

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461548

研究課題名(和文)ビスフォスフォネートによる骨細胞機能制御機構の解明

研究課題名(英文)Study of the effect of bisphosphonate on osteocyte function and bone formation

研究代表者

北岡 太一 (Kitaoka, Taichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20599229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨形成不全症に対するビスホスホネート(BP)治療が骨形成に与える影響を、骨形成抑制因子であるスクレロスチンに着目して検討した。BP治療経過中にスクレロスチンは有意な変化を示さなかった。一方、BP治療中に測定したパラメーターのうち、骨形成マーカーである骨型アルカリホスファターゼ(BAP)がスクレロスチンの変化に寄与する可能性が示された。小児期の成長に伴いBAPの値は変化する。BP治療および成長に伴う骨形成への影響とスクレロスチンとの関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the levels of sclerostin, an inhibitor of bone formation, during bisphosphonate treatment in patients with osteogenesis imperfecta, and evaluated the influence of bisphosphonate on bone formation. Serum sclerostin concentration did not change significantly during the bisphosphonate treatment. On the other hand, bone-specific alkaline phosphatase (BAP), a bone formation marker, was associated significantly with the change of sclerostin levels. Since the levels of BAP gradually increased during childhood, it was suggested that the change of sclerostin levels may, in part, contribute to the effect of bone formation with bisphosphonate treatment and the growth.

研究分野：医歯薬学，内科系臨床医学，小児科学，小児内分泌学

キーワード：スクレロスチン 骨形成不全症 ビスホスホネート 骨代謝マーカー

1. 研究開始当初の背景

リン制御因子である線維芽細胞増殖因子 23 (FGF23) は、尿細管におけるナトリウム・リン共輸送体および 1- α -水酸化酵素の発現低下をもたらす、血中リン濃度を低下させる。FGF23 は主に骨細胞ないし骨芽細胞から分泌されているが、その制御機構の詳細は明らかにされていない (L Darryl Quarles. Nat Rev Endocrinol 2012)。

骨形成不全症は、骨脆弱性、低骨密度、青色強膜、および象牙質形成不全症を特徴とする遺伝性骨系統疾患で、その約 90% は 1 型コラーゲン遺伝子である *COL1A1* および *COL1A2* の異常による。一般的には臨床症状と重症度に基づき 4 つの病型に分類される (Silence 分類)。骨形成不全症の治療としてビスホスホネート製剤の一つであるパミドロネートの周期的投与が確立されている。

申請者は、骨形成不全症児に対するビスホスホネート治療における FGF23 濃度の変化を検討し、FGF23 濃度の低下が血清リン値の低下と同じかそれより早い段階から起こることを見出した (Kitaoka T. J Bone Miner Metab 2011)。これはビスホスホネートの骨細胞への直接作用の可能性を示唆する結果であり、他の骨細胞由来因子も同様に制御されている可能性がある。この機序の解明は、骨細胞機能制御機構の解明のみならず、種々の骨疾患に対する新規治療の開発につながると思われる。

主に骨細胞において発現すると考えられている遺伝子として、FGF23 以外に、*DMP1*、*SOST*、*PHEX*、*MEPE* 等が報告されている。その一つである *SOST* は sclerosteosis の原因遺伝子として発見され、遺伝子産物であるスクレロスチンは、Wnt シグナルを抑制することで骨量調節に関与することが知られている。骨細胞から分泌されたスクレロスチンを阻害することにより、骨形成が誘導されることが報告されており、骨粗鬆症に対する臨床応用として抗スクレロスチン抗体の治療も進行中である (Tilman D Rachner. Lancet 2011, Aline G Costa. Curr Osteoporos Rep 2012)。

血中のスクレロスチン濃度とビスホスホネート治療の関係については、長期的な評価において用量依存的に増加することが報告されているが (Gatti, D. Bone 2012)、急性期について検討された報告は無い。我々は、ビスホスホネート治療による骨細胞機能への影響として FGF23 を検討したが、今回はより骨細胞特異的なスクレロスチンに焦点をしばって研究を行う。ビスホスホネートによるスクレロスチンの低下を示すことができれば、骨吸収抑制のみならず、骨形成促進もビスホスホネートによる骨量増加の機序の一部を担っている可能性を示唆される。

2. 研究の目的

ビスホスホネート治療が骨細胞に対して

直接的な影響を与えていることを検証するために、骨形成不全症に対するビスホスホネート治療において、FGF23 以外の骨細胞由来因子である血清スクレロスチン濃度の経時変化について検討することを目的とした。

一方、血清スクレロスチン濃度が、骨形成不全症に対するビスホスホネート治療において、治療効果等の臨床上的指標となる可能性を考慮し、骨代謝マーカー、骨密度および臨床病型との関連について検討することも目的とした。

3. 研究の方法

患者より採取した血清検体を用いてのスクレロスチンおよび FGF23 濃度の測定に関しては、倫理委員会の承認を受けている。

(1) 骨形成不全症児に対するパミドロネート治療によるスクレロスチン濃度の経時変化の検討

対象: 周期的パミドロネート点滴治療施行中の骨形成不全症児 10 名 [男児 3 名、年齢 1.8 ~ 9.2 歳 (中央値 5.5 歳)]

方法: 連日 3 日間のパミドロネート (年齢に応じて 1 回投与量を調節し、年 9mg/kg) 点滴治療の前、点滴後 3 日目、5 日目に血液を採取し、血清中のカルシウム (Ca)、リン (P)、intact PTH (iPTH)、1,25(OH)₂D、骨型アルカリフォスファターゼ (BAP)、1 型コラーゲン N テロペプチド (NTx)、TRACP5b、FGF23 (ELISA, Kainos Laboratories) およびスクレロスチン (ELISA, BIOMEDICA) を測定し、パミドロネート投与による急性期変化を検討した。検体の採取は食事時の Ca および P の影響を除くため、早朝空腹時の採血とした。

(2) 骨形成不全症児に対するビスホスホネート治療によるスクレロスチン濃度の長期的な経時変化の検討

対象: ビスホスホネート治療中の骨形成不全症児 18 名 [男児 4 名、年齢 2.5 ~ 15.2 歳 (中央値 7.2 歳)、周期的パミドロネート点滴治療施行例 14 名、経口ビスホスホネート製剤内服治療例の 4 名]

方法: 治療経過中の血清 Ca、P、iPTH、1,25(OH)₂D、BAP、NTx およびスクレロスチン濃度の長期的な経時変化を検討した。周期的パミドロネート点滴治療例については各周期のパミドロネート点滴治療前のパラメーターを選択した。

(3) 骨形成不全症児に対するビスホスホネート治療によるスクレロスチン濃度の変化と治療効果の検討

対象: 周期的パミドロネート点滴治療施行中の骨形成不全症児 10 名 [1 型 4 名、7.8 ~ 16.5 歳、中央値 9 歳; 3 型 3 名、5.8 ~ 9.3 歳、中央値 7.8 歳; 4 型 3 名、5.3 ~ 6.9 歳、中央値 6.8 歳]

方法：周期的パミドロネート治療中の腰椎骨密度(L1-L4 BMD)、骨折頻度、NTx、BAP および側弯について治療前後の変化および変化量について検討した。

4. 研究成果

(1) 骨形成不全症児に対するパミドロネート治療によるスクレロスチン濃度の経時変化の検討

パミドロネート点滴治療により Ca、P は治療 3 日目より有意に低下し(各々 $p=0.0101$, $p=0.0236$)、低 Ca 血症に反応して iPTH および $1,25(OH)_2D$ は治療 5 日目に有意な上昇を認めた(各々 $p=0.001$, $p<0.0001$)。また骨代謝マーカーの推移については、骨吸収マーカーである NTx は治療後有意に低下するが($p=0.0007$)、骨形成マーカーである BAP は有意な変化を認めず、また破骨細胞機能マーカーである TRACP5b も有意な変化を認めなかった。一方、骨細胞関連因子については、治療後 3 日より FGF23 の有意な低下を認めるものの($p=0.0036$)、スクレロスチンは治療経過中に有意な変化を認めなかった。

そこでビスホスホネート治療が骨細胞に与える影響を評価するため、骨代謝マーカーである NTx および BAP、破骨細胞機能マーカーである TRACP5b を説明変数として、スクレロスチンに影響を及ぼす因子を重回帰分析により検討したところ、寄与率は高くないが妥当な重回帰式が予測され、有意な説明変数として BAP が示された(表)。骨形成マーカーである BAP の値は、小児期の成長に伴い変化する。一方、スクレロスチン濃度と年齢との間には有意ではないがゆるい負の相関を認めた。骨形成不全症に対するビスホスホネート治療によるスクレロスチン濃度の変化は、ビスホスホネート治療および成長に伴う骨形成への影響と関連している可能性が示唆された。

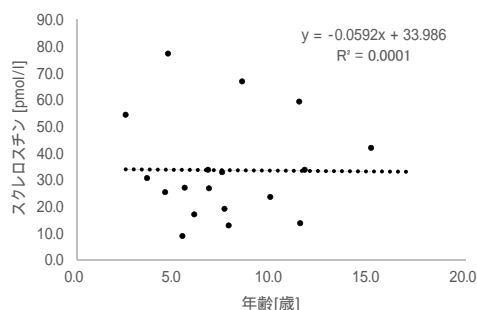
表. 重回帰分析の結果

	標準化	p 値	VIF
BAP	0.6465	0.021	1.229
NTx	-0.5698	0.056	1.547
TRACP5b	0.5027	0.068	1.340

(2) 骨形成不全症児に対するビスホスホネート治療によるスクレロスチン濃度の長期的な経時変化の検討

長期的なビスホスホネート治療の経過中、Ca、P、iPTH および $1,25(OH)_2D$ 値については有意な変化を認めず、基準値内での推移であった。骨代謝マーカーである NTx および BAP についても有意な変動は認めなかった。一方、スクレロスチン濃度は、症例により変化の幅が大きく(最大値と最小値の差 = 16.9~74.7、中央値 30.9)、また、増加および減少といった一定の傾向を認めなかった。各症例の最終測定値でのスクレロスチン濃度の分布は図

図. スクレロスチン濃度と年齢の関係



の通りで、年齢との間に相関は認めなかった。

長期的なビスホスホネート治療が骨細胞に与える影響を評価するため、各パラメータを説明変数として、スクレロスチンに影響を及ぼす因子を重回帰分析により検討したが、有意な結果は得られなかった。

(3) 骨形成不全症児に対するビスホスホネート治療によるスクレロスチン濃度の変化と治療効果の検討

ビスホスホネート治療により腰椎骨密度は増加したが、1 型において有意な増加を認めるのみであった($p=0.003$)。骨折頻度については、1 型、3 型および 4 型の全てで減少傾向を認めるものの有意差は認めなかった。重症例である 3 型では骨折頻度および骨密度の改善が不良で、また骨折頻度の高い症例では *COL1A1* および *COL2A2* 遺伝子のグリシン変異を有していた。

ビスホスホネート治療開始前からの各パラメータの変化量の検討では、骨形成マーカー(BAP)と骨吸収マーカー(NTx)に正の相関を認めた($r=0.7515$, $p=0.012$)。これはビスホスホネート治療による骨代謝回転の抑制効果を示していると考えられ、骨代謝マーカーが治療中の骨リモデリング維持の指標になる可能性が示唆された。

Cobb 角 11 度以上の側弯を有する症例において、パミドロネート治療と側弯の関連について検討したところ、NTx と有意ではないが正相関を認め、骨吸収抑制効果が強いほど側弯の程度が軽度である傾向が認められた。

1 型、3 型および 4 型でのスクレロスチン濃度に有意な差は認めなかった。ビスホスホネート治療による各パラメータの変化量について、スクレロスチン濃度に影響する要素を探索したが、有意な因子は検出されなかった。これに関しては、各病型における検討症例数の影響が加味されるため、今後さらに検証を進める必要があると考えられた。

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 1 件)

大藪恵一、北岡太一、窪田拓生、難波範行。

遺伝性骨粗鬆症. 最新の骨粗鬆症学
骨粗鬆症の最新知見 , 査読なし, 71 増刊
号 2 : 583-588, 2013

[学会発表](計4件)

Varoona Bizaoui-Auffret, Takuo Kubota,
Yasuhisa Ohata, Nobutoshi Nawa,
Hirofumi Nkayama, Keiko Yamamoto,
Makoto Fujiwara, Taichi Kitaoka,
Satoshi Takakuwa, Noriyuki Namba,
Keiichi Ozono. Correlation between
genotype and phenotype in patients
with osteogenesis imperfecta using
targeted exome sequencing. 第 48 回
発育異常研究会: 2015/6/20, 大阪

難波範行. 小児の骨と成長: 骨系統疾患
の translational research. 第7回 西
日本小児内分泌研究会: 2015/2/21, 熊本
北岡太一. 新生児期から見られる骨系統
疾患の理解. 第 59 回 日本未熟児新生児
学会: 2014/11/10-12, 松山

中山尋文, 北岡太一, 藤原誠, 大幡泰久, 窪
田拓生, 高桑聖, 難波範行, 大藺恵一, 柏井
将文, 吉川秀樹. 周期的パミドロネート
静注療法の骨形成不全症児の側弯に対す
る効果. 第 48 回 日本小児内分泌学
会: 2014/9/25-27, 浜松

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北岡 太一 (KITAOKA, Taichi)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 20599229

(2) 研究分担者

難波 範行 (NAMBA, Noriyuki)

大阪大学・大学院医学系研究科・招聘教員

研究者番号: 10379076