

200/0454

厚生科学研究補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

骨粗鬆症治療薬に対する反応性決定遺伝子の
同定と臨床応用

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 細井孝之

平成14年3月31日

目次

I. 総括研究報告書	
骨粗鬆症治療薬に対する反応性決定遺伝子の同定と臨床応用	細井孝之 - - - - - 1
II. 分担研究報告書	
1. 高齢者における骨折予防をエンドポイントとする骨粗鬆症治療の評価を検討するためのデータベース構築	堀内敏行 - - - - - 5
2. 骨粗鬆症治療法の感受性決定要因としての遺伝子多型決定にむけてのコホートの設定	白木正孝 - - - - - 8
3. 骨粗鬆症治療薬に対する反応決定遺伝子の探索	井上 聡 - - - - - 15
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	- - - - - 21

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等 研究事業）
総括研究報告書

骨粗鬆症治療薬に対する反応性決定遺伝子の同定と臨床応用

主任研究者 細井 孝之（東京都老人医療センター 内分泌科医長）

研究要旨

骨粗鬆症治療薬に対する反応性決定遺伝子を同定するためには、その遺伝子の臨床的意義を検証するための臨床データベースが必要である。本年度は骨粗鬆症治療の最終目的である骨折予防効果を検証しうるデータベースを作成するとともに、新規脊椎圧迫骨折の判定基準を策定した。また、骨粗鬆症治療薬に対する反応性を決定する遺伝子の候補を選定するために *in vitro* の系においてマイクロアレイの手法をもちいて薬剤反応性遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子における多型性を検索し、骨折予防効果を指標にした骨粗鬆症治療薬反応性との関連性を探索するシステムが構築された。

A. 研究目的

骨粗鬆症、特に加齢に伴う骨量減少が病的に亢進し、高齢者の骨折リスクを増加させる退行期骨粗鬆症に対する対策は、高齢化が進行する現在、医学的のみならず社会的にも大きな課題である。脊椎の圧迫骨折や大腿骨頸部骨折は本症の合併症であり、骨粗鬆症の診療はこれらの予防を最大の目的としている。近年の骨量測定方法の進歩と普及により、骨量を臨床的指標とした骨粗鬆症の診療体系が構築されている。さらに血液・尿中の骨代謝マーカーが臨床応用されている。わが国で骨粗鬆症に対して適応を得ている薬剤は、活性型ビタミンD3製剤、ビタミンK2製剤、カルシトニン製剤、女性ホルモン製剤、蛋白質同化ホルモン製剤、ビスホスホネート製剤、イプリフボン、カルシウム製剤と多岐にわたる。これら薬剤の分子レベルでの標的は、未だ不明の部分が多く残されている。しかしながら、治療薬の効果は個人レベルで大きく異なることが観察されている。また、骨代謝における上記の臨床的指標が有意に変動するためには少なくとも6か月、骨折の予防効果を確かめるためには2-3年という長期間を要する。そこで、骨粗鬆症治療薬の有効性を個人レベルであらかじめ予測することができれば、患者の利益になることはもちろん、医療経済学的にも有意義であり、広く社会に貢献することが期待される。

本研究では、骨粗鬆症治療薬に対する反応性決定候補遺伝子の多型性について、臨床的な意義を検討するとともにその分子生物学的な意義を探索する。さらに、heteroduplex HPLC や DNA チップ技

術をはじめとする最新の分子生物学的手法も駆使し、新しい骨粗鬆症治療薬反応性決定遺伝子群を同定する。本研究により、骨粗鬆症の薬物療法を最適化する手段が構築されることが期待される。本年度は骨粗鬆症治療の最終目的である骨折予防効果を検証しうるデータベースを作成するとともに、新規脊椎圧迫骨折の判定基準を策定することを目的の一つとした。さらに骨粗鬆症治療薬に対する反応性を決定する遺伝子の候補を選定するために *in vitro* の系においてマイクロアレイの手法をもちいて薬剤反応性遺伝子群を抽出した。これらの遺伝子における多型性を検索し、骨折予防効果を指標にした骨粗鬆症治療薬反応性との関連性を探索するシステム構築した。

B. 研究方法

1. 高齢者における骨折予防をエンドポイントとする骨粗鬆症治療の評価を検討するためのデータベース構築：東京都老人医療センター骨粗鬆症外来の受診者（地域連携医師受診者を含む）について少なくとも3年間の前向き調査を行ない、追跡し、診療形態や治療内容によって層別した群間で骨折発生率を比較検討する。

2. 骨粗鬆症治療法の感受性決定要因としての遺伝子多型決定にむけてのコホートの設定：成人病診療研究所を平成5年から13年までに受診した対象から無作為に1713例を登録し、基本属性を検討する。これらの対象のうち、骨粗鬆症と診断された例には無作為で治療法を割り付け、経過を追跡する。また、新規骨折発生率をエンドポイントとする

治療効果の判定基準を作成する。

3. 骨粗鬆症治療薬に対する反応決定遺伝子の探索：骨粗鬆症治療薬反応性の分子機序を明らかにするために、初代培養骨芽細胞を用いて細胞周期関連制御因子を中心としたタンパクレベルでの発現制御の分子機構の探索ならびにマイクロアレイ法を用いた老化応答遺伝子、骨粗鬆症治療薬応答遺伝子の探索を行った。

B. 結果と考察

東京都老人医療センターのデータベース作成にあたってはまず 1999 年 4 月から 2000 年 9 月までの骨粗鬆症外来開設初期の受診者を第 1 期分とし、その後の集団については 1 年ごとに 1 期分として入力していくこととした。問診内容(自覚症状、疼痛の部位と程度、月経歴、既往歴、服用中の薬剤、運動習慣、食習慣、転倒歴、最大身長、最大体重など)、身体所見の測定値(身長、体重、アームスパン、握力、MMSE、片足起立時間など)、dual energy X-ray absorptiometry (DXA) による腰椎、大腿骨近位部、前腕骨遠位端の骨量、骨レントゲン撮影(胸腰椎 2 方向、骨盤前後方向、手指骨 MD 法) 所見、血清副甲状腺ホルモン、血清 1, 25(OH) ビタミン D、血清オステオカルシン、血清骨特異アルカリフォスファターゼ、尿中デオキシピリジノリンまたは NTX などの検査所見が入力された。第 1 期の登録者は約 1000 名であり、そのうち女性が 80% を占め、女性における閉経後の女性ホルモン減少が骨粗鬆症発症において重要な役割をはたしていることを反映している。一方、男性患者も増加してきている。男性については前立腺癌に対して LH-RH アナログの治療を受けている方および男女問わず、膠原病、気管支喘息に対するステロイド療法による、続発性骨粗鬆症の方に骨密度低下をきたす方が目立って多くなっている。成人病診療研究所のコホートにおいても同様の臨床所見が入力され、すでに二年以上の観察期間を経過し、骨粗鬆症治療薬の骨量ならびに骨折予防に対する効果の解析が進行している。また、すべての対象者からインフォームド Consent のもとに遺伝子解析用の採血がなされており、次年度における遺伝子解析の準備が整えられている。また、レントゲン写真の経時の変化を内科、整形外科、放射線科におけるそれぞれの専門家によって解析し、新規脊椎圧迫骨折の判定基準を作成した。

骨粗鬆症治療薬に対する反応性規定遺伝子の探索にあたっては、①骨芽細胞老化に伴う TGF β 反応性低下時における細胞周期制御蛋白の遺伝子変化、

②マイクロアレイを用いた初代培養骨芽細胞における TGF β 応答遺伝子ならびに細胞老化応答遺伝子の探索、③エストロゲン欠乏状態における骨芽細胞モデルにおけるエストロゲン応答遺伝子の探索、といった 3 つのアプローチを行なった。その結果、p57 の発現変動ならびに CDK4 やサイクリン D2 の結合が p57^{Ki02} から p27^{Ki01} へとシフトすることが発見された。また、マイクロアレイを用いた検索により、TGF β の添加によって発現が変動する遺伝子として、Smad2 ならびに Smad3 をはじめとする 100 以上の候補遺伝子が、細胞老化にともなって発現が変動する遺伝子として、osteonectin ならびに fibronectin をはじめとする 100 以上の遺伝子をリストアップすることが出来た。エストロゲン欠乏状態における骨芽細胞モデルでは、細胞周期の正の制御因子であるサイクリン D2 の変動が注目された。これらの結果をさらに解析し、骨粗鬆症治療薬反応性遺伝子群のパネルを作成し、それらの多型性と臨床データとの関連を検討していく。

C. 健康危険情報：今年度の研究において当該情報は得られなかった。

D. 研究発表

論文発表

1. Muramatsu M., Inoue S: BREAKTHROUGHS AND VIEWS - Estrogen receptors: How do they control reproductive and non-reproductive functions. *Biochem Biophys Res Commun* 270(1): 1-10 (2000)
2. Muramatsu M, Ogawa S, Watanabe T, Ikeda, K, Hiroi, H, Orimo A, Inoue S: Recent advances in steroid receptor research: focusing on estrogen receptors (2000) *Hormone replacement therapy and osteoporosis* (Edited by Kato J, Minaguchi H, Nishio Y) Springer Verlag, Berlin, (pp 43-74)
3. Ikeda K, Inoue S, Orimo A, Hiroi H, Tsuchiya F, Gorai I, Higashi Y, Muramatsu M Expression and Estrogen Inducible Promoter Activity of Human Estrogen-responsive Finger Protein Gene in Breast and Ovarian Cancer Cells (2000) *Hormonal Carcinogenesis III* (Edited by Li JJ, Daling JR, Li SA), Springer-Verlag, New York, (pp 424-428)
4. Nishihara E, Nagayama Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Yamashita S, Koji T: Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor alpha and beta in rat pituitary gland detected by

- immunohistochemistry. *Endocrinology* 141(2), 615-620 (2000)
5. Miyao M, Morita H, Hosoi T, Kurihara H, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Yazaki Y, Ouchi Y: Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Calcif Tissue Int* 66(3), 190-194 (2000)
 6. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S: Association of estrogen receptor beta (ERbeta) gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 269(2), 537-541 (2000)
 7. Urano T, Hosoi T, Shiraki M, Toyoshima H, Ouchi Y, Inoue S: Possible involvement of p57Kip2 gene in the bone metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 269(2), 422-426 (2000)
 8. Hoshino S, Hosoi T, Miyao M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Identification of a novel polymorphism of estrogen receptor alpha gene that is associated with calcium excretion in urine. *J Bone Miner Metab* 18(3), 153-157 (2000)
 9. Ikeda K, Orimo A, Higashi Y, Muramatsu M, Inoue S: Efp as a primary estrogen responsive gene in human breast cancer. *FEBS Lett* 472(1), 9-13 (2000)
 10. Ikeda K, Sato M, Tsutsumi O, Tsuchiya F, Tsuneizumi M, Emi M, Imoto I, Inazawa J, Muramatsu M, Inoue S: Promoter analysis and chromosome mapping of human EBAG9 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 654-660 (2000)
 11. Ogawa S, Saito T, Matsuda Y, Seki N, Hayashi A, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M, Hori T, Inoue S: Chromosome mapping of RNF16 and Rnf16, human, mouse and rat genes for testis finger protein (terf), a member of the RING finger family. *Cytogenet Cell Genet* 89, 56-58 (2000)
 12. Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda S, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J Biol Chem* 275, 21372-21379 (2000)
 13. Orimo A, Yamagishi T, Tominaga N, Yamauchi Y, Hishinuma T, Okada K, Suzuki M, Sato M, Nogi Y, Suzuki H, Inoue S, Yoshimura K, Shimizu Y, Muramatsu M: Molecular cloning of testis-abundant finger protein (tfp) ring finger protein 23 (RNF23) RBCC (RING-B box-coiled coil) -B30.2 protein on the class I region of the human MHC. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 45-51 (2000)
 14. Orimo A, Tominaga N, Yoshimura K, Yamauchi Y, Nomura M, Sato M, Nogi Y, Suzuki M, Suzuki H, Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M: Molecular cloning of ring finger protein 21 (RNF21) / interferon-responsive finger protein (ifp1), which possesses two ring-B box-coiled coil domains in tandem. *Genomics* 69, 143-149 (2000)
 15. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S: Association of estrogen receptor beta (ESR2) gene polymorphism with blood pressure. *J Hum Genet* 45(6), 327-330 (2000)
 16. Miyao M, Hosoi T, Emi M, Nakajima T, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y: Association of bone mineral density with a dinucleotide repeat polymorphism at the calcitonin (CT) locus. *J Hum Genet* 45(6), 346-350 (2000)
 17. Kuruto-Niwa R, Inoue S, Ogawa S, Muramatsu M, Nozawa R: Effects of Tea catechins on the ERE-regulated estrogenic activity. *J Agric Food Chem* 48(12), 6355-6361 (2000)
 18. Inoue S, Ogawa S, Horie K, Hoshino S, Goto W, Hosoi T, Tsutsumi O, Muramatsu M, Ouchi Y: An estrogen receptor beta (ER beta) Isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ER alpha and ER beta. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 814-819 (2000)
 19. Omoto Y, Inoue S, Ogawa S, Toyama T, Yamashita H, Muramatsu M, Kobayashi S, Iwase H: Clinical value of the wild-type estrogen receptor beta expression in breast cancer. *Cancer Lett* 163: 207-212 (2001)
 20. Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y: Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta. *Biol Pharm Bull* 24, 351-356 (2001)
 21. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Shirai Y, Emi M: A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. *J Hum Genet* 46, 267-272 (2001)
 22. Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Ishiwata I, Inoue S, Takayama M, Sato A, Inazawa J: A Novel Amplification at 17q21-23 in Ovarian Cancer Cell Lines Detected by Comparative Genomic Hybridization. *Gynecol Oncol* 81, 172-177 (2001)
 23. Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, Sasano H: Expression and Cellular Localization of Estrogen Receptors alpha and beta in the Human Fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2258-2262 (2001)
 24. Tsuchiya F, Ikeda K, Tsutsumi O, Hiroi H, Momoeda M, Taketani Y, Muramatsu M, Inoue S: Molecular cloning and characterization of mouse EBAG9, homolog of a human cancer associated surface antigen: expression and regulation by estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 284, 2-10 (2001)
 25. Kaneki M, Hedges SJ, Hosoi T, Fujiwara S, Lyons

- A, Crean SJ, Ishida N, Nakagawa M, Takechi M, Sano Y, Mizuno Y, Hoshino S, Miyao M, Inoue S, Horiki K, Shiraki M, Ouchi Y, Orimo H: Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2. possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition* 17, 315-21 (2001)
26. Zhou Y, Shimizu I, Lu G, Itonaga M, Okamura Y, Shono M, Honda H, Inoue S, Muramatsu M, Ito S: Hepatic Stellate cells contain the functional estrogen receptor beta but not the estrogen receptor alpha in male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun* 286, 1059-1065 (2001)
27. Orimo A, Tomioka Y, Shimizu Y, Sato M, Oigawa S, Kamata K, Nogi Y, Inoue S, Takahashi M, Hata T, Muramatsu M: Cancer-associated myofibroblasts possess various factors to promote endometrial tumor progression. *Clin Cancer Res* 7, 3097-3105 (2001)
28. Jisa E, Dornstauder E, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Jungbauer A: Transcriptional activities of estrogen receptor alpha and beta in years properties of raloxifene (1). *Biochem Pharmacol* 62, 953-961 (2001)
29. Tsuneizumi M, Emi M, Nagai H, Harada H, Sakamoto G, Kasumi F, Inoue S, Kazui T, Nakamura Y: Over-representation of the EBAG9 gene at 8q23 associated with early-stage breast cancers. *J Clin Cancer Res* 7, 3526-3532 (2001)
30. Suzuki T, Inoue S, Kawabata W, Akahira J, Mariya T, Tsuchiya F, Ogawa S, Muramatsu M, Sasano H: EBAG9/RCAS1 in human breast carcinoma: a possible factor in endocrine-immune interactions. *Br J Cancer* 85, 1731-1737 (2001)
31. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogawa S, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue S: Differential expression of estrogen receptor beta (ER beta) and its C-terminal truncated splice variant of ER beta cx as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 289, 692-699 (2001)
32. Hirose T, Morito K, Kizu R, Toriba A, Hayakawa K, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y: Estrogenic/ antiestrogenic activities of benzo[alpha]pyrene monohydroxy derivatives. *J Health Science* 47, 552-558 (2001)
33. Okada A, Ohta Y, Buchanan DL, Sato T, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Iguchi T: Changes in ontogenetic expression of estrogen receptor alpha and not of estrogen receptor beta in the female rat reproductive tract. *J Mol Endocrinol* (2002) in press.
34. Morito K, Aomori T, Hirose T, Kinjo J, Hasegawa J, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y: Interaction of Phytoestrogens with Estrogen Receptors alpha and beta (II). *Biol Pharm Bull* (2002) in press.
35. Omoto Y, Kobayashi S, Inoue S, Ogawa S, Toyama T, Yamashita H, Muramatsu M, Gustafsson J, Iwase H: Evaluation of oestrogen receptor (beta) wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers. *Eur J Cancer* (2002) in press.
36. Fujita M, Ogawa S, Fukuoka H, Tsukui T, Nemoto N, Tsutsumi O, Ouchi Y, Inoue S: Differential Expression of Secreted Frizzled Related Protein 4 (sFRP4) in Decidual Cells during Pregnancy. *J Mol Endocrinol* (2002) in press.
37. 風間広仁、堀内敏行、松岡浩司、小林秀、荒木厚、井上潤一郎、服部明德、細井孝之、田中孝司。下垂体腫瘍と下垂体卒中により中枢性尿崩症および下垂体前葉機能不全をきたしたと考えられる高齢女性の一例。ACTH RELATED PEPTIDES 1 1 巻、235-244、2001。
38. 堀内敏行、室谷ゆかり、細井孝之、石橋英明、山本精三、矢富直美、中村哲郎、折茂肇。Qualeffo を用いた高齢者椎体骨折患者の QOL 評価。Osteoporosis Japan 9 巻、2 号、226-230、2001。
39. 堀内敏行。スタチンと骨粗鬆症。Geriatric Medicine. 39 巻、4 号、591-594、2001 年 4 月号。
40. 細井孝之、堀内敏行、白木由美子、水野有三、宮尾益理子、馬場利明、草場宣廷、白木正孝。DNA プローブによる骨粗鬆症関連遺伝子多型の検出およびその臨床的有用性について。医学と薬学 45 巻、5 号、914-922、2001 年 5 月
41. 堀内敏行。ビスフォスフォネートの骨粗鬆症の治療薬としての展望。リュウマチ科。25 巻、6 号、510-514、2001 年 6 月
42. Yoshida T, Sakamoto H, Horiuchi T, Yamamoto S, Suematsu A, Oda H, Koshihara Y. Involvement of prostaglandin E2 in Interleukin-1 α induced parathyroid hormone-related peptide production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3272-3278, 2001
43. 堀内敏行。高齢者の代表的な疾患の臨床知識と薬物療法。骨粗鬆症。薬局 52 巻、11 号、2522-2527、2001 年
44. 堀内敏行。糖尿病性腎症の骨代謝管理。腎と透析 臨時増刊号。496-499、2001

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等 研究事業）
分担研究報告書

高齢者における骨折予防をエンドポイントとする
骨粗鬆症治療の評価を検討するためのデータベース構築

分担研究者 堀内 敏行（東京都老人医療センター 内科医長）

研究要旨

高齢者の骨折予防に対する方策を確立するための長期縦断調査を遂行するために、骨粗鬆症外来受診者に関するデータベースを作成する。高齢者の骨折を予防するためには集学的なアプローチが必要であり、その体系を確立するためには多角的な観点から構築されたデータベースが有用である。本研究では、学際的な協力のもとに運営されている東京都老人医療センターにおける骨粗鬆症外来受診者を対象としてデータベースを作成するものであり、骨折予防に向けた重要な知見を得るための基盤が得られるものと期待される。

A. 研究目的

高齢者の骨折予防に対する方策を確立するための長期縦断調査を遂行するために、骨粗鬆症外来受診者に関するデータベースを作成する。高齢者の骨折を予防するためには集学的なアプローチが必要であり、その体系を確立するためには多角的な観点から構築されたデータベースが有用である。本研究では、学際的な協力のもとに運営されている東京都老人医療センターにおける骨粗鬆症外来受診者を対象としてデータベースを作成するものであり、骨折予防に向けた重要な知見を得るための基盤が得られるものと期待される。

B. 研究方法

対象：東京都老人医療センター骨粗鬆症外来受診者

調査項目：問診(自覚症状、疼痛の部位と程度、月経歴、既往歴、服用中の薬剤、運動習慣、食習慣、転倒歴、最大身長、最大体重など)項目、身体所見の測定値(身長、体重、アームスパン、握力、MMSE、片足起立時間等)、dual energy X-ray

absorptiometry(DXA)による腰椎、大腿骨近位部、前腕骨遠位端の骨量測定値、骨レントゲン所見(胸腰椎2方向、骨盤前後方向、手指骨 MD 法)、血漿副甲状腺ホルモン、血清 1,25(OH)ビタミン D、血清オステオカルシン、血清骨特異的アルカリフォスファターゼ、尿中デオキシピリジノリンまたは NTX を測定する。

C. 結果と考察

骨粗鬆症は骨量の減少によって易骨折性をきたす疾患である。骨粗鬆症の合併症である骨折は高齢者の生活の質を脅かすのみならず、いわゆる寝たきりの大きな原因の一つである。骨折の予防には骨量を指標とした診断と治療とともに、転倒予防をめざした全人的医療が必要である。このため、骨粗鬆症を学際的な疾患としてとらえた上でのチーム医療の体制を組むことが有用である。当センターではこのような骨粗鬆症診療を実現させるために 1999 年 4 月、骨粗鬆症外来を開設した。さらに、地域の連携医師との共同診療にも力を入れている。今回のデータベース作成にあたってはまず 1999 年 4 月から 2000 年 9 月までの骨粗鬆症外来開設初期の

受診者を第1期分として集中的にデータ入力し、その後の集団については1年ごとに1期分として入力していくこととした。

骨粗鬆症外来の受診者は腰背痛などの自覚症状があるために受診する方、自覚症状はないものの骨量測定を希望される方、地域連携医師から紹介された方、骨粗鬆症検診で精密検査を指示された方など様々である。

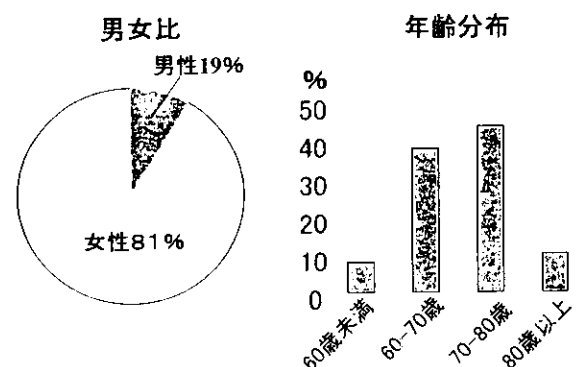
受診者には、問診(自覚症状、疼痛の部位と程度、月経歴、既往歴、服用中の薬剤、運動習慣、食習慣、転倒歴、最大身長、最大体重など)、身体所見の測定(身長、体重、アームスパン、握力、MMSE、片足起立時間など)などの診察に引き続いて、dual energy X-ray absorptiometry(DXA)による腰椎、大腿骨近位部、前腕骨遠位端の骨量測定、骨レントゲン撮影(胸腰椎2方向、骨盤前後方向、手指骨MD法)を行なった。さらに鑑別診断と骨代謝状態の把握を目的とした血液・尿検査を施行した。骨代謝状態の把握には、血清副甲状腺ホルモン、血清1,25(OH)ビタミンD、血清オステオカルシン、血清骨特異アルカリフォスファターゼ、尿中デオキシピリジノリンまたはNTXを測定している。これらの測定結果を踏まえて治療方針を決定し、かかりつけ医への報告や逆紹介による病診連携も活用した診療を勧めている。また転倒リスクが高い場合には転倒予防外来を受診していただき、リスクの評価ならびに転倒予防指導を行っている。

骨粗鬆症治療は長期にわたる診療の継続が必要である。骨折予防という最終評価事項による治療効果の判定には最低3年間の観察が必要ともいわれている。

当外来では、先に述べたように受診者の臨床データを1年単位にグループ化した解析を行ない、その結果を今後の診療に役立てていく予定である。第1期の登録者は約1000名であり、そのうち女性が80%を占め、女性における閉経後の女性ホルモン減少が骨粗鬆症発症において重要な役割をはたしていることを反映している(図)。一方、男性患者

も増加してきている。男性については前立腺癌に対してLH-RHアナログの治療を受けている方および男女問わず、膠原病、気管支喘息に対するステロイド療法による、続発性骨粗鬆症の方に骨密度低下をきたす方が目立って多くなっている。このような点からも各診療科との連携を密にした診療を行なっていく必要性がある。

図 第一期登録者内訳 (976名)



D. 結論

骨粗鬆症治療薬に対する反応性決定遺伝子の同定と臨床応用に向けて新たに臨床データベースの構築が必須である。また膠原病、喘息のステロイド治療による骨粗鬆症、前立腺癌治療のLH-RHアナログによる骨粗鬆症も随時データベースに加えていき解析する必要がある。

F. 健康危険情報:

今年度の研究において当該情報は得られなかった。

G. 論文発表

- 1) 風間広仁、堀内敏行、松岡浩司、小林秀、荒木厚、井上潤一郎、服部明德、細井孝之、田中孝司。下垂体腫瘍と下垂体卒中により中枢性尿崩症および下垂体前葉機能不全をきたしたと考えられる高齢女性の一例。ACTH RELATED PEPTIDES 11巻、235-244、2001。
- 2) 堀内敏行、室谷ゆかり、細井孝之、石橋英明、山本精三、矢富直美、中村哲郎、折

- 茂肇。Qualeffo を用いた高齢者椎体骨折患者の QOL 評価。Osteoporosis Japan 9 巻、2 号、226-230、2001。
- 3) 堀内敏行。スタチンと骨粗鬆症。Geriatric Medicine. 39 巻、4 号、591-594、2001 年 4 月号。
- 4) 細井孝之、堀内敏行、白木由美子、水野有三、宮尾益理子、馬場利明、草場宣廷、白木正孝。DNA プローブによる骨粗鬆症関連遺伝子多型の検出およびその臨床的有用性について。医学と薬学 45 巻、5 号、914-922、2001 年 5 月
- 5) 堀内敏行。ビスフォスフォネートの骨粗鬆症の治療薬としての展望。リュウマチ科。25 巻、6 号、510-514、2001 年 6 月
- 6) Yoshida T, Sakamoto H, Horiuchi T, Yamamoto S, Suematsu A, Oda H, Koshihara Y. Involvement of prostaglandin E2 in Interleukin-1 α induced parathyroid hormone-related peptide production in synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis. J Clin Endocrinol Metab 86:3272-3278, 2001
- 7) 堀内敏行。高齢者の代表的な疾患の臨床知識と薬物療法。骨粗鬆症。薬局 52 巻、11 号、2522-2527、2001 年
- 8) 堀内敏行。糖尿病性腎症の骨代謝管理。腎と透析 臨時増刊号。496-499、2001

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業費）

分担研究報告書

骨粗鬆症治療法の感受性決定要因としての遺伝子多型決定にむけてのコホートの設定

分担研究者 白木正孝 成人病診療研究所所長

研究要旨：骨粗鬆症の発症を規定する要因またはその治療効果を規定する要因を検索し、将来の遺伝子解析に資するために研究対象となるコホートの設定を行った。平成5年から13年までの9年間に成人病診療研究所を訪れた対象から無作為に1713例を登録し、基本属性の検討を終えた。結果的にこれらの症例の脊椎骨密度の平均Z-Scoreは-0.15であり、この点からほぼ平均的日本人女性集団であることが確認された。現在、これらの例のうち、骨密度正常例はそのまま経過観察を行い、骨粗鬆症と診断された例は無作為に治療法を割り付け経過観察中である。平均経過観察期間は約900日、経過観察率は64.1%である。無治療群の骨折発生率は脊椎骨折が年率5%、大腿骨頸部骨折が年率0.3%であった。

A. 研究目的

高齢化社会の到来をひかえ、種々の退行期疾患の効率的治療方法の開発が望まれている。この目的を果たすためには、多様な原因により発生する退行期疾患を分類し、その病態別の治療法を開発するとともに、もう一方では患者個人レベルで治療法を検討することも必要である。近年進歩した遺伝子レベルにおける個人の体質解析はこのことを可能ならしめるかもしれない。このような効率的医療を実現するためには、退行期疾患の自然経過を検討し基本データを集積しない限り、治療方法の客観

的評価ができないばかりでなく、新しい治療方法が従来の治療方法に勝るのか否かの判断もできない。さらには十分な症例の蓄積がない限り、多様な原因で発生する疾患の基本的病態解析すらおぼつかない。以上の考察から、我々は退行期疾患の一つである骨粗鬆症の病態解析、治療方法評価、遺伝的背景の解析に耐えるコホートを作成することにした。今年度は現在までに我々が設定したコホートの一般性を検討し、このコホートにおける骨折発生率を検討した。

B 研究方法

- 1) 研究機関の立地条件：成人病診療研究所をその機関とした。本研究所は長野県安曇野に位置し、標高約 600m、人口構成は高齢化率が約 17%とまだ高齢化した社会ではない。経済的には新産業地域指定後、比較的多くの工場が進出し、それまでの農業主体の産業構造から脱却している。最近では第三次産業への就労も増加している。しかし、老年世代はいまだに現役の農業を小規模ながら営んでおり、人口の移動は少なくとも老年人口に関していえば殆どないといつてよい。世代的には 60 才以上の老年者の殆どが規模の差はあれなんらかの農作業を経験しており、それ以下の世代は各種の産業に就労するか純粋な家婦であることが多い。すなわち老年世代と若年世代とは就業内容が異なっている。
- 2) 検討項目：成人病診療研究所を訪れ、同意が得られた対象について脊椎レントゲン撮影、全身および腰椎骨密度測定 (DXA)、骨代謝マーカー、カルシウム代謝調節ホルモンなどを測定した。レントゲン写真は 1-2 年間隔、腰椎骨密度

は半年おきに測定した。また一部の例では同意文書を得た上で末梢白血球より DNA を抽出した。これら測定項目が一般日本人に比べどのような分布を呈しているかを検討し、本コホートの一般性を検証した。

- 3) 新規骨折観察方法：本研究に登録され一年以上経過観察された閉経後婦人 1594 例を対象とした。本研究においては登録時同意取得のもと骨粗鬆症例には各種の骨粗鬆症治療薬がランダムに割り付けられているが骨粗鬆症 895 例中 230 例はカルシウム剤のみの治療となっているため、これらを骨粗鬆症対照としてとり扱った。313 例は骨減少例、386 例が骨密度正常例であった。これらの例は全例 1-2 年間隔でレントゲン撮影がなされ、脊椎骨折の有無が確認された。またその他の臨床骨折に関しては、それを疑うべき事象があった場合、その都度レントゲン撮影を行い、臨床骨折の有無を確認した。症例ごとの観察期間が異なるため、観察期間の一年ごとの骨折発生率を算出した。
(倫理面での配慮) 本研究計画は当研究所倫理委員会にて倫理的に妥当であることが確認されている。

C 研究結果

- 1) コホートの一般性の検討

本コホートの骨に関する一般性を検討するため登録された 1594 例の脊椎骨密度の Z Score を求めたところその平均値は-0.15 でありほぼ 0 付近であった。従って、本コホートは一般的な日本人女性の骨密度に等しい分布を呈すると考えられた。

2) 骨折率の算出：対象を骨粗鬆症無治療例、骨粗鬆症治療例、および非骨粗鬆症例の三群に分類し、それぞれの年間骨折発生率を計算した。骨折発生率は観察年度に起こった新規骨折例数を総観察例数で除して求めた。各臨床骨折ごとに頻度をもとめたが、図 1 には脊椎骨折の発生率（骨粗鬆症無治療群および非骨粗鬆症群）を示した。骨粗鬆症群の脊椎骨折発生率は非骨粗鬆症群のそれに比べ明らかに高値であり、観察期間依存性に骨折発生率は高まった。図 2 には同様に大腿骨頸部骨折発生率を示した。ここでも脊椎骨折と同様に期間依存性がみられ、また骨粗鬆症群の骨折率が高く、非骨粗鬆症群では殆ど骨折はみられなかった。大腿骨頸部骨折発生率は脊椎骨折発生率よりもはるかに低く約 1/10 にすぎなかった。なお今回の検討では 1594 例中 18 例に大腿骨頸部骨折がみられ、

うち 11 例は骨粗鬆症例であり、他の 7 例は非骨粗鬆症例であった。骨粗鬆症、非骨粗鬆症をとわず、観察期間がのびるほど骨折発生数は増したが、第 4 年度以後観察症例数が少なくなるため、event-dependent bias が発生することが懸念されたため、結果は症例数がそろった第 3 年度まで示した。これらの骨折以外に前腕骨遠位端骨折が 28 例にみられたが、この骨折の発生もほぼ同様に期間依存性、および骨密度依存性がみられた。骨折発生率は大腿骨頸部骨折よりは多く、脊椎骨折の発生率の 1/5 程度であった（図 3）。

3) 大腿骨頸部骨折例の臨床背景

表 1 に 18 例の大腿骨頸部骨折例の臨床背景を示した。以前から知られているように高齢、パーキンソン症候群、片麻痺、痴呆などの神経系疾患の合併、および低骨密度、既存骨折の存在など骨粗鬆症の合併が殆どの例でみられた。

4) 骨折例と非骨折例の検査所見

表 2 に各骨折群の臨床検査所見についてまとめた。脊椎骨折を発生した群と大腿骨頸部骨折を発生した群が特徴的な検査所見を呈した。すなわち、両骨折群とも高齢であり、体格が小さく、低骨密度であるが、大腿

骨頸部骨折患者は脊椎骨密度値は非骨折群と差を認めなかった。また大腿骨頸部骨折例はビタミン D 不足と副甲状腺機能亢進症が特徴的であった。

D. 考察

今回の結果より、脊椎骨折、大腿骨頸部骨折、および前腕骨遠位端骨折のいずれの骨折も骨密度に依存性にかつ観察期間依存性にその発生が高まることが明らかとなった。骨粗鬆症例でその傾向が顕著であり、このことは骨粗鬆症が放置されてはならないことを示している。さらに大腿骨頸部骨折の臨床像が明らかとなった。すなわち、高齢で既存骨折をもった骨粗鬆症例で神経系の合併症をもつものに関しては大腿骨頸部骨折の危険性が高いと言わざるを得ない。さらに検査的にはビタミン D 不足がみられ、それによると考えられる二次性副甲状腺機能亢進症が存在することが大腿骨頸部骨折の特徴的検査所見であった。Munier ら(1)は施設入所老年者にビタミン D を投与して大腿骨頸部骨折発生を抑制できたと報告しているが、今回の検討からその結果は妥当なものと考えられた。多くの報告がビタミン D の正常値についてはみなおしが必要と述べているが、今回の検討でも、ビタミン D の正常値のみなおし作業が必要と考

えられた。

骨折発生率に関しては、脊椎骨折発生率は無治療骨粗鬆症例の第一年で 5.2%、第二年で 11.4%、第三年で 13%と計算された。これに対し、FIT-I(2)における対照群の報告では大量のカルシウムとビタミン D が補充されているためか、年間骨折発生率は観察期間に無関係に約 4%程度であり、Lindsay ら(3)の meta-analysis によれば年間 6.6%と報告されている。今回の統計では我々のほうが平均骨折率が 9.8%となるのでやや高い。この差はビタミン D の充足状態によるのかもしれない。しかし、一方では大腿骨頸部骨折発生率に関しては、症例数が少ないこともあって正確にはいえないが、我々の値は Risedronate の HIP 研究(4)のそれに比べ約 1/3 程度の発生率である。(HIP 研究 3.9% : 三年間) vs (1% 三年間)

このことは我が国で大腿骨頸部骨折に関する介入試験を行おうとすると欧米の研究に約 3-4 倍の症例数を必要とすることになると考えられる。

大腿骨頸部骨折が発生した患者の内容を検討すると、骨粗鬆症由来と思われる症例が約 60%であり、40%の症例は骨粗鬆症由来とは考え難かった。Risedronate の HIP 研究でも Risedronate が有効だったのは骨粗鬆症群のみであり、骨とは無関係なり

スクをもつ群では Risedronate は有効性がなかったとされる。従って、ヒッププロテクターのよい適応は骨粗鬆症とは無関係なリスク群ということになるのかもしれない。

今回のような前向き研究により骨粗鬆症の臨床骨折を網羅的に観察した報告はなく、このデータは貴重な基礎データになりうるものと考えられる。

E. 結論:

日本女性を代表するコホートを設定できた。このコホートをを用いた検討から閉経後婦人における骨折の発生には明らかな骨密度依存性と観察期間依存性がどの骨折にもみられた。このことは骨粗鬆症が放置されると骨折の罹病率が高まることを意味しており、早期の治療への導入が必要であることの根拠となると考えられた。

今回の対象群では海外の大規模研究に比べ条件の差はあるものの、脊椎骨折発生率は高く、大腿骨頸部骨折発生率は低く見積もられた。

従って我が国で大腿骨頸部骨折の介入試験を行うさいには海外の大規模試験にもまして大量の対象が必要とされると予想された。

F 健康危険情報

とくになし。

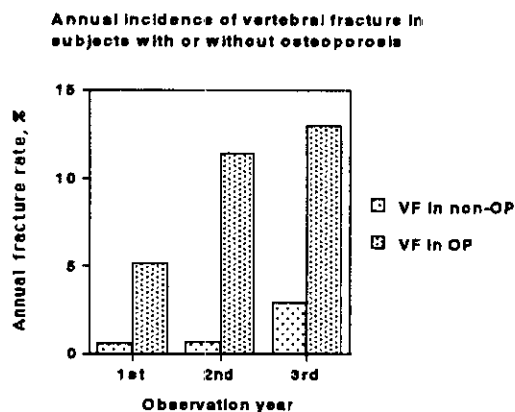
G 研究発表

これらの成果は平成 14 年度日本骨粗鬆症学会にて発表予定である。

H 知的財産権の出願

なし。

図 1 脊椎骨折発生頻度



op=骨粗鬆症

図 2 大腿骨頸部骨折発生頻度

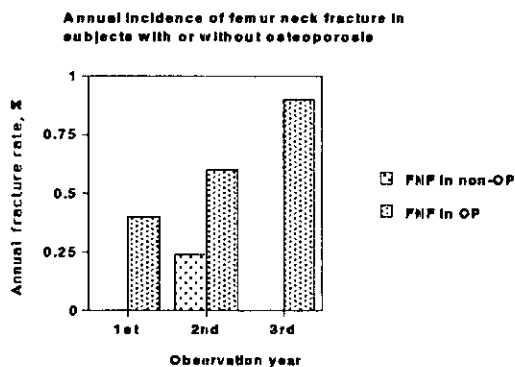


図 3 前腕骨骨折発生頻度

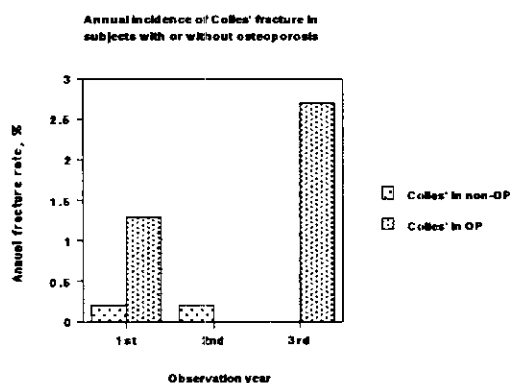


表 1 観察期間中に大腿骨頸部骨折を生じた症例一覧

症例番号	年齢	神経疾患	既存骨折	LBMD, g/cm ²
1	76	+	+	0.716(OP)
2	89	+	+	0.830(OP)
3	84	-	+	1.128 (non-OP)
4	88	+	+	0.836(OP)
5	69	+	-	1.105(non-OP)
6	77	-	-	1.111(non-OP)
7	76	+	+	0.706(OP)
8	71	-	+	0.933 (OP)
9	85	+	+	0.465 (OP)
10	82	-	-	1.007 (non-OP)
11	76	-	-	0.951 (non-OP)
12	77	-	- (knee OA)	0.924 (non-OP)
13	38	-	+ (hyperparathyroidism)	0.576 (2 nd -OP)
14	90	-	+	0.758 (OP)
15	90	+	-	0.986 (non-OP)
16	84	-	+	0.219 (OP)
17	93	+	+	0.429 (OP)
18	86	+	+	0.775 (OP)

表 2 各骨折例の臨床検査所見

Item	Non-Fr	Vertebral Fr	Colles' Fr	FNF	P
Age (yo)	63.9±0.3 a	71.4±0.5 b	65.3±1.8 c	76.1±2.8 d	A<B, 0.0001 A<D 0.0001
Body weight	50.0±0.2	48.8±0.5	50.3±1.1	45.2±2.4	A>B 0.0371 A>D 0.0087
Body height	150±0.2	148±0.5	151±1	147±2	A>B 0.0001 A>D 0.0371
LBMD(g/cm ²)	0.88±0.01	0.77±0.01	0.85±0.03	0.80±0.06	A>B 0.0001
TBMD(g/cm ²)	0.97± 0.003	0.89±0.01	0.96±0.02	0.85±0.03	A>B 0.0001 A>D 0.0001
Fat Mass (%)	31.5±0.2	31.5±0.7	31.0±1.6	26.0±2.8	A>D 0.0035
DPD(nM/mMCR)	7.3±0.1	8.5±0.2	7.9±0.4	10.0±1.2	A<B 0.0001 A<D 0.0012
PTH (pg/ml)	35.8±0.5	37.9±1.1	40.5±4.1	46.5±4.7	A<D 0.0066
25-vitamin D (ng/ml)	21.4±0.2	20.9±0.5	18.4±1.3	16.3±1.4	A>D 0.0037
u-Ca/Cr	0.22± 0.004	0.22±0.01	0.20±0.02	0.16±0.03	A>D 0.05

厚生省科学研究費補助金(ヒトゲノム・再生医療等研究事業)
分担研究報告書

分担研究者 井上 聡 東京大学大学院医学系研究科
加齢医学講座

骨粗鬆症治療薬に対する反応決定遺伝子の探索

研究要旨 骨粗鬆症治療薬反応性の分子機序を明らかにするために、初代培養骨芽細胞を用いて細胞周期関連制御因子を中心としたタンパクレベルでの発現制御の分子機構の探索ならびにマイクロアレイ法を用いた老化応答遺伝子、骨粗鬆症治療薬応答遺伝子の探索を行った。この結果、新たな分子標的がリストアップされ、骨粗鬆症治療薬反応性の指標としての候補遺伝子群が得られた。

A. 研究目的

高齢ならびに閉経は骨粗鬆症の発症において重要な誘因である。高齢者骨粗鬆症では、内分泌ホルモンをはじめとする様々な増殖や分化の制御因子ならびに骨粗鬆症治療薬に対する骨芽細胞の反応性が老化によって低下していることが考えられる。この骨芽細胞の老化における分子機構を解明する上でシグナル伝達の最終段階である細胞周期制御機構を解明することが必須である。当分担研究者らは *in vitro* での骨芽細胞の分化モデルであるラット初代培養骨芽細胞に TGF β とビタミン D を添加した際の増殖と分化に与える影響について細胞周期とその制御因子に関して検討を加えた。その結果、これら因子は骨芽細胞の増殖、分化の制御を細胞周期制御因子の一つである CDK 阻害蛋白 p57^{Kip2} の発現を増減させることにより、そのシグナルの下流に位置する p107 のリン酸化と脱リン酸化を制御する共通の分子機構を介して行っていることを発見した (Urano et al. J Biol Chem (1999))。さらにヒト p57^{Kip2} のアミノ酸欠損を有する遺伝子多

型が骨粗鬆症の発症に影響を与える可能性を見だし報告した (Urano et al. Biochem Biophys Res Commun (2000))。以上より細胞周期制御蛋白である p57^{Kip2} は骨芽細胞において増殖制御のみならず、分化制御においても重要な役割を担うことにより骨粗鬆症の発症ならびに骨粗鬆症治療薬への反応性に関与していることが示唆された。しかし骨芽細胞老化において、これら細胞周期シグナルのどこに変化が生じるかという疑問に対しては未だ十分な検討がなされていない。そこで今回、骨芽細胞老化に伴う TGF β 反応性低下時における細胞周期制御蛋白の遺伝子変化を探索した。さらにマイクロアレイ法を用いて初代培養骨芽細胞における TGF β 応答遺伝子ならびに細胞老化応答遺伝子に関して Gene profiling を行った。

高齢者骨粗鬆症と閉経後骨粗鬆症の異なる病因としてはエストロゲン低下、欠乏が挙げられる。エストロゲンは閉経後骨粗鬆症の最も有効な治療薬の一つとして破骨細胞に作用し、骨吸収を抑制する作用が知られている。その

一方で骨芽細胞に対するエストロゲン作用に関しては未だ不明である点が多い。そこでマイクロアレイ法を用いて初代培養骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子についても Gene profiling を行った。

B. 研究方法

1, 骨芽細胞老化に伴う TGF β 反応性低下時における細胞周期制御蛋白の遺伝子変化

ラット初代培養骨芽細胞を1:2ratio で継代することにより細胞の passage を増加させ細胞老化を誘導した。各 passage における 10%FCS での増殖能ならびに TGF β を添加後 48 時間後の細胞数の変化率を測定した。各条件下での細胞抽出液を用いて細胞周期制御因子の発現を Western blot 法を用いて検討した。

2, 初代培養骨芽細胞における TGF β 応答遺伝子ならびに細胞老化応答遺伝子の探索

初代培養骨芽細胞に TGF β を添加し、添加後 0 分、30 分、60 分、120 分後の RNA を採取した。これら RNA をマイクロアレイ法を用いて添加後 30 分、60 分、120 分に共通して上昇する遺伝子、ならびに 60 分、120 分に共通して上昇する遺伝子をリストアップした。つぎに 2 passage ならびに 8 passage での細胞から RNA を採取し、マイクロアレイ法を用いて細胞老化により誘導される遺伝子をリストアップした。

3, 初代培養骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の探索

我々が作成したエストロゲン低応答性トランスジェニックラット(Ogawa et al. J Biol Chem 2000)胎児頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞ならびに野生株由来の初代培養骨芽細胞から RNA を採取した。これら RNA からマイクロアレイ法を用いて発現に差異のある遺伝子をリストアップすることにより骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子を探索した。

C. 研究結果

1, 骨芽細胞老化に伴う TGF β 反応性低下時

における細胞周期制御蛋白の遺伝子変化

骨芽細胞においては血清下での増殖能の低下に先立って、TGF β による細胞増殖応答性ならびに ALP 活性の低下が出現した。細胞周期制御因子に関しては細胞周期の負の制御因子であるはずの p57 の発現が継代とともに劇的に減少し、8 passage 以後では検出が出来なくなった。これら細胞に TGF β を添加すると添加後 24 時間後には p57^{Kip2} タンパクが 90%以上減少した。継代とともに TGF 添加前の p57 の発現量は減少していったが TGF β によるその発現の減少率には変化はなかった。一方、他の CKI である p27 の発現が継代と共に増加し、TGF β 添加後も発現減少を認めなかった。さらに免疫沈降を用いてこれらタンパクとその阻害標的である CDK2 や CDK4 ならびにサイクリン D2 との結合を確認したところ継代とともにこれらタンパクは p57^{Kip2} との結合から p27^{Kip1} との結合にシフトした。

2, 初代培養骨芽細胞における TGF β 応答遺伝子ならびに細胞老化応答遺伝子の探索

上記のように骨芽細胞老化において、そのシグナル伝達の最終段階である細胞周期制御因子変化が確認された。そこでこれら遺伝子調節を媒介する因子を同定することを目的として初代培養骨芽細胞から抽出した mRNA を用いて TGF β 応答遺伝子ならびに老化応答遺伝子の探索を行った。

TGF β 添加 60 分後 120 分後に共通して誘導される遺伝子としてはシグナルの早期応答遺伝子として知られる Smad2 ならびに Smad3 をはじめとする 100 以上の候補遺伝子を、細胞老化時に誘導する遺伝子としては細胞老化のマーカーとして知られる osteonectin ならびに fibronectin をはじめとする 100 以上の遺伝子をリストアップすることが出来た。

3, 初代培養骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の探索

エストロゲン低応答性トランスジェニックラット頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞から抽出した

RNA と野生株由来の初代培養骨芽細胞 RNA との比較から発現変化のある遺伝子をリストアップした。エストロゲン低応答性ラット由来において低発現を示す候補遺伝子としてサイクリン D2 が挙げられた。サイクリン D2 は細胞周期の正の制御因子として細胞増殖を誘導する因子として知られている。実際にこれらの発現がタンパクレベルでも発現に差異があることを Western blot 法を用いて確認した。さらに野生株にエストロゲンを添加し、細胞増殖を誘導したところサイクリン D2 の発現誘導が確認されそれと同時にサイクリン D2 の結合タンパクである CDK4 の酵素活性の上昇が確認された。しかしながら TGF β 添加時のような p57^{Kip2} の発現減少は確認されず、TGF β とエストロゲンではその増殖誘導の分子機構に違いがあることが確認された。

D. 考察

細胞老化に伴う TGF β 応答性の低下時においても TGF β による p57^{Kip2} の発現減少率が継代においても持続していた。TGF β 応答性による p57^{Kip2} の分解は TGF β 受容体から smad2、smad3 を介していることが既に報告されており、細胞老化時においても受容体を介した p57^{Kip2} を分解させるシグナル伝達が十分に残存していることを示唆させる。しかしその一方で CKI の発現パターンは p57^{Kip2} から p27^{Kip1} に移行しており、この遺伝子制御に関連する因子がマイクロアレイ法のリスト中に存在する可能性が示唆された。今後、老化骨芽細胞に TGF β を添加した時の Gene profiling を行い、今回行った、TGF β 応答遺伝子との比較を行うことにより細胞周期シグナルを低下させる因子を検討するとともに、骨粗鬆症治療薬反応性のマーカーとしてリストアップする。これにより得られた知見は高齢骨粗鬆症の治療における遺伝子標的として検討する。

また今回行った骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の検索においてはサイクリン D2 が細胞周期制御において中心的な役割を果た

していた。同じ骨芽細胞の増殖因子である TGF β とはその増殖誘導のメカニズムが異なっていたことは興味深く、これらの差異が増殖因子による骨芽細胞の分化ならびに骨リモデリングへのシグナル伝達に対しても異なる影響を及ぼすことが示唆され、骨形成の促進を目指した新しい骨粗鬆症治療薬開発のよい指標となる。

来年度以降、マイクロアレイ法による骨芽細胞研究をさらに進展させ、骨粗鬆症治療薬として用いられているビタミン D、ビタミン K を骨芽細胞に添加した時に誘導される遺伝子や老化モデルマウス、ビタミン D 受容体ノックアウトマウス、p57 ノックアウトマウス等の骨形成に異常を生じるマウス由来の骨芽細胞における gene profiling を網羅的に行う。これらのリストから高齢者ならびに閉経後骨粗鬆症発症における分子標的の差異、ならびに相同性、さらには複数存在する骨粗鬆症治療薬における分子標的を明らかにし、骨粗鬆症治療薬反応性の分子機構の解明と臨床応用を目指す。すなわち、当研究の応用により患者個人の病態、遺伝子マーカーに合わせた、治療薬に対する高い応答性を有したオーダーメイド医療へと発展させていく。

E. 結論

初代培養骨芽細胞を用いて細胞周期関連制御因子を中心としたタンパクレベルでの発現制御の分子機構の探索ならびにマイクロアレイ法を用いた老化応答遺伝子、TGF β 応答遺伝子、エストロゲン応答遺伝子の探索を行い、新たな分子標的を示すとともに、骨粗鬆症治療薬反応性の指標としての意義を探った。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Muramatsu M., Inoue S: BREAKTHROUGHS AND VIEWS - Estrogen receptors: How do they

- control reproductive and non-reproductive functions. *Biochem Biophys Res Commun* 270(1): 1-10 (2000)
2. Muramatsu M, Ogawa S, Watanabe T, Ikeda, K, Hiroi, H, Orimo A, Inoue S: Recent advances in steroid receptor research: focusing on estrogen receptors (2000) *Hormone replacement therapy and osteoporosis* (Edited by Kato J, Minaguchi H, Nishio Y) Springer Verlag, Berlin, (pp 43-74)
 3. Ikeda K, Inoue S, Orimo A, Hiroi H, Tsuchiya F, Gorai I, Higashi Y, Muramatsu M Expression and Estrogen Inducible Promoter Activity of Human Estrogen-responsive Finger Protein Gene in Breast and Ovarian Cancer Cells (2000) *Hormonal Carcinogenesis III* (Edited by Li JJ, Daling JR, Li SA), Springer-Verlag, New York, (pp 424-428)
 4. Nishihara E, Nagayama Y, Inoue S, Hiroi H, Muramatsu M, Yamashita S, Koji T: Ontogenetic changes in the expression of estrogen receptor alpha and beta in rat pituitary gland detected by immunohistochemistry. *Endocrinology* 141(2), 615-620 (2000)
 5. Miyao M, Morita H, Hosoi T, Kurihara H, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Yazaki Y, Ouchi Y: Association of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *Calcif Tissue Int* 66(3), 190-194 (2000)
 6. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S: Association of estrogen receptor beta (ERbeta) gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 269(2), 537-541 (2000)
 7. Urano T, Hosoi T, Shiraki M, Toyoshima H, Ouchi Y, Inoue S: Possible involvement of p57Kip2 gene in the bone metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 269(2), 422-426 (2000)
 8. Hoshino S, Hosoi T, Miyao M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Identification of a novel polymorphism of estrogen receptor alpha gene that is associated with calcium excretion in urine. *J Bone Miner Metab* 18(3), 153-157 (2000)
 9. Ikeda K, Orimo A, Higashi Y, Muramatsu M, Inoue S: Efp as a primary estrogen responsive gene in human breast cancer. *FEBS Lett* 472(1), 9-13 (2000)
 10. Ikeda K, Sato M, Tsutsumi O, Tsuchiya F, Tsuneizumi M, Emi M, Imoto I, Inazawa J, Muramatsu M, Inoue S: Promoter analysis and chromosome mapping of human EBAG9 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 273, 654-660 (2000)
 11. Ogawa S, Saito T, Matsuda Y, Seki N, Hayashi A, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M, Hori T, Inoue S: Chromosome mapping of RNF16 and Rnf16, human, mouse and rat genes for testis finger protein (terf), a member of the RING finger family. *Cytogenet Cell Genet* 89, 56-58 (2000)
 12. Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda S, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J Biol Chem* 275, 21372-21379 (2000)
 13. Orimo A, Yamagishi T, Tominaga N, Yamauchi Y, Hishinuma T, Okada K, Suzuki M, Sato M, Nogi Y, Suzuki H, Inoue S, Yoshimura K, Shimizu Y, Muramatsu M: Molecular cloning of testis-abundant finger protein (tfp) ring finger protein 23 (RNF23) RBCC (RING-B box-coiled coil) -B30.2 protein on the class I region of the human MHC. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 45-51 (2000)
 14. Orimo A, Tominaga N, Yoshimura K, Yamauchi Y, Nomura M, Sato M, Nogi Y, Suzuki M, Suzuki H, Ikeda K, Inoue S, Muramatsu M: Molecular cloning of ring finger protein 21 (RNF21) / interferon-responsive finger protein (ifp1), which possesses two ring-B box-coiled coil domains in tandem. *Genomics* 69, 143-149 (2000)
 15. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S: Association of estrogen receptor beta (ESR2) gene polymorphism with blood pressure. *J Hum Genet* 45(6), 327-330 (2000)