

腸内細菌叢を標的とした骨折予防戦略の構築

東北大学大学院医学系研究科 分子代謝生理学分野

日本学術振興会 特別研究員PD 荒井 誠

はじめに

骨粗鬆症とは「低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患である」と定義されており⁽¹⁾、わが国でも骨密度測定値を取り入れた診断基準が策定されている。近年、骨粗鬆症の患者数および有病率は、高齢化の進行とともに増加の一途をたどっており、わが国における骨粗鬆症患者数は約1,300万人と推定されている^(2, 3)。

骨粗鬆症で最も問題となるのは骨折である。脆弱性骨折の代表である大腿骨近位部骨折のわが国における年間発生数は約18万件であり、その数は年々増加している⁽⁴⁾。さらに、骨折はそれによって移動を含めた生活全般の機能が低下するだけでなく、生命予後にも悪影響を及ぼしていることが明らかになっている⁽⁵⁾。

こうした社会的要請に応えるべく、骨代謝の研究が進み、各種の骨粗鬆症治療薬が開発されているが、それでもなお、高齢化の進行とともに増加する骨粗鬆症患者数や骨折発生数を抑えているとは言い難いのが現状である。そこで、骨代謝研究に新たなアプローチを取り込むには、一度、骨の立ち位置を振り返る必要がある。従来、骨は重力に抗するだけの支持的かつ静的な組織としてしか捉えられていなかったが、今や、絶えずリモデリングを続け、また他臓器との相互作用も有する動的な臓器であると認識されている⁽⁶⁾。このように、骨組織を全身の代謝ネットワークの一部と捉えたときに、同じくそのネットワークの一部として近年注目を浴びている腸内細菌叢が、骨代謝と関連しているのではないかと我々は着想した。

ヒトの腸内には数百種類、細胞数にしての数百兆細胞もの常在菌がいるとされ、腸はヒトの体で最も多く常在菌が存在する部位である。この腸内細菌叢は複雑な生態系であるが、構成菌種やそれらがコードする遺伝子を網羅的に調べるメタゲノム解析が2006年に開発され⁽⁷⁾、さらに近年の次世代シーケンサーの実用化と相まって、研究が急速に進んでいる。その結果、腸内細菌叢はホストの代謝や免疫系に大きく関与することや⁽⁸⁾、腸内細菌叢の破綻 (dysbiosis) が、種々の自己免疫性疾患・肥満や糖尿病などの代謝性疾患・癌・心疾患・神経精神疾患など全身諸臓器の疾患に結びつくことが明らかとなってきた⁽⁹⁾。

骨粗鬆症および腸内細菌叢を取り巻く上記の背景を基に、私は腸内細菌叢が全身の代謝ネットワークを介して骨代謝に関与しているのではないかと仮説を立てた。この関連を明らかにすることで、骨恒常性維持機構の詳細がより明らかになり、腸内細菌叢を標的とした科学的合理性に基づく新規の治療法開発の糸口がつかめるものと期待される。

そこで本研究では、股関節の人工骨頭置換術を受ける患者を対象に、骨密度や血清マーカ

一などの臨床情報と、便試料を用いて同定した腸内細菌叢を照らし合わせ、骨代謝と骨強度の関連を探索することを目的とした。

結 果

総合病院 国保旭中央病院（千葉県旭市）において大腿骨近位部骨折や変形性股関節症などのために人工骨頭置換術もしくは人工股関節置換術を受ける患者を対象とした。年齢が40歳以上の女性患者を対象とした。また、除外基準として、30日以内に治験薬を使用した、もしくは、今回手術を行う側と対側の大腿骨近位部の手術歴がある患者は対象から除外した。

なお、本研究は東北大学および旭中央病院における倫理審査委員会の承認を得た上で、患者・家族に十分な説明を行い、研究参加への同意が得られた例のみを研究対象としている。2020年7月27日倫理審査委員会承認、承認番号2020-1-391。

対象患者から便検体を採取し、その便検体からゲノムDNAを抽出した。そして表1に示すプライマーを用いて細菌の16S rRNAのVariable region (V) のうち、V1-V2領域を増幅した。なお、表1の配列で小文字で記した部分が当該領域の増幅のために必要な相補的な配列である。この配列は27Fmod-454A, 338R-454Bとして報告されている⁽¹⁰⁾。また、表1で大文字で記した部分はアダプター配列、*印の部分はマルチプレックスのためのインデックス配列である。

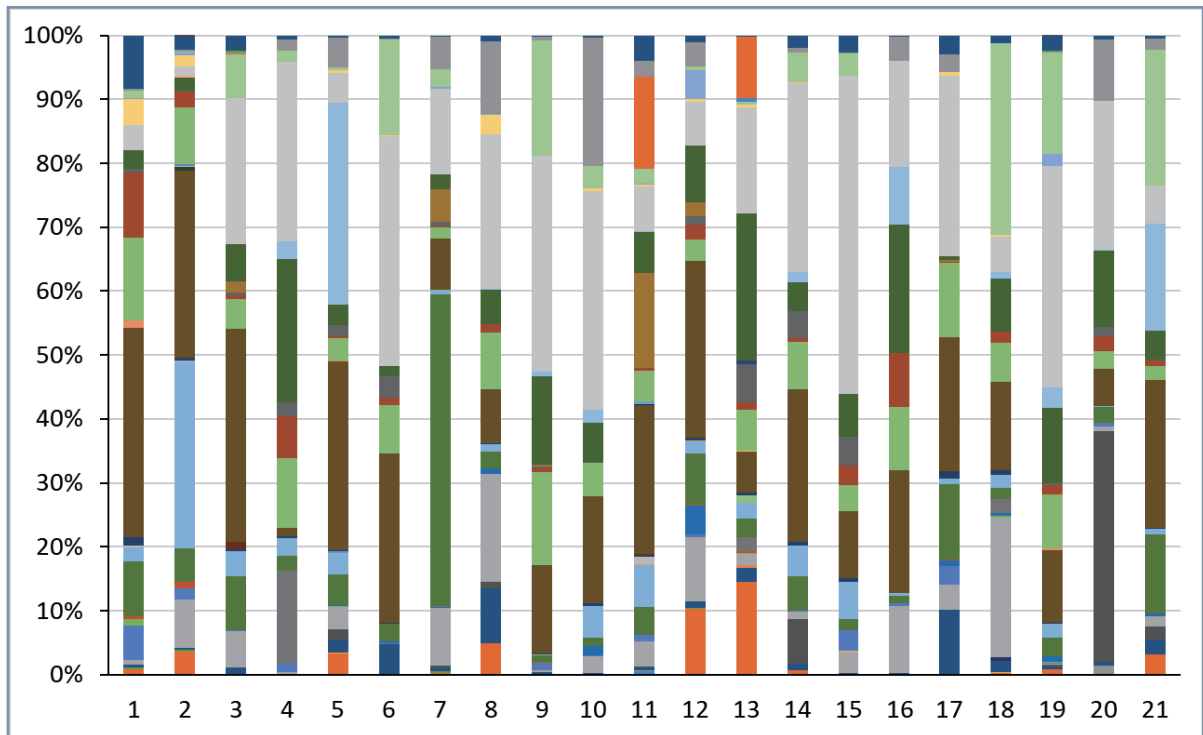
表1 用いたプライマー配列

Forward	5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG***** agrgtttgatymtggtcag-3'
Reverse	5'-CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATtgctgcctcccgtaggagt-3'

PCR産物を得た後はIon Torrentのシステムに従ってライブラリーの作成・精製を行った。最終的にはIon 318 Chip Kit v2 BCにライブラリーを充填して、Ion PGMでシーケンスを施行した。そして、シーケンスによって得られたリードをMicroSEQ IDデータベースおよびGreengenesデータベースにマッピングを行うことで菌種を同定した。

得られた結果が図1である。ここでは科 (family) レベルでの結果を示している。横軸は患者1から患者21、縦軸はそれぞれの患者由来の便検体中に含まれていた菌種の占める割合を100%積み上げ、棒グラフで示したものである。棒グラフのそれぞれの色がどの菌種であるかを示す凡例はここでは伏せてあることをご容赦いただきたい。

図1 各患者の腸内細菌叢の組成 (科レベル)



考 察

今回の結果は、実際の臨床検体（便検体）を基にして、たしかに腸内細菌叢の構成を知ることができることを示している。その後も登録患者数は増え、現在も新たなサンプルを蓄積している。

また、ここでは触れていないが、これらの各患者は大腿骨近位部骨折や変形性股関節症という疾患情報、骨密度や血液検査といった各種の臨床検査情報、既往歴や薬剤歴といった患者背景などを有している。今後は腸内細菌叢のプロファイルを各種の臨床情報と照らし合わせることで骨代謝への寄与の大きい菌種を絞り込み、治療標的の基盤としたい。

要 約

超高齢化社会を迎えたわが国では骨粗鬆症の有病率は増加の一途をたどっている。そこで今回の研究では骨粗鬆症・骨折の新たな治療・予防の戦略として、近年様々な病態への関与が指摘されている腸内細菌叢に着目した。今回の研究で実際の患者群における腸内細菌叢プロファイルのデータが蓄積してきており、今後臨床情報とさらに照らし合わせることで、治療標的の創出が期待される。

文 献

1. Report of a WHO Study Group. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. World Health Organ Tech Rep Ser. 843:1-129, 1984.
2. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Cohort profile: research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study. *Int J Epidemiol*. 39:988-95, 2010.
3. Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab*. 27:620-8, 2009.
4. Orimo H, Yaegashi Y, Hosoi T, Fukushima Y, Onoda T, Hashimoto T, Sakata K. Hip fracture incidence in Japan: Estimates of new patients in 2012 and 25-year trends. *Osteoporos Int*. 27 (5):1777-84, 2016.
5. Qu X, Huang X, Jin F, Wang H, Hao Y, Tang T, Dai K. Bone mineral density and all-cause, cardiovascular and stroke mortality: a meta-analysis of prospective cohort studies. *Int J Cardiol*. 166:385-93, 2013.
6. 荒井 誠、竹田 秀. 臓器連関からみた骨粗鬆症の病態. *Geriatric Medicine ライフ・サイエンス* 54:769-772, 2016.
7. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 312:1355-9, 2006.
8. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 124:837-48, 2006.
9. Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 90:859-904, 2010.
10. Kim SW, Suda W, Kim S, Oshima K, Fukuda S, Ohno H, Morita H, Hattori M. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res*. 20:241-53, 2013.