

機関番号：32670

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500725

研究課題名（和文） 骨量調節に関与するアルカリホスファターゼ遺伝子多型とミネラル代謝との関連について

研究課題名（英文） Association between the functional polymorphism of tissue-non specific alkaline phosphatase gene and mineral metabolism

研究代表者

五関 正江（GOSEKI MASAE）

日本女子大学・家政学部・教授

研究者番号：00170449

研究成果の概要（和文）：アルカリホスファターゼ（ALP）はリン酸エステルを加水分解する反応を触媒する酵素で、特に骨組織に存在する組織非特異型 ALP は石灰化との関連が深い。骨量は食生活などの環境因子と複数の遺伝因子によって決定される。本研究では、この酵素の遺伝子多型の機能ゲノム的研究を進め、骨代謝マーカーとの関連などについて検討し、リン酸代謝を含めたミネラル代謝調節に関する有用な結果を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：Alkaline phosphatase (ALP) hydrolyzes a variety of monophosphate esters, and tissue-nonspecific ALP (TNSALP) is indispensable for bone mineralization. Bone mass seems to be determined by genetic as well as environmental factors. In this study, we demonstrated the effects of the TNSALP genotype on associations among serum bone metabolism markers. Our data may be useful for the regulation of mineral metabolism including the phosphate metabolism pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2009年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 総計 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：科研費の分科・細目：生活科学・食生活

キーワード：アルカリホスファターゼ、ミネラル代謝、骨粗鬆症、骨密度、遺伝子多型、栄養因子

1. 研究開始当初の背景

骨組織に存在する臓器非特異型アルカリホスファターゼ（Tissue-nonspecific Alkaline Phosphatase； TNSALP；骨型ア

ルカリホスファターゼ）は、骨形成マーカーとして知られ、石灰化に深く関わる酵素であるが、その生理的基質や生理機能につ

いては、未だ不明な点が多い。研究代表者は1983年より、本酵素の酵素化学的性質、免疫学的性質、遺伝子発現調節機構、先天的なTNSALP遺伝子異常である低ホスファターゼ症についての遺伝子診断・遺伝子解析を進め、骨代謝における本酵素の重要な生理的役割について報告してきた (FEBS J. 272:1704-1717, 2005; Biochem. Biophys. Res. Commun. 327:124-129 2005; J. Med. Dent. Sci. 51:1-9, 2004; Biochem. Biophys. Res. Commun. 299:395-399, 2002; J. Bone Miner. Metab. 20:28-33, 2002; J. Bone Miner. Res. 16:2313-2319, 2001; Oral Diseases 7:1-5, 2001 他)。また、近年になって骨粗鬆症の発症に関連する候補遺伝子が同定されてきているが、TNSALP遺伝子多型についてはまだ研究が行われていなかった。そこで、2003年から日本人閉経後女性501名を対象とし、TNSALP遺伝子の多型検索を行い、アミノ酸置換を起こすSNP (一塩基多型、スニップ) である787T>C

(Tyr246His:C型)と787T(Tyr246Tyr:T型)について骨密度との関連について解析を行い、骨密度およびZスコアで、いずれもCC型群が最も高い値、TT型群が最も低い値を示し有意な差が認められた。これらの結果からTNSALP遺伝子が骨粗鬆症の発症要因に関与する重要な候補遺伝子の1つであることが示された。このTNSALP遺伝子多型 (787T>Cと787T) の発見については、世界に先駆けてアメリカ骨代謝学会 (J. Bone Miner. Res. 18:S382, 2004) で発表し、論文にまとめることができた (J. Bone Miner. Res. 20:773-782, 2005)。

2. 研究の目的

本研究では、アルカリホスファターゼによる骨量調節において、加齢・老化や各種栄養因子の影響に着目して、このTNSALP遺伝子多

型の機能ゲノム的研究をさらに進め、ミネラル代謝との関連を明らかにすることを目的とした。この理由として、対象者の日本人閉経後女性 (501名) を平均年齢(73.6±5.8歳)で2群に分けて、TNSALP遺伝子多型について解析したところ、このTNSALP遺伝子多型による骨密度への影響が加齢により顕著に大きくなることが明らかになったからである (J. Bone Miner. Res. 20:773-782, 2005)。加齢にはさまざまな栄養因子が関わっていると考えられるが、TNSALPはリン酸エステルを加水分解する反応を触媒する酵素であり、加齢・老化とリン酸代謝との深い関係を示唆するものである。また、今後のTNSALPの機能解析を含めたミネラル代謝研究が、骨粗鬆症の一次予防や治療において新しい目標となる可能性を提供すると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養におけるALP遺伝子多型の発現タンパク質の研究: マウス骨芽細胞様細胞株であるST2細胞を用いて、TNSALP遺伝子の発現ベクターを用いて、発現タンパク質の酵素化学的性質、基質親和性などについて比較し、さらに、本酵素の基質との反応性に及ぼす金属イオンとの3次元解析を行った。

(2) 動物実験による各種栄養因子によるALP活性誘導、ミネラル代謝への影響についての研究:

① 小腸型ALPのノックアウトマウスを用いて、肝臓におけるTNSALPと小腸型ALPの遺伝子発現の相違、高脂肪食投与の影響などについて、肝臓や小腸の組織からRNAを抽出し、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 分析により、比較した。

② 栄養因子として、ビタミンK₁(フィロキノン:PK)、またはビタミンK₂(メナテトレ

ノン：MK-4) についての研究を進めた。すなわち、PK または MK-4 の経口投与による ALP 活性誘導について、7 週齢の ICR 系雄マウス 21 匹について、PK を経口投与した PK 群、MK-4 を経口投与した MK 群、および Cont. 群 (生理的食塩水を投与) の 3 群に分け、投与 4 時間後にサンプルを採取した。3 部位 (十二指腸・空腸・回腸) の小腸粘膜について ALP 活性を測定した。さらに RNA を抽出し、小腸型 ALP (*Akp3*, *Akp6*)、組織非特異型 ALP (*Akp2*)、および胎児型 ALP (*Akp5*) に特異的なプライマーを用いて RT-PCR 分析を行った。また、近年になって、ビタミン K の核内受容体であるステロイド X 受容体を介する新しい作用が注目されており、この核内受容体遺伝子 (Pregnane X Receptor : PXR) の発現についても比較した。

③ PK または MK-4 の長期投与によるミネラル代謝、体組成への影響について、6 週齢の SD 系雌ラット 23 匹について、PK 群 (PK: 600 mg/kg diet)、MK-4 群 (MK-4: 600mg/kg diet)、および Cont. 群の 3 群に分け、3 か月後に骨密度、骨強度、体脂肪量をはじめ血中骨代謝関連マーカーについて比較検討した。

(3) ヒトを対象とした研究 (ALP 遺伝子多型と血中骨代謝マーカー、食事摂取状況、骨量測定など) : 健常な若年成人約 200 名を対象として研究を実施した (日本女子大学ヒトを対象とした実験研究に関する倫理審査委員会により承認されている)。すなわち、対象者の身体計測 (体重、体脂肪率など)、採血前の 3 日間の食事調査、食物摂取頻度調査、血液生化学検査、食生活アンケート調査、骨量測定などを行った。採血した血液からは、DNA を抽出し、TNSALP 遺伝子多型のタイピングを行った。骨量測定については、超音波骨評価装置により、右足踵で超音波伝播速度

(SOS)、超音波透過指標 (TI)、音響的骨評価値 (OSI) を測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞培養における ALP 遺伝子多型の発現タンパク質の研究 : マウス骨芽細胞様細胞株である ST2 細胞を用いて、TNSALP 遺伝子の発現ベクターを用いて、発現タンパク質の生成や酵素化学的性質、基質親和性について比較した (Fig. 1)。

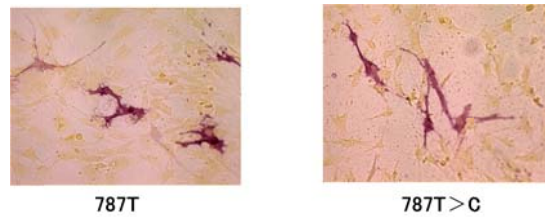


Fig. 1 ST2 細胞における ALP 活性の比較 (Biomedical Research 29:213-219, 2008 より)

さらに、本酵素の基質との反応性に及ぼすカルシウムイオンとの 3 次元的解析を行った。これらの結果から、TNSALP 787T>C 遺伝子多型により、発現たんぱく質の基質親和性を示す K_m 値の有意な差が認められ ($P < 0.01$)、骨量調節との関連が示唆された (Biomedical Research 29:213-219, 2008)。

(2) 動物実験による各種栄養因子による ALP 活性誘導、ミネラル代謝への影響についての研究 :

① 小腸型 ALP のノックアウトマウスを用いた、肝臓における TNSALP と小腸型 ALP の遺伝子発現の相違、高脂肪食投与の影響などについて、肝から RNA を抽出し、RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 分析により比較した結果、TNSALP 遺伝子に相当する *Akp2* mRNA の発現だけでなく、小腸 ALP 遺伝子の 2 種類の ALP (*Akp3*,

Akp6)のうちの片方の mRNA (*Akp6*)のみの mRNA 発現を確認でき、ノックアウトマウスとの比較や高脂肪食の影響についても示すことができた (J. Electrophoresis 54:27-32, 2010)。

② PK または MK-4 の経口投与による影響については、マウス空腸部位の ALP 比活性が、MK 群で Cont. 群に比べて有意に高値を示した ($P < 0.05$) (Fig. 2)。一方、十二指腸および回腸部位では、ALP 比活性に有意な差は認められなかった。

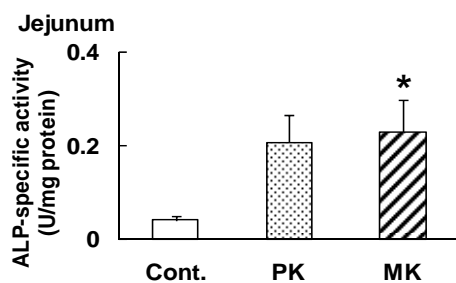


Fig. 2 空腸部位の ALP 比活性の比較

(J. Nutr. Sci. Vitaminol. in press, 2011 より)

さらに、RT-PCR 分析により遺伝子発現について比較したところ、空腸において、PK 群、MK 群の両群で Cont. 群に比べ、小腸 ALP 遺伝子である *Akp3*、*Akp6* や *PXR* 遺伝子の mRNA の発現増強が認められ、*Akp2* と *Akp5* の PCR 産物は検出されなかった。ビタミン K 経口投与により、小腸 ALP 活性が上昇し、小腸型 ALP 遺伝子発現の増強だけでなく、*PXR* 遺伝子についても mRNA の発現が増強された。今回の結果から、骨だけでなく、小腸においてもビタミン K が *PXR* を介して、小腸 ALP 遺伝子の転写調節に関連している可能性が示唆された (J. Nutr. Sci. Vitaminol. in press, 2011)。

③ PK または MK-4 の長期投与によるミネラル

代謝、体組成への影響について、骨密度や体脂肪量、ミネラル代謝関連マーカーなどについて比較検討を行った。その結果、Cont. 群に比べ、PK 群では大腿骨の骨密度が有意に増加し (Fig. 3)、MK 群では、骨強度、骨幅、骨塩量が有意に増加していた。

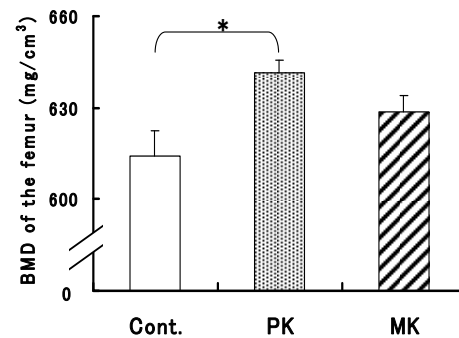


Fig. 3 大腿骨の骨密度の比較

(Bone 48:1036-1042, 2011 より)

また、興味深いことに、Cont. 群に比べ、PK 群、MK 群の両群で、内臓脂肪量や血中トリグリセライド濃度が有意に減少し、ビタミン K 摂取が骨粗鬆症予防だけでなく、生活習慣予防においても有効である可能性が示唆された (Bone 48:1036-1042, 2011)。

(3) ヒトを対象とした研究 (ALP 遺伝子多型と血中骨代謝マーカー、食事摂取状況、骨量測定など): 健康な若年を対象に血中 BAP 活性を含めた骨代謝関連マーカーの測定ならびに 3 日間の食事調査を行った。また、末梢血白血球から分離した DNA を用いて TNSALP 遺伝子多型の解析を行った。血中 BAP 活性と骨代謝マーカーについて解析したところ、男性では血中 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ とオステオカルシンで正の相関関係が認められた。一方、女性では有意な相関関係は認められず、男女差があることが明らかになった。この遺伝子多型別に血清 BAP 値と血清リン値を比較したとこ

ろ、男性では、骨粗鬆症発症リスクが低いと考えられている CC 型で有意な負の相関関係が認められたのに対し、TC 型や TT 型では相関が認められなかった。一方、女性では遺伝子型による差はみられなかった。今回の結果から TNSALP787T>C 遺伝子多型が、若年男性の血清リン濃度調節に深く関わる事が明らかとなった(32th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, J. Bone Miner Res. 25: M00309, 2010)。

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 7 件)

- ① Haraikawa M, Sogabe N, Tanabe R, Hosoi T, Goseki-Sone M. : Vitamin K₁ (phyloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) induces intestinal alkaline phosphatase gene expression. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 査読有. in press. 2011.
- ② Goseki-Sone M: Reply to Letter to the Editor "Vitamin K family effects on bone growth" Bone 査読有. 48:1428-1428, 2011.
- ③ Sogabe N, Maruyama R, Baba O, Hosoi T, Goseki-Sone M: Effects of long-term vitamin K₁ (phyloquinone) or vitamin K₂ (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. Bone 査読有. 48: 1036-1042, 2011.
- ④ Goseki-Sone M, Sogabe N, Nakano T, Tanabe R, Haraikawa M, Alpers D.H, Komoda T: Expression of

intestinal-type alkaline phosphatase mRNA in liver of Akp3 knockout mice. J Electrophoresis 査読有. 54:27-32, 2010.

- ⑤ 曾我部夏子、丸山里枝子、佐藤和人、五関-曾根正江 : 大学生におけるボディ・マス・インデックスと食生活および骨量との関連性について 栄養学雑誌, 査読有. 67:58-64, 2009.
- ⑥ Sogabe N, Oda K, Nakamura H, Orimo H, Watanabe H, Hosoi T, Goseki-Sone M : Molecular effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism (787T>C) associated with bone mineral density. Biomedical Research 査読有. 29:213-219, 2008.
- ⑦ 五関-曾根 正江: 特集:ゲノムからみた骨・関節疾患 Seminar. 「Nutrigenomics の可能性」CLINICAL CALCIUM 査読無、執筆依頼. 2:46-51, 2008.

[学会発表] (計 10 件)

- ① Sogabe N(Goseki-Sone M): Association between serum bone-specific alkaline phosphatase activity and biochemical markers, dietary nutrients, and functional polymorphism of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene in healthy young adults. 32th ASBMR (Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research) (Oct.18, 2010) Toronto, Canada.
- ② 祓川摩有(五関 - 曾根 正江): マウスにおけるビタミン K 経口投与によるアルカリホスファターゼ遺伝子発

現への影響. 第13回 日本病態栄養学会 (2010年1月10日) 京都.

- ③ 曾我部夏子(五関-曾根 正江): 若年成人におけるカルシウム摂取状況と骨型アルカリホスファターゼとの関連について. 第13回 日本病態栄養学会 (2010年1月10日) 京都.
- ④ 曾我部夏子(五関-曾根 正江): 若年成人における臓器非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子多型と骨代謝マーカーおよび栄養摂取状況の関連. 第57回 日本栄養改善学会 (2010年9月12日) 埼玉県.
- ⑤ Sogabe N (Goseki-Sone M): Effects of vitamin K₁ or vitamin K₂ on bone metabolism in growing female rats. 31th ASBMR SU0063, (Sep. 13, 2009) Denver, USA.
- ⑥ Goseki-Sone M: Effects of tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism on the relationship between dietary nutrient intake and serum markers of bone metabolism. International Mini-Symposium on Alkaline Phosphatase. (April 26, 2008) Tokyo, Japan.
- ⑦ Sogabe N (Goseki-Sone M): Nutritional effects of the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene polymorphism associated with bone mineral density. 15th ICD (International Congress of Dietetics) (Sep. 10, 2008) Yokohama, Japan.
- ⑧ Goseki-Sone M: Calcium intake and serum bone formation markers are associated with the functional single

nucleotide polymorphism in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene. 30th ASBMR, (Sep. 14, 2008) Montreal, Canada.

- ⑨ 曾我部夏子(五関-曾根 正江): ラット小腸アルカリホスファターゼ活性へ及ぼすビタミンK₁またはビタミンK₂経口投与の影響について. 第60回 日本家政学会 (2008年5月31日) 東京.
- ⑩ 曾我部夏子(五関-曾根 正江): ビタミンK₁またはビタミンK₂経口投与によるラット小腸アルカリホスファターゼ活性誘導作用について. 第62回 日本栄養・食糧学会 (2008年5月3日) 埼玉県.

[その他]
ホームページ等

<http://mcm-www.jwu.ac.jp/~goseki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五関 正江 (GOSEKI MASAE)

日本女子大学・家政学部・食物学科・
教授

研究者番号: 00170449

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし