

# 平成 26 年度研究報告書

研究代表者

所属 島根大学医学部内科学講座 内科学第一

氏名 山内 美香、杉本利嗣

## 1. 研究テーマ

新たな骨質評価マーカーの解明：骨細胞分泌因子の関与の検討

## 2. 研究者氏名

山内美香<sup>1)</sup>、名和田清子<sup>1)2)</sup>、清原信昭<sup>1)</sup>、杉本利嗣<sup>1)</sup>

島根大学医学部内科学講座内科学第一<sup>1)</sup>、島根県立大学健康栄養学科<sup>2)</sup>

## 3. 研究概要

(目的)

超高齢社会突入後も高齢化が進み続けているわが国、わが県において、介護予防、健康寿命の延伸が急務である。その点で重要な疾患の一つに骨粗鬆症がある。より骨折しやすい人を早く見つけて、治療介入することが重要である。これまで、骨粗鬆症の診断は骨密度によって行われてきたが、骨密度で表される骨強度は 70%程度で、骨密度のみでは表されないとされる。骨密度以外の骨強度に関与する因子は骨質と表現され、骨質劣化型の骨粗鬆症が存在することが明らかとなってきた。そこで、新たな骨質評価マーカーを解明することを目的とする。Ca、P、ビタミン D 代謝の異常が、骨質劣化に関与する可能性があるため、生理的状況において、Ca、P、ビタミン D 代謝に関与する因子を明らかにする。

近年、骨細胞が分泌するスクロスチンが骨形成に重要な Wnt  $\beta$  カテニン系シグナルの抑制因子であることが明らかとなった。また、同様に骨細胞が分泌する FGF-23 は  $\alpha$  Klotho とともにリンやビタミン D 代謝に関与する。そこで、スクロスチンや FGF-23、 $\alpha$  Klotho と Ca 代謝および骨代謝との関係を検討し、骨質評価マーカーとなりうるか否かを検討する。

(方法)

### 1) 対象

骨粗鬆症健診受診者のうち、本研究に対して同意の得られた健常閉経後女性 174 名を対象とした。骨代謝に影響を及ぼす疾患の合併や薬剤の服用歴を認めるものは除外した。

## 2) 検査項目

骨粗鬆症健診を受けた健常閉経後女性 174 名を対象とした。血液検査において Ca (mg/dL)、P (mg/dL)、Cr (mg/dL)、intact PTH (pg/mL)、25(OH)D (ng/mL)、骨形成マーカーである I 型プロコラーゲン N-プロペプチド(P1NP) (ng/mL)、オステオカルシン(OC) (ng/mL)、骨吸収マーカーである I 型コラーゲン架橋 C-テロペプチド(CTX) (ng/ml)を測定した。また、既報の ELIZA 法を用いた方法にて患者血清における可溶性  $\alpha$  Klotho (pg/mL)濃度を測定した<sup>1)</sup>。尿検査にて uCa (mg/dL)、uCr (mg/dL)、uP (mg/dL)を測定し、eGFR (estimated glomerular filtration rate) (ml/min/1.73m<sup>2</sup>)、尿中 Ca/Cr 比、FECa (%)、リン再吸収率 (tubular reabsorption of phosphate: %TRP)を算出した。

また、DXA 法で腰椎、大腿骨頸部骨密度を測定し、椎体骨折の有無を判定した。非椎体骨折の有無は医師による聴取により確認した。非外傷性の椎体骨折および非椎体骨折のいずれかを有する者を脆弱性骨折有りと判定した。

## 3) 統計学的解析

統計解析は SPSS-17.0 を用い、いずれの場合も危険率 5%未満をもって有意とした。

## (結果)

### 1) 対象者の背景

対象群の平均年齢(mean±SD)は 63.2±7.4 歳であった。(表 1)。

### 2) 可溶性 $\alpha$ Klotho と各因子における単回帰分析

可溶性  $\alpha$  Klotho は年齢、BMI と相関を認めなかった(図 1)。

また、可溶性  $\alpha$  Klotho は Cr、eGFR (図 2)、Ca (図 3)、intact PTH、25(OH)D (図 4)、P1NP、CTX、OC、uCa/uCr、FECa、および骨密度と相関を認めなかったが、P ( $r=-0.156$ ,  $p=0.040$ ) (図 3)、および%TRP ( $r=-0.178$ ,  $p=0.019$ ) と有意な負相関を認めた。(図 5)。

### 3) 可溶性 $\alpha$ Klotho と P および%TRP における重回帰分析

可溶性  $\alpha$ -Klotho と P は年齢を考慮すると相関を認めなかった。一方、可溶性  $\alpha$  Klotho は年齢、BMI、Ca、intact PTH、25(OH)D、FGF23、HDL-C、カルシウム摂取量、リン摂取量、ビタミン K 摂取量で補正後も %TRP と有意な負相関を認めた ( $r=-0.172$ ,  $p=0.038$ ) (図 6)。

#### 4) 脆弱性骨折の有無での FGF23 および $\alpha$ Klotho の比較

FGF23 および  $\alpha$  Klotho は椎体骨折、非椎体骨折、および全脆弱性骨折の有無での検討において、いずれも骨折有り群と無し群で有意差を認めなかった。

#### (考察)

$\alpha$  Klotho は早期老化様症状を呈する突然変異マウスの原因遺伝子として同定された<sup>2)</sup>。 $\alpha$  Klotho は副甲状腺、腎臓尿細管、脳の脈絡膜で発現しており、 $\alpha$  Klotho 遺伝子ノックアウトマウスは血中 Ca、P、1,25(OH) $D_2D_3$  の著明な上昇を認め、その後の分子機能解析により、Ca-P 代謝調節因子であることが明らかとなった<sup>3)</sup>。 $\alpha$  Klotho は細胞膜上に存在するタイプと、細胞膜貫通ドメインの直上で切断された分泌されるタイプが知られており、膜型  $\alpha$  Klotho は FGF 受容体(FGFR1)、FGF23 と複合体を形成することで、ビタミン D の活性化や P 利尿に関与する。一方、細胞外ドメインで切断された可溶性  $\alpha$  Klotho は血中、尿中、脳脊髄液中に存在するが<sup>4)</sup>、その機能の詳細は明らかとなっていない。 $\alpha$  Klotho は  $\beta$ -glucuronidase 活性を示し、この作用により  $\alpha$  Klotho が結合蛋白の特殊な糖鎖構造を認識することで、FGFR1 が FGF23 と選択的に結合することを可能にしていると考えられている。一方、可溶性  $\alpha$  Klotho も  $\beta$ -glucuronidase 活性を保持していることから可溶性  $\alpha$  Klotho が酵素、あるいはグルクロン酸結合蛋白としての機能を有する可能性が示唆されている。実際、可溶性  $\alpha$  Klotho が NaPi-2a 蛋白の N 型糖鎖に作用し、NaPi-2a 蛋白が分解されやすくしているとの報告がある<sup>5)</sup>。本検討では生理的範囲において可溶性  $\alpha$  Klotho が Ca、P、ビタミン D 代謝に関与するか、そして骨折の予測因子となるか、もしなるとすると FGF23 と独立したものを、健常閉経後女性において検討した。今回の可溶性  $\alpha$  Klotho が %TRP と負相関を示すとの結果を得た。可溶性  $\alpha$  Klotho 自身がヒトにおける生理的状態においても、P 代謝に関与する可能性を初めて明らかにした。

一方、 $\alpha$  Klotho、FGF23 はいずれの骨折の有無でも差を認めず、骨脆弱性の予測因子としては選択されなかった。FGF23、 $\alpha$  Klotho は腎機能との関連を有するため、腎機能別に検討しこれらが骨折予測因子となりうるかを検討していく予定である。

(結語)

可溶性 $\alpha$  Klotho 自身がP代謝をはじめとするミネラル代謝異常症に関与する可能性がある。

## 文献

- 1) Yamazaki Y, et al: Establishment of sandwich ELISA for soluble alpha-Klotho measurement: Age-dependent change of soluble alpha-Klotho levels in healthy subjects. *Biochemical and biophysical research communications* 398: 513-518, 2010.
- 2) Kuro-o M, et al: Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390: 45-51, 1997.
- 3) Yoshida T, et al: Mediation of unusually high concentrations of 1,25-dihydroxyvitamin D in homozygous klotho mutant mice by increased expression of renal 1alpha-hydroxylase gene. *Endocrinology* 143: 683-689, 2002.
- 4) Imura A, et al: Secreted Klotho protein in sera and CSF: implication for post-translational cleavage in release of Klotho protein from cell membrane. *FEBS letters* 565: 143-147, 2004.
- 5) John GB, et al: Role of Klotho in aging, phosphate metabolism, and CKD. *Am J Kidney Dis* 58: 127-134, 2011.

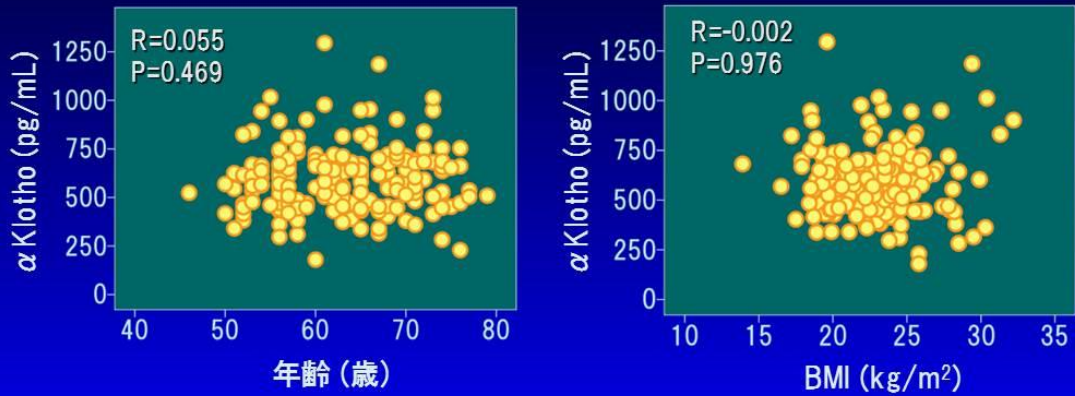
図表

表 1. 対象群の背景

Background Data			
	Mean ± SD		Mean ± SD
n (名)	174	FBS (mg/dL)	91 ± 9
椎体骨折者 (名)	37	HbA <sub>1c</sub> (%)	5.3 ± 0.4
非椎体骨折者 (名)	31	Cr (mg/dl)	0.58 ± 0.10
全脆弱性骨折者 (名)	61	eGFR (ml/min/1.73m <sup>2</sup> )	82.0 ± 15.0
年齢 (歳)	63.2 ± 7.4	Ca (mg/dL)	9.1 ± 0.3
閉経後年数(年)	13.1 ± 8.0	P (mg/dL)	3.5 ± 0.4
身長 (cm)	151.8 ± 5.4	intactPTH (pg/mL)	45.0 ± 14.0
体重 (kg)	52.7 ± 7.3	25(OH)D (ng/mL)	16.0 ± 4.3
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.9 ± 3.1	FGF23 (pg/mL)	34.0 ± 9.2
TG (mg/dL)	86 ± 41	α - Klotho (pg/mL)	596.7 ± 171.9
LDL-C (mg/dL)	132 ± 28	Uca/Ucr (mg/dL)	0.10 ± 0.06
HDL- C (mg/dL)	67 ± 16	FECa (%)	0.61 ± 0.32
		%TRP (%)	89.1 ± 3.6

図 1. 閉経後女性における可溶性 α Klotho と年齢および BMI との単相関

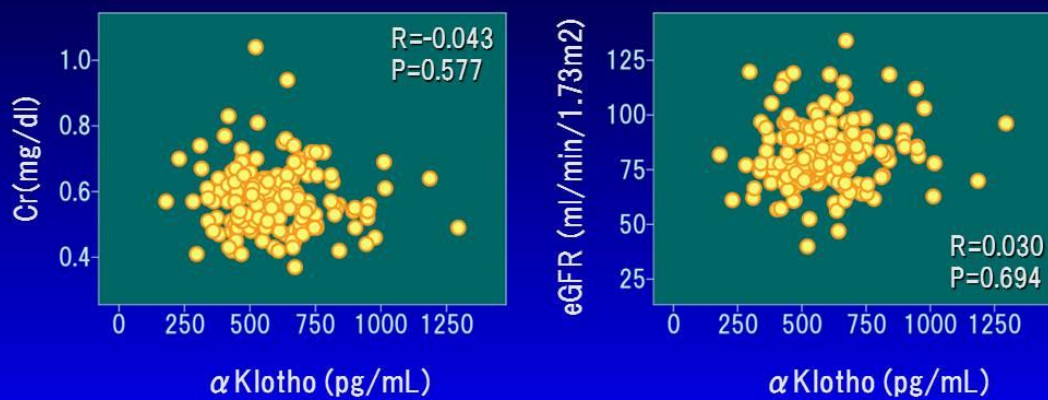
## 閉経後女性における $\alpha$ Klothoと年齢及びBMIの関係



Spearman's rank correlation coefficient

図 2. 可溶性 $\alpha$ Klotho と Cr および eGFR との単相関

## 閉経後女性におけるCr及びeGFRと $\alpha$ Klothoの関係



Spearman's rank correlation coefficient

図 3. 可溶性  $\alpha$  Klotho と血中 Ca および P 濃度との単相関

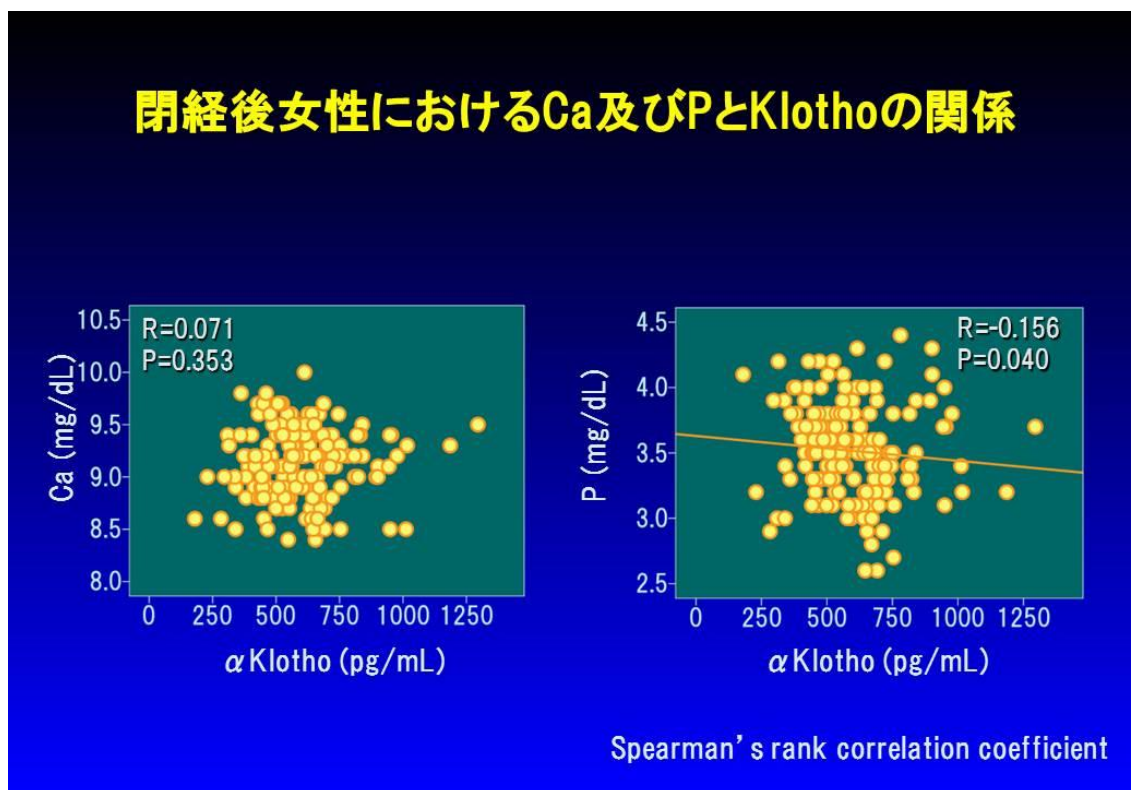
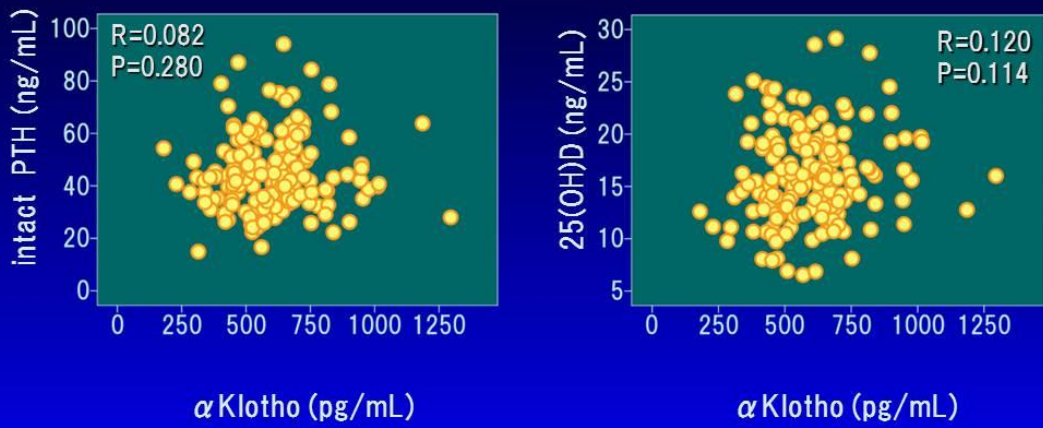


図 4. 可溶性  $\alpha$  Klotho と血中 PTH および 25(OH)D 濃度との単相関

## 閉経後女性におけるPTH及び25(OH)DとKlothoの関係



Spearman's rank correlation coefficient

図 5. 可溶性  $\alpha$  Klotho と %TRP との単相関

## 閉経後女性における%TRPと $\alpha$ Klothoの関係

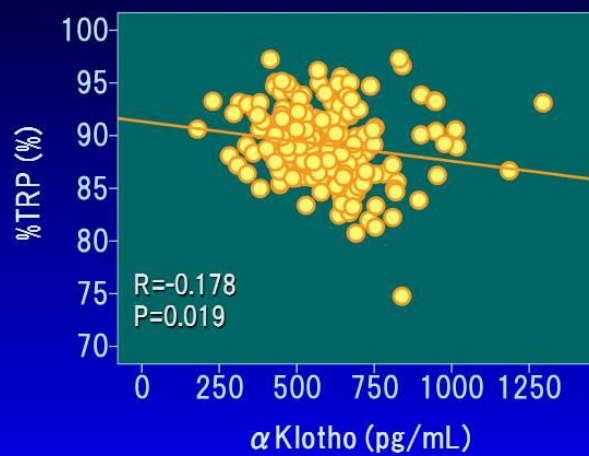




図 6. 可溶性  $\alpha$  Klotho と %TRP における重回帰分析

独立変数		Log( $\alpha$ -Klotho)	
		r	p
%TRP	補正なし	-0.204	0.007
	年齢	-0.204	0.007
	年齢、BMI	-0.203	0.008
	年齢、BMI、Ca、PTH、25(OH)D、FGF23	-0.175	0.031
	年齢、BMI、Ca、PTH、25(OH)D、FGF23、HDL-C、カルシウム摂取量、リン摂取量、ビタミンD、ビタミンA	-0.198	0.016
	年齢、BMI、Ca、PTH、25(OH)D、FGF23、HDL-C、カルシウム摂取量、リン摂取量、ビタミンK	-0.172	0.038

4. 学会機関誌もしくは学会への関連論文（演題）発表状況

論文

- 1) Yamauchi M, Yamaguchi T, Nawata K, Tanaka K, Takaoka S, Sugimoto T: Increased low-density lipoprotein cholesterol level is associated with non-vertebral fractures in postmenopausal women. *Endocrine*. 48:279-86, 2015
- 2) Tanaka K, Kanazawa I, Yamaguchi T, Yano S, Kaji H, Sugimoto T: Active vitamin D possesses beneficial effects on the interaction between muscle and bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 450: 482-487, 2014
- 3) 山内美香, 杉本利嗣: Ca 検査値異常のアプローチ, *日本内科学会雑誌*, 103: 870-877, 2014

学会発表

- 1) Nawata K, Yamauchi M, Yamamoto M, Tanaka K-I, Ogawa N and Sugimoto T: Relationship between soluble  $\alpha$  klotho and nutritional intake in

postmenopausal women, 24th annual scientific meeting of Australian and New Zealand Bone and Mineral Society, Queenstown, 2014 in September

- 2) Yamaguchi T, Tada Y, Kanazawa I, Morita M, Furuya N, Yamamoto M, Yamauchi M and Sugimoto T: Intensive glyceemic control improved the excretion of urine mineral ions in type 2 diabetes mellitus, 24th annual scientific meeting of Australian and New Zealand Bone and Mineral Society, Queenstown, 2014 in September
- 3) 杉本利嗣: シンポジウム、骨粗鬆症治療における薬剤選択とその長期展望、テリパラチドの適応症例、第 16 回日本骨粗鬆症学会、東京、2014.10.23
- 4) 田中賢一郎, 金沢一平, 山口徹, 梶博史, 杉本利嗣: AGE2、3 及び活性型ビタミン D の筋芽細胞分化及び骨芽細胞分化促進因子 Osteoglycin 発現に及ぼす影響、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2014.7.24-26
- 5) 名和田清子, 山内美香, 田中賢一郎, 小川典子, 杉本利嗣: 閉経後女性における可溶性  $\alpha$  klotho と栄養摂取量の関係についての検討、第 32 回日本骨代謝学会学術集会、大阪、2014.7.24-26
- 6) 杉本利嗣: パネルディスカッション、骨粗鬆症治療の今後の展望、骨形成促進剤: Daily と Weekly PTH の相違点第 87 回日本整形外科学会学術総会、神戸、2014.5.23
- 7) 田中賢一郎, 金沢一平, 山口徹, 梶博史, 杉本利嗣: 活性型ビタミン D は AGE2、3 による筋芽細胞分化抑制及び骨芽細胞分化促進因子 Osteoglycin 発現抑制を回復させる、第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡、2014.4.24-26
- 8) 山内美香、杉本利嗣: クリニカルアワー; 骨・ミネラル代謝異常症診療の進歩、骨粗鬆症診療の state-of-the-art、第 87 回日本内分泌学会学術総会、福岡、2014.4.24-26