参加を許諾した場合でも拒否した場合でも全く同質の治療がおこなわれることを説明したうえで、患者の任意によりインフォームドコンセントを得て行われた。

4. 研究成果

- ①36名の骨粗鬆症患者での予備的検討を行った結果、血漿中MEPE濃度は骨密度や従来の骨代謝マーカー、年齢、体重のいずれとも関連を認めなかったが、身長および椎体骨折数と有意の関連を認めた。つまり、血漿中MEPE濃度が低い群で椎体骨折数が多く（多重骨折を生じている）、身長も低いという結果が得られた。しかしこの際に低値の患者では測定感度以下となり、ELISAの感度改善の必要性が認識された。
- ②5種類の抗MEPE monoclonal抗体（抗MEPEmAb）を用いてELISAの感度を改善する条件調整を行う検討を行った。また、抗MEPEmAbを用いたELISAがとらえる血漿中の蛋白がMEPEの断片のどの部分であるか、MEPE配列内に存在する生理活性部分と予想されるAC100配列、ASARM配列が測定されているのか、全長MEPEが測定されているのかの詳細を明らかにする目的で、MEPE配列内の生理活性部分と予想されるとヒト血漿およびrecombinant MEPEを用いて免疫沈降、電気泳動、マスマスペクトロメトリーを行った。これらの検討の過程で、残念なことに開発していたELISAがMEPE由来の断片をとらえている以外に、MEPE以外の物質由来のペプチドもとらえていることが明らかとなった。抗体の交差結合により同時にとらえてしまっている物質の同定を多大な努力と時間を投資

して試みたが、微量であることと抗体自身の交差反応ゆえにその同定は困難を極め未だ成功していない。それゆえ、研究期間中には抗MEPE monoclonal抗体を用いたELISAの臨床応用に至っていない。

- ③血清中の濃度の正常値を検討するために同意を得た22歳から68歳までの健康人4000名強のサンプリングを終え、性別、年齢別に均等抽出した500名のアルカリフォスファターゼ(ALP)、無機リン(IP)、カルシウム(Ca)を測定した。これらの血漿の抗MEPE monoclonal抗体を用いたELISAで正常値を明らかにする予定であったが②に記載した理由で至っていない。しかし、②の問題点は我々に他の骨細胞特異的蛋白質の検討に目を向ける機会を同時に与え、本来の目的である骨細胞特異的物質の血中濃度測定による骨の評価に向けて、現在MEPE以外の骨細胞特異的物質の検討を進めることができている。
- ④加齢とともに変化する酸化ストレスや酸素濃度が骨細胞、破骨細胞に及ぼす影響を検討した。骨芽細胞から骨細胞への分化は低酸素環境で促進され、骨細胞特異的蛋白のMEPEも低酸素環境下で発現・産生が増加することが明らかとなった。一方、破骨細胞の分化に関しては、破骨細胞の前駆細胞であるCD14陽性単球のc-fmsの発現増加とその支持細胞としての骨芽細胞株のSaOS-4/3細胞でのM-CSFの発現増加により持続的に破骨細胞の分化誘導が持続し長期間にわたり破骨細胞が存在し得ることが明らかとなった。これらの結果は、極めて単純な生体内環境である組織内の酸素濃度が細胞の分化に影響あるいはコントロールしていることを示している。
- ⑤まとめ
加齢とともに変化する血流環境、心肺機能、増加する酸化ストレス、加齢と

ともに変化する酸化ストレスが生体の運動器の老化と関連している。しかし生体の各組織内での骨内酸素分圧環境の変化を臨床的にとらえることは現時点で不可能ではある。本研究では酸素濃度の変化は骨細胞、破骨細胞とも大きく分化に影響を及ぼすことが明らかとなり、全身の骨に極めて多数存在する骨細胞由来の骨細胞特異物質測定を血中でとらえることが、生体の骨内環境の加齢変化をとらえる可能性を示唆している。それゆえ、本研究の目的である骨細胞に由来する骨細胞特異物質の血中濃度測定は骨強度の新たな評価以上の重要性を持つことが認識された。

骨細胞に由来する骨細胞特異物質の血中濃度測定による骨折リスクの新しい評価方法の開発に関しては、MEPEをターゲットとした方法は抗MEPEmAbのとらえている物質にMEPE由来でないものの混入が確認されその物質の同定が極めて困難であるという予期せぬ問題に直面し未だ臨床応用には至ってはいないが、in vitro検討により骨細胞由来特異的蛋白質の次のターゲットにすべき物質が明らかとなった。この結果およびこの間に得られたサンプルをもとに現在次のターゲットの測定系の開発を行うに至っている。

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40件)

1. Yamasaki N, Tsuboi H, Hirao M, Nampei A, Yoshikawa H, Hashimoto J. High oxygen tension prolongs the survival of osteoclast precursors via macrophage colony-stimulating factor Bone. Bone 44, 71-79, 2009. 査読有
2. Kashii M, Hashimoto J, Nakano T, Umakoshi Y, Yoshikawa H Alendronate Treatment Promotes Bone Formation with a Less Anisotropic Microstructure during Intramembranous Ossification in Rats J Bone Miner Metab. 2008; 26(1):24-33. 査読有
3. Hirao M, Hashimoto J, Ando W, Ono T, Yoshikawa H Response of serum

carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to alendronate monotherapy and combined therapy with vitamin K2 in postmenopausal women J Bone Miner Metab. 2008;26(3):260-4. 査読有

4. Ando W, Tateishi K, Katakai D, Hart DA, Higuchi C, Nakata K, Hashimoto J, Fujie H, Shino K, Yoshikawa H, Nakamura N. In Vitro Generation of a Scaffold-Free Tissue-Engineered Construct (TEC) Derived from Human Synovial Mesenchymal Stem Cells: Biological and Mechanical Properties, and Further Chondrogenic Potential. Tissue Eng Part A. 14(12):2041-9. 2008 査読有
5. Hirao M, Hashimoto J, Yamasaki N, Ando W, Tsuboi H, Myoui A, Yoshikawa H. Oxygen tension is an important mediator of the transformation of osteoblasts to osteocytes. J Bone Miner Metab. 2007; 25(5):266-76. 査読有
6. Fujii N, Hamano T, Mikami S, Nagasawa Y, Isaka Y, Moriyama T, Horio M, Imai E, Hori M, Ito T Risedronate, an effective treatment for glucocorticoid-induced bone loss in CKD patients with or without concomitant active vitamin D Nephrol Dial Transplant. 22 (6):1601-1607, 2007 査読有
7. Kishida Y, Yoshikawa H, Myoui A. Parthenolide, a natural inhibitor of nuclear factor-kappaB, inhibits lung colonization of murine osteosarcoma cells. Clin Cancer Res 2007;13:59-67. 査読有

[学会発表] (計27件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 淳 (HASHIMOTO JUN)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40237938

(2) 研究分担者

吉川 秀樹 (YOSHIKAWA HIDEKI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60191558

守山 敏樹 (MORIYAMA TOSHIKI)

大阪大学・保健センター・教授

研究者番号：30283815

名井 陽 (MYOUI AKIRA)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10263261

中村 憲正 (NAKAMURA NORIMASA)

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・招聘教授

研究者番号：50273719

(3) 連携研究者

()

研究者番号：