

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592229

研究課題名(和文) 胃切除後骨障害の病態解明と治療 胃 肝臓 骨連関からのアプローチ

研究課題名(英文) Investigation of gastrectomy-induced bone pathology and treatment: an approach from stomach-liver-bone axis

研究代表者

上田 和樹 (Ueda, Kazuki)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：50405437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの胃切除モデルを作製し、病態を多角的に解析した。Micro CTでは、顕著な骨密度と骨塩量の低下を認めたと、組織学的検索では、骨吸収と骨形成が共に増加する高代謝回転型骨で、石灰化と類骨も増加している "High turnover bone with hyperosteoridosis" であり、今まで知られていない、新しい機序の骨代謝異常が考えられた。そこで本研究では、遺伝子発現の網羅的解析とdata miningによる機能解析を行い、骨では1500個の遺伝子発現レベルが変化すること、その機能解析では、炎症;免疫系の変化が想定された。

研究成果の概要(英文)：Using a gastrectomy (GX) rat model, we showed that GX induced high turnover of bone with hyperosteoridosis, prominent increase of mineralization and increased mRNA expression of both osteocalcin and osteonectin. The increased 1, 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> level and unchanged PTH and calcitonin levels suggested that conventional bone and Ca metabolic pathways were not involved or changed in compensation. Thus, GX-induced bone pathology was different from a typical osteomalacia.

Gene expression profiles through microarray analysis and data mining using Ingenuity Pathway Analysis indicated that 612 genes were up-regulated and 1,097 genes were down-regulated in the GX bone. Network analysis indicated 9 genes were hubs connected with tissue development and immunological diseases. These results suggest that chronic systemic inflammation might underlie the GX-induced pathological changes in bone.

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：Bone histomorphometry parietal cells stomach transcriptosome

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胃切除術後、高率に骨障害を発症するが、その原因はカルシウムの吸収不全による骨軟化症と考えられていた。ラットにおいても胃を切除すると骨量が顕著に低下するが、腸からのカルシウムやビタミン D の吸収障害や上皮小体ホルモン PTH の分泌亢進ではないこと、PTH に非依存性に腎臓でのリン酸排泄の亢進があること、胃体部（酸分泌）の粘膜が重要であること、骨形成の低下ではなく、骨吸収の亢進と報告されていた。私どもは、何らかの骨吸収抑制物質が内分泌され、胃切除による胃粘膜の減少により、骨吸収抑制物質が減少し、結果として骨吸収が促進すると予想した。しかし胃と骨の関係に注目した研究はほとんどなかった。

(2) 私どもは、エストロゲンが胃粘膜（壁細胞）から門脈内へ内分泌され、そのエストロゲンが肝臓にのみ作用していることを報告している（Ueyama T et al. Endocrinology 2002）。エストロゲンは肝臓に存在するエストロゲン $\alpha$ 受容体に結合し、転写を制御する。胃由来のエストロゲンは肝臓で補足されることから、胃から門脈に内分泌される物質（エストロゲンなど）が肝臓に作用し、その作用により、肝臓で産生され、体循環に内分泌される新たな物質を介して、骨代謝に関与するという、全く新規の臓器連関（胃-肝臓-骨）を考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、胃-肝臓-骨の病態の理解、および仲介する物質の同定である。まず、骨病変を組織学的に詳細に解析する。また骨代謝に関わる既知の因子を定量する。胃切除の有無の

間で、肝臓および骨で発現が変化する遺伝子群、血清中のタンパク群を網羅的に比較することにより、肝臓から分泌され、骨代謝を制御する因子を検索、同定する。このため、まず Microarray 解析を行い、肝臓と骨とでそれぞれ、胃摘出群と対照群で発現レベルに差がある遺伝子群を抽出する。また血清中で変化するタンパクを LC-MS/MS で同定、定量する。次に、Bioinformatics の手法を用いて、肝臓と骨代謝をリンクする分泌性タンパクとその遺伝子を抽出する。

## 3. 研究の方法

### (1) 胃切除モデル動物の作成

骨が成熟した 10 週齢のオスラットを用いた。胃を摘出し、食道と十二指腸を端々吻合し、長期間生存させた（GX）。対照ラット（sham）には開腹術を行った。術後体重をモニターし、sham ラットには適宜エサを制限し、体重の変化を GX 群と合わせた。術後 5 週間で、血液を採取し、血清を得た。また肝臓、大腿骨（左右）、頭頂骨を採取した。腎臓、大腸、下垂体、甲状腺、上皮小体などの骨代謝に関与しうる組織も採取した。これらは、直ちにドライアイスで凍結、また RNA 安定化保存液に付けて保存した。一部は 4%パラホルムアルデヒド液で保存した。

### (2) CT による解析

小動物用 X 線 CT (LaTheta LCT-200、Hitachi-Aloka) を用いて、大腿骨を撮影し、付属のソフトで定量した。

### (3) 骨組織化学による解析

GX および sham のラットをサンプリン

グ前に、テトラサイクリンおよびカルセインを皮下投与し、石灰化する骨を蛍光ラベルした。大腿骨および頭蓋冠を 70% アルコールで固定後、Villanueva 染色し、薄切後、骨形態計測のパラメーターを定量した。

#### (4) 血清成分の解析

カルシウム、無機リン、25 (OH) VD<sub>3</sub>、1,25 (OH)<sub>2</sub> VD<sub>3</sub>、PTH、calcitonin を定量した。

#### (5) RNA 発現の解析

結合組織を除去し、凍結粉碎した大腿骨から total RNA を抽出し、骨代謝に関する遺伝子の発現を RT-PCR 法で定量した。

#### (6) Microarray 解析と IPA 解析

大腿骨から抽出した total RNA より、whole rat genome oligo DNA microarray version 3.0 (Agilent) を用いて、網羅的発現解析を行った。

Microarray で発現に差があった遺伝子群の意義付けは Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて行った。

#### (7) 2次元電気泳動と LC-MS/MS による血清蛋白の網羅的解析

血清成分はアルブミンやグロブリンを除去後、GX および sham のサンプルをそれぞれ蛍光ラベルし、2次元電気泳動を行った。発現に差があったスポットについて、サンプリングし、LC-MS/MS にてペプチド配列を決定し、同定、定量した。

#### (8) 胃酸分泌抑制剤の効果

胃切除ではなく、胃酸分泌を抑制するプロトンポンプ阻害薬 (ランソプラゾール) を投与したモデルで解析した。単回投与群として、ランソプラゾール (10、30、100

mg/kg) を経胃的に投与した。対照群は溶媒液を投与した。投与後 3 時間と 6 時間で肝臓を採取し、抗酸化ストレス酵素群の遺伝子発現を RT-PCR 法で、蛋白発現を Western blot 法と免疫組織化学法で検討した。慢性投与群として、ランソプラゾール (30 mg/kg) を 7 日間皮下投与した。慢性投与した後、チオアセトアミド (500 mg/kg) 投与による肝障害モデルを作製し、肝障害の程度を血清酵素と病理組織で評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 実験動物

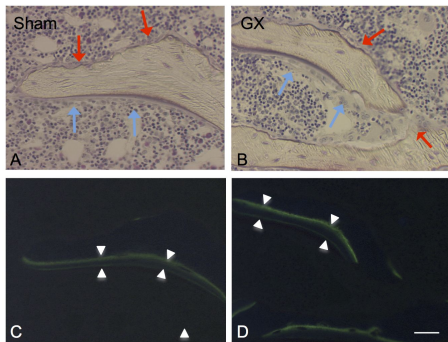
手術時の体重は sham で  $303.7 \pm 1.7$  g (n=12)、GX で  $299.0 \pm 2.2$  g (n=16)、サンプリング時、sham で  $371.0 \pm 10.9$  g (n=12)、GX で  $353.5 \pm 18.3$  g (n=12) で、群間で差がなかった。

### (2) CT による解析

GX では顕著な骨密度と骨塩量の低下を認めた。

### (3) 骨組織化学による解析

組織学的検索では、破骨細胞と骨芽細胞、つまり骨吸収と骨形成が共に増加する高代謝回転型骨で、骨石灰化が亢進する一方、石灰化する前の類骨も増加している”High turnover bone with hyperosteoidis”であり、骨軟化症や閉経後骨粗鬆症とは全く異なった。



赤矢印は破骨細胞、青矢印は骨芽細胞。  
は、石灰化の程度を示す。

#### (4) 血清成分の解析

カルシウムの低下、無機リンの増加、25 (OH) VD<sub>3</sub> の減少、活性型 1,25 (OH)<sub>2</sub> VD<sub>3</sub> の有意な増加を認めた。一方、PTH や Calcitonin レベルは対照群と差がなかった。

#### (5) RNA 発現の解析

大腿骨での骨代謝関係の遺伝子発現では、骨吸収マーカーの tartrate-resistant acid phosphatase 5b mRNA レベル、骨形成マーカーの osteocalcin mRNA レベルともに有意に増加していた。ビタミン D 代謝酵素では腎臓での 1 $\alpha$ -hydroxylase mRNA レベルが有意に増加した。PTH や Calcitonin mRNA レベルも差はなかった。遺伝子発現レベルも組織学的検索や血清生化学検査に相当した変化であった。

#### (6) Microarray 解析と IPA 解析

遺伝子発現の網羅的解析と data mining による機能解析を行い、骨では 1500 個の遺伝子発現レベルが変化すること、その機能解析では、8 個の遺伝子がハブを形成していること、炎症・免疫系の変化が想定された。

#### (7) LC-MS/MS による血清蛋白の網羅的解析

20 種類の血清蛋白に発現変化があった。

#### (8) 胃酸分泌抑制剤の効果

ランソプラゾールの投与により、抗酸化ストレス転写因子 Nrf2 の mRNA、タンパク量の増加および Nrf2 の肝細胞での核内移行を認めた。一方 Nrf2 を結合する Keap1 は mRNA、タンパク量とも変化がなかった。

Nrf2 の下流の HO-1 などの増加を認め、HO-1 免疫陽性が肝細胞にて増加した。

この条件で肝障害を起こすと、コントロール群（非投与群）に比べ、ランソプラゾール投与群では、肝障害が有意に軽減した。

以上、骨の病的変化を micro CT および骨形態計測で詳細に検討し、教科書の記載のような骨軟化症ではなく、“High turnover bone with hyperostoidis”と命名した特異な組織像であることを明らかにした。血清生化学検査でもビタミン D レベルはむしろ激増し、骨軟化症ではあり得ないこと、calcitonin や PTH など従来因子には差がないことを明らかにした。遺伝子発現でもこれらを裏付けた。従って、予想通り未知の因子（群）の変化があると考えられた。骨での遺伝子の網羅的解析と data mining を行い、いくつかの鍵となる遺伝子群を見いだした。また血清蛋白の網羅的解析で、骨代謝のバイオマーカーとなりうる因子を抽出できた。

胃酸分泌を抑制するランソプラゾールに、肝臓で抗酸化ストレス耐性を高める効果があることが新たに分かった。良く知られた薬効とは異なる作用であり、肝疾患への効果が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 2 件)

Ueyama T, Yamamoto Y, Ueda K, Yajima A, Maeda Y, Yamashita Y, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M. Is gastrectomy-induced high turnover of bone with hyperosteoridosis and increase of mineralization a typical osteomalacia? PLoS ONE 2013, 8(6): e65685. doi:10.1371/journal.pone.0065685  
査読有

Yamashita Y, Ueyama T, Nishi T, Yamamoto Y, Kawakoshi A, Sunami S, Iguchi M, Tamai H, Ueda K, Ito T, Tsuruo Y, Ichinose M. Nrf2-inducing anti-oxidation stress response in the liver - New beneficial effect of Lansoprazole. PLoS ONE, 2014, 9(5): e97419. doi:10.1371/journal.pone.0097419  
査読有

[ 学会発表 ] (計 4 件)

山下泰伸、上田和樹、玉井秀樹、一瀬雅夫  
急性肝障害に対するランソプラゾールの有効性 第 50 回日本肝臓病学会  
2014.5.30、東京

上山敬司、山下泰伸、西 利男、山本悠太、玉井秀樹、伊藤隆雄、鶴尾吉宏、一瀬雅夫  
ランソプラゾールの新規薬効-肝臓における転写因子Nrf2の誘導と抗酸化ストレス作用 第87回日本薬理学会 2013.3.19、  
仙台

上山敬司、山本悠太、伊藤隆雄、鶴尾吉宏  
胃切除後の骨障害の解析 第 118 回日本解剖学会総会 2013.3.30、高松

上山敬司、鶴尾吉宏 胃切除後骨障害モデ

ルの病態解析 第 85 回日本内分泌学会、  
2012.4.21、名古屋

[ 産業財産権 ]

出願状況 (計 1 件)

名称：ランソプラゾールの新規医薬用途

発明者：上山敬司、山本悠太、西 利男、山下泰伸、一瀬雅夫、松尾孝徳

権利者：公立大学法人和歌山県立医科大学、武田薬品工業株式会社

種類：特許

番号：出願願 2014-017958 号

出願年月日：26年1月31日

国内外の別：国内

6. 研究組織

( 1 ) 研究代表者

上田 和樹(Ueda, Kazuki)

和歌山県立医科大学・医学部・第二内科・博士研究員

研究者番号：50405437

( 2 ) 研究分担者

上山 敬司(Ueyama, Takashi)

和歌山県立医科大学・医学部・解剖学第一・准教授

研究者番号：50264875