

科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 8月28日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21650112

研究課題名（和文） ビタミン K2 による血管石灰化／骨粗鬆症の同時抑制と骨血管相関への
実験的アプローチ研究課題名（英文） Inhibitory effect of vitamin K2 on vascular calcification and osteoporosis:
experimental approach to understanding the bone-vascular axis

研究代表者 松本 健志 (MATSUMOTO TAKESHI)

大阪大学・基礎工学研究科・准教授

研究者番号：30249560

研究成果の概要（和文）：

本研究では、骨粗鬆症および動脈石灰化の病態を *in vivo/ex vivo* で計測し、両疾患の関連性（骨-血管相関）を解析するとともに、これら疾患に対するビタミン K2 抑制効果の評価を目的とした。まず、*in vivo* CT を確立して経時的なマウス骨形態変化を観察し、慢性腎不全モデル（CKD）における骨粗鬆症の進行を解析した。また、同モデルより摘出した椎骨と大動脈試料について、前者にはマイクロ CT による形態評価とフーリエ赤外分光法による材料特性評価、後者には Von Kossa 染色による組織学的評価と原子発光分析によるミネラル蓄積計量を行った。CKD マウスの脛骨海綿骨は、週齢が増すにつれ顕著な骨量低下を示した。材料特性については CKD マウスと対照マウスの間に差はみられなかった。大動脈には CKD マウス、対照マウスともに顕著な石灰化は確認できなかったが、CKD マウスでは骨量減少に応じたカルシウム、リン含有量の増加傾向が見られ、特に皮質骨厚さとこれらミネラル含有量の間には有意な相関（骨-血管相関）が認められた。また、ビタミン K2 摂取の骨に対する効果について基礎的検討を行い、成長期の海綿骨における骨量増加作用、皮質骨における材料・力学的な成熟性増進の効果を確認した。

研究成果の概要（英文）：

This study aims to explore the bone-vascular axis based on *in vivo/ex vivo* measurements of bone properties and vascular calcification and to evaluate the inhibitory effects of vitamin K2 intake on these metabolic disorders. We established *in vivo* μ CT, which was customized for imaging of mouse hindlimbs, and determined the time course of trabecular architectural changes in the tibia of a mouse model of high-turnover chronic kidney disease (CKD). At the end of the experimental period, structural and material properties of vertebral cortical bone were evaluated by μ CT and Fourier transform infrared microspectroscopy, and aortic calcification was examined by von Kossa staining and plasma atomic emission spectrometry. The age-related regression of tibial trabecular network was observed to the higher degree in CKD mice than in control mice. The material properties of vertebral cortical bone did not differ significantly between CKD and control mice, and there was no appearance of aortic calcification in both groups. However, aortic accumulation of P and Ca contents were higher in CKD and inversely correlated with the cortical bone thickness, suggesting the existence of a bone-vascular axis. On the other hand, vitamin K2 supplementation had a beneficial effect on trabecular bone mass and architecture as well as the maturation of cortical bone tissue in growing rat tibiae, showing its potential to enhance bone quality and reducing fracture risk during growth spurts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	700,000	0	700,000
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：医用生体工学・生体材料学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：骨-血管相関・慢性腎不全・骨粗鬆症・血管石灰化・ビタミン K2・インビボ CT

1. 研究開始当初の背景

動脈や心臓弁の石灰化は循環機能の悪化を招き、心血管死に導く危険因子として認識されている。長年の間、これら血管石灰化は血中の余剰なカルシウムやリンが受動的に沈着した終末的病変と考えられ、予防・治療の対象と見なされなかった。しかし近年、血管石灰化は骨組織の骨化に極めて類似した現象であることが明らかになり、有効な予防・治療法の開発が強く求められるようになった(Johnson ら, *Circ Res* 2006; Demer ら, *Circulation* 2008)。

一方、血管石灰化の進行と骨密度低下の相関を示す疫学的調査研究や(Frost ら, *Calcif Tissue Int* 2008 など)、脂質代謝異常や炎症など、血管石灰化と骨粗鬆症に關与する共通の因子の存在から(Forrester ら, *Am J Cardiol* 2007 など)、“骨-血管相関”の概念が受け入れられるようになった。現在、医学的かつ社会経済学的観点から、骨-血管相関に基づく血管石灰化と骨粗鬆症の予防・治療法の探索が進められている。

骨芽細胞より分泌されるオステオカルシン(骨 Gla 蛋白)は、ビタミン K によってカルボキシル化され、カルシウムと結合して骨形成に寄与する。カルボキシル化の作用はビタミン K2 で大きく、その補給は骨量低下を抑制して骨強度を維持する(Kaneki ら, *Nutrition* 2001; Knapen ら, *Osteoporos Int* 2007)。また、ビタミン K2 による骨芽細胞の骨基質産生や分化・活性への關与も明らかにされている(Ichikawa ら, *J Biol Chem* 2006, *J Mol Endocrinol* 2007 など)。一方、血管壁のマトリックス Gla 蛋白もビタミン K によってカルボキシル化され、石灰化を抑えて動脈硬化予防に働く(Luo ら, *Nature* 1997 など)。その摂取が多いほど石灰化レベルが低くなることから、欧州の疫学研究で報告されている(Geleijnse ら, *J Nutr* 2004)。しかし、血管石灰化と骨粗鬆症を關連付け、ビタミン K2 の両疾患への作用

を検討した例は見当たらない。

2. 研究の目的

本研究では、慢性腎不全モデルマウス(血管石灰化/骨粗鬆症モデル)の大動脈石灰化および脛骨粗鬆化の進行を、高感度で定量性に優れた形態・化学分析法によって *in vivo/ex vivo* で計測し、両疾患の病態の關連性(骨-血管相関)およびビタミン K2 の作用を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物 5 週齢で 5/6 腎摘除によって慢性腎不全を惹起した♀ICR マウス(Nx)を利用し、対照群(Sham)と比較した。

インビボ CT インビボ観察に基づく評価を可能とするため、傾斜型インビボ CT システムを構築した。本システムは、マイクロフォーカス X 線透視装置(SMX-1000; Shimadzu)をベースとし、マウスを固定する回転テーブルと駆動モータ、そのドライブと X 線検出器を制御するコントローラからなる。また、回転テーブルには鉛シールドを装着し、計測部位となる膝部を除いてマウスへの X 線被曝を遮断した。また、予備実験として、骨の形態検出精度および被曝によるマウスへの影響について検討し、実験目的に適合した撮像条件を決定した。10 週から 16 週齢に渡ってマウスの脛骨海綿骨のインビボ CT 計測を行い(解像度 15 μm)、BoneJ (Doube ら, *Bone* 2010)を利用して形態パラメータを決定した。

マイクロ CT インビボ CT の後、第二胸椎を摘出し、マイクロ CT 装置(SMX-1000/VCT unit; Shimadzu)を用いて形態計測を行った(解像度 10 μm)。CT 画像は海綿骨と皮質骨に分離し、それぞれの形態は BoneJ を利用して定量化した。

フーリエ変換赤外分光顕微鏡計測 フーリエ変換赤外分光光度計(IRPrestige-21; Shimadzu)と赤外線顕微鏡(AIM-8800;

Shimadzu)を組合せ、局所的な皮質骨の材料特性計測を行った。皮質骨試料は鏡面仕上げし、リン酸帯域(930-1200 cm^{-1})およびコラーゲンI型帯域(1600-1720 cm^{-1})に対してスペクトル解析を行い、ヒドロキシアパタイト結晶化度、コラーゲン架橋度、鈣質/有機基質比を決定した。

原子発光分析 インビボ CT の後に摘出した大動脈血管壁組織中のカルシウム、リン、およびマグネシウムの含有量を、高周波プラズマ発光分析装置(ICP-8100; Shimadzu)を用いて決定した。摘出した胸部大動脈を乾燥させ、濃硝酸および過塩素酸を加えて分析用の試料溶液を作製し、試料溶液中の元素量を検量線法によって定量化した。

4. 研究成果

図1にNx群, Sham群のマウスについて、脛骨海綿骨の形態変化をインビボCTでトラッキングした結果を示す。ともに週齢とともに海綿骨の希薄化・骨量減少が確認できるが、その変化はNx群で顕著であった。なお、被曝量は商用のインビボCTと同レベルの650 mGy/scanである。

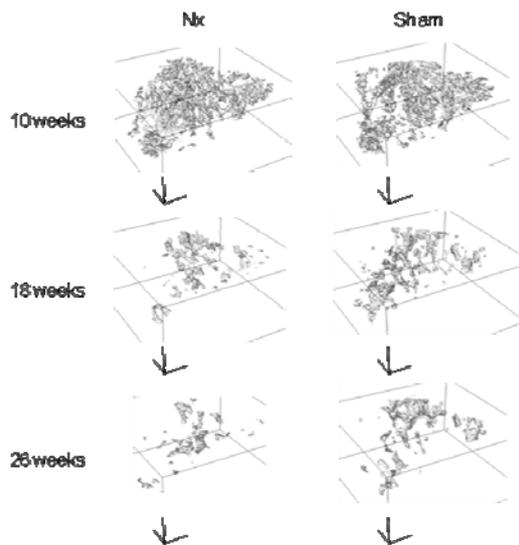


図1 マウス脛骨の海綿骨インビボCT像。Nx, 慢性腎不全群; Sham, 対照群。ボックス太線: 400 μm

摘出した椎骨は脛骨と同様にNx群で粗鬆化が認められた(図2, 表1)。皮質骨の材料特性については両群に差は無く、また、摘出した血管のVon Kossa染色からは、Nx群にも石灰化の徴候が確認できなかった。しかし、血管壁内のカルシウムとリンの含有量はNxで有意に高値を示し、これら元素の含有量の増加と皮質骨体積率、皮質骨厚さの減少は有意に相関し(図3)、骨-血管相関の存在が示唆された。なお、カルシウム、リンとともにマグネシウムの血管壁内含有量も増加した。マグネシウムが石灰化を抑制する役割を持つこ

とから(Kircelli ら, Nephrol Dial Transplant 2012), これがNxで血管石灰化が認められなかった一因と考えられた。

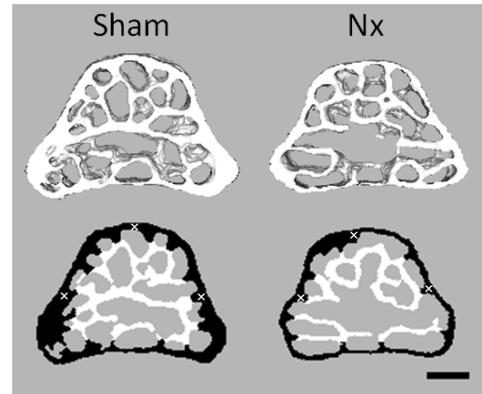


図2 マウス椎骨のCT像。Sham, 対照群; Nx, 慢性腎不全群。×印は材料特性評価ポイントを示す。スケール: 300 μm

表1 骨形態パラメータおよび材料特性

	Sham	Nx
Cor.V/T.V (%)	48.0±0.5	41.9±1.6*
Cor.Th (μm)	65.4±2.0	59.8±2.3
Tb.V/M.V (%)	20.8±1.0	16.9±1.4*
Tb.Th (μm)	39.8±0.8	37.9±1.0
Tb.N (mm^{-3})	683±48	511±31*
Tb.Conn.D (mm^{-3})	174±20	114±13*
Mineral/matrix	8.2±0.7	7.9±0.9
mineral maturity	1.3±0.1	1.3±0.1
collagen maturity	5.8±1.4	4.3±0.9

Sham, 対照群(n=6); Nx, 慢性腎不全群(n=6); Cor.V/TV, 皮質骨体積率; Cor.Th, 皮質骨厚さ; Tb.V/M.V, 海綿骨体積率; Tb.Th, 骨梁幅; Tb.N, 骨梁数密度; Tb.Conn.D, 骨梁結合度。*P<0.05 vs. Sham

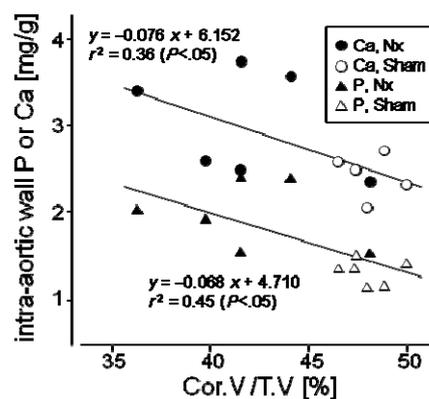


図3 血管壁内カルシウム/リン含有量 vs. 皮質骨体積率。

ビタミンK2の慢性腎不全モデルに対する効果については未だ着手できていないが、ラットを対象とした基礎的検討では、ビタミンK2の骨形成促進作用が認められた。図4にビタミンK2摂取群(menatetrenone; Eisai, 22

mg/kg/day)と対照群の皮質骨のコラーゲン成熟度, ミネラル結晶度, 骨硬度のプロットを示す. ビタミン K2 摂取群では骨の成熟性が増加している. また, 海綿骨についても, ビタミン K2 摂取によって骨量, 骨梁幅は増加し, そのアナボリック効果が確認できた.

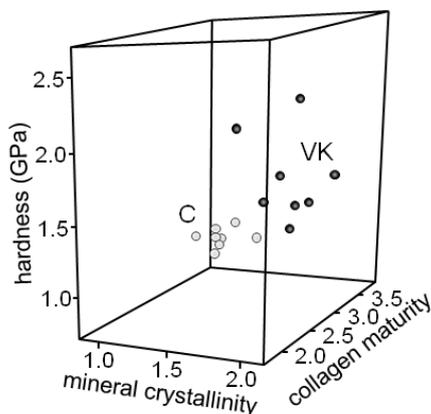


図4 コラーゲン成熟度, ミネラル結晶度, 骨硬度のプロット. VK, ビタミン K2 摂取群; C, 対照群.

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3件)

- ① S. Kadokawa, T. Matsumoto, H. Naito, M. Tanaka: Assessment of Trabecular Bone Architecture and Intrinsic Properties of Cortical Bone Tissue in a Mouse Model of Chronic Kidney Disease. *J Hard Tissue Biol* 20: 79-86, 2011, 査読有り.
- ② T. Matsumoto, T. Miyakawa, D. Yamamoto: Effects of Vitamin K on the Morphometrical and Material Properties of Bone in the Tibiae of Growing Rats. *Metabolism* 61: 407-414, 2012, 査読有り.
- ③ T. Matsumoto, S. Fukushima, T. Kanasaki, S. Hagino: Relationship Between Aortic Mineral Elements and Osteodystrophy in Mice With Chronic Kidney Disease. *Biol Trace Elem Res*, in press, 査読有り.

[学会発表] (計6件)

- ① 金崎丈, 萩野伸悟, 福島修一郎, 松本健志, 田中正夫: 慢性腎臓病における骨-血管相関: 骨 μ CTおよび血管壁原子発光分析による評価, 第24回バイオエンジニアリング講演会, 大阪, 2012年.
- ② 金崎丈, 萩野伸悟, 福島修一郎, 松本健志, 田中正夫: 慢性腎臓病マウスモデルを用いた骨-血管相関の解析, 生体医工学シンポジウム2011, 長野, 2011年.
- ③ 楞川祥太郎, 松本健志, 内藤尚, 田中正夫:

慢性腎不全が骨微細構造の経時変化および骨質に及ぼす影響の評価, 日本機械学会・関西支部第86期定時総会講演会, 京都, 2011年.

- ④ 楞川祥太郎, 松本健志, 内藤尚, 田中正夫: 慢性腎臓病が骨に与える影響の実験的評価, 関西学生会平成22年度学生員卒業研究発表講演会, 京都, 2011年.
- ⑤ 楞川祥太郎, 松本健志, 内藤尚, 田中正夫: *in vivo* CTを用いた腎切除モデルマウスにおける骨形態の経日的変化についての評価, 日本機械学会・関西支部第85期定時総会講演会, 神戸, 2008年.
- ⑥ T. Matsumoto, T. Miyakawa, H. Naito, M. Tanaka: Microscopic Analysis of Bone in Growing Rats Under the Influence of Vitamin K2 and Mechanical Loading, *World Cong. Med. Phys. Biomed. Eng.*, Munich, 2009年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 健志 (MATSUMOTO TAKESHI)
大阪大学・基礎工学研究科・准教授
研究者番号: 30249560

(2) 研究分担者

福島 修一郎 (FUKUSHIMA SHUICHIRO)
大阪大学・基礎工学研究科・助教
研究者番号: 40362644