

分担研究報告書

A) 遺伝子解析

ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究

加藤 茂明（東京大学分子細胞生物学研究所教授）

特発性大腿骨頭壊死症発症の分子メカニズムの一つには、グルココルチコイド作用の変異が考えられている。本研究では、ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、特発性大腿骨頭壊死症発症の作用点を明らかにする。具体的には、ステロイドホルモンレセプターの転写促進領域の同定、及びこれらレセプターの転写共役因子の同定を試みている。その結果、ERのN末端側の転写促進領域（AF-1）に結合するP68を細胞核抽出液より精製・クローニングした。

はじめに

特発性大腿骨頭壊死症発症の分子メカニズムの一つには、グルココルチコイド作用の変異が考えられている。ステロイドホルモンは核内レセプターを介した標的遺伝子群の転写制御によりその作用を現す。本研究では、ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能を分子レベルで解析することで、特発性大腿骨頭壊死症発症の作用点を明らかにする。具体的には、ステロイドホルモンレセプターの転写促進領域の同定、及びこれらレセプターの転写共役因子を同定する。

目的

核内レセプターを有する脂溶性ホルモンは、各組織において特徴ある生理活性を示す。このような組織特異的な生理作用はレセプターの生体内局在のみでは説明できず、むしろレセプターの細胞種特異的な機能によると考えられるようになってきている。このような組織特異性は、最近核内レセプターと相互作用する核内共役因子群が担うものと考えられている。従って、本研究では内分泌かく乱物質の標的分子としての転写共役因子の機能を探るものである。共役因子は、核内レセプターと基本転写因子群とを仲介し、転写制御に必須な構成因子と考えられているため、組織特異的なホルモン作用の理解にはこの共役因子の同定と性状解析は必須と考えられる。そこで本アプローチでは、特に組織特異的な作用が知られる性ステロイドホルモン（エストロゲン：女性

ホルモン、アンドロゲン：男性ホルモン）レセプター転写共役因子を中心に据え、グルココルチコイドレセプター（GR）への作用を検討する。

方法及び結果

1. 核内ステロイドホルモンレセプターの機能領域と機能制御

転写制御因子である核内レセプターは、2つの転写促進領域をレセプタータンパクN末端とC末端に有すると言われている。しかしながら、ホルモン結合によるレセプターの構造変化とそれに関わるこれら2つの領域の機能的な相互作用や、これに関与する共役因子との相互作用は全く不明である。またこれらの転写促進領域は各種キナーゼによりリン酸化されることで、転写促進活性が変わることがわかっている。そこで、エストロゲンレセプター（ER α 、ER β ）をモデルとして、ER分子内でのリガンド依存的な構造変化とタンパク内相互作用を、昨年度はこれらの相互作用と既知核内レセプター共役因子（SRC-1/TIF2/AIB1、p300/CBP）と女性ホルモンレセプター（TRAP/DRIP220）の相互作用を中心に調べp300/CBPはN末側転写促進能に関与することを明らかにした。

2. ホルモン活性を規定するレセプター共役因子の同定

上述した共役因子として既に同定されたものには、転写を促進するco-activatorと転写を抑制するco-repressorの存在が知られている。しかしながらこれ

ら既知共役因子群はレセプター種固有のものではなく、多くは数種のレセプター間で共有するものが多い。そこでレセプター種 [ER、アンドロゲンレセプター (AR)、ミネラルコルチコイドレセプター (MR)、ビタミンDレセプター (VDR)] 固有の共役因子の検索・同定を、酵母two-hybrid法を用いたcDNAスクリーニング、及び生化学的手法を用いて行った。その結果、ERのN末端側の転写促進領域 (AF-1) に結合するP68を細胞核抽出液より精製・クローニングした。P68はcDNAクローニングの結果、RNAヘリケースの1種であることが判明し、AR、MR、VDRへの効果についても調べたところ全く効果がなく、ER α 特異的であることが判明した。

考察及び結論

現在、同様の手法によりP72RNAヘリケースを同定しており、それらの性状解析を急ぐとともにGRへの効果を調べているところである。

研究発表

- 1) Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, 2000 (in press).
- 2) Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 (in press).
- 3) Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, 2000 (in press).
- 4) Sekine, K., Ohuchi, H., Fujiwara, M., Yamasaki, M., Yoshizawa, T., Sato, T., Yagishita, N., Matsui, D., Koga, Y., Itoh, N., Kato, S.: FGF10 is essential for the limb and lung formation. *Nature Genetics*, 21, 138-141, 1999.
- 5) Takeyama, K., Masuhiro, Y., Fuse, H., Endoh, H., Murayama, A., Kitanaka, S., Suzawa, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: Selective interaction of vitamin D receptor with transcriptional coactivators by a vitamin D analog. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 1049-1055, 1999.
- 6) Endoh, H., Maruyama, K., Masuhiro, Y., Kobayashi, Y., Goto, M., Tai, H., Yanagisawa, J., Metzger, D.,

Hashimoto, S., Kato, S.: Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor α . *Mol. Cell. Biol.*, 19, 5363-5372, 1999.

- 7) Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Toriyabe, T., Kashiwagi, K., Watanabe, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of TGF β and vitamin D signaling pathways on SMAD proteins acting as common transcriptional coactivators. *Science*, 283, 1317-1321, 1999.
- 8) Yanagi, Y., Suzawa, M., Kawabata, M., Miyazono, K., Yanagisawa, J., Kato, S.: Positive and negative modulation of vitamin D receptor function by transforming growth factor β signaling through Smad proteins. *J. Biol. Chem.*, 274, 12971-12974, 1999.
- 9) Kato, S., Sekine, K.: FGF-FGFR signaling in vertebrate organogenesis. *Cell. Mol. Biol.*, 45, 631-638, 1999.
- 10) Kitanaka, S., Murayama, A., Sakaki, T., Inoue, K., Seino, Y., Fukumoto, S., Shima, M., Yukizane, S., Takayanagi, M., Niimi, H., Takeyama, K., Kato, S.: No enzyme activity of 25-hydroxyvitamin D $_3$ 1 α -hydroxylase gene product in pseudovitamin D-deficiency rickets including that with mild clinical manifestation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 84, 4111-4117, 1999.
- 11) Murayama, A., Takeyama, K., Kitanaka, S., Kadera, Y., Kawaguchi, Y., Hosoya, T., Kato, S.: Positive and negative regulations of the renal 25-hydroxyvitamin D $_3$ 1 α -hydroxylase gene by parathyroid hormone, calcitonin, and 1 α , 25(OH) $_2$ D $_3$ in intact animals. *Endocrinology*, 140, 2224-2231, 1999.
- 12) Suzawa, M., Takeuchi, Y., Fukumoto, S., Kato, S., Ueno, Naoto, Miyazono, K., Matsumoto, T., Fujita, T.: Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells *in vitro*. *Endocrinology*, 140, 2125-2133, 1999.
- 13) Takeda, S., Yoshizawa, T., Nagai, Y., Yamato, H., Fukumoto, S., Sekine, K., Kato, S., Matsumoto, T., Fujita, T.: Stimulation of osteoclast formation by 1,25-dihydroxyvitamin D requires its binding to vitamin D receptor (VDR) in osteoblastic cells:

- Studies using VDR knockout mice. *Endocrinology*, 140, 1005-1008, 1999.
- 14) Sawada, N., Sakaki, T., Kitanaka, S., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase coexpression with adrenodoxin and NADPH-adrenodoxin reductase in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 265, 950-956, 1999.
 - 15) Sakaki, T., Sawada, N., Takeyama, K., Kato, S., Inouye, K.: Enzymatic properties of mouse 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 259, 731-738, 1999.
 - 16) Kato, S., Takeyama, K., Kitanaka, S., Maruyama, A., Sekine, K., Yoshizawa, T.: In vivo function of VDR in gene expression-VDR knock-out mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 69, 247-251, 1999.
 - 17) Kato, S.: Genetic mutation in the human 25-hydroxyvitamin D₃ 1 α -hydroxylase gene causes vitamin D-dependent rickets type I. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 156, 7-12, 1999.
 - 18) Sasaki-Iwaoka, H., Maruyama, K., Endoh, H., Komori, T., Kato, S., Kawashima, H.: A trans-acting enhancer modulates estrogen-mediated transcription of reporter genes in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 14, 248-255, 1999.
 - 19) Okuno, M., Sato, T., Kitamoto, T., Imai, S., Kawada, N., Suzuki, Y., Yoshimura, H., Moriwaki, H., Onuki, K., Masushige, S., Muto, Y., Friedman, S. L., Kato, S., Kojima, S.: Increased 9,13-di-*cis*-retinoic acid in rat hepatic fibrosis: implication for a potential link between retinoid loss and TGF- β mediated fibrogenesis *in vivo*. *J. Hepatol.*, 30, 1073-1080, 1999.

グルココルチコイド受容体の遺伝子多型解析法の開発

谷口俊一郎（信州大学医学部加齢適応研究センター）
堀内 博志、高岡 邦夫（信州大学医学部整形外科）

我々は、大腿骨頭壊死の発生とグルココルチコイド (GC) 感受性との関連性を遺伝子レベルで検討する目的で、GC感受性の増強に対応が示唆されているGC受容体遺伝子のコドン363に注目し、その簡便な変異検出法を開発した。すなわち、コドン363におけるAsn (AATTGG) からSer (AGTTGG) への変化がAATTを認識する制限酵素TspE Iでの切断に差が生じることから、このコドンを含む領域をPCR法で増幅し、PCRに引き続きTspE Iで切断してAsnホモ型、Asn/Serヘテロ型、Serホモ型のいずれかを決定するための簡便な方法を開発し、これが有効であることを認めた。

はじめに

ステロイド投与患者間で大腿骨頭壊死を生ずるか否かは、ステロイド感受性の差によると示唆されている。一方、S.Lambertsのグループによって、グルココルチコイド受容体の遺伝子には多型があり、コドン363における、asparagineからserineへの変化がグルココルチコイドに対する感受性の増強に対応しているとの報告がなされた(1)。

我々は、大腿骨頭壊死の発生とグルココルチコイド感受性との関連性を遺伝子レベルで検討する目的で、グルココルチコイド受容体遺伝子のコドン363に注目した。

S. Lambertsのグループはグルココルチコイド受容体遺伝子の多型をSSCP法によって調べているが、多数のサンプルをスクリーニングするには、より簡便な方法が必要とされた。そこで、我々は、コドン363における、asparagine (AATTGG) からserine (AGTTGG)への変化がAATTを認識する制限酵素TspE Iによる切断に差が生じることに着目し、PCR法と組み合わせたコドン363における多型検出のための簡便な方法を開発した。

方法と結果

グルココルチコイド受容体遺伝子のコドン363の上流と下流でTspE I部位 (AATT) が一箇所になるように、PCRのプライマーを設定した：
ATTCCCGTTGGTCCGAAA (forward)、

TTCGACCAGGGAAGTTCAGA (reverse)。PCRの条件は94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 1分で30サイクル行った。この設定により91塩基対のDNA断片が増幅されることが既知の塩基配列データ(2)より予想され、そのことが確認された。また、増幅されたDNA断片の塩基配列はダイレクトシーケンシングによって確認した。増幅したサンプルの一部にはMg濃度が0.5mMになるようにEDTAを加え、引き続きTspE Iによる切断反応を65℃で2時間行った。その後、4%アガロースゲル・TBE緩衝液・100ボルト・25分のミニゲル電気泳動を行い、臭化エチジウムで染色した。

増幅されたDNAがasparagine (AATTGG)型であれば、約70塩基と20塩基に分かれ、serine (AGTTGG)型であれば91塩基のみであることが予想され、そのことが確認された。この方法でasparagineホモ型は70塩基と20塩基のみ、asparagine/serineヘテロ型は90塩基、70塩基、20塩基、serineホモ型は90塩基のみを示すことが考えられる。我々が、現在まで調べた限りでは、全てasparagineホモ型のみが検出された。また、それらのサンプルについて塩基配列でもその妥当性を確認した。

考 察

ここに示したグルココルチコイド受容体遺伝子のコドン363多型検出のための方法は、少量のDNA量(50ng)で行うことができ、かつ解析に必要な時間は2時間強であり非常に簡便である。もし、大腿骨

頭壊死とステロイド感受性、グルココルチコイド受容体多型との間で相関がみられれば、大腿骨頭壊死を防ぐためにステロイド投与量をあらかじめ考慮する予防的示唆を与えるための簡便な臨床検査法となる。一方、相関がみられないとすれば、人種差によるステロイド感受性に対する遺伝子多型の関係を見い出すべく、グルココルチコイド受容遺伝子の他の部位に着目した検討が必要になる。この点について他に示唆されているものとして制限酵素Bcl I についてのRFLPがあり(3)、このRFLPと大腿骨頭壊死とステロイド感受性との関連性を見い出すべく簡便な方法を開発することが次の課題と考えられる。

参考文献

- 1) N.Hutzenga et al. A Polymorphism in the Glucocorticoid Receptor Gene May Be Associated with an Increased Sensitivity to Glucocorticoids in Vivo. *J.Clinical Endocrinology and Metabolism*, 144-151, 1998.
- 2) J.Koper et al. Lack of Association between Five Polymorphisms in the Human Glucocorticoid Receptor Gene and Glucocorticoid Resistance. *Human Genetics*, 663-668, 1997.
- 3) M.Pnarelli et al. Glucocorticoid Receptor Polymorphism, Skin Vasoconstriction, and Other Metabolic Intermediate Phenotypes in Normal Human Subjects. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism* 1846-1852, 1998.

日本人におけるグルココルチコイド受容体遺伝子多型の検討

中島 滋郎 (大阪大学大学院医学系研究科 生体統合医学 小児科)

ステロイドホルモン (ス剤) は標的細胞内のグルココルチコイド受容体 (GR) を介して生物学的効果を発現する。本研究ではス剤投与患者での大腿骨頭壊死発症とGR遺伝子多型の関連について検討する。N363S多型については、今回検討した健常成人31人ではすべてAATのホモ接合子であった。また、BclIによるRFLPについてはGR遺伝子イントロン中のBclIによる切断部位を含む遺伝子のクローニングを行い、現在この周辺のDNA配列の決定を行っている。

はじめに

副腎皮質ステロイド薬 (ステロイドホルモン) の長期投与患者において、骨・軟骨に対する影響は最も重要な副作用の一つである。我々は従来よりステロイドホルモンを長期投与している慢性腎炎やネフローゼ症候群およびSLE患児において骨塩量や骨代謝マーカーを経時的に測定しており、その副作用の出現に個人差が存在することを経験している。しかしながら、現時点では骨におけるステロイドホルモン感受性を予測できるような因子は明らかにされていない。近年多くの疾患において、その原因遺伝子あるいは間接的に関与する遺伝子の多型が発症頻度や予後あるいは治療に対する反応性のちがいに関係しているとの報告がなされている。例えば、骨粗鬆症においてはビタミンD受容体やエストロゲン受容体遺伝子多型と骨塩量の関係が明らかにされつつある。さらにビタミンD受容体遺伝子多型と活性型ビタミンD治療に対する患者の反応性に違いがあることが報告されている。

ステロイドホルモンは標的細胞内のグルココルチコイド受容体 (GR) を介してその生物学的効果を発現する。GR遺伝子多型については、成人において高血圧の発症¹⁾ や皮膚やリンパ球でのステロイドホルモンへの反応性の差異²⁾ とGR遺伝子のBclIによる制限断片長多型 (RFLP) との関連が報告されている。さらに、健常成人の骨塩量については、GR遺伝子のコドン363の遺伝子変異 (N363S) がその決定因子の一つであることが明らかにされている³⁾。しかし、ステロイド治療の副作用、特に大腿骨頭壊死とGR

遺伝子多型についての検討は今だにされていない。また、日本人での検討は、健常人での遺伝子多型の出現頻度も含めて、ほとんどなされていない。本研究では、このGR遺伝子多型とステロイドホルモン投与患者での大腿骨頭壊死発症に関連があるかについて検討する。そのためにまず、本年度は既報のGR遺伝子多型について日本人での出現頻度について検討した。

対象と方法

(1) N363S多型の検討

この多型は、GR遺伝子のエクソン2上のコドン363のAATがAGTに変異したものである (図1)。健常成人31人より得たゲノムDNAを、5'-tgatattcactgatggactc-3' と 5'-cttgaatagccattagaaaa-3' のプライマーセットを用いてPCRで増幅し、反応物のDNA配列をダイレクトシーケンス法で決定した。

(2) BclIによるRFLPの検討

GR遺伝子のBclIによる制限酵素切断部位についてはほとんど報告がない。サザン解析の結果より、エクソン2とエクソン3の間のイントロン2内にRFLP部位があると想定される。コンピュータで検索した結果、BACクローン343g16 (約38kb) がこのイントロン2の一部を含んでいることがわかった (図1)。健常成人より得たゲノムDNAを、エクソン2上のプライマー1とBACクローン上のプライマー2 (図1下部) でLATaq (宝酒造) を用いてPCRで増幅した。

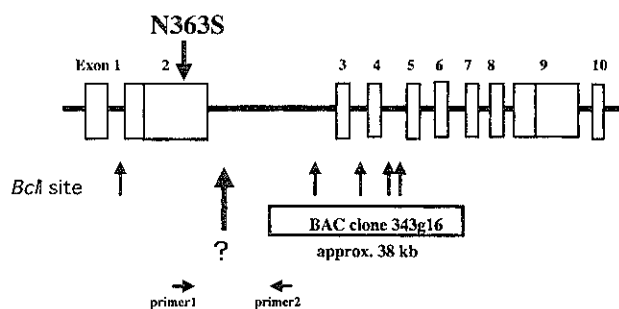


図1 ヒトグルココルチコイド受容体遺伝子構造の模式図

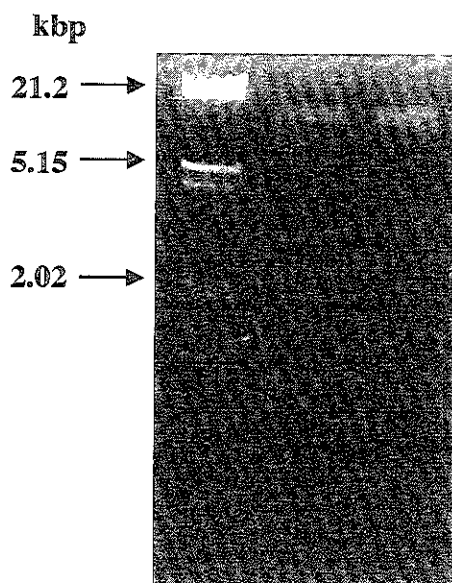


図2 GR遺伝子イントロン2のPCR法による増幅

結果

(1) N363S多型の検討

今回検討した健常成人31人ではすべてAATのホモ接合子であった。

(2) BclIIによるRFLPの検討

図2に2名の健常人のサンプルの結果を示す。2名とも10-20kbのPCR産物が得られた。このバンドをゲルより切り出し精製した後、pT7Blueベクターにクローニングした。現在、DNA配列をシーケンス中である。

考察

現在、多くの疾患の発症や、薬物治療に対する反応性の個体差に様々な遺伝子の多型が関係していることが解明され始めている。大腿骨頭壊死は、ステロイド剤投与と関係していること、発症に個人差があることが知られている。この背後にある遺伝的要素

を解明する目的で、我々はまずGR遺伝子の多型に注目し、解析を始めた。

今回の検討結果より、N363Sの多型は日本人では見つからず、上記の目的には利用するのは困難であると思われた。BclIIによるRFLPの検討には従来サザン解析法が用いられてきたが、GR遺伝子のBclIIによる制限酵素切断部位およびその周辺のDNA配列を決定することで、PCR法での解析が可能になる。今回、この部分を含む遺伝子のクローニングが行えたと考えられるので、今後、PCR法による解析方法を確立し、健常人および患者での検討を行う予定である。また、GR以外の候補遺伝子、例えばステロイド代謝系の酵素などについての検討も行う予定である。

参考文献

- 1) Graham CM et al.: Abnormalities of glucocorticoid metabolism and the renin-angiotensin system: a four-corners approach to the identification of genetic determinants of blood pressure. *J Hypertension*10:473, 1992
- 2) Panarelli M et al. : Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1846, 1998
- 3) Huizenga NAT et al. : A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 83:144, 1998

特発性大腿骨頭壊死症におけるグルコルチコイド受容体の遺伝子多型性解析

堀内 博志、五明 広樹、若林 真司（信州大学医学部整形外科）
斎藤 直人、小林 千益、縄田 昌司（信州大学医学部整形外科）
藤沢多佳子（信州大学医学部整形外科）
中島 滋郎（大阪大学大学院医学系小児科）
谷口俊一郎（信州大学医学部加齢適応センター）
高岡 邦夫（信州大学医学部整形外科）

特発性大腿骨頭壊死症発生の素因にグルコルチコイド受容体の遺伝子多型性が関与していると考え、Exon2 codon363 の point mutation について検討した。

患者および健常人より採取した DNA を用い、PCR/RFLP を行った。結果は AVN17例、健常人25例ともに全例 normal allele であり、日本人ではこの部位の mutation の存在頻度が低く、AVN への関与も少ないと考えた。

はじめに

ステロイド剤が特発性大腿骨頭壊死症を誘発することが広く認められているが、ステロイド治療を受けた症例全部に本症が発生するわけではない。この事実は、骨壊死発生の素因の存在を強く示唆している。様々な観点からこの素因について検討されてきたが、明確な解答は得られていない。我々は遺伝子多型性 (polymorphism) が素因として存在しているのではないかと考えた。近年、多くの疾患においてその発生に polymorphism の関与が報告されている。

ステロイド剤が Glucocorticoid receptor (GR) を介してのみ作用することに着目し、骨壊死発生の素因のひとつとして GR の polymorphism が存在するのではないかと考えた。GR にはいくつかの polymorphism が存在することが報告されている¹⁾。そのうちのひとつに Exon 2 の codon 363 の point mutation があるが、この mutation を持つ場合 normal allele と比べ glucocorticoid の hypersensitivity になっていると報告がある²⁾。この codon363 point mutation が特発性大腿骨頭壊死症患者に高率に存在するのではないかと仮説をたて、本研究を行った。

対 象

今回の対象は、特発性大腿骨頭壊死症17例、(ステロイド性10例、アルコール性 2 例、狭義の特発性 5 例) および健常人として、volunteer および股関節手術手術症例で MRI により大腿骨頭壊死の否定された計 25 例を設定した。採血に際しては、informed consent を行い同意を得た。

方 法

多型性の検出には、PCR/RFLP (restriction fragment length polymorphism, 制限酵素断片長多型) を用いた。対象者の末梢血から白血球を分離し genomic DNA を抽出した。Eson 2 の codon 363 を挟んで primer を設定し、PCR で増幅した。PCR は、50ng の genomic DNA に、10×buffer、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.5 μM の各 primer、および 2.5U Taq polymerase を加え 100 μl の系で行った。PCR 条件は、94°C 5 分の変性の後、94°C 1 分の熱変性、55°C 1 分の annealing、72°C 1 分の伸長反応を 1 サイクルとして 30 サイクル行った。

この PCR 産物を、制限酵素 TspE I で切断した後、4% アガロースゲルにて電気泳動し、ethidium bromide 染色により検出した。Normal allele は TspE I により切断されるので、70bp、20bp の 2 本のバンドとして

検出される。しかしmutantはTspE Iで切断されないため90bpの一本のバンドとして検出されることになる。

PCR産物が目標とした範囲を検出しているかは、sequenceにより確認した。

結 果

PCR productsのsequenceを行いHGRのExon 2, 1201～1291が増幅されていることを確認した。電気泳動でもnormalの場合、TspE Iで切断した後では2本のバンドが確認でき、PCRのみのcontrolと区別できた。

しかし、今回のAVN17例では1例もmutantが存在しなかった。また、健常人25例でもmutantは存在しなかった。我々が検討した42例ではGR codon363のpoint mutationは1例も存在しなかった。

考 察

human glucocorticoid receptor (HGR)は5番染色体に存在し、1985年にEvansのグループがcDNAをcloningした³⁾。さらにglucocorticoidはこのGRを介してのみ作用することもわかっている。近年、GRにはいくつかのpolymorphismが存在することが明らかになっている¹⁾。そのなかで、Exon 2のcodon 363でasparagineがserineに変わるpoint mutationは、dexamethasone投与での血中cortisolやinsulinの反応がnormal alleleの場合と比べhypersensitivityであるとの報告がされている²⁾。

そこで我々は、glucocorticoidのhypersensitivityを誘導する可能性のあるHGR codon 363のpoint mutationが特発性大腿骨頭壊死骨頭壊死症例で高頻度みられるのではとの仮説をたて検討した。

本研究で用いた手法はPCR/RFLPだが、HGR codon 363のpoint mutationをPCR/RFLPで検出したのは、我々が初めてである。PCR/RFLPはSequenceを調べる方法に比べ簡便であり、スクリーニングには適した方法である。我々はPCR産物のsequenceを行い目標としている範囲が増幅されていることを確認した。

今回の17例の特発性大腿骨頭壊死症と健常人25例の検討ではHGR codon 363 point mutationは1例も存在しなかった。このことから、この部分のmutationが骨壊死発生の素因となっている可能性は低いと考えた。また、NetherlandsでのHuizengaらの検討では216人中13人(6%)にmutantが存在したと報告されているが²⁾、我々の検討では、日本人において健常

人25例を含め計42例でmutantは1例も存在しなかったことから、このpoint mutationは人種間に存在頻度の差があることが示唆された。

今回検討したpolymorphismはAVNとの関連性はみられなかったが、我々は今後もHGRに注目して検索していく方針である。

参考文献

- 1) Koper J. et al. Lack of association between five polymorphisms in the human glucocorticoid receptor gene and glucocorticoid resistance. *Hum Genet.* 1997 ; 99 : 663-668
- 2) Huizenga N. et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *JCEM.* 1998 ; 83 : 144-151
- 3) Hollenberg S. et al. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985 ; 318 : 635-641

B) 病態解析

摘出骨細動脈標本の薬物反応評価実験装置の試作と応用

大橋 俊夫、水野 理介（信州大学医学部第一生理）
堀内 博志、高岡 邦夫（信州大学医学部整形外科）

摘出骨細動脈灌流標本作成方法を確立し、骨髓内の抵抗血管の機能特性を検討した。その結果、ヒトとラットの骨髓内細動脈は、PTH-rP1-34によって顕著な拡張反応を誘起することが判明した。

はじめに

骨への血液供給は、骨の成長-再生など骨の生理学的機能発現に関与し、さらには骨粗鬆症、大腿骨頭壊死症などの骨疾患の病態発生に重要な影響を与えることが考えられる。しかしながら、骨内の循環調節機構とくに骨髓内を走行する微小血管系の機能的構築は全く明らかにされていない。骨微小血管の機能的構築は、ブタ大腿骨頭海綿骨の抵抗血管の反応性が検討されているのみである^{1,2)}。この標本を用いた実験系は、血管の張力変化を指標として血管の反応性を検討したもので³⁾、血管抵抗を直接反映する抵抗血管径の変化を測定-評価したのではない。この方法は、血管内腔にタングステンワイヤーを貫通し標本の短軸方向に張力を負荷したもので、本来血管に負荷されるべき応力分布を無視した実験系であり、血管壁の持つ幾何学的機能特性を十分に考慮していない。そこで今回我々は、摘出骨細動脈に対してより生理学的環境に近い物理学的条件を負荷した骨細動脈灌流標本を作成した。そして、この方法とビデオマイクロスコープシステムを併用してラットとヒトの摘出骨細動脈に対する生理活性物質の反応性を検討し新知見を得たので報告する。

対象と方法

実験動物を用いた実験系は信州大学実験動物ガイドラインに、またヒト標本を用いた実験系は信州大学医学部で承認されたインフォームドコンセントに沿って行われた。ウイスター系雄性ラットならびに大腿骨頭切除術を行ったヒトの大腿骨内の細動脈（内径60~200 μ m）を実験に用いた（図1）。摘出細動脈灌流方法は、すでに我々が確立した方法に基づいて

行った（図2）⁴⁾。摘出した骨髓内に走行する細動脈は、実体顕微鏡下、自作した臓器槽内の微小ガラスピペットでその両端をカニューレーションし、ナイロン糸を用いて結紮固定した。血管流入路は、チューブを介してリザーバーに接続され、流出路は三方活栓によって閉鎖され血管内圧を55mmHgに保った。血管外腔は、pH7.4、37 $^{\circ}$ C、21%O₂-5%CO₂-74%N₂によって通気されたクレブス液を持続的に灌流した。血管内径変化は、対物レンズ-撮影レンズ-CCDカメラを介して画像として取り込みビデオカセットレコーダーに記録した。血管内径は、自作した内径測定装置（ビデオキャリパー）を用いて自動的ならびに手動的に測定した⁵⁾。この内径測定装置の空間的ならびに時間的分解能は各々0.4 μ m、20MHzである。標本に対して、種々の生理活性物質を投与してその反応性を検討した。

結果

内圧55mmHgを負荷した摘出ラット骨細動脈は、室温から37 $^{\circ}$ Cの加温とともに120 μ mから60 μ mまで能動的に収縮を呈した（図3A）。一方、ヒトの骨細動脈は筋原性収縮を示さなかった。ヒト骨細動脈は、高カリウム（80mM）溶液ならびにノルエピネフリン（NE）に対して顕著な収縮反応を誘起した（図4B）。parathyroid hormone-related protein1-34（PTH-rP1-34）ならびにプロスタサイクリンアナログは、ラットならびにヒトの骨細動脈に対して顕著な拡張反応を示した（図3BC、図4CD）。

考察

内径300 μ m以下の小動脈-細動脈は、機能的に抵

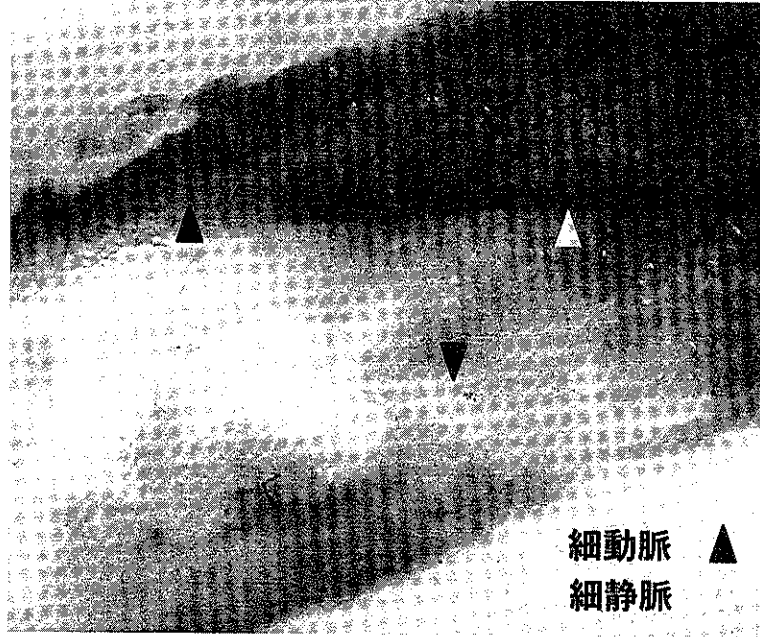


図1 ラットの骨内微小循環系

ラット骨髓内微小血管系。黒矢頭と黄矢頭は各々細動脈(約 $30\mu\text{m}$)と細静脈(約 $100\mu\text{m}$)を示す。

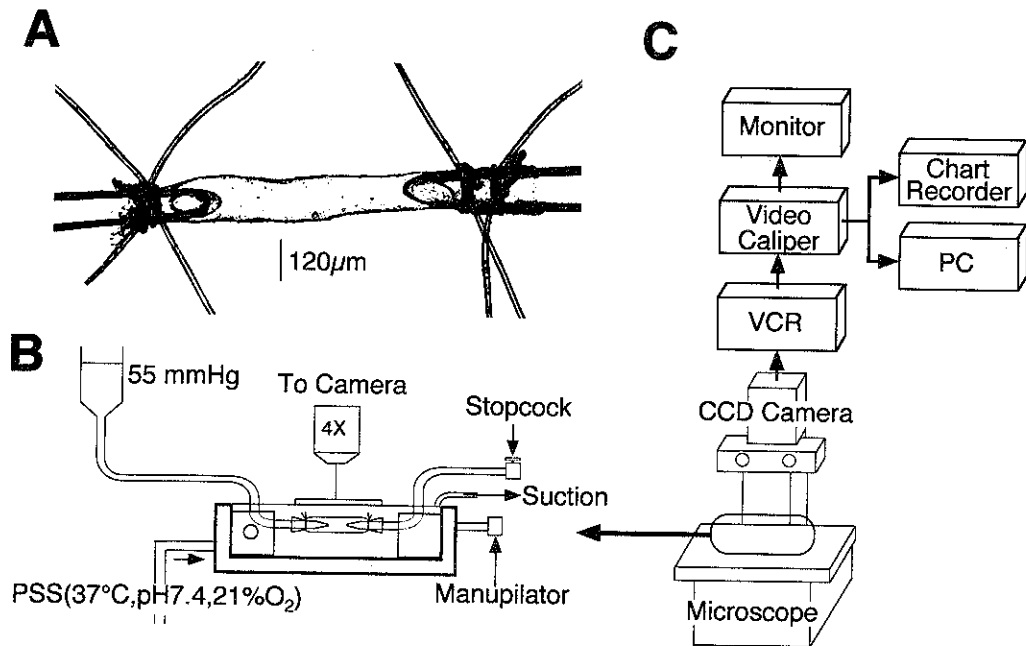


図2 ビデオマイクロスコープシステムの概略図

ビデオマイクロスコープシステムの概略図。標本はガラスピペットでカニューレションされ、血管内圧 55mmHg を負荷される (A)。標本外腔側は Krebs 液で持続的に灌流される (B)。標本内径変化は正立顕微鏡の対物レンズ-撮影レンズ-CCDカメラを介して記録・観察される (C)。

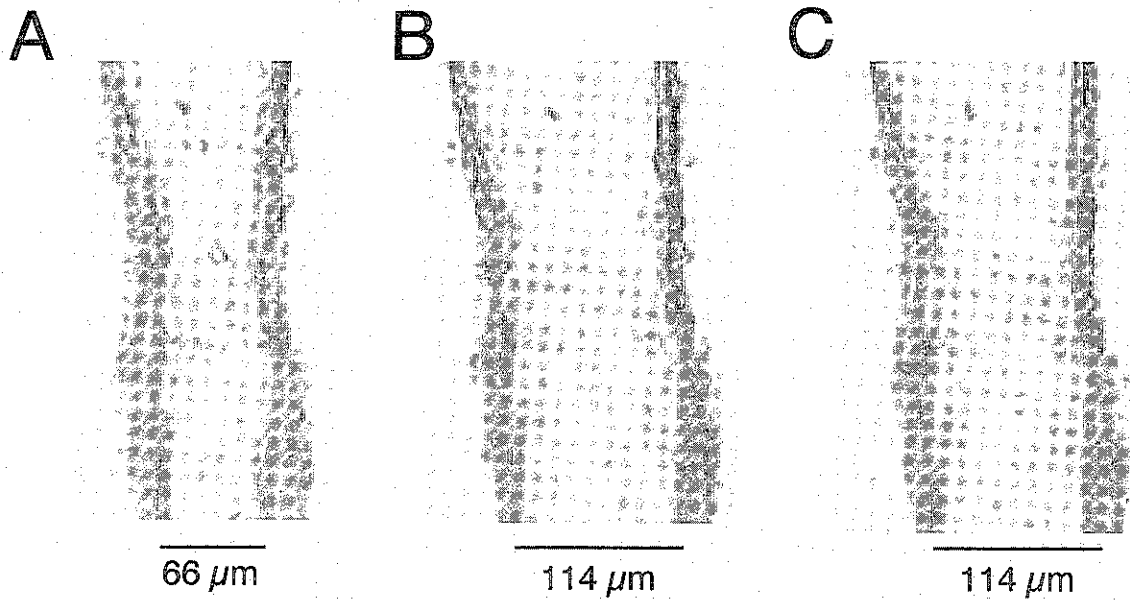


図3 摘出ラット骨細動脈に対する PTH-rP1-34 とアイソカルバサイクリンの反応

摘出ラット骨細動脈に対する PTH-rP1-34 とアイソカルバサイクリンの反応。摘出ラット骨細動脈は、受動的な最大径 $120\ \mu\text{m}$ から $66\ \mu\text{m}$ まで筋原性収縮を呈した (A)。 10^{-8}M PTH-rP1-34 (B) と 10^{-6}M アイソカルバサイクリン (C) は摘出ラット骨細動脈を拡張した。

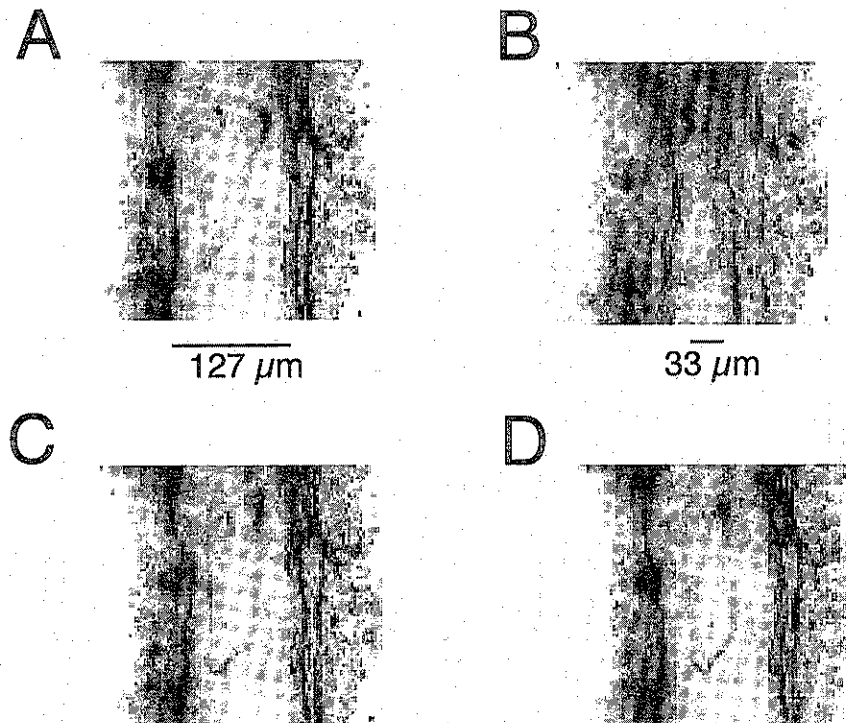


図4 摘出ヒト骨細動脈に対する NE、PTH-rP1-34 とアイソカルバサイクリンの反応

摘出ヒト骨細動脈に対する NE、PTH-rP1-34 とアイソカルバサイクリンの反応。摘出ヒト骨細動脈は、NE (10^{-6}M) に対して $127\ \mu\text{m}$ (A) から $33\ \mu\text{m}$ (B) へと収縮反応を誘起した。 10^{-8}M PTH-rP1-34 (C) と 10^{-6}M アイソカルバサイクリン (D) は NE により収縮したヒト骨細動脈を拡張した。

抗血管と呼ばれ末梢臓器ならびに組織への血流を直接制御する微小循環系である。すなわち、血流量は内径の4乗に比例して増減するため、抵抗血管のわずかな収縮は顕著な血流量の減少を、また抵抗血管のわずかな拡張は顕著な血流量の増加を引き起こす。骨循環の調節機構は、従来より生体内(マイクロスフェア法)ならびに摘出骨灌流標本を用いた実験系によって検討されてきた^{6,7,8)}。これらの実験系は、骨全体としての血流量変化を検討できる利点を有するが、骨内細動脈の収縮ならびに拡張機能評価とその作用機序の解明をすることができない。今回我々が確立した骨細動脈灌流標本は、骨髓内に走行する細動脈の反応性を直接定量的に評価することができた。従って、本実験系は骨微小循環の生理学的機能発現の解明のみならず、骨循環障害によって誘起される様々な骨関連疾患の病態発生機序の解明ならびに新規の骨疾患治療薬の開発に大きく寄与することが考えられる。

抵抗血管の機能的特徴の一つとして筋原性の血管収縮が存在し、この現象はin vivoならびにin vitroの実験系において観察されている。本実験系において、摘出ラット骨細動脈は筋原性の血管収縮を呈したが、ヒトの標本は有意な筋原性の血管収縮を示さなかった。ヒト細動脈の筋原性収縮は、冠血管や脳血管においてその存在が報告されている^{9,10)}。従って、骨細動脈における筋原性収縮には著しい種差ならびに部位差が存在することが示唆される。

生体内に分布する、抵抗血管系には極めて密にアドレナリン作動性交感神経が分布していることが知られている。この自律神経末端からは、NEが化学伝達物質として放出され標的組織である抵抗血管に作用して血管収縮を誘起する。生体においては、アドレナリン作動性交感神経の恒常的緊張によって抵抗血管の緊張性収縮を行い体血圧を維持する。本実験において、ヒトの摘出骨内細動脈がNEに対して極めて顕著な収縮反応を誘起した結果から、骨内の抵抗血管の収縮制御機構に内因性のNEの関与、すなわち交感神経系による調節機構の存在が示唆される。

プロスタサイクリンは、血管内皮細胞から放出される強力な血管平滑筋弛緩因子であるとともに血小板凝集抑制因子であることが知られている。本実験系において、骨内細動脈は、プロスタサイクリンのアナログであるアイソカルバサイクリンに対して、極めて顕著な拡張反応を誘起した。これらの結果から、

骨細動脈の緊張性制御に内因性の拡張性プロスタノイドがparacrine因子として骨内の循環動態に大きく関与している可能性が示唆され、これらの拡張性プロスタノイドが骨内循環の改善薬として有効である可能性を示唆している。

PTH-rPは、悪性腫瘍患者に高Ca血症を誘起する原因物質として癌細胞から同定された生理活性物質である。最近PTH-rPは、癌細胞のみならずほとんどすべての正常組織において産生されていることがわかってきた¹¹⁾。PTH-rPの生理学的機能は、PTHと同様にCaとP代謝を行うことである。一方近年、PTH-rPは心血管系にも影響を与え得ることが報告された。すなわち心筋に対しては収縮力の増強作用を、血管に対しては血管平滑筋弛緩反応を誘起する¹²⁾。さらにPTH-rPは血管内皮細胞から一酸化窒素を産生放出させることも明らかになった¹³⁾。今回の実験結果から、PTH-rP1-34はヒトならびにラットの骨内細動脈に対して顕著な拡張反応することはが判明した。従って、PTH-rP1-34は、骨代謝のみならず骨内循環動態を調節するparacrine/autocrine因子として働く生理活性物質であることが示唆される。

参考文献

- 1) Lundgaard A. et al. : Method for assessment of vascular reactivity in bone : in vitro studies on resistance arteries isolated from porcine cancellous bone. *J Orthop Res.* 1996 ; 14 : 962-971.
- 2) Lundgaard A. et. al. : Vasorelaxation in isolated bone arteries : vasoactive intestinal peptide, substance P, calcitonin gene-related peptide, and bradykinin studied in pigs. *Acta Orthop Scand.* 1997 ; 68 : 481-489.
- 3) Mulvany MJ. et al. : Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ. *Nature.* 1976 ; 260 : 617-619.
- 4) Mizuno R. et al. : Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in spontaneous activity of isolated lymph microvessels in rats. *Am J Physiol.* 1999 ; 277 : H1453-H1456.
- 5) Ono N. et al. : Development of experimental apparatus for investigating lymphatic pumping activity of murine mesentery in vivo. *Jpn. J. Physiol.* (in press)
- 6) Gross PM. et al. : Neurohumoral regulation of blood flow to bones and marrow. *Am J Physiol.* 1979 ; 237 :

H440-H448.

- 7) Driessens M. et al. Vascular reactivity of the isolated tibia of the dog. *Am J Physiol.* 1979 ; 236 : H904-H908.
- 8) Driessens M. et al. Effects of calcitonin, hydrocortisone, and parathyroid hormone on canine blood vessels. *Am J Physiol.* 1981 ; 241 : H91-H94.
- 9) Miller FJ Jr. et al. : Myogenic constriction of human coronary arterioles. *Am J Physiol.* 1997 ; 273 : H257-H264.
- 10) Gokina NI. et al. : Electrical activity underlying rhythmic contraction in human pial arterioles. *Circ Res.* 1996 ; 78 : 148-153.
- 11) Philbrick WM et al. : Defining the role of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol Rev.* 1996 ; 76 : 127-173.
- 12) Schlüter KD. et al. : Cardiovascular actions of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Cardiovasc Res.* 1998 ; 37 : 34-41.
- 13) Sutliff RY. : Vasorelaxant properties of parathyroid hormone-related protein in the mouse : Evidence for endothelium involvement independent and nitric oxide formation. *Endocrinology.* 1999 ; 140 : 2077-2083.

摘出ウサギ骨抵抗血管の機能特性に対するグルココルチコイドの影響

堀内 博志、小林 千益（信州大学医学部整形外科）
斎藤 直人、高岡 邦夫（信州大学医学部整形外科）
水野 理介、大橋 俊夫（信州大学医学部第一生理学）

ステロイド投与家兎モデルにおいて、骨髄内抵抗血管は生理、薬理的にどのような機能特性を示すか検討し、骨壊死発生の骨髄内抵抗血管の関与を明らかにすることを目標とした。実体顕微鏡下に摘出したウサギ大腿骨骨髄内傾向血管を骨抵抗血管灌流標本により、機能特性を検討した。今回検討した薬剤では、ステロイド投与がアラキドン酸の反応に影響を与える可能性が示唆された。詳細について現在検討中である。

はじめに

特発性大腿骨頭壊死症のモデルは発症機序の解明と予防方法の確立に有用であるが、従来、動物モデルにステロイド誘発骨壊死モデルを作ることには困難とされてきた。しかし、近年ステロイド単独投与家兎骨壊死モデルが確立され、病理学的検討や血清学的検討が報告されている^{1),2)}。

また、ステロイド投与家兎において骨髄内血管造影³⁾での検討や血管内皮細胞の病理組織学的検討⁴⁾が報告されているが、骨髄内抵抗血管の生理、薬理的反応の検討は行われていない。

そこで今回私たちは、ステロイド投与家兎モデルにおいて、骨髄内抵抗血管は生理、薬理的にどのような機能特性を示すか検討し、骨壊死発生の骨髄内抵抗血管の関与を明らかに出来ないかと考えた。

対象および方法

動物は、日本白色家兎、オス、体重3.5kg~4.0kgを用い、コントロールおよびメチルプレドニゾロン(MPSL)投与群を設定した。MPSL投与群は、日本白色家兎にMPSL 20mg/kg/dayで3日間連続筋注を行い、7日目に屠殺した。検討材料は大腿骨骨髄内抵抗血管を用いた。骨髄内抵抗血管は、大腿骨頸部の流入動脈から骨髄内に入って分枝した部分で採取した。細動脈の摘出は、実体顕微鏡下に行い、摘出灌流方法は既に報告している独自の方法を使用した⁵⁾。摘出した骨髄内は、実体顕微鏡下に、自作した臓器

槽内の微小ガラスピペットに両端をカニューレションし、ナイロン糸を用いて結紮固定した。血管外腔は、pH7.4, 37°C, 21%O₂-5%CO₂-74%N₂により通気したクレブス液を持続的に灌流した。血管内径の変化は既に報告した方法⁶⁾を用いて観察した。

今回検討した薬剤は、塩化カリウム(KCl)、ノルエピネフリン(NE)、アセチルコリン(ACh)、NOの作用を持つS-Nitroso-N-Acetylpenicillamine(SNAP)、アラキドン酸(Arachidonic acide, AA)、PGI₂アナログであるisocarbacyclin(ICC)の5つである。

結果

ウサギ大腿骨髄内は、コントロール群およびMPSL群ともにKCl(80mM)に対して著明な収縮反応を示した。NEに対しては、両群ともNE 10⁻¹⁰M~NE 10⁻⁷Mまでは反応しないが、NE 10⁻⁶M, NE 10⁻⁵Mでは両群ともに著明な収縮反応が確認された。この時、両群ともに収縮をとまなう血管壁の肥厚がみられた(図)。

次に、NE 10⁻⁶Mによって前収縮を負荷し標本に対するをかけ、薬剤の反応性を確認した。ACh(10⁻⁸M~10⁻⁵M)では、両群ともに濃度依存性の拡張作用が確認された。SNAP(10⁻⁸M~10⁻⁵M)投与でも、両群で濃度依存性の拡張作用が確認された。AAにおいては、コントロール群では反応が見られないものの、MPSL群では低濃度(10⁻⁸M)で拡張作用が観察された。その後は濃度依存性に収縮反応が出現した。

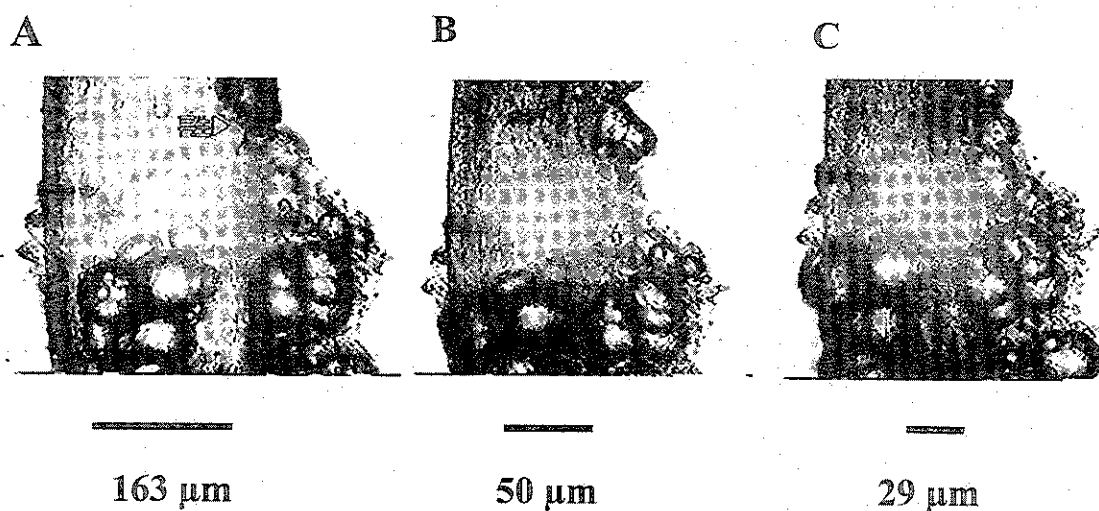


図 摘出ウサギ大腿骨骨髓内細動脈に対するKClおよびNEの反応（コントロール）
A:薬物投与前、B: 80mM KCl投与、C:NE 10^{-5} M投与

考察

特発性大腿骨頭壊死症の発生機序は、様々な仮説が提唱されてきたが未だ解明されていない。ステロイド剤が誘因となることは、周知であるがどのような機序で壊死発生に関与しているかは不明である。

近年、ステロイド投与家兎骨壊死モデルが確立され病理学的検討や血清学的検討が報告され^{1),2)}、骨壊死発生の病態の検討が進んでいる。さらに血管造影³⁾や病理組織学的手法⁴⁾によって骨髓内の動脈系および静脈系の特性変化の検討がなされている。しかし、骨髓内の循環動態における血管系の機能特性についての検討はなされていない。骨内循環障害が骨壊死発生の原因と考えられる以上、骨髓内血管の生理学的機能特性の検討は重要と考えられる。我々はステロイド投与家兎骨壊死モデルにおいて、大腿骨骨髓内細動脈の生理学的機能特性を検討し、骨微小循環系の機能特性を明らかにするのみならず、骨壊死発生機序解明の一助となることを本研究の目的とした。

今回、我々は実体顕微鏡下に家兎骨髄内抵抗血管を摘出したが、これらは内径が $200\mu\text{m}$ であり機能的には抵抗血管の範疇に分類される。抵抗血管はその内径の4乗に比例して、血流量を変化させるため末梢組織への血流供給に大きな影響を与える。我々の骨抵抗血管灌流標本は、骨髓内細動脈の生理学的機能特性を定量的に評価できるため、骨髓内循環動態の解明に極めて有用な方法と考えている。

今回の研究で、コントロール群とステロイド投与

群ともに、大腿骨内抵抗血管がNEで収縮反応を示したことから骨内抵抗血管の交感神経系による循環動態調節作用の存在が示唆された。また、AChで両群ともに弛緩反応がみられたことから、骨髓内細動脈においてもムスカリン様受容体を介した副交感神経系の関与が示唆された。同様に、プロスタサイクリンのアナログであるICCも骨髓内抵抗血管に対して、強力な拡張作用を有していることが本実験で確認された。今回の実験で、AChおよびICCが骨内循環に影響を及ぼし、骨髓内血流を変化し得ることが示唆された。

今回、ステロイド投与群とコントロール群において骨髓内抵抗血管の反応性に差があったのは、AA（アラキドン酸）であった。コントロールでは、AAの反応がみられなかったが、MPSL群では低濃度では拡張反応がみられ、高濃度では収縮反応が観察された。AAは細胞膜リン脂質の構成体であり、COXによってプロスタグランジンやトロンボキサンA₂などに代謝される。したがって、ステロイド投与によって、骨髓内抵抗血管におけるCOX代謝系に変化が生じた可能性が示唆される。今後、COX阻害薬を使用するなどして反応性の相違が何に起因しているか検討することとしている。また、ステロイド投与による反応性の差に時間依存性が存在するか今後検討する必要があると考えている。

参考文献

- 1) Yamamoto T. et al. Corticosteroid enhances the experimental induction of osteonecrosis in rabbits

- with Swartman reaction. Clin Orthop. 1995 ; 316 : 235-243
- 2) Yamamoto T. et al. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues. Arthritis Rheum . 1997 ; 40: 2055-2064
 - 3) 渥美 敬 ほか. 大量ステロイド投与家兎大腿骨の早期血行変化の検討(第3報). 厚生省特定疾患骨・関節系疾患調査研究班平成7年度研究報告書. 1996 ; 71-75
 - 4) 堀井健志 ほか. ステロイド投与家兎における骨内血管系の変化. 別冊整形外科. 1999 ; 35 : 54-59
 - 5) Mizuno R. et al. :Involvement of ATP-sensitive K⁺ channels in spontaneous activity of isolated lymph microvessls in rats. Am J Physiol. 1999 ; 277 : H1453-1456.
 - 6) Ono N. et al. :Development of experimental apparatus for investigating lymphatic pumping activity of murine mesentery *in vivo* . Jan. J. Physiol. (in press)