

閉経後の日本人女性における腸内細菌叢、骨代謝、および骨折リスクの間の関連

尾崎 大也¹ 久保田 亮平¹ 前野 卓也² Mohamed Abdelhakim³ 仁杉 直子⁴

¹ さいたま市 武蔵浦和メディカルセンター 武蔵浦和整形外科内科クリニック

² さいたま市 武蔵浦和メディカルセンター むさし薬局

³ 日本医科大学形成外科・再建・美容外科

⁴ さいたま市 武蔵浦和メディカルセンター ミューズ皮膚科ペインクリニック

概要

骨代謝と骨折のリスクに関する腸内細菌叢のデータは限られています。ビタミン K は特定の腸内細菌によって産生され、骨の質を維持する役割を果たしていると報告されています。

目的:閉経後の日本人女性における腸内細菌叢の組成、骨代謝、および骨折リスクの関係を調査しました。

方法:骨塩密度(BMD)は、閉経後の 38 人の女性(平均年齢 62.9 歳)で、前腕の二重エネルギーX線吸収測定法を使用して評価されました。血清骨代謝回転マーカー(ビタミン K 画分と酒石酸耐性酸性ホスファターゼ 5b; TRACP-5b)、腸内細菌叢プロファイリング(16S rRNA 遺伝子配列決定)、および骨折歴とビタミン K 摂取量を含む自己記入式質問票データを収集して分析しました。ビタミン K2、BMD、および TRACP-5b のデータは、それぞれ 0.06 ng / mL、87.05%、および 420 mU / dL のカットオフ値を使用して高レベルグループと低レベルグループに分けられました。細菌の割合を分析しました。骨折の発生率と相対リスクを各細菌について調査しました。

結果:*Bacteroides* 属は高ビタミン K2 グループで優勢でした(29.73%対 21.58%、 $P = 0.022$)。骨折の発生率は低 *Bacteroides* 群で有意に高く、骨折歴のリスク比は 5.6 倍高かった。

Rikenellaceae 科は、低 BMD 群でより豊富で、高 TRACP-5b 群でより豊富でした(それぞれ 2.15%対 0.82%、 $P = 0.004$; 2.38%対 1.12%、 $P = 0.013$)。

結論:*Bacteroides* 属と *Rikenellaceae* 科は、骨代謝と骨折のリスクに関与している可能性があります。骨代謝における根底にある微生物叢関連経路のさらなる調査は、治療戦略を明らかにし、骨粗鬆症の予防を促進する可能性があります。

序論

近年、日本の人口は急速に高齢化しており、65 歳以上の高齢者が総人口の 27.7%以上を占めています。したがって、骨粗鬆症の発生率は着実に増加しています。40 歳以上の日本人患者の骨粗鬆症の有病率は、骨粗鬆症性腰椎 L2-L4 領域の男性と女性でそれぞれ 12.4%と 26.5%に加えて、男性で 3.4%、女性で 19.2%であると報告されました[1]。全国の骨粗鬆症患者の推定数は、特に女性で 1,300 万人を超えています。閉経後の女性では、エストロゲン欠乏による骨吸収の増加と骨密度の低下により骨粗鬆症が進行します。骨粗鬆症は、骨折の主要な危険因子と広く考えられています。したがって、椎体、前腕、および近位大腿骨の骨折などの骨粗鬆症関連の骨折が発生する可能性が高くなります[2]。骨折リスク評価ツール(FRAX®)は、骨塩密度(BMD)およびその他のリスクを評価することにより、股関節骨折および主要な骨粗鬆症性骨折のリスクがある患者の主要な骨粗鬆症性骨折の 10 年確率を評価するために世界保健機関によって開発されました。BMD とライフスタイルに関連する要因[3]。骨粗鬆症に関する日本の診療ガイドラインでは、骨折リスクが 15%以上であることが医薬品治療を開始するための基準と見なされています。股関節骨折は、骨折後 1 年以内に死亡

スクを 10%から 20%増加させます。股関節骨折の患者の機能状態は、骨折前の機能状態と比較して、これらの患者の 60%で徐々に悪化します。さらに、脊椎骨折は、X 線撮影を使用して検出されたものの間でさえ、死亡のリスクの増加に寄与します。日本の骨粗鬆症患者の中で、股関節骨折はこれらの患者の年間 13 万人に発生しています。これらのうち、20,000 人の患者が死亡し、60,000 人が機能低下を経験しています[4]。このように、予防は医療だけでなく社会全体にとっても重要な課題となっています。

ヒトマイクロバイオームは推定 100 兆個の微生物で構成されており、腸には約 1000 種類の細菌が生息しています[5、6]。この腸内細菌集団は、まとめて腸内細菌叢と呼ばれます。

ヒト腸内細菌叢は、Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria、Proteobacteria を含む 4 つの主要な共存門で構成されています。これらの門は腸内細菌叢の 90%以上を占めています[7]。

腸内細菌叢は、複雑なメカニズムを介して腸の恒常性を維持します。この恒常性は、ストレスや老化などのさまざまな刺激によって多少乱されても、元の状態に戻る傾向が強いです。さらに、生きている有益なバクテリア(プロバイオティクス)の経口摂取は、腸内細菌叢を変える可能性があります。しかし、宿主の遺伝的素因または外部環境要因の過度の影響のいずれかによる腸の恒常性の崩壊(microbial dysbiosis と呼ばれる)は、感染に対する先天性腸管防御の喪失につながる可能性があります。これは最終的に、炎症性腸疾患(IBD)[8]や結腸直腸癌[9]などの胃腸障害、肥満[10]や糖尿病[11]などの代謝性疾患、およびその他のさまざまな障害を引き起こす可能性があります。うつ病[12]、パーキンソン病[13]、およびアレルギー[14]として。microbial dysbiosis と上記の疾患との間のこの関連は広く報告されている。

ただし、骨粗鬆症患者の腸内細菌叢の変化の影響は不明であります。王ら。原発性骨粗鬆症、骨減少症の患者、および正常な対照における腸内細菌叢の多様性を分析しました。彼らは、骨粗鬆症の患者では、正常対照群と比較して Firmicutes 門の割合が増加し、骨粗鬆症の患者では Bacteroidetes 門の割合が有意に減少したと報告されていることを発見しました[15]。

分類の観点から、腸内細菌は、Firmicutes、Bacteroidetes、Actinobacteria、および Proteobacteria に代表される門から、クラス、目、科、および属に細分されます(図 1)。

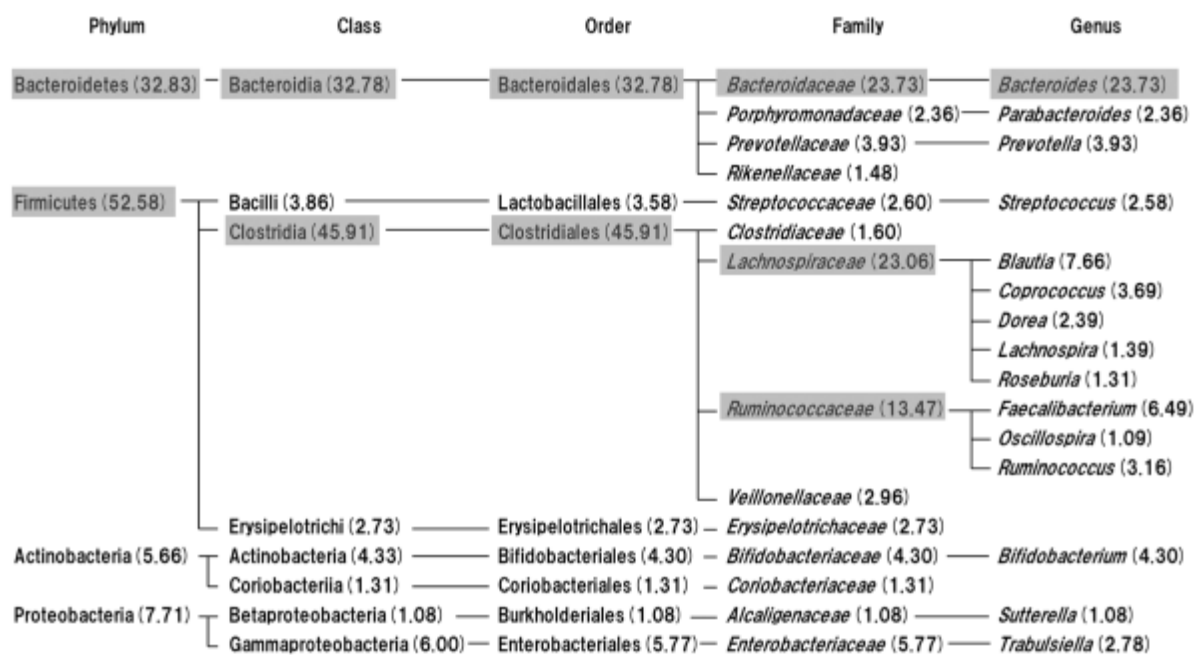


Fig. 1 Bacterial species targeted for statistical analysis. List of bacteria with their taxonomical classification (phylum-class-order-family-genus) with a mean value of > 1% (n = 38). Numbers are presented as averages (%). Bacterial species highlighted in gray indicate bacterial species with mean value of $\geq 10\%$

同じ門でも、家族や属などの各グループにはさまざまな機能があります。

たとえば、Firmicutes 門の Ruminococcaceae 科は、Faecalibacterium 属や Butyricoccus 属などの酪酸産

生細菌で構成されています。酪酸菌は、IBD などの胃腸障害における微生物叢の調節を標的とする有望なプロバイオティクス候補です[16]。同様に、*Ruminococcaceae* 科のメンバーである *Ruminococcus gnavus* は、人工股関節置換術後の感染[17]、*Ruminococcus gnavus* による肝膿瘍、および感染性心内膜炎に関与していると報告されています。さらに、報告によると、*Ruminococcus* 属は脳梗塞および心筋梗塞の発症に関与していることが示されています[18]。したがって、異なる機能を持つ細菌は、分類の観点から同じ集団を構成します。

この研究は、骨粗鬆症患者における腸内細菌叢の変化、特に家族および属レベルでの変化の影響を明らかにするために実施されました。腸内細菌叢の役割をよりよく理解することは、骨粗鬆症の新しい治療法の開発につながる可能性があります。したがって、閉経後の日本人女性の腸内微生物叢と骨代謝を調査および分析することにより、特定の腸内微生物が骨粗鬆症に関連しているかどうかを判断することを目的としました。

方法

対象者

この研究では、2017年1月から2017年4月に外来治療のために武蔵浦和整形外科内科クリニックを訪れた閉経後の女性38人(平均年齢62.9歳(範囲、50~82歳))からデータを収集しました。すべての被験者が参加するための情報に基づく同意を提供しました。そして各参加者のデータの個人識別を回避するために十分な倫理的配慮がなされました。糖尿病、悪性腫瘍、急性期骨折(2か月以内)、IBDの患者、または透析を受けた患者、または骨粗鬆症の薬を服用した患者、ワルファリン、ステロイド、抗生物質のサンプル採取前3か月以内の患者は除外しました。これは、これらの状態や薬が骨代謝や腸内細菌叢に影響を与える可能性があるためです。

BMDは、二重エネルギーX線吸収測定法(DCS 600EXV; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)を使用して、前腕の近位1/3で測定されました。骨密度は、若年成人の平均(YAM:20~44歳での平均値の骨密度の100%)の値に基づいて決定されました。

生化学的パラメータ

クリニックのシステム上、採血の時間帯を統一することが困難であったため、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ5b (TRACP-5b)は、従来のカルボキシ末端コラーゲン架橋より日内変動が少ない[19]ため、骨吸収マーカーとして使用することにしました。また、ビタミンK欠乏症の尺度として低カルボキシル化オステオカルシン(ucOC)を使用しました。骨代謝の生化学的指標として、ビタミンK1、K2、 1α 、25-(OH) $_2$ ビタミンD、アルカリホスファターゼ(ALP)、カルシウム(Ca)、およびリン(P)の血清レベルを測定しました。

アンケート調査

閉経年齢、骨折歴、およびFRAXスコアが記録されました。細菌組成との関係を明らかにするために、運動頻度、排便頻度、アルコール摂取頻度、穀物、野菜、ヨーグルト、乳酸菌飲料、日本で一般的なビタミンK2の豊富な供給源である大豆発酵製品(納豆)の食事摂取量についてランダムアンケート調査を実施しました。研究中、食事制限やライフスタイル管理措置は被験者に適用されませんでした。高摂取グループと低摂取グループの2つのグループが定義されました。各グループは、週あたりの食事の数(0、1-3、4-6、毎日)と納豆の摂取頻度について調査されました。骨折歴については、交通事故や高所からの転倒などの高エネルギー傷害は除外した。質問票情報と腸内細菌叢との関係を統計的に分析した(表1)。

Table 1 Relationship between questionnaire factors and gut microbiota

	n	<i>Bacteroides</i>	<i>Rikenellaceae</i>	<i>Lachnospiraceae</i>	<i>Blautia</i>	<i>Oscillospira</i>	<i>Ruminococcus</i>	<i>Veillonellaceae</i>	<i>Erysipelotrichaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Sutterella</i>	
Alcohol (over 350ml beer)	More than twice/month	16	17.75	1.55	25.51	7.77	1.03	3.06	3.22	4.03	4.96	1.31
	Less than twice/month	22	28.07	1.43	25.73	7.59	1.14	3.23	2.77	3.48	3.82	0.92
	P value		0.0054**	0.383	0.657	0.976	0.976	0.965	0.767	0.515	0.214	0.406
Exercise (more than 30 minutes)	More than once/week	17	24.41	0.95	29.76	10.40	1.01	3.17	2.94	2.79	1.79	0.81
	Less than once/week	21	23.17	1.91	22.30	5.44	1.16	3.15	2.97	4.46	6.33	1.30
	P value		0.965	0.150	0.0019**	0.0015**	0.780	0.953	0.714	0.067	0.0006***	0.190
Stool frequency	More than once/day	25	22.15	1.42	26.19	8.50	0.76	2.79	3.36	3.69	4.31	1.19
	Less than once/day	13	26.75	1.60	24.58	6.05	1.73	3.86	2.19	3.75	4.27	0.88
	P value		0.236	0.538	0.451	0.181	0.006**	0.317	0.317	0.770	0.559	0.331
Rice, bread, noodles, mochi	More than twice/day	23	26.22	1.71	25.87	7.56	0.91	3.10	1.90	3.59	4.03	1.14
	Less than twice/day	15	19.90	1.13	25.28	7.82	1.38	3.24	4.59	3.90	4.71	0.99
	P value		0.038*	0.420	0.731	0.881	0.347	0.881	0.021*	0.823	0.858	0.799
Unpurified cereals (unpolished rice, millet rice, bran)	More than once/week	18	23.89	1.37	26.92	8.16	1.56	3.83	2.20	3.88	3.37	0.85
	Less than once/week	18	24.89	1.46	24.55	7.35	0.68	2.63	4.03	3.19	4.90	1.08
	P value		0.825	0.949	0.411	0.812	0.012*	0.342	0.133	0.728	0.071	0.427
Green and yellow vegetables	More than once/2 days	21	25.66	1.41	24.88	7.25	0.94	2.92	2.28	3.75	3.73	0.97
	Less than once/2 days	17	21.33	1.57	26.57	8.18	1.28	3.44	3.80	3.66	5.01	1.22
	P value		0.419	0.769	0.607	0.628	0.872	0.780	0.110	0.918	0.355	0.353
Yogurt, lactic acid bacteria beverage	More than once/2 days	26	23.99	1.64	25.69	7.64	1.09	3.02	2.78	3.89	4.30	1.02
	Less than once/2 days	12	23.16	1.13	25.52	7.72	1.10	3.45	3.34	3.32	4.30	1.22
	P value		0.753	0.717	0.753	0.802	0.362	0.672	0.722	0.615	0.925	0.571
Natto	More than once/2 days	11	16.97	1.27	26.41	7.04	1.05	4.05	2.88	3.62	3.14	0.50
	Less than once/2 days	27	26.48	1.57	25.32	7.92	1.11	2.79	2.99	3.75	4.77	1.32
	P value		0.0079**	0.923	0.664	0.782	0.898	0.500	0.949	0.809	0.509	0.090

* = P<0.05

** = P<0.01

*** = P<0.001

腸内細菌叢の分析:糞便サンプリング、DNA 抽出および配列決定

グアニジンチオシアン酸塩溶液を含むブラシタイプの収集キット (FecesCollectionkit®; Techno Suruga Laboratory、静岡、日本) を使用して糞便サンプルを収集し、分析まで 4°C で保存しました。自動 DNA 抽出機 (GENE PREP STAR PI-480; 倉敷紡績株式会社、大阪、日本) を製造元の指示に従って使用して、糞便サンプルから DNA を抽出しました。16S リボソーム RNA (rRNA) 領域 (V1-V2) は、フォワードプライマー (16S_27Fmod: TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG AGR GTT TGA TYM TGG CTC AG) とリバースプライマー (16S_338R: GTC TCG TGG) を使用して増幅されました。GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GTG CTG CCT CCC GTA GGA GT) と KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR キット (Roche、バーゼル、スイス)。Illumina MiSeq プラットフォーム (Illumina、カリフォルニア州サンディエゴ) を使用して 16S アンプリコンをシーケンスするために、Nextera XT Index キット (Illumina) を使用してデュアルインデックスアダプターを接続しました。各ライブラリーを 5ng / μL に希釈し、等量のアリコートをして混合して、それぞれ 4nM のライブラリープールを作成しました。混合ライブラリーの DNA 濃度は、プライマー1 (AAT GAT ACG GCG ACC ACC) およびプライマー2 (CAA GCA GAA GAC GGC ATA) を使用した KAPA SYBR FAST qPCR マスターミックス (KK4601、KAPA Biosystems、マサチューセッツ州ウィルミントン) での qPCR を使用して定量化されました。CGA)。ライブラリー調製は、16S ライブラリー調製イルミナプロトコル (Illumina) に従って実施しました。ライブラリーは、MiSeq Reagent Kit v2 (500 Cycles) を使用して 250 bp ペアエンド用にシーケンスされました (図 2)。

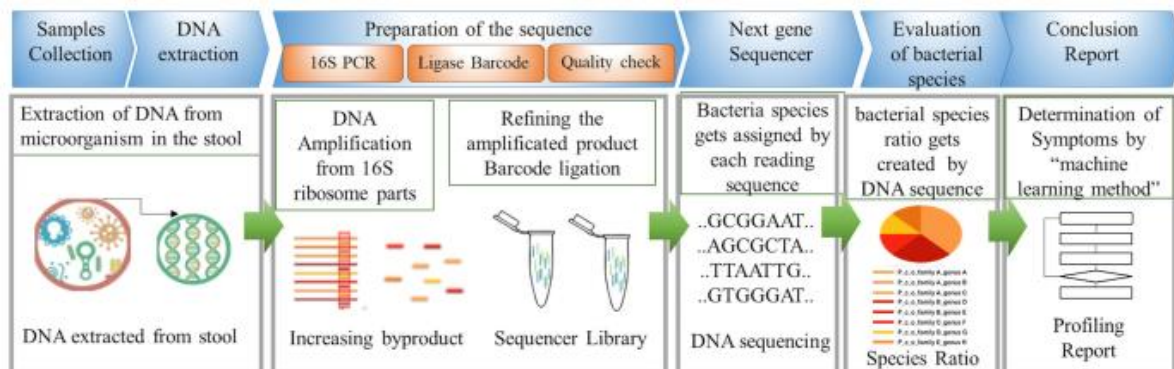


Fig. 2 Overview of fecal sample genetic profiling using the 16S rRNA gene to obtain a representation of gut microbiota composition

腸内細菌叢の分析:16SrRNA 遺伝子配列に基づく分類法の割り当て

部分的な 16SrRNA 遺伝子配列のペアエンドリードは 97%のヌクレオチド同一性によってクラスター化され、Quantitative Insights を通じて Greengenes データベース(v13.8)(Second Genome, South San Francisco, CA)[20]を使用して分類学的情報が割り当てられました。微生物生態学(QIIME)パイプライン(v1.8.0)(コロラド大学ボルダー校ナイトラボ)[21]。QIIME パイプラインに基づくデータ処理と割り当ての手順は次のとおりです。(i)ペアエンド読み取りに参加する。(ii)Q30(> 99.9%)の精度と> 300bp の読み取り長による品質フィルタリング。(iii)後続の分析のために、サンプルごとに 10,000 回の読み取りをランダムに抽出します。(iv)UCLUST(v1.2.22q)による 97%の同一性を持つ運用分類単位(OTU)のクラスタリング[22];(v)RDP 分類子[23]と完全長 16S 遺伝子 Greengenes データ(v13.8)を使用して、各 OTU に分類学的情報を割り当て、細菌属の同一性と組成を決定します。腸内細菌叢の分析は、日本の東京にあるサイキンソー社に委託されました。

結果から、38 人の閉経後の女性の平均が、門、クラス、目、家族、および属のレベルで計算されました。この研究の探索的性質により、平均比率が 1%以上の細菌のみが統計分析の対象となり、平均比率が 1%未満の細菌は除外されました(図 1)。

臨床パラメータの測定によるグループ化

年齢、閉経年齢、BMD、骨折歴、FRAX スコア、ucOC、TRACP-5b、ビタミン K1、およびビタミン K2 のレベルを次の 2 つのグループに分けました。

年齢と BMD は平均値に基づいて分けられました。これは、骨粗鬆症の基準値に基づいて BMD を分割することが困難だったためです。データ収集中に骨粗鬆症の治療を受けた患者を除外した後、骨粗鬆症の診断基準を満たした患者はごくわずかでした。閉経年齢については、日本人女性(50.2 歳)の平均値[24]をカットオフとして使用した。骨折履歴データは、骨折履歴の有無にかかわらずグループに分けられました。ucOC および TRACP-5b については、日本の正常値のカットオフが使用されました。ビタミン K2 については、大部分がこの値を超えたため、0.06 ng / mL の下限を使用しました。日本では、FRAX スコアの推奨カットオフ値は 15%ですが、この研究では 38 人中 3 人の患者しかいなかったため、2 つのグループに分けることは困難でした。次に、カットオフ値を平均値として採用しました。納豆の場合、1 回の摂取量は 40g(ビタミン K 摂取量:375.6 μ g[25])と計算され、被験者の平均摂取量である 150 μ g がカットオフ値として使用されました。アンケートの結果から、納豆を週に 4~6 回 40g 以上食べた人は納豆の摂取頻度が高いグループに分類され、納豆を週に 1~3 回食べた人は納豆の摂取頻度が低いグループに分類されました。

統計分析

グループ間の腸内細菌の有意差を評価するために比較が行われました。統計分析はマンホイットニーの U 検定を使用して実行され、腸内細菌叢の半分以上が正規分布を示さなかったため、 $P < 0.05$ が有意であると見なされました。各属の骨折リスクは、腸内細菌叢の 2 つのグループと骨折歴から決定され、オッズ比と相対リスクが計算されました。私たちの研究の探索的性質のため、多重検定の修正は実行されませんでした。

結果

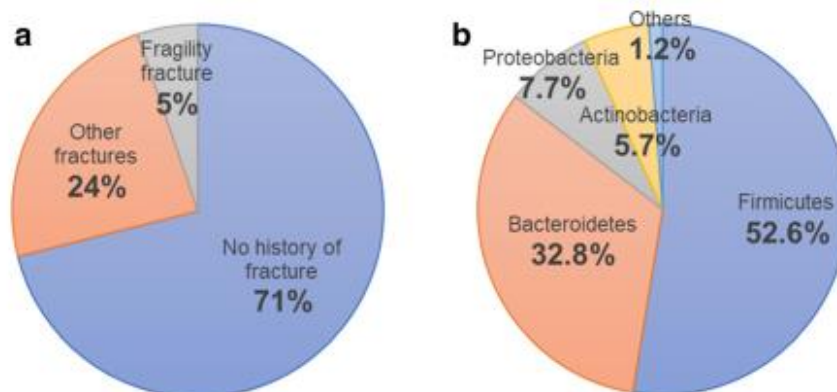
YAM 値の平均 BMD は $87.05\% \pm 11.78\%$ であり、閉経年齢の平均 BMD は 51.79 ± 4.65 歳でした。骨代謝マーカー (ucOC、TRACP-5b) および評価されたすべての骨栄養素 (ビタミン D、K1、K2、Ca、および P) は、 12.59 ± 4.59 pg/mL とわずかに低い活性ビタミン D を除いて、正常レベル内でした。FRAX スコアは $8.37\% \pm 3.95\%$ でした (表 2)。骨折歴のある 11 人の患者のうち、2 人の患者は脆弱性骨折を持っていました (図 3a)。アンケートデータは、38 人の患者のうち 17 人が少なくとも週に 1 回運動し、16 人がより頻繁にアルコールを消費し、11 人が納豆を頻繁に食べたことを示しました (表 1)。

Table 2 Characteristics of the participants

	Average value
Age	62.87 ± 6.22
Menopausal age	51.79 ± 4.65
BMD (YAM:%)	87.05 ± 11.78
ucOC (ng/ml)	4.38 ± 2.16
TRACP (mU/dL)	371.45 ± 126.77
Vitamin D (pg/mL)	12.59 ± 4.59
Vitamin K1 (ng/mL)	1.08 ± 0.75
Vitamin K2 (ng/mL)	0.08 ± 0.08
FRAX (%)	8.38 ± 3.94

Note: BMD, Bone mineral density; ucOC, Uncarboxylated osteocalcin; TRACP-5b, tartrate-resistant acid phosphatase 5b; ALP, Alkaline phosphatase; FRAX, Fracture Risk Assessment

Fig. 3 (a) Fracture history of the 38 patients in this study. (b) Mean values of gut microbiota composition at the phylum level



腸内微生物群集の構成

門レベルでの腸内細菌叢組成の平均値は、Firmicutes 門で $52.58\% \pm 9.87\%$ 、Bacteroidetes 門で $32.83\% \pm 11.64\%$ 、Proteobacteria 門で $7.71\% \pm 9.16\%$ 、Actinobacteria 門で $5.66\% \pm 4.51\%$ でした (図 3b)。

年齢

患者は 62.9 歳以上 62.9 歳未満のグループに分けられました (それぞれ $n = 20$ と $n = 18$)。年齢が高いグループでは、*Lachnospiraceae* 科と *Blautia* 属の割合が有意に低かった (それぞれ $P = 0.047$ 、 0.002) (表 3)。

閉経年齢

日本人女性の閉経年齢は 50.2 歳であるため、患者は閉経期の高い年齢層 ($n = 22$) と閉経期の低い年齢層 ($n = 16$) に分けられました。*Oscillospira* 属と *Ruminococcus* 属は、閉経期の高い年齢層で有意に豊富でした (それぞれ、 $P = 0.018$ 、 0.014)。対照的に、*Erysipelotrichaceae* 科と *Bifidobacterium* 属は、閉経期の低い年齢層で有意に豊富でした (それぞれ $P = 0.011$ 、 0.014) (表 3)。

BMD

BMD は、平均 BMD より高いグループ (高 BMD グループ) と平均 BMD より低いグループ (低 BMD グループ; それぞれ $n = 19$) の間で比較されました。*Rikenellaceae* 科は、低 BMD グループで有意に豊富でした ($P = 0.004$) (表 3)。

Table.3 Relationship between clinical measurements and microbial community

				g_Bacteroides	f_Rikenellaceae	f_Lachnospiraceae	g_Blautia	g_Oscillospira	g_Ruminococcus	f_Veillonellaceae	f_Erysipelotrichaceae	g_Bifidobacterium	g_Sutterella
Age	62.9	Older group	20	21.82	1.20	23.27	5.34	1.18	3.77	2.69	3.55	4.09	0.87
		Younger group	18	25.84	1.80	28.27	10.25	1.00	2.47	3.25	3.89	4.54	1.33
		P value		0.380	0.660	0.047*	0.002**	0.511	0.520	0.306	0.861	0.682	0.446
Menopausal age	50.2	High-age group	22	23.86	1.67	26.83	7.82	1.43	4.29	2.90	2.59	3.26	0.77
		Low-age group	16	23.54	1.22	23.99	7.44	0.63	1.60	3.02	5.25	5.73	1.52
		P value		0.790	0.399	0.237	0.894	0.018*	0.014*	0.861	0.011*	0.014*	0.044*
BMD	87.05	High group	19	23.14	0.82	26.76	8.19	0.93	2.67	3.18	3.49	4.52	0.93
		Low group	19	24.31	2.15	24.52	7.13	1.26	3.64	2.74	3.93	4.07	1.24
		P value		0.849	0.004**	0.358	0.540	0.408	0.249	0.144	0.249	0.726	0.312
History of fracture	(YAM : %)	Present	11	20.11	2.00	21.30	6.18	1.44	2.94	3.02	4.98	4.37	0.71
		Absent	27	25.20	1.27	27.40	8.27	0.96	3.24	2.93	3.19	4.27	1.23
		P value		0.074	0.259	0.020*	0.234	0.402	0.822	0.961	0.126	0.809	0.550
ucOC	4.5	High-level group	17	25.34	1.54	25.42	8.00	1.01	3.06	2.19	3.80	4.19	1.60
		Low-level group	21	22.42	1.44	25.81	7.39	1.17	3.23	3.65	3.63	4.39	0.66
		P value		0.371	0.394	0.803	0.849	0.528	0.692	0.286	0.895	0.860	0.044*
TRACP	420	High-level group	11	25.54	2.38	23.64	5.88	0.87	3.81	2.58	3.65	5.98	1.73
		Low-level group	27	22.99	1.12	26.45	8.39	1.19	2.89	3.30	3.73	3.61	0.82
		P value		0.469	0.013*	0.281	0.209	0.573	0.215	0.373	0.664	0.016*	0.103
Vitamin K2	0.06	High-level group	10	29.73	1.78	26.65	7.07	1.10	3.18	3.48	4.69	5.63	1.88
		Low-level group	28	21.58	1.38	25.28	7.88	1.09	3.15	2.82	3.36	3.82	0.80
		P value		0.022*	0.803	0.691	0.921	0.740	1.000	0.816	0.336	0.312	0.026*
FRAX	8.38	High-score group	17	23.01	1.10	23.08	5.97	1.02	3.20	2.12	3.71	2.99	1.05
		Low-score group	21	24.31	1.79	27.70	9.04	1.15	3.12	3.64	3.71	5.36	1.11
		P value		0.692	0.547	0.076	0.081	0.419	0.547	0.044*	0.587	0.277	0.606

* = P<0.05

** = P<0.005

Note: BMD, Bone mineral density; ucOC, Uncarboxylated osteocalcin; TRACP-5b, tartrate-resistant acid phosphatase 5b; ALP, Alkaline phosphatase; FRAX, Fracture Risk Assessment

骨折歴

骨折歴は 38 人の患者のうち 11 人で観察されました。これらのうちの 2 つは脆弱性骨折を持っていました。*Lachnospiraceae* 科は、骨折歴のあるグループではそれほど豊富ではありませんでした(P = 0.02)。骨折歴は年齢による有意な影響を受けませんでした(表 3)。

ucOC

ucOC の正常値は<4.5ng / mL に設定されたため、≥4.5ng/ mL が高 ucOC グループに指定され、<4.5 ng / mL が低 ucOC グループに指定されました(それぞれ n = 17 および n = 11)。*Sutterella* 属は高 ucOC グループで優勢でした(P = 0.044)(表 3)。

TRACP-5b

TRACP-5b(正常値<420 mU / dL)に関して、患者は、カットオフ値が 420 mU / dL の高 TRACP-5b グループと低 TRACP-5b グループに分けられました(それぞれ n = 11 と n = 27)。*Lachnospiraceae* 科と *Bifidobacterium* 属は、高 TRACP-5b グループで優勢でした(それぞれ P = 0.013、0.016)(表 3)。

ビタミン K2

血中ビタミン K2 測定値の下限は 0.06ng / mL であったため、これをカットオフ値として使用し、患者を高ビタミン K2 グループ(n = 10)と低ビタミン K2 グループ(n = 28)に分類しました。*Bacteroides* 属と *Sutterella* 属は高ビタミン K2 グループで優勢でした(それぞれ P = 0.022、0.026)(表 3)。また、ビタミン K2 と納豆摂取量の間に関連関

係はありませんでした。

FRAX

FRAX スコアのカットオフ値は 8.37%であるため、患者は高 FRAX スコアグループと低 FRAX スコアグループに分けられました(それぞれ $n = 9$ と $n = 29$)。 *Veillonellaceae* 科は、FRAX スコアの低いグループで優勢でした($P = 0.044$)(表 3)。

FRAX スコアを除いて、年齢のグループ間に有意差はありませんでした。FRAX ツールには年齢も項目として含まれているため、FRAX スコアの高いグループは年齢も高い傾向がありました。

ビタミン D、ビタミン K1、ALP、Ca、P に有意差は見られませんでした。

骨折リスク

骨折リスクの高いグループと骨折リスクの低いグループの骨折の発生率を上記の細菌間で比較しました。 *Bacteroides* 属では、低骨折リスクグループの骨折発生率は 52.9%でしたが、高骨折リスクグループの骨折発生率は 9.5%でした(オッズ比 10.7、95%信頼区間:1.88、60.9、 $P = 0.0049$ 、相対リスク 5.57。しかし、他の細菌は有意差を示さなかった。 *Lachnospiraceae* 科は上記の FRAX の結果と同様に骨折のリスクが低い傾向があり、 *Rikenellaceae* 科と *Erysipelotrichaceae* 科は骨折のリスクがわずかに高い傾向があった(図 4)。

議論

この研究では、統計分析の結果は、腸内細菌が骨塩密度と骨折のリスクに影響を与えることを示唆しています。 *Bacteroides* 属はビタミン K2 レベルと骨折リスクに有意差を示し、 *Rikenellaceae* 科は BMD と TRACP-5b レベルに有意差を示しました。さらに、年齢と骨折歴の両方の観点から重要な *Lachnospiraceae* 科について考察したいと思います。

Bacteroides 属

Bacteroides 属はビタミン K を合成します。本質的に、ビタミン K は、フィロキノン(ビタミン K1)やメナキノン(MKn; ビタミン K2)などの特定のタンパク質を完全に合成するために人間が必要とする構造的に類似した脂溶性化合物のグループです。ビタミン K は、肝臓での血液凝固因子、骨でのオステオカルシン、軟骨と血管壁でのマトリックス Gla タンパク質の産生における補因子です[26]。さらに、オステオカルシンやマトリックス Gla タンパク質など、骨の特定のタンパク質はビタミン K に依存しているため、ビタミン K も骨基質の質の調節に重要な役割を果たします[27]。

ビタミン K2 同族列であるメナキノン-4(MK-4、メナテロン)は、日本の骨粗鬆症の治療に使用されています。骨吸収と骨折の観点から、よく知られている予防効果があることが知られています。さらに、大腿骨、頸椎、および椎骨の圧迫骨折の発生率は、血中ビタミン K 濃度が低い高齢女性および血清 ucOC レベルが高い女性で高くなっています[28]。

MKn には、枯草菌を含む有名な発酵大豆製品である納豆に含まれる MK-7 が大量に含まれています。MK-7 は他の発酵食品にも含まれています。MKn は腸内細菌叢によっても生成されますが、MK-10 と MK-11 はバクテロイデスによって合成されます[29]。

私たちの研究では、*Bacteroides* 属は低レベルのビタミン K2 グループよりも高レベルのビタミン K2 グループで有意に豊富でした($P = 0.022$)(表 3)が、これら 2 つの間で納豆摂取量に関して有意差はありませんでしたグループ。したがって、食事摂取はビタミン K2 レベルに影響を与えず、ビタミン K2 産生バクテロイデスが何らかの影響を及ぼしたと推測しました。

BMD に有意差がなかったことを考えると、*Bacteroides* 属は骨の強度に影響を与えないと仮定しました。さらに、*Bacteroides* は骨の質に何らかの影響を与えると考えられており、脆弱性骨折ではなく、骨粗鬆症とは関係のない骨折

に関連しています。

私たちの研究では、骨折リスクは低レベルの *Bacteroides* 属群で 5.6 倍高く(図 4b)、骨代謝と骨折リスクにおける *Bacteroides* 属の役割を示唆しています。難消化性デンプン、高レベルの水溶性繊維、赤身の肉を含む食事を摂取すると、*Bacteroides* 属の存在量が増える可能性があることも報告されています[7]。したがって、上記の食事を摂取すると、骨折のリスクが軽減される可能性があります。

Rikenellaceae 科

Rikenellaceae 科の機能はまだよく理解されていません。しかし、この家族は多くの糖尿病患者に豊富に存在すると報告されています[30]。また、潰瘍性大腸炎を発症する可能性が低い PD-1^{-/-}マウスは、腸内細菌叢の組成に変化を示し、腸内細菌科の割合が大幅に減少しました[31]。私たちの研究では、*Rikenellaceae* 科は低 BMD グループと高 TRACP-5b グループでより豊富であり、このファミリーが骨吸収と骨密度に悪影響を与える可能性があることを示唆しています。さらに、高脂肪食を与えられたマウスは *Rikenellaceae* 科の割合が増加することが報告されているため[32]、これは動物実験ですが、高脂肪食を控えることは骨強度にプラスの影響を与える可能性があります。

Lachnospiraceae 科

Lachnospiraceae 科は、人間の腸内で最も豊富な細菌の 1 つです[33]。*Lachnospiraceae* 科は、複雑な多糖類を短鎖脂肪酸に分解します。これらの細菌の豊富さは、宿主の免疫力を高め、腸の健康の強力な指標です。それらは、高齢者の腸[34]や、糖尿病[35]、肝硬変[36]、結腸癌[37]などのさまざまな病気の人で減少するため、有用な細菌の 1 つと見なされています。

Lachnospiraceae 科は、BMD が低い個体ではそれほど豊富ではなく、BMD および T スコアと正の相関があったことも報告されています[38]。この研究では、BMD に有意差はありませんでしたが、高 *Lachnospiraceae* 科グループよりも低 *Lachnospiraceae* 科グループの方が、相対リスクが 3 倍高い一方で、骨折発生率は有意に高かった(図 4b)。これは、*Lachnospiraceae* 科が骨折のリスクを予測するための有用な細菌として作用する可能性があることを示唆しました。

結語

私たちのデータは、*Bacteroides* 属と *Lachnospiraceae* 科の豊富さが骨代謝と骨折のリスクにプラスの役割を果たす可能性があることを示唆しています。さらに、*Rikenellaceae* は骨代謝と骨折のリスクに悪影響を与える可能性があります。

腸内細菌叢の特定の種を対象とした新しい治療法への注意は、骨粗鬆症と骨折予防のために保証されています。さらなる研究は、特定の種と、骨強度の増加または骨折の予防におけるそれらの潜在的な役割の分析に焦点を当てる必要があります。