

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591692

研究課題名（和文） 非侵襲的骨質評価法の確立

研究課題名（英文） Establishment of non-invasive bone quality evaluation method.

研究代表者 木田吉城 (KIDA YOSHIKUNI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：90328310

**研究成果の概要（和文）：**日常診療において、骨密度以外の骨強度因お子である「骨質」の劣化評価の可能性が示唆された。すなわち、同一個体から血液・尿・皮膚・骨を採取して非侵襲的な骨質評価を行った結果、骨質因子である骨コラーゲンのAGEs(架橋ペントシジン)化は、推定糸球体濾過量や尿中ペントシジン濃度に最も強く現れ、間接的な骨質低下の有用な指標になると考えられる。

**研究成果の概要（英文）：**Degradation of “bone quality”, a marker of bone strength different from bone density, has become available for evaluation in everyday clinical practice. The possibility was validated by the results of a non-invasive analysis of bone quality in which blood, urine, skin and bone samples from the same individual were collected and compared with those from other individuals for accumulation of advanced glycation end products (AGEs, cross-linking pentosidine). Higher AGEs levels were well correlated with two non-invasive parameters: estimated glomerular filtration rate and urine pentosidine concentration that may be therefore considered as indirect but useful markers of bone quality breakdown.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨質評価法, AGEs, ペントシジン, コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

現在、日常診療の場において骨密度測定が骨折リスクの評価に広く用いられている。しかし、骨密度が高いにもかかわらず骨折をきたす症例の存在や、骨粗鬆症治療薬の骨折リスクの低下に対する骨密度増加の寄与度は低い(4-30%)といった臨床的事実から、骨密度以外の骨強度因子である「骨質」の重要性が指摘されており、同時に、非侵襲的な骨質評価法の確立が待たれている。我々は、骨の単位体積当たり 50%を占めるコラーゲンの分子間をつなぎ止める構造体である架橋構造が、骨強度の発現に重要な役割を演じていることを明らかにし、さらに骨質を規定する因子であることを見いだしている。

最近、我々は、原発性骨粗鬆症例では骨形成の早期に悪玉架橋であるペントシジンの過形成と善玉架橋である生理的架橋の低形成が骨脆弱化の原因となることを独自に開発した分析装置を用いて、初めて明らかにしてきた。

このように、我々が明らかにしたコラーゲン架橋の異常という骨質異常を反映するかのよう、尿中ペントシジン排泄量の高値が独立した骨折予測マーカーとなることを平均5年間の前向き研究から明らかにしてきたが、血液や尿中のペントシジン量が骨コラーゲンのペントシジン量を反映するのかは未だ判明していない。

## 2. 研究の目的

今回は、同一個体から骨、皮膚、尿、血液を採取し、各検体間のAGEs架橋(ペントシジン)量の相関性を検証した。さらに骨と類似したコラーゲンの老化過程をとる皮膚に着目し、非侵襲的な皮膚蛍光AGEs測定装置(Skin fluorescence AGEs Reader, DiagnOptics)によるAGEs評価と、AGEsの代表的構造体であるペントシジン量との相関を検証し、間接的な骨コラーゲンのAGEs化度の評価法として有用性であるか否かを検討した。これらの非侵襲的なAGEs測定によるコラーゲンの老化度評価が骨コラーゲンのAGEs化を反映することが検証できれば、これまで不可能であった材質劣化の評価が日常診療において可能になると考えている。AGEs形成は腎機能の影響を受けるため腎機能の指標としてeGFR, Ccr(Cockcroft法)との関連もあわせて検討した。

## 3. 研究の方法

**検査対象：**整形外科において手術施行予定の症例で、閉経後女性もしくは50歳以降の男性で、本研究の同意が得られた患者を対象とした。手術適応は従来通り臨床症状、画像所見、患者の希望などから総合的に判断した。

**皮膚AGEsリーダーによる測定：**測定に要する時間は30秒程度であり、痛みや皮膚への障害をもたらさない。



図1. 皮膚AGEs測定器

### (1) 手術前

#### ① 血液生化学

・ホモシステイン, ビタミンB6, ビタミンB12, 葉酸, コレステロール, 中性脂肪, 低比重リポ蛋白(LDL), 酸化LDL, 高感度CRP

・AGEs架橋: ペントシジン

・骨代謝マーカー: ピリジノリン, デオキシピリジノリン, I型コラーゲンN末端架橋テロペプチド(NTX), 骨型アルカリフォスファターゼ

②尿生化学: 尿中ペントシジンを解析し、血中濃度との相関をみる。

③骨密度測定: DEXA法(腰椎, 大腿骨)

④脊椎単純レントゲン: 胸椎, 腰椎の既存骨折の有無を確認する。

ここで得られたデータは、以下に示す採取した検体(皮膚, 骨, 腱, 靭帯)の解析結果と比較し、相関の有無を検証する。

### (2) 手術後

①採取した組織(皮膚, 骨, 腱, 靭帯)のコラーゲン分析

採取した組織を液体窒素で粉碎し、中性塩および酸抽出を行いコラーゲンを精製する。精製したコラーゲンは、独自に開発した高速液体クロマトグラフィー法を用いて善玉架橋である生理的架橋(未熟型のリジノノルロ

イシン架橋、成熟型のピリジニウム架橋)の形成量と、そのパターンを規定するコラーゲンのリジン水酸化率を解析し、悪玉架橋であるペントシジン (老化架橋: Advanced glycation end products)も分離定量する。さらに、これらの架橋パラメータをもとにして、我々が新たに定義したコラーゲンの成熟指数と老化指数を評価に加える。

#### ②骨質マーカーとしての尿中・血中ペントシジン動態の検証

骨質マーカーとして尿中および血中のペントシジン値が骨コラーゲンのペントシジンの異常をどの程度反映するのか明らかにする。具体的には、骨のコラーゲン架橋分析のみならず、コラーゲンを含む皮膚、腱、靭帯における善玉架橋およびペントシジンの定量を行う。

#### ③骨密度測定: 1年と2年後の調査

#### ④脊椎単純レントゲン: 1年と2年後の調査として、新規骨折の有無を確認する。

### (3)検証

①解析したパラメーターによって骨折リスク予測が可能であるか、多変量解析, Cox ハザード解析を行い検証する。

②皮膚 AGEs リーダーの測定値が、骨コラーゲンの AGEs 量を反映するか検証する。

## 4. 研究成果

### (1)研究成果

解析の結果、各組織のペントシジン量は、年齢と正の相関を示したのに対し、eGFR とは負の相関を示した。血中と尿中のペントシジン量は正の相関を示した。さらに、尿中ペントシジン量は、骨や皮膚のペントシジン量と有意な正の相関を示した。皮膚 AGEs リーダー値は、皮膚ペントシジンと強い相関を示したものの、骨ペントシジンとの相関性は低かった。

これらのことから、各検体間のペントシジン値は、互いに相関していたことから、組織の AGEs 化は、酸化ストレスや糖化の程度に応じて同一個体内では同程度に生じる可能性があるといえる。

また、各検体のペントシジン量と eGFR は強い相関が認められたことから、加齢に伴う腎機能の低下は、酸化ストレスを高めて、組織コラーゲンの AGEs を誘導する可能性がある。

骨質因子である骨コラーゲンの AGEs 化は、eGFR あるいは尿中ペントシジン測定値が最も強く、間接的な骨質低下指標として有用となる可能性があると考えられる。

### (2)国内外における位置づけ・今後の展望

近年、原発性および続発性の骨粗鬆症に伴う骨脆弱化は、骨密度の低下のみでは説明ができないことはコンセンサスが得られている。我々は、骨の主要な構成成分であるコラーゲンの役割について、骨血管相関という概念でヒトや動物モデルを用いてその理論を実証してきた。こうした概念は、原発性骨粗鬆症のみならず糖尿病性の骨折にも関係していることも初めて明らかにした。

コラーゲンの生物学的・力学的機能の発現に関わる架橋物質を微量の検体から網羅的に測定可能な施設は、我々の施設以外にはない。この技術的先進性を屈指して、日常診療で簡便に汎用可能な測定法を検証し、確立していくことは我々の施設において可能と考えている。AGEs リーダーによる心血管イベント予測は諸外国でなされているが、組織 AGEs 化度と非侵襲的な AGEs 測定法(皮膚 AGEs リーダー、血液・尿検査)との相関性をもとにした骨粗鬆症例における骨折や心血管イベントに関する報告はない。

このように我々の解析技術を活用し、非侵襲的な測定技術により出された値が体内のどの組織のコラーゲンの老化を反映しているのか評価することは可能であると考えている。

## 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7件)

- ①木田吉城, 齋藤充, 丸毛啓史  
骨質マーカーとしてのペントシジンの有用性  
Medical Technology 41:358-359, 2013 有
- ②齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史  
生活習慣病の骨組織: 骨質への影響とその対応  
Osteoporosis Japan 21:84-91, 2013 有
- ③齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史  
新しい医療技術: 週1回テリパラチド注射療法の骨作用  
整形・災害外科 56:273-282, 2013 有
- ④木田吉城, 齋藤充, 丸毛啓史  
骨質からみた骨吸収抑制剤の使い分け-骨質劣化型骨粗鬆症に対する使い分け-  
Bone Joint Nerve 2:325-330, 2011 有
- ⑤齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史 他  
新しい医療技術: 骨質マーカーとしての血

清ペントシジンとホモシステイン  
整形・災害外科 54:723-729, 2011 有

⑥齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史 他  
慢性閉塞性肺疾患 (COPD) における骨脆弱  
化機序の解明-全身性(骨・肺・血管・皮膚・  
血液・尿)コラーゲン分析をもとに-  
Osteoporosis Japan 19:588-591, 2011 有

⑦木田吉城, 齋藤充, 曾雌茂, 丸毛啓史  
非侵襲的骨質(材質)評価法の確立-皮膚  
AGEs リーダー・血/尿中ペントシジンおよ  
び腎機能を指標として-  
Osteoporosis Japan 18:639-642, 2010 有  
〔学会発表〕(計4件)

①Kida Y, Soshi S, Hashimoto K, Marumo K.  
Accuracy and usefulness of a single-time  
multilevel resistration using real-time  
CT system for navigated surgery.  
Spine across the Sea 2012 2012.8.1  
Hawaii

②齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史  
エルデカルシトール投与は新旧骨単位の  
コラーゲンの酵素性架橋を増加させ総  
AGEs およびペントシジン架橋の形成を抑制する(招待講演)  
第14回日本骨粗鬆症学会 2012.9.28 新潟

③齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史  
骨代謝からみた運動器疾患の病態評価-バ  
イオマーカーによる骨質評価-(招待講演)  
第85回日本整形外科学会学術総会  
2012.5.18 京都

④齋藤充, 木田吉城, 丸毛啓史  
尿中ペントシジンおよび血中ホモシステ  
イン高値は脊椎椎体骨折の独立した危険  
因子である(招待講演)  
第85回日本整形外科学会学術総会  
2012.5.18 京都

[その他]

ホームページ:

東京慈恵会医科大学整形外科学講座  
<http://www.jikeiseikei.com>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木田 吉城 (KIDA YOSHIKUNI)  
東京慈恵会医科大学: 医学部・助教  
研究者番号: 90328310

### (2) 研究分担者

齋藤 充 (SAITO MITSURU)  
東京慈恵会医科大学: 医学部・准教授  
研究者番号: 50301528