

〔原 著〕

## GGCX 遺伝子多型がオステオカルシンの Gla 化と骨密度に及ぼす影響 — 第二報 GGCX 遺伝子多型による ucOC/OC 比の検討 —

長谷川秀隆<sup>1)</sup>、神口 浩<sup>2)</sup>、村上 大介<sup>1)</sup>、長谷川結香<sup>3)</sup>  
松木 勇樹<sup>4)</sup>、松木 秀明<sup>5)</sup>

### 要 旨

本研究の目的は、 $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) 遺伝子多型が、オステオカルシンの Gla 化と骨密度に及ぼす影響を検討し、将来、骨代謝異常をきたす慢性疾患を持つ人々に骨量低下や骨粗鬆症の予防のための効果的な栄養指導を行うことである。

今回、男女 54 人 (平均年齢 19.4 歳) を対象に調査を行った。GGCX 遺伝子 (SNP: R325Q, 974G>A rs699664) 多型判定試験の結果は、GG 型 11 人 (26.0%)、AA 型 3 人 (6.0%)、GA 型 40 人 (74.0%) で、AA 型は、女性のみを検出であった。音響的骨評価値は、AA 型が他の遺伝子型に比べて最も低かった。ビタミン K の不足状態を反映する低カルボキシルオステオカルシン (ucOC) の平均値は、GG 型 8.91 ng/ml (SD=3.80)、AA 型 4.30 ng/ml (SD=2.02)、GA 型 6.88 ng/ml (SD=3.40) であった。その原因として、AA 型は、ビタミン K 摂取量 (推定) が少ないことが考えられた。ビタミン K を補酵素とする GGCX の活性の指標となる ucOC/OC 比は、GG 型 1.09 (SD=0.30)、AA 型 1.41 (SD=0.36)、GA 型 1.21 (SD=0.40) であった。これにより、AA 型は、ビタミン K が補酵素として効果的に働いていないことが示唆された。

キーワード：GGCX 遺伝子多型、ucOC/OC 比、ビタミン K、骨密度

### I. 緒 言

これまで骨粗鬆症の予防として、カルシウムやビタミン D などの微量栄養素が重要とされてきたが、近年ビタミン K もまた骨形成や骨リモデリングにおける働きが明らかになってきた<sup>1)</sup>。 $\gamma$ -グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) は、Glu オステオカルシン (Glu-OC) の Gla 化に関与する酵素である。活性化された Gla 型オステオカルシンは、カルシウムと結合して骨形成が行われる<sup>2)</sup>。GGCX は、ビタミン依存性のタンパク質であり、ビタミン K を補酵素として働くことが判明している<sup>3)</sup>。現在、臨床において骨粗鬆症の治療としてビタミン K<sub>2</sub> 製剤が使用され、その効果が期待されている<sup>4)</sup>。National Center for Biotechnology Information (NCBI) の遺伝子マップによると、GGCX 遺伝子は G (グアニン) が A (アデニン) に変異する一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) であり、2p12 に存在することが判明している<sup>5)</sup>。この変異によって、アミノ酸はアルギニンからグルタミンに変化する。GGCX 遺伝子多型が Glu-OC の Gla 化に及ぼす影響についての研究では、低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) 値に差が認められ、ビタミン K の作用が GGCX の遺伝子型によって異なることが示唆されている<sup>6)</sup>。

本研究の目的は、Glu-OC の Gla 化と骨密度に及ぼす GGCX 遺伝子多型の影響を検討し、将来、骨量低下や骨粗鬆症予防のための効果的なビタミン K 摂取の栄養指導を行うことである。

今回、GGCX 遺伝子多型判定試験によって GG 型、AA 型、GA 型に分類し、音響的骨評価値 (OSI)、ucOC /OC 比について比較を行った結果を報告する。

- 1) 弘前医療福祉大学保健学部看護学科 (〒 236-8102 青森県弘前市小比内 3-18-1)
- 2) 東海大学教育・研究支援センター分子科学部門 (〒 259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143)
- 3) 弘前大学医学部附属病院 (〒 036-8563 青森県弘前市本町 53)
- 4) 東海大学医学部附属大磯病院 (〒 259-0198 神奈川県中郡大磯町月京 21-1)
- 5) 東海大学健康学部看護学科 (〒 259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋 143)

## Ⅱ. 研究方法

### 1. 調査対象者：A 大学学生 男女 54 人（平均年齢 19.4 歳）

調査期間：2009 年 11 月 14 日～2010 年 3 月 31 日

倫理的配慮：調査に際し、対象者に研究の趣旨を説明し、調査項目については選択できること、調査への参加は自由意志であることを説明した。同意後に骨密度測定、GGCX 遺伝子多型判定試験、骨代謝マーカー測定、食事調査、食事に関するアンケート調査を実施した。

なお、本研究は 2009 年 9 月に東海大学健康科学部倫理審査委員会の承認を得ている。

### 2. 研究の役割分担

- 1) 検体採取、遺伝子解析、栄養調査、統計学的解析：長谷川秀隆
- 2) 遺伝子解析・指導：神口浩
- 3) 血液検査データの集計：村上大介
- 4) 検体採取：長谷川結香
- 5) 栄養調査の集計：松木勇樹
- 6) 栄養調査、統計学的解析、測定に関する総括：松木秀明

### 3. GGCX 遺伝子多型判定試験の方法

DNA抽出は、TritonX-100, Guanidine-HCl抽出法を用いて、全血からDNAを抽出した。遺伝子多型判定試験は、PCR-SSP法（Polymerase Chain Reaction-Sequence Specific Primer Method）によるGGCX遺伝子多型判定試験を行った。使用したフォワードプライマーの塩基配列は、5'-ACAGTAGGGAATCTCCAGGAAGAAC-3'（GGCX-in7F）と設定した。リバースプライマーの塩基配列は、3'末端において、アレルに対して特異的に反応するように設定し、A型に反応する5'-GGCAACAGTTGTTGCAACCTTT-3'（GGCX 8RA）とG型に反応する5'-GGCAACAGTTGTTGCAACCTTC-3'（GGCX 8RG）を使用した（SIGMA-ALDRICH社製 oligonucleotide primer）。PCR用酵素は、Fast Start High Fidelity PCR System（Roche社製）を使用し、PCR装置Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler（Applied Biosystems社製）によりPCRを行った。PCRの反応条件は、PCR前に96℃ 2分間加熱 — 変性96℃ 10秒間 — アニーリング64℃ 15秒間 — 伸長72℃ 30秒間を40サイクル行い、72℃ 5分間維持した（図1）。PCRにより得られたPCR産物を1.5% アガロース TBE バッファーで電気泳動を行い（50V 1時間）、エチジウムブロマイド（EtBr）染色を行った。

### 4. 血液検査

検査項目：OC（RIA 固相法）、ucOC（ECLIA 法）、血清 I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド（NTX；ELISA 法）、血清 Ca 濃度（アルセナゾⅢ法）を測定した。

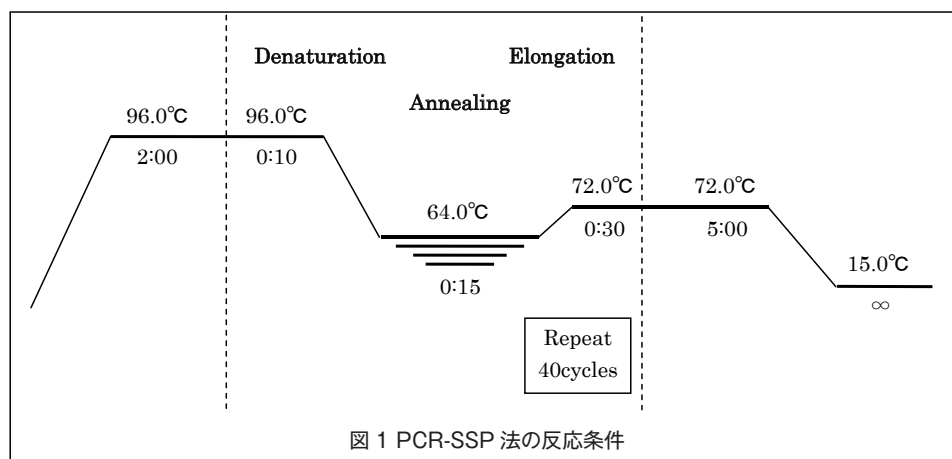


図 1 PCR-SSP 法の反応条件

## 5. 骨密度測定

骨密度測定には、ALOKA社製超音波骨評価装置 AOS-100を使用し、踵骨部で測定した。超音波伝播速度（SOS: Speed Of Sound）は、超音波が踵骨を透過する音速を示し、骨密度を反映する。超音波透過指標（TI: Transmission Index）は、超音波の透過する度合いを示し、骨量を反映する。SOSとTIの演算値（ $OSI=TI \times SOS^2$ ）より算出された値が、音響的骨評価値（OSI: Osteo Sono-Assessment Index）である。SOS、TI、OSIの値は、DXA法（Dual-energy X-ray Absorptiometry）による骨密度（Bone Mineral Density:BMD）と相関する<sup>7)</sup>。

## 6. 食事調査

血液検査前日の一日の食事内容について、目安量記録法（自己記入方式）と写真により調査し、「五訂増補日本食品標準成分表」に基づいた建帛社「エクセル 栄養君 Ver.4.0」のアドインソフトを使用し、摂取栄養素と摂取量を算出した。「エクセル栄養君 Ver.4」は、主食103、主菜90、副菜83、和え物・サラダ49、汁物35、デザート40の計約400品目の料理データを搭載し、摂取した食事のメニューの材料と使用した分量を入力することで摂取カロリーと摂取栄養素の量を算出する栄養管理ソフトである。本研究における栄養素摂取量は、推定量として算出した値である。対象者には、調査の際に「主要食品重量目安表」を配布した。

## 7. 生活習慣調査

質問票を用いて、食事習慣（ダイエット経験の有無、ファストフードおよびインスタント食品、スナック菓子、納豆、緑黄色野菜、牛乳、海藻などの摂取頻度）と運動習慣（現在または中学・高校時代の運動クラブの所属、練習時間、経験年数など）を調査した。

## 8. 解析方法

主にビタミンK摂取量（推定）と骨密度およびucOC/OC比、GGCX遺伝子型と骨密度およびucOC/OC比などの骨代謝マーカーについて関連性を調べた（Pearsonの相関係数）。また骨密度と骨代謝マーカーについて男女間で2群間の比較を行った（Studentのt検定）。

統計解析には、統計ソフトSPSS Ver.11.5（シリアルNo.6266581）を使用した。

## Ⅲ. 結果

遺伝子検査に同意した対象者54人の平均年齢と標準偏差値は、19.5歳（SD=1.24）であった。GGCX遺伝子多型判定試験を行った結果、PCR-SSP法によって増幅されたDNAは、3種類の遺伝子型が確認された。検出されたバンドの結果を図2に、またGGCX遺伝子GG型、AA型、GA型の割合については図3に示した。GGCX遺伝子型の割合は、GG型20.0%、AA型6.0%、GA型74.0%でGA型のヘテロ接合型が多かった。AA型については、今回男性からは検出されず、男女比は得られなかった。被験者54人について測定した各平均値と標準偏差(SD)は、音響的骨評価値(OSI

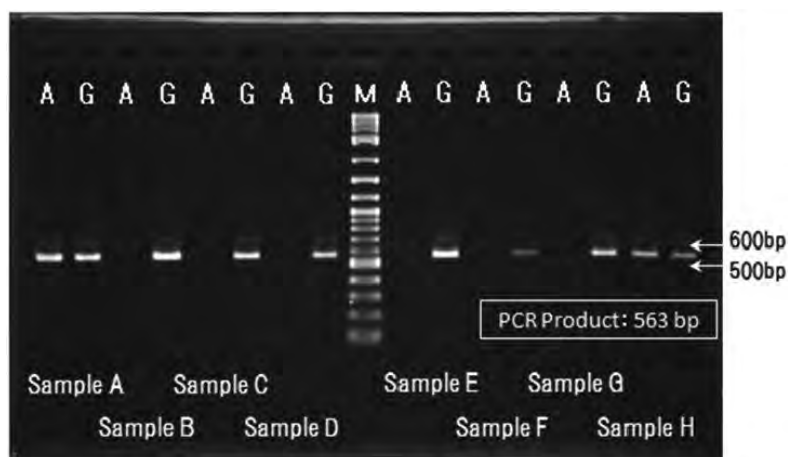


図2 GGCX 遺伝子多型判定試験で確認されたバンド（PCR-SSP法）

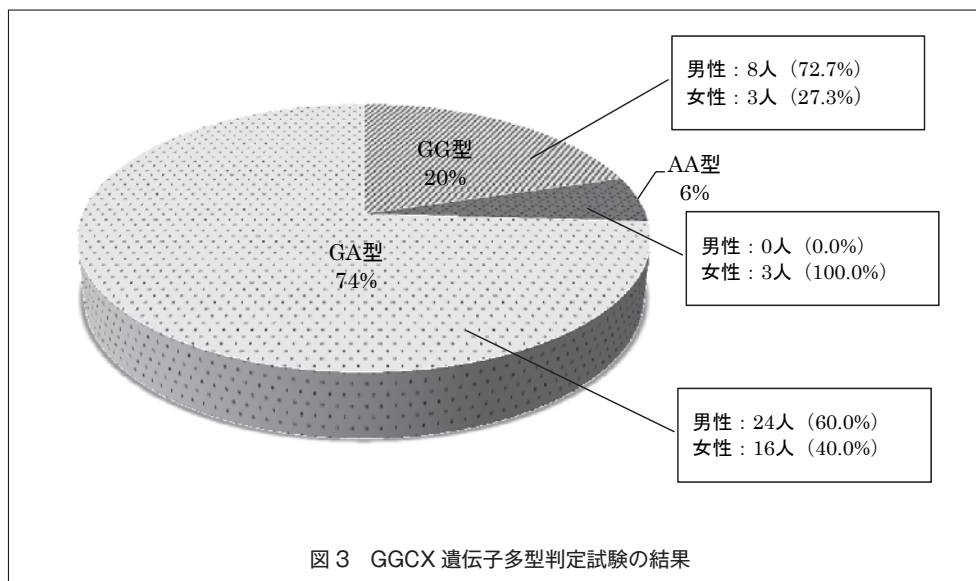


表1 骨代謝と微量栄養素摂取量（推定）との関連性

| Pearsonの相関係数( <i>r</i> ) | カルシウム                           | リン             | ビタミンD        | ビタミンK        | ビタミンB <sub>6</sub> | ビタミンB <sub>12</sub> |
|--------------------------|---------------------------------|----------------|--------------|--------------|--------------------|---------------------|
| OSI                      | <i>r</i> 0.194<br><i>n</i> 48   | 0.258<br>48    | -0.041<br>48 | 0.149<br>48  | 0.278<br>48        | 0.119<br>48         |
| OC                       | <i>r</i> 0.064<br><i>n</i> 48   | 0.191<br>48    | -0.047<br>48 | 0.174<br>48  | 0.186<br>48        | -0.131<br>48        |
| ucOC                     | <i>r</i> -0.106<br><i>n</i> 48  | 0.041<br>48    | -0.125<br>48 | -0.076<br>48 | 0.057<br>48        | -0.100<br>48        |
| ucOC/OC比                 | <i>r</i> 0.098<br><i>n</i> 48   | 0.009<br>48    | 0.117<br>48  | 0.195<br>48  | -0.012<br>48       | 0.119<br>48         |
| 血清NTX                    | <i>r</i> 0.358 *<br><i>n</i> 48 | 0.370 **<br>48 | 0.055<br>48  | 0.233<br>48  | 0.256<br>48        | 0.051<br>48         |
| 血清Ca                     | <i>r</i> 0.365 *<br><i>n</i> 48 | 0.215<br>48    | 0.173<br>48  | 0.240<br>48  | 0.197<br>48        | 0.315<br>48         |

\*\*:*p*<0.01 \*:*p*<0.05

×10<sup>6</sup>) 3.42 (SD=0.47)、血清NTX 18.37 nmol BCE/L (SD=5.64)、OC 7.54 ng/mL (SD=2.27)、ucOC 7.15 ng/mL (SD=3.54)、血清カルシウム 9.70 mg/dL (SD=0.30) であった。

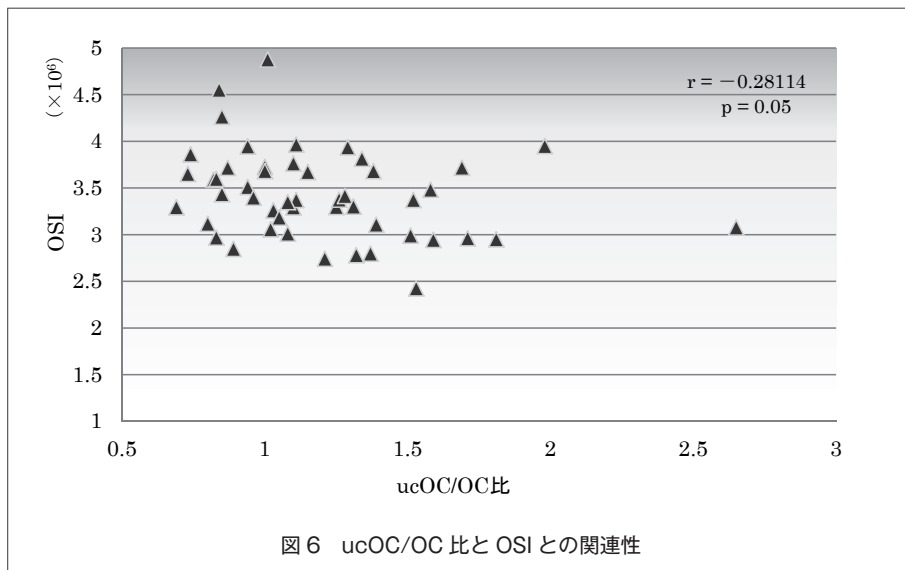
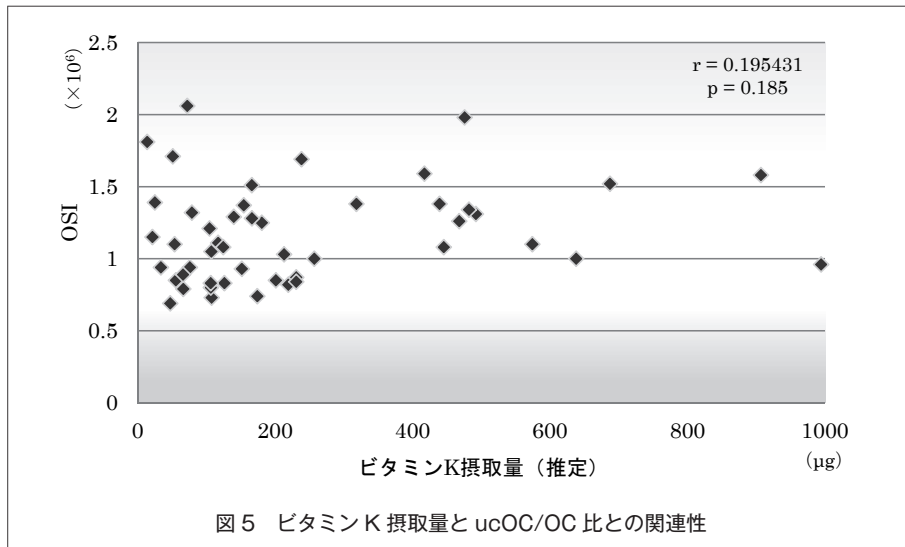
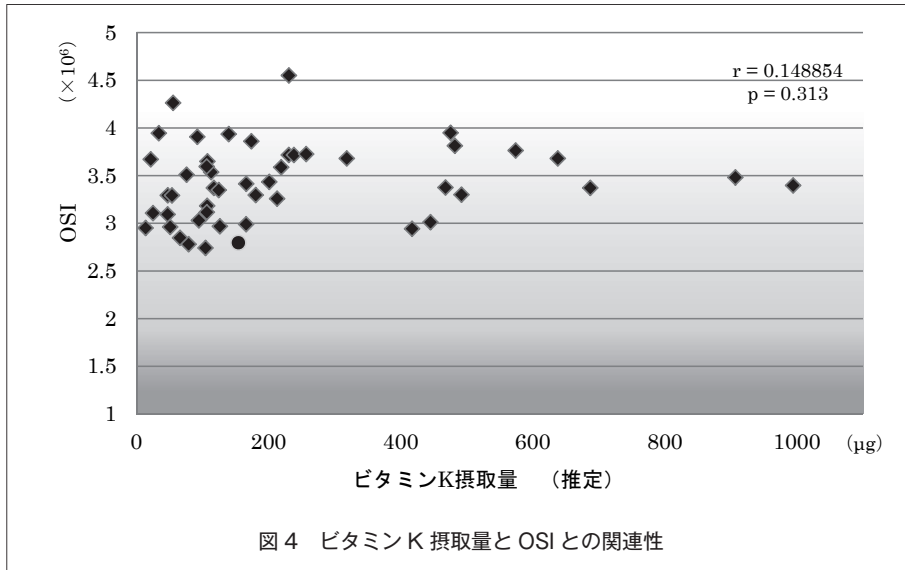
一日の食事調査を栄養管理ソフト「エクセル栄養君 Ver.4」により算出した栄養素の摂取量（推定）は、ビタミンK 272.57 μg (SD=272.38)、ビタミンD 7.3 μg (SD=10.97)、カルシウム 426.56 mg (SD=259.60)、リン 1122.49 mg (SD=466.21) であった。

### 1. 骨代謝と微量栄養素

骨代謝と微量栄養素摂取量（推定）との関連について表1に示した。ビタミンK摂取量（推定）とOSIとの相関関係は、*r*=0.148854 (*p*=0.313) で有意性は認められなかった（図4）。ビタミンK摂取量（推定）とucOC/OC比との相関関係は、*r*=0.195431 (*p*=0.185) で有意な関連性は認められなかった（図5）。またucOC/OCとOSIとの相関関係について分析した結果、*r*=-0.28114 (*p*=0.05) で有意性は認められなかったものの負の相関関係の傾向にあった（図6）。

### 2. GGCX 遺伝子型とOSIおよび骨代謝マーカー

骨代謝マーカーの平均値をGGCX遺伝子型で比較すると、血清NTX (nmol BCE/L) は、GG型 18.00 (SD=5.56)、AA型 13.60 (SD=4.16)、GA型 18.83 (SD=5.70)、OC (ng/mL) は、GG型 8.86 (SD=2.43)、AA型 5.63 (SD=1.37)、GA型 7.32 (SD=2.14)、ucOC (ng/mL) は、GG型 8.91 (SD=3.80)、AA型 4.30 (SD=2.02)、GA型 6.88 (SD=3.40)、血清カルシウム (mg/dL) は、GG型 9.68 (SD=0.31)、AA型 9.73 (SD=0.21)、GA型 9.70 (SD=0.31) であった。OSI (×



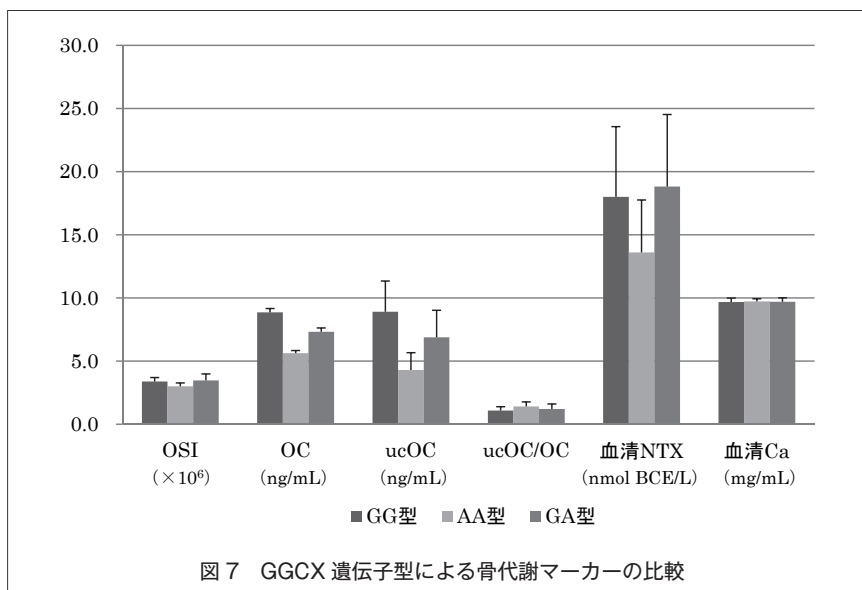


表2 GGCX 遺伝子型による骨代謝関連する栄養素摂取量（推定）の比較

| Mean±SD | n  | カルシウム (mg)     | リン (mg)        | ビタミンD (μg) | ビタミンK (μg)    | ビタミンB6 (mg) | ビタミンB12 (μg) |
|---------|----|----------------|----------------|------------|---------------|-------------|--------------|
| GG型     | 10 | 335.25±146.12  | 1061.67±146.13 | 7.72±7.33  | 242.35±200.20 | 1.27±0.63   | 7.88±6.81    |
| AA型     | 3  | 297.04±131.39  | 786.36±440.11  | 4.57±4.71  | 48.75±32.75   | 0.80±0.23   | 4.18±2.53    |
| GA型     | 35 | 2101.96±824.32 | 1195.44±497.64 | 8.36±9.28  | 258.50±242.31 | 1.40±0.64   | 6.48±70.2    |

10<sup>6</sup>) について、GGCX の遺伝子型で平均値を比較すると、GG 型 3.40 (SD=0.31)、AA 型 3.00 (SD=0.26)、GA 型 3.47 (SD=0.52) であった。また ucOC/OC 比については、GG 型 1.09 (SD=0.30)、AA 型 1.41 (SD=0.36)、GA 型 1.21 (SD=0.40) であった (図7)。

### 3. GGCX 遺伝子型と摂取微量栄養素

一日の食事調査結果から骨代謝に関連する微量栄養素摂取量（推定）について表2に示した。今回、GGCX 遺伝子 AA 型の比較対象者数が3人のため、3群の比較は行わなかったが、AA 型は、カルシウム、リン、ビタミンD、ビタミンK、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>12</sub>の摂取量が、他の遺伝子型と比較して少ない傾向にあった。また食事習慣に関する調査結果から、ビタミンK<sub>2</sub>が多く含まれている納豆の摂取頻度は、GG 型 3.2回/週 (SD=1.5)、GA 型 3.2回/週 (SD=2.0) であったのに対して、AA 型の被験者は納豆を食べる習慣がなかった。骨代謝におけるビタミンKの不足状態を示す ucOC とビタミンKを含む食品の摂取頻度について、ucOC 納豆と摂取頻度との関連は、 $r=0.048844$  ( $p=0.801$ )、緑黄色野菜と ucOC との関連は、 $r=0.029775$  ( $p=0.888$ ) で、有意な相関関係は認められなかった。

### 4. 性別による OSI、骨代謝マーカーの比較

OSI と骨代謝マーカーについて、性別で各平均値を比較した結果、OSI ( $\times 10^6$ ) は男性 3.62 (SD=0.44)、女性 3.12 (SD=0.34)、OC (ng/mL) は男性 8.51 (SD=1.95)、女性 6.12 (SD=1.69)、ucOC (ng/mL) は男性 8.49 (SD=3.26)、女性 5.06 (SD=2.46)、ucOC/OC 比は男性 1.09 (SD=0.30)、女性 1.36 (SD=0.42)、血清 NTX (nmol BCE/L) は男性 20.53 (SD=5.38)、女性 15.78 (SD=5.08) であった。OSI、OC、ucOC、血清 NTX は女性の方が有意に低値 ( $p<0.001$ ) であったのに対して、ucOC/OC 比は女性の方が有意に高値 ( $p<0.05$ ) であった (図8)。

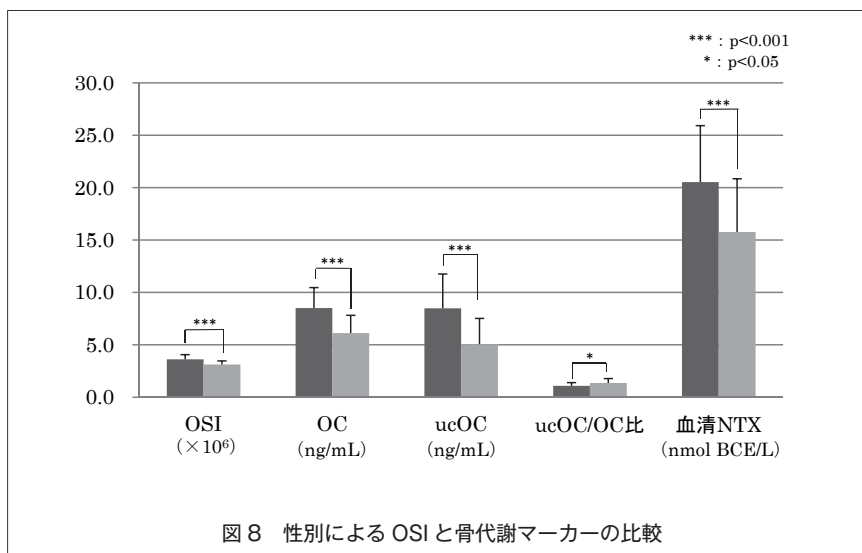


図8 性別によるOSIと骨代謝マーカーの比較

#### IV. 考 察

##### 1. ビタミンK摂取量とオステオカルシンのカルボキシル化

対象者のOSI平均値は $3.42 (\times 10^6)$  (SD=0.47)で、ALOKA社の調べ<sup>8)</sup>による20歳のOSI平均値 $2.71 (\times 10^6)$  (SD=0.26)と比較すると高値であった。GGCXの補酵素として働くビタミンKについて、厚生労働省の「日本人の食事摂取基準(2010年版)」によると、ビタミンKの摂取目安量は、18歳～29歳の男性が $75 \mu\text{g}/\text{日}$ 、女性が $60 \mu\text{g}/\text{日}$ である<sup>9)</sup>。対象者の平均摂取量(推定)は、ビタミンKは $272.57 \mu\text{g}$  (SD=272.38)であり、基準摂取量と比べて多かった。ビタミンK摂取量(推定)に対してOSI、OC、ucOC、ucOC/OC比の各関連性については有意な相関関係は認められなかったが、OSIとucOC/OC比が負の相関の傾向にあったことは、ucOC/OC比が低いほど、ビタミンKが効果的にGGCXに作用し、Glu-OCのGla化に関与していることが推測された。ビタミンK摂取量と大腿骨骨折との関連について検討した研究では、ビタミンKを $100 \mu\text{g}/\text{日}$ 以上を摂取した群と $100 \mu\text{g}/\text{日}$ 未満の摂取量の群を比較した結果、 $100 \mu\text{g}/\text{日}$ 以上摂取した群は大腿骨骨折の発症率が低いことが報告されている<sup>10) 11)</sup>。またビタミンK作用不足の指標であるucOCを低下させるために必要なビタミンKの摂取量は、 $500 \mu\text{g}/\text{日}$ 以上を必要とすることが示唆されている<sup>12) 13)</sup>。今回我々が行った食事調査は、対象者の一日の食事を栄養管理ソフトで栄養素の摂取量を推算したものである。「日本食品標準成分表2010」によると納豆(可食部100g)に含まれるビタミンKの含有量は約 $600 \sim 930 \mu\text{g}$ である<sup>14)</sup>。これらから、ビタミンK摂取量とucOCとの関連性を検討するためには、納豆などのビタミンKを多く含む食品を摂取する対照実験により、血清ビタミンK濃度、ucOC/OC比との関連について比較する必要がある。

##### 2. GGCX遺伝子型によるOSIと骨代謝マーカー

各骨代謝マーカーの基準値(株式会社SRL)<sup>15)</sup>は、血清NTX男性 $9.5 \sim 17.7 \text{ nmol BCE/L}$ 、閉経前女性 $7.5 \sim 16.5 \text{ nmol BCE/L}$ 、OC $2.5 \sim 13 \text{ ng/mL}$ 、ucOC $4.50 \text{ ng/mL}$ 未満で、本調査結果は、いずれも基準値を逸脱するGGCX遺伝子型は認められなかった。OSI、各骨代謝マーカーについて、GGCX遺伝子型GG型、AA型、GA型間で比較した結果、AA型は、OSI、OC、ucOC、血清NTXが基準値内であるが低い傾向にあった。またucOC/OC比は、AA型が逆に高い傾向を示した。骨代謝とは、破骨細胞によって古い骨を壊し、カルシウムを血中に放出する工程(骨吸収)と骨芽細胞によりコラーゲン産生やリン酸カルシウムの沈着をして骨化する工程(骨形成)である。破骨細胞によって骨コラーゲンが分解されて産生されるNTXは、血液中に放出された後尿中に排泄される。NTXは骨密度の減少のスピードを示し、骨吸収の状態を反映するとされている<sup>16)</sup>。OCは、非コラーゲン性のタンパク質であり骨芽細胞内で合成される。またucOCは、Glu-OCの3残基の全てがGla化されずに、一つ以下のグルタミン酸残基がカルボキシル化されたものである<sup>17)</sup>。OCは、骨形成マーカーとしての意義を持っているが、ucOCは、直接的に骨形成の状態を反映していない<sup>18)</sup>。AA型が骨形成マーカーと骨吸収マーカーのどちらも低値であったことは、骨回転そのものが他の遺伝子型に比べ低いことを示唆していると言える。しかし、OSI、OC、ucOC、血清NTXは、女性が低値だっ

たこと、ucOC/OC比は、女性が高値であったことから、骨量、骨代謝マーカーに差が生じたのは、性差も要因として考えられる。

### 3. GGCX 遺伝子型によるビタミンKと骨代謝

ucOCは、骨代謝においてビタミンKが不足している場合、Glu-OCがGla-OCに変換されず、OCが骨基質に取り込めないため、血液中に放出されることになる。今回の結果では、AA型のucOCは、GG型、GA型に比べ低い値であった。またビタミンK摂取量(推定)をみると、AA型は、平均値48.75 $\mu$ gで、日本人の摂取基準の60 $\mu$ g/日(女性)を下回り、他の遺伝子型よりも摂取量(推定)が少なかった。ビタミンKが不足している状態では、ucOCの値は高くなることが予測できるが、AA型は、4.30 ng/mlで基準値(4.50 ng/ml)を若干下回っていた。ucOC/OC比は、GGCX 遺伝子型別の相対的な割合であるため、AA型のucOC/OC比が他の遺伝子型に比べて高くなったと考えられる。したがって、今回の調査では、GGCX 遺伝子型の違いによるビタミンKの摂取量(推定)とGlu-OCのGla化への影響については、明確な結果は得られなかった。納豆摂取と血清ビタミンK濃度との相関については検討していないが、納豆中のメナキノンの変化と摂取後の血中ビタミンK濃度についての研究では、納豆5 g、30 g、100 gを摂取し、摂取前、4時間後、8時間後、24時間後、48時間後の血中ビタミンK<sub>2</sub>(メナキノン)濃度を測定している。その結果、いずれの量の納豆摂取でも2~4時間後をピークとして有意に血中濃度は上昇し、納豆に含まれるメナキノン量に対して、投与量依存性に血中ビタミンK<sub>2</sub>濃度は高まると報告している<sup>19)</sup>。

今後、ビタミンK摂取量と血清ビタミンK濃度との関連を検討し、GGCX 遺伝子型間で血清ビタミンK濃度に差がない状態で、OSIとucOC/OC比を比較検討する必要がある。

### 4. 性ホルモンと骨代謝

AA型は、他の遺伝子型に比べucOC/OC比が高く、OSIは、他の遺伝子型よりも低い値を示しているが、ucOCとOCについては他の遺伝子型よりも低値であった。AA型が女性のみを検出であったことから、GGCX 遺伝子の変異による相違以外に、性差による骨代謝の違いも考えられ、OSI、血清NTX、ucOC、OCに影響を及ぼしたと考えられる。今回使用した骨量測定装置AOS-100(アロカ社)の20歳の男女のOSI( $\times 10^6$ )の標準値<sup>20)</sup>は、女性が2.7094、男性3.0586で女性の方が低い基準値で、一般的に女性の方が、骨量が低いことがわかる。性差が骨代謝に及ぼす因子として性ホルモンが関与し、エストロゲンとアンドロゲンが影響していることが知られている。本調査では、対象者の性ホルモン測定はしていないため、骨密度、骨代謝マーカーへの性差の影響については推察に過ぎないが、マウスを用いた骨代謝と性ホルモンについての研究では、エストロゲン受容体は、骨代謝に直接関与する骨芽細胞にER $\alpha$ とER $\beta$ が存在し、エストロゲンの直接的な骨芽細胞への作用が考えられている<sup>21)</sup>。エストロゲンの骨芽細胞への作用は、アルカリホスファターゼ活性の促進、骨芽細胞の増殖促進、コラーゲンmRNAの発現増強がラットによる実験により認められ、これらの作用はヒトのエストロゲン欠乏状態における骨吸収の促進、骨芽細胞数の減少、代謝活動の低下と一致しているとしている<sup>22)</sup>。しかし、その骨代謝への作用は複雑で、ノックアウト(遺伝子欠損)マウスを用いた実験では、ER $\alpha$ 完全ノックアウトマウスのオスとメスは、骨代謝回転を低下させ、骨量を増加させた。またER $\beta$ の欠損マウスは、メスにおいて骨吸収が低下し、骨量を増加させた。さらにER $\alpha$ とER $\beta$ の両方欠損したマウスは、メスでは骨代謝回転が低下し、骨量は著明に減少している。このようにER $\alpha$ 、ER $\beta$  遺伝子の単独欠損あるいは両方の欠損による雌雄の骨代謝回転、骨量への影響が異なることが報告されている<sup>23)</sup>。アンドロゲンの骨への作用は、骨量を増大させ、特に皮質骨量を増大させることで骨の伸長を促し、強度を増す効果があると考えられている<sup>24)</sup>。そのアンドロゲンの骨代謝作用は、エストロゲン合成酵素であるアロマターゼによってエストロゲンに変換されることによって行われていることが明らかになってきている<sup>25)</sup>。

ビタミンK濃度に対する性ホルモンの影響を検討した研究では、去勢した性成熟前の雌雄ラットに性ホルモンを投与し、肝組織中のビタミンK濃度の変化を調べた結果、エストロゲンはビタミンK濃度を増加させ、テストステロンはビタミンK濃度を低下させた。同量のエストロゲンを投与した場合、オスの去勢ラットの方がメスよりビタミンK濃度が上昇し、オスはエストロゲンに対する感受性が高いと推測している。またビタミンK欠乏食を摂取させた雌雄ラットのビタミンK濃度の変化は、メスが13.62から1.86 ng/g、オスが3.97から2.4 ng/gに減少し、メスのラットの方がビタミンK濃度の減少が顕著で、オスのラットの方がビタミンK濃度の維持力が強いことが示されている<sup>26)</sup>。

今回の調査結果において、ucOC値が男性より女性の方が低値であったのは、被験者の年齢がエストロゲンの分泌



が盛んな20歳前後であり、エストロゲンの関与によるビタミンK濃度の上昇が推測される。ビタミンK濃度が高くなることで、GGCXの働きが活性化し、Glu-OCのGla化が促進されることが考えられるが、女性の方がucOC/OC比が高いことは、Glu-OCがGla化する際に必ずしもビタミンKが効率良く働いたとは考えられない。

現在のところ多くの臨床検査では、ucOCやOCに関して特に性別ごとの基準値を設定していないが、骨量と合わせた分析をする際には、性ホルモンによる骨代謝の影響を考慮し、特に女性の場合は、月経周期やエストロゲン濃度を合わせてGGCX遺伝子型による骨代謝の影響を検討する必要がある。

## V. 結 論

AA型は、OSIと骨形成マーカーであるOCが他の遺伝子型GG型、GA型と比べ低値であった。また骨代謝におけるビタミンKの状態を示すucOCについて、AA型が低値であった要因は、ビタミンK摂取量(推定)が少ないことが考えられた。AA型のOSIが低い傾向にあり、Glu-OCがGla化する過程で、ビタミンKを補酵素とするGGCXの活性の指標としてのucOC/OC比についてもAA型は他の遺伝子型より高い傾向にあった。このことは、AA型がGlu-OCのGla化の過程で、ビタミンKが補酵素として効果的に働いていないことが推測された。しかし、AA型のOSIが低い傾向にあった要因は、AA型が女性のみを検出であったことから、骨代謝における性差も影響していたことが考えられた。

## VI. 今後の課題

GGCX遺伝子型間で血清ビタミンK濃度を一定にし、男女に分けてGGCX遺伝子多型によるGlu-OCのGla化の相違を検討する必要がある。

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、ご協力いただきました被験者の皆様に深く感謝いたします。

(受理日 平成26年3月3日)

## 文 献

- 1) 岡野登志夫, 津川尚子, 須原義智, 中川公恵, 鎌尾まや: 骨折予防からみたビタミンKの栄養状態. *Osteoporosis Japan* 16(2): 159-164, 2008
- 2) 東浩太郎, 井上聡: 骨におけるビタミンKの作用メカニズム. *骨粗鬆症治療*, 8(3): 10-16, 2009
- 3) Knobloch JE, Suttie JW. 1987. Vitamin K-dependent carboxylase. Control of enzyme activity by the "propeptide" region of factor X. *J Biol Chem* 262: 15334-15337
- 4) 齋藤充: ビタミンK<sub>2</sub>と骨質. *骨粗鬆症治療*, 8(3): 29-35, 2009
- 5) NCBI: dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=ggcx%20rs699664>
- 6) Sogabe N, Tsugawa N, Maruyama R et al: Nutritional effect of gamma-glutamyl carboxylase gene polymorphism on the correlation between the vitamin k status and gamma-carboxylation of osteocalcin in young males. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 419-425, 2007
- 7) 木村博承: 超音波測定法による「骨密度検診」の有用性と生活習慣との関連. *岡山医誌*, 112: 69-182, 2000
- 8) ALOKA株式会社: 女性の音響的骨評価値(OSI)の年齢別標準値早見表. 超音波骨評価装置 AOS-100取扱説明書. 9-10, 2005
- 9) 厚生労働省: 日本人の食事摂取基準(2010年版). <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/dl/s0529-4l.pdf>
- 10) Feskanich D, Weber P, Willett WC, et al. Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 74-9.
- 11) Booth SL, Tucker KL, Chen H, et al. Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with

- bone mineral density in elderly men and women. *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 1201-8.
- 12) Binkley NC, Krueger DC, Kawahara TN, Engelke JA, Chappell RJ, Suttie JW: A high phylloquinone intake is required to achieve maximal osteocalcin gamma-carboxylation. *Am J Clin Nutr* 76: 1055-60, 2002
  - 13) Bügel S, Sørensen AD, Hels O, et al. Effect of phylloquinone supplementation on biochemical markers of vitamin K status and bone turnover in postmenopausal women. *Br J Nutr* 2007; 97: 373-80.
  - 14) 文部科学省：日本食品標準成分表 2010. [http://www.mext.go.jp/component/b\\_menu/shingi/toushin/\\_icsFiles/afieldfile/2011/01/25/1299012\\_4.pdf](http://www.mext.go.jp/component/b_menu/shingi/toushin/_icsFiles/afieldfile/2011/01/25/1299012_4.pdf)
  - 15) 株式会社SRL：検査項目レファレンス. [http://www.srl.info/srlinfo/kensa\\_ref\\_CD/](http://www.srl.info/srlinfo/kensa_ref_CD/)
  - 16) 星野真二郎, 井上聡市, 大内耐義：血中ならびに尿中 I 型コラーゲン N-telopeptide1 (NTx) の骨代謝マーカーとしての有用性に関する検討. *日本末病システム学会雑誌*, 8(2) : 248-250, 2002
  - 17) 三浦雅一：骨代謝マーカー測定の進歩 ①非カルボキシル化またはカルボキシル化オステオカルシン. *THE BONE*, 12(4) : 47-51, 1998
  - 18) 和田誠基, 扶川武志, 神谷貞浩：低カルボキシル化オステオカルシン測定の実際と意義. *骨粗鬆症治療*, 8(3) : 212-216, 2009
  - 19) 須見洋行：納豆菌発酵, 及び納豆摂取時の被験者血液中のビタミン K (メナキノ-7) 濃度. *日本家政学会誌*, 50(4) : 309-312, 1999
  - 20) 日本骨粗鬆症学会 骨強度測定機器の評価と臨床応用に関する委員会：QUS使用の実際. *Osteoporosis Japan*, 13: 31-35, 2005
  - 21) 細井孝之：エストロゲンと骨代謝—基礎と臨床—. *THE BONE*, 16(2) : 49-54, 2002
  - 22) 山本照子 著, 須田立雄 編集：骨形成と骨吸収及びそれらの調節因子 2. 廣川書店：347-362, 1995
  - 23) Sims NA, Dupont S, Krust A, et al: Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone* 30: 18-25, 2002
  - 24) 佐藤隆史, 加藤茂明, 河野博隆：アンドロゲン受容体研究の最近の進歩—骨代謝との関連も含めて—. *THE BONE*, 16(2) : 23-27, 2002
  - 25) 森嶋庸輔, 山田治基, 原田信広：アロマターゼ (アロマターゼ KO オスマウス). *THE BONE*, 20(2) : 55-59, 2006
  - 26) 北條めぐみ, 大塚博光, 会澤芳樹：ビタミン K 濃度に対する性ホルモンの影響. *日本血栓止血学会誌*, 10(6) : 444-450, 1999

---

## Effect of polymorphisms in the gamma-glutamyl carboxylase gene *GGCX* on gamma-carboxylation of osteocalcin and bone mineral density: Comparison of the ucOC/OC ratio by *GGCX* gene polymorphism

Hidetaka Hasegawa <sup>1)</sup> Hiroshi Kamiguchi <sup>2)</sup> Daisuke Murakami <sup>1)</sup> Yuka Hasegawa <sup>3)</sup>  
Yuki Matsuki <sup>4)</sup> Hideaki Matsuki <sup>5)</sup>

1) Hirosaki University of Health and Welfare (3-18-1 Sanpinai, Hirosaki, Aomori, 036-8102, Japan)

2) Tokai University Education and Research Support Center (143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan)

3) Hirosaki University School of Medicine and Hospital (53 honchou, hirosaki, aomori, 036-8563)

4) Tokai University Oiso Hospital. (21-1 Gakyou, Oiso, Kanagawa, 259-1198, Japan)

5) Tokai University School of Health Sciences (143 Shimokasuya, Isehara, Kanagawa, 259-1193, Japan)

### Abstract

The purpose of our study was to examine the relationship between gamma-carboxyglutamic acid, osteocalcin-regulated bone density, and polymorphisms in the  $\gamma$ -glutamyl carboxylase (*GGCX*) gene. Our aim is to provide effective nutrition education about the risks of low bone-mineral density and how to reduce the risks of osteoporosis in people who are predisposed to bone metabolism disorders.

We enrolled 54 men and women (average age 19.4 years old) in this study. *GGCX* (SNP; R325Q, 974G>A rs699664) genotype frequencies were 20.0% GG (wild type; n=11), 74.0% GA (n=40), and 6.0% AA (homozygous variant; n=3). The AA genotype was detected only in women. Ultrasound calcaneal bone mass was lowest in subjects with the AA genotype. Further, undercarboxylated osteocalcin (ucOC), which indicates a shortage of vitamin K, averaged 8.91 ng/mL in GG individuals (SD=3.80), 4.30 ng/mL in AA individuals (SD=2.02), and 6.88 ng/mL in GA individuals (SD=3.40). Thus, we concluded that the AA genotype was associated with poor uptake of vitamin K. The ratio of undercarboxylated osteocalcin to osteocalcin (ucOC/OC ratio) represents *GGCX* activity, which depends on the vitamin K a coenzyme, and was highest in AA subjects. Thus, the AA genotype is associated with non-function of vitamin K as a coenzyme.

Key Words: *GGCX* genotype testing, undercarboxylated osteocalcin, Vitamin K, bone mineral density