

学位論文題名

Bone metabolism and oxidative stress  
in postmenopausal rats with iron overload

(閉経ラットの鉄負荷による骨代謝と酸化ストレス)

学位論文内容の要旨

結論

骨粗鬆症は、多元的要因により発症する疾患であるが、最近、酸化ストレスとの関連性が指摘されている。ROS は内因性の酸素代謝同様、種々の環境因子により産生される。そして、加齢変化やアテローム性動脈硬化症、発癌、骨粗鬆症のような多くの疾病の原因であると考えられている。特に、骨粗鬆症は閉経後の女性にとってもっとも重大な加齢に関係した疾患の一つである。興味深いことに、Polidori らは酸化ストレスの蓄積を原因とする骨粗鬆症が、比較的若い男性に発症したことを報告している。また、破骨細胞により産生された ROS が直接骨吸収に関与していることも立証されている。更に、骨芽細胞が ROS に対し防御する GPx のような抗酸化因子を産生すること、また、骨吸収に関連する TGF- $\beta$  も産生する事が報告されている。しかしながら、どのような機構で ROS が骨組織の破壊を促進し、骨吸収を惹起させるのか明らかでない。従って、著者らは鉄添加食により骨に蓄積された鉄イオンが過酸化水素存在下で OH ラジカルを産生するフェントン反応に注目して、乳酸鉄投与による閉経ラットの酸化ストレスと骨代謝の関係を骨代謝マーカー、酸化ストレスマーカー、サイトカインなどの指標を用いて研究した。

実験方法

実験動物として 57 週令の Wistar 系閉経ラットと 7 週令 Wistar 系若年メスラットを使用した。2 週間普通食を与えた後、5%乳酸鉄添加飼料で 28 日間飼育し、尿、血液を採取し、glutathione peroxidase (GPx) 活性、Alkaline phosphatase 活性、TGF- $\beta$ 、オステオカルシン、オステオポンチン、デオキシピリジノリン、カルシウム、リン、 $\gamma$ -Carboxyglutamic acid (Gla)、8-OHdG について定量分析した。

結果

閉経ラットは血清アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン共に若年メスラットに比べ有意に減少した ( $P<0.01$ )。対照的に、血清カルシウム、リン濃度は若年メスラット、閉経ラット共に同じ値を示した。一方、4週間乳酸鉄添加食グループの血清アルカリフォスファターゼ活性は変化しなかったが、オステオポンチンは、コントロール食グループに比べ、有意に増加した ( $P<0.01$ )。尿中デオキシピリジノリン、カルシウム、リン量は同じ値であったが、Glaの排泄は閉経ラットに比べ若年メスラットの方が有意に高かった。乳酸鉄添加食グループはコントロール食に比べ、デオキシピリジノリンで2.7倍、カルシウムで2倍と有意に増加した。対照的にリン排泄量はコントロール食に比べ有意に減少した。しかし、Glaは変化しなかった。重要なことに、血清鉄量と尿中デオキシピリジノリン排泄量は尿中カルシウム量同様に、有意な正の相関が見られた。一方、尿中8-OHdG及び、血清GPxのような酸化ストレスに対する生物学的マーカーは、乳酸鉄添加食はコントロール食に比べて、血清GPx活性を有意に減少させたが、8-OHdGは増加させた ( $P<0.01$ )。興味深いことに、若年メスラットは閉経ラットに比べてGPx活性が有意に高かった ( $P<0.01$ )。尚、8-OHdGは若年メスラット、閉経ラットとも同じ値であった。酸化ストレスと血清TGF- $\beta$ 量との関係については、乳酸鉄添加食はコントロール食に比べて、閉経ラットの血清TGF- $\beta$ の濃度を増加させた。そして、乳酸鉄添加食は、コントロール食に比べ血清鉄濃度で1.8倍、尿中铁濃度で30倍に増加させた。興味あることに、血清TGF- $\beta$ と血清及び尿中铁濃度の間に正の相関が認められた ( $r=0.836, P<0.001$  in serum;  $r=0.777, P<0.002$  in urine)。また、TGF- $\beta$ は血清GPx活性と負の相関を示した ( $r=0.674, P<0.003$ )。

## 考察

著者らはこの研究でROS、酸化ストレス、骨吸収マーカーがそれぞれ骨粗鬆症に関連することを明らかにした。すなわち、閉経ラットにおける乳酸鉄添加食は、コントロール食に比べ、骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン量、カルシウム量を有意に増加させた。また、血清、尿中铁濃度の増加を反映して、血清GPx活性を有意に減少させ、尿中8-OHdGを増加させた。事実、Dreherらは骨をとりまく微小環境や破骨細胞で産生されるROSに対し、GPxを介する抗酸化防御の重要性を指摘している。彼らは、GPxの欠損、もしくは減少が骨芽細胞の機能を低下させ、その結果、骨粗鬆症のような骨疾患の発症を起こすと主張した。興味あることに、最近、血漿GPx活性が閉経後骨粗鬆症の女性で有意に低下していることも報告されている。従って、著者らの結果は、細胞、特に骨をとりまく微小環境に取り込まれた鉄が、フェントン反応系でROSを発生させ、その結果、NF- $\kappa$ B転写因子を介してGPx活性を低下させることを示唆している。一方、乳酸鉄添加食は、有意にTGF- $\beta$ の増加を誘導した。その結果、RANKLを介した破骨細胞形成を増加させたものと考えられる。さらに、

著者らは、鉄添加食がオステオポンチンを有意に増加させることを示すことができた。オステオポンチンに関しては、最近、RANK/RANKL 経路を介して破骨細胞による骨吸収に関連することが示唆されている。従って、鉄負荷によるオステオポンチン量の増加は骨吸収の亢進を反映しているものと思われる。一般に、ROS は老化や骨粗鬆症の原因であり、また、老化にともなうエストロゲンの機能低下は、骨吸収に関連していることが明らかにされている。それゆえ、著者らは、酸化的ストレスと骨吸収の関連性を若年メスラットと閉経ラットで比較した。予測したように、閉経ラットは、乳酸鉄添加ラットで見られたように、若年メスラットに比べて GPx 活性の低下が認められた。しかしながら、8-OHdG を除いて、デオキシピリジノリン、カルシウムの尿排泄量については若年メスラット、閉経ラット間において違いを観察することはできなかった。一方、閉経ラットは骨芽細胞活性を反映してアルカリフォスファターゼ活性同様、オステオポンチン、オステオカルシン量が一貫して低い値を示した。これは、骨代謝、特に骨形成の違いによるものと考えられる。尿中 8-OHdG の増加に関しては、食餌由来、細胞死、骨代謝による DNA 修復、何れによるものかは不明である。最近、Basu らは食事により影響を受けない酸化的ストレスのマーカの一つである尿中イソプロスタンの排泄が、女性の骨密度と負の相関があると報告している。それ故に、骨吸収における鉄の影響の特異性と共に、これらの点について更に研究する必要がある。

## 結語

骨代謝マーカーをめぐって Wistar 系閉経ラットに乳酸鉄を負荷し、酸化的ストレスと骨代謝の関係について解析した。その結果、乳酸鉄負荷による Fenton 反応を介した ROS は骨吸収を誘導し、骨粗鬆症の発症、進展に関連することが明らかになった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 正 人  
副 査 教 授 鈴 木 邦 明  
副 査 助 教 授 坂 本 亘

学 位 論 文 題 名

## Bone metabolism and oxidative stress in postmenopausal rats with iron overload

(閉経ラットの鉄負荷による骨代謝と酸化ストレス)

活性酸素ラジカル(reactive oxygen species: ROS)には、スーパーオキシド( $O_2^{\cdot-}$ )、過酸化水素( $H_2O_2$ )、ヒドロキシラジカル(OH)などがあり、生理活性物質として生体の機能にさまざまな影響を与えることが知られている。また、ROSは種々の疾患の病態に関与するとの報告もある。骨においても、酸化ストレスが骨粗鬆症様の症状を呈したとの報告もあるが、ROSと骨代謝の関係についてその詳細は明らかではない。そこで本研究では、ラットを用い乳酸鉄投与で生じたフェントイン反応によるROS産生が、骨代謝にどのような影響を及ぼすかを調べ、活性酸素と骨代謝の関係を明らかにすることを目的とした。

本研究では、57週齢ならびに7週齢のWistar系ラットを使用した。57週齢のラットに2週間普通食を与えた後、5%乳酸鉄添加飼料を用い28日間飼育した。それらラットより尿ならびに血液を採取し試料として用いた。測定は、尿中のデオキシピリジノリン、オステオカルシン、カルシウム、リン、鉄、 $\gamma$ -carboxyglutamic acid (Gla)ならびに8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)について行った。また、血清中のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性、オステオカルシン、オステオポンチン、カルシウム、リン、TGF- $\beta$ 1量ならびにglutathione peroxidase (Gpx)活性について定量した。

57週齢と7週齢のラットを比較したところ、血清中のALP、オステオポンチン、オステオカルシンならびに尿中のGlaは57週齢のラットでは低い値を示したが、血中のカルシウム、リンの量ならびに尿中のデオキシピリジノリン、カルシウム、リン、8-OHdGの量に有意な差は認められなかった。57週齢のラットに5%乳酸鉄を負荷したところ、コントロール食の場合と比べて体重が有意に減少した。血清中のオステオカルシン、オステオポンチン、TGF- $\beta$ 1量ならびに尿中のデオキシピリジノリン、カルシウム、8-OHdG量は、5%乳酸鉄の負荷により増加した。他方、血清中ならびに尿中のリン量、血清中のGpx活性については、5%乳酸鉄の負荷により減少した。血清中のALP活性、カルシウム量ならびに尿中のGlaの量は、乳酸鉄添加飼料による変化は認められなかった。

乳酸鉄負荷により、変化の認められた尿中のデオキシピリジノリンならびにカルシウム量については、それらの量と血清中の鉄濃度とのあいだに有意な正の相関が認められた。また、血清中の TGF- $\beta$ 1 量と血清もしくは尿中の鉄濃度とのあいだに、有意な正の相関を認めた。一方、血清中の TGF- $\beta$ 1 量と血清中の Gpx 活性のあいだには負の相関を認めた。

以上の結果より、以下のことが考えられた。まず、57 週齢のラットと 7 週齢のラットにおいて違いの認められた血清中の ALP、オステオポンチン、オステオカルシンならびに尿中の Gla については、加齢もしくは閉経による骨代謝の全体的なターンオーバーの低下を意味するものと考えられた。次に、乳酸鉄を添加した飼料によって、尿中のデオキシピリジノリンならびにカルシウム量が増加したことは、血中の鉄濃度が増加したことによっておそらく骨組織においてフェントイン反応がさかんに行われるようになり、局所に ROS が産生され骨吸収が増大し、これら尿中の骨代謝の指標となる値が変化したものと考えられた。また、血清中のオステオカルシンならびにオステオポンチン量の変化は ROS によって骨組織に生じた変化により、もたらされたものと推測された。血清中の TGF- $\beta$ 1 量と血清もしくは尿中の鉄濃度とのあいだの正の相関から、TGF- $\beta$ 1 を産生する細胞における TGF- $\beta$ 1 の産生が ROS によって増大したことが考えられたが、いかなる細胞に由来するのか等は明らかではない。この TGF- $\beta$ 1 の増加が骨代謝に影響を及ぼした可能性も推測された。乳酸鉄負荷による抗酸化防御に機能する Gpx の血清中の減少は、おそらく Gpx 産生細胞において ROS もしくは ROS による 2 次的な原因によって、Gpx 産生が低下したものと考えられた。尿中の 8-OHdG の増加が細胞死もしくは DNA 修復等いかなる機構によっておこったのかは、不明であった。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容について口頭により質疑が行われた。主な質疑項目は、それぞれの測定項目に関する測定の意義、乳酸鉄の他の臓器への影響、血清採集の方法、血中 TGF- $\beta$ 1 の由来、Gpx による抗酸化防御の意義、ラットの閉経の時期等であった。また、本研究の背景となる活性酸素についてなど多岐にわたる関連事項の試問も行った。学位申請者からは、いずれの質問に対しても適切かつ明快な回答が得られた。更に、今後の研究の方向性についても明確な将来の展望が示された。

本論文は、57 週齢の閉経後ラットにおける乳酸鉄負荷による骨代謝マーカーの変動を明らかにした点が評価され、この業績は、今後の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士（歯学）の学位を授与されるにふさわしいと認められた。