

## D. 考 察

特発性大腿骨頭壊死の病因はいまだに不明であるが、最近Weinsteinらはステロイド誘発性大腿骨頭壊死の壊死組織において骨細胞のアポトーシスが認められることを報告した。またKabataらはステロイドによる家兎骨壊死モデルにおいて骨髄細胞のアポトーシスが誘導されることを報告している。われわれの検討でも壊死に陥った骨頭において骨細胞のアポトーシスが認められ、このような現象が特発性大腿骨頭壊死の進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。このようなアポトーシスは局所の虚血によって誘導されることが考えられるが、本研究においてわれわれは壊死組織の周囲にTNF- $\alpha$ を高発現する細胞の存在を明らかにした。TNF- $\alpha$ はin vitroの研究から骨細胞のアポトーシスを強力に誘導することが明らかになっており、大腿骨頭壊死における役割が示唆された。大腿骨頭壊死の研究が困難な理由のひとつは適当な動物モデルが存在しないことである。Weinsteinらはマウスへのステロイド投与によって骨細胞アポトーシスが誘導されることを報告している。われわれの検討でもデキサメサゾンペレットの皮下投与によって骨細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかになった。このモデルが大腿骨頭壊死のモデルとして適当かどうかは今後のさらなる検討が必要であるが、少なくともin vivoで骨細胞のアポトーシスを誘導できる実験系であることは間違いない。今後はTNF- $\alpha$ ノックアウトマウスを含めてさまざまなミュータントマウスを用いてステロイドによる骨細胞アポトーシスの強弱を検討していく予定である。われわれのプレリミナリーな結果ではTNF- $\alpha$ ノックアウトマウスでは骨細胞アポトーシスの減少が認められた。今後これについてさらに詳細な検討をおこなっていく予定である。

## E. 結 論

特発性大腿骨頭壊死の骨細胞アポトーシスに局所におけるTNF- $\alpha$ の産生が関与している可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, and Inoue J-I. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J*, 20:1271-1280, 2001

- 2) Tanaka S, Nakamura K, and Oda H. The osteoclast: a potential therapeutic target of bone and joint destruction in rheumatoid arthritis. *Modern Rheumatology* 11:177-183, 2001.

- 3) Yamamoto A, Miyazaki T, Kadono Y, Takayanagi H, Miura T, Wakabayashi K, Nishina H, Katada T, Oda H, Nakamura K, and Tanaka S. Requirement of Both NF- $\kappa$ B and JNK Pathways for Osteoclastogenesis Induced by Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL). *J. Bone Miner. Res.* 2001 in press.

### 2. 学会発表

- 1) 第5回骨カルシウム懇話会 (2001.3.16-17) 大阪 TRAF6を介した破骨細胞分化シグナル
- 2) 第4回分子リウマチつくばセミナー (2001.3.9) つくば 整形外科疾患に対する分子生物学的アプローチ
- 3) 産業医科大学セミナー (2001.5.23) 小倉 破骨細胞をターゲットにした骨代謝疾患治療
- 4) 第74回日本整形外科学術集会 (2001.4.19-22) 千葉 (幕張) 破骨細胞を標的とした骨関節疾患遺伝子治療の試み *J. Jpn. Orthop. Assoc.* 75:S137, 2001
- 5) 新潟骨・関節フォーラム (2001.7.4) 新潟整形外科疾患に対する分子生物学的アプローチ
- 6) 第6回 病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会 (2001.8.3-4) 宮崎 破骨細胞の分化・活性化の分子メカニズム
- 7) 第18回東京都リウマチ膠原病懇話会 (2001.9.22) 東京 破骨細胞をターゲットにした骨代謝疾患治療
- 8) 第2回運動器科学研究会 (2001.10.7-8) 高知 パネルディスカッション「運動器科学の将来展望」
- 9) 第12回骨研究フォーラム (2001.11.9) 岡山 破骨細胞をターゲットにした骨代謝疾患の治療
- 10) 第1回長崎歯周病フォーラム (2001.12.2) 長崎 ワークショップ 歯周組織の新しい再生治療を求めて 骨の破壊と骨組織における遺伝子治療の可能性
- 11) 第24回 日本分子生物学会年会 (2001.12.9-12) 横浜 ワークショップ ポストゲノム時代のリウマチ研究と運動器科学 破骨細胞をターゲットにした骨関節破壊治療
- 12) 第13回 中之島リウマチセミナー (2001.12.15-16) 大阪 Osteoprotegerin

## D) 遺伝子解析

# ノックアウトマウスを用いた核内受容体の骨代謝における機能解析

加藤 茂明 (東京大学分子細胞生物学研究所)

ステロイドホルモンの生理作用は、ステロイドホルモン受容体が標的遺伝子の転写をリガンド依存的に調節することで発揮される。我々はステロイドホルモン受容体の生体内高次機能を解明するため、ノックアウトマウスを作出・解析している。現在解析を進めている *androgen receptor KO* マウスにおいて観察された骨の表現型について報告する。

## A. 研究目的

大腿骨頭壊死症の原因の一つであるグルココルチコイドは核内受容体であるグルココルチコイド受容体を介してその作用を発揮している。本研究の目的は、ステロイドホルモンレセプターのノックアウトマウス (以下KOマウス) を用いてその生体内高次機能を解明することである。

## B. 研究方法

グルココルチコイド受容体と同じ核内受容体スーパーファミリーに属する *androgen receptor* (以下AR) KOマウスを作出した。

エストロゲンシグナルの生体内での骨代謝調節機構はER欠損マウスの解析により解明されつつあるのに対し、アンドロゲンシグナルについては不明のままであった。これはAR遺伝子がX染色体上に位置し、雄性個体 (XY) がARの機能欠損により生殖能を失うために、キメラマウスの交配を経る従来の標的遺伝子組み換え法では、AR遺伝子欠損マウス (ARKOマウス) の作出が不可能であったためである。今回我々は遺伝子の欠損を時間的・空間的に誘導できる *Cre/lox P system* を用いてこの問題を克服し、雌雄のARKOマウスの作出に成功した。

骨組織におけるアンドロゲンの作用を分子レベルで解明するため、雄マウスの骨組織の解析を行った。

(倫理面への配慮)

全ての実験動物の取り扱いには東京大学実験動物取り扱い規約に則って行った。

## C. 研究結果

KOマウスは正常に発育したが、雄KOマウスでは外生殖器が雌性化し、生殖能を持たず、血中アンドロゲン濃度は著明に減少していた。雄KOマウス (8週齢) の大腿骨の骨密度は同胞雄WTマウスに比べて約20%低下しており、3D-CTにおいてこの骨量減少は海綿骨・皮質骨ともに見られた。骨組織形態計測でも、KOマウスにおいてBV/TVが29%減少、骨形成の指標 (Ob.S/BSが19%、MARが30%増加) と骨吸収の指標 (N.Oc/B.Pmが51%、Oc.S/BSが41%増加) がともに上昇していた。この骨量減少のメカニズム解明のために、新生仔頭蓋骨由来の骨芽細胞 (POB) 培養系において、増殖曲線、ALP活性、Alizarin red染色を指標としてその増殖・機能を検討したところ、雄KO POBではそのどれもが雄WTよりも亢進していた。POBと骨髄細胞の共存培養系では、骨髄細胞の由来に関わらず、POBがKO由来の場合に限り破骨細胞形成が亢進していた。

## D. 考察

AR欠損雄マウスは、高回転型の骨量減少を呈し、その背景には骨芽細胞の増殖、骨形成能、および破骨細胞形成支持能の亢進があることが明らかとなった。KOとWTの雄マウスの間で血中エストロゲン濃度に差がなかったことより、アンドロゲンはエストロゲンとは独立した骨代謝調節機能を有する可能性が示唆された。

しかし、雄のAR KOマウスで骨量が減少したメカニズムについては、ARの欠損による直接的な影響のほか、テストステロンの減少が組織におけるアロマ

テースによる変換後のエストロゲン量の低下を引き起こすことによって生じている可能性も考えられる。今後、性ホルモンなどの薬剤負荷実験を行うほか、骨組織特異的なARKOマウスの作出を行い、ARの骨代謝における機能解析を更に進めていく予定である。

## E. 結論

1. Cre-loxP systemを用いて雌雄のARKOマウスのラインを確立した。
2. 雄のARKOマウスはTfmマウスと同様の表現型を示した。
3. 雄のARKOマウスは高回転型の骨量減少を呈した。
4. 骨量減少の背景には骨芽細胞の増殖、骨形成能、および破骨細胞形成支持能の亢進があることが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 論文発表

#### 発表論文 (原著)

- 1) Matsui, D., Sakari, M., Sato, T., Murayama, A., Takada, I., Kim, M., Takeyama, K., Kato, S.: Transcriptional regulation of the mouse steroid 5 $\alpha$ -reductase type II gene by progesterone in brain. *Nucleic Acids Research*, 2002 (in press).
- 2) Mezaki, Y., Yoshida, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: N-terminal activation function is dominant in ligand-dependent transactivation of medaka estrogen receptor  $\alpha$  in human cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 289, 763-768, 2001.
- 3) Van Cromphaut, S. J., Dewerchin, M., Hoenderop, J. G. J., Stockmans, I., Van Herck, E., Kato, S., Bindels, R. J. M., Collen, D., Carmeliet, P., Bouillon, R., Carmeliet, G.: Doudenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13324-13329, 2001.
- 4) Kallay, E., Pietschmann, P., Toyokuni, S., Bajna, E., Hahn, P., Mazzucco, K., Bieglmayer, C., Kato, S., Cross, H. S.: Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis*, 22, 1429-1435, 2001.
- 5) Yagishita, N., Yoshizawa, T., Yamamoto, Y., Sekine, K., Uematsu, Y., Murayama, H., Nagai, Y.,

Krezel, W., Chambon, P., Matsumoto, T., Kato, S.: Aberrant growth plate development in VDR/RXR $\gamma$  double-null mutant mice. *Endocrinology*, 142, 5332-5341, 2001.

- 6) Yamamoto, Y., Wada, O., Suzawa, M., Yogiashi, Y., Yano, T., Kato, S., Yanagisawa, J.: A tamoxifen responsive estrogen receptor alpha mutant D351Y shows reduced tamoxifen-dependent interaction with corepressor complexes. *J. Biol. Chem.*, 276, 42684-42691, 2001.
- 7) Yahata, T., Shao, W., Endoh, H., Hur, J., Coser, K. R., Sun, H., Ueda, Y., Kato, S., Isselbacher, K. J., Brown, M., Shioda, T.: Selective coactivation of estrogen-dependent transcription by CITED1 CBP/p300-binding protein. *Genes Dev.*, 15, 2598-2612, 2001
- 8) Kitanaka, S., Takeyama, K., Murayama, A., Kato, S.: The molecular basis of vitamin D-dependent rickets type I. *Endocrine J.*, 48, 427-432, 2001.
- 9) Inui, N., Murayama, A., Sasaki, S., Suda, T., Chida, K., Kato, S., Nakamura, H.: Correlation between 25-hydroxyvitamin D3 1 $\alpha$ -hydroxylase gene expression in alveolar macrophages and the activity of sarcoidosis. *Am. J. Med.*, 110, 687-693, 2001.
- 10) Watanabe, M., Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Takeyama, K., Arao, Y., Suzawa, M., Kobayashi, Y., Ogawa, S., Yano, T., Yoshikawa, H., Masuhiro, Y., Kato, S.: A subfamily of RNA binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor  $\alpha$  coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. *EMBO J.*, 20, 134-1352, 2001.
- 11) Masuyama, R., Nakaya, Y., Tanaka, S., Tsurukami, H., Nakamura, T., Watanabe, S., Yoshizawa, T., Kato, S., Suzuki, K.: Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology*, 142, 494-497, 2001.
- 12) Sasagawa, S., Kato, S.: A nuclear receptor screening method using a steroid receptor coactivator-1 fragment in a yeast two-hybrid system. *Anal. Biochem.*, 289, 295-297, 2001.
- 13) Kato, S.: Estrogen receptor-mediated cross-talk with growth factor signaling pathways. *Breast Cancer*, 8, 3-9, 2001.

# SNPデータベースを用いたステロイドホルモン関連遺伝子多型の検索

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発達医学講座)

ステロイドホルモン感受性と関連が予想される遺伝子多型について、日本人のSNPデータベース (JSNP)を用いて解析を行った。SNPはグルココルチコイド受容体遺伝子上には3ヶ所 (JST006606, 032069, 057143)、CYP3A4遺伝子上には2ヶ所 (JST014730, 089336)で、11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 遺伝子上には認めない。我々の検討ではJST6606多型はT/T93.3%、T/C6.7%、C/C0%であった。ステロイド投与患者での検討ではT/C型がT/T型に比べて、骨塩量の低下が軽度である傾向が見られた。

## A. 研究目的

ステロイドホルモン薬は各種の膠原病や腎疾患、悪性腫瘍の治療あるいは移植後の免疫抑制などに幅広く使用されている。一方、その副作用も全身におよぶが、骨に対しては骨粗鬆症や大腿骨頭壊死を起こす。このような作用あるいは副作用の出現の程度には個人差が存在することから、ステロイドホルモン薬 (グルココルチコイド) の反応性の差異に遺伝的因子が関与している可能性が示唆されてきたがその詳細は不明であった。

体内に吸収されたグルココルチコイドは血流により運ばれ、一部は肝臓で主にCYP3A4により代謝され、一部は標的細胞に至る。標的細胞内では11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type2 (11 $\beta$ -HSD 2) で一部は不活性化され、残りはグルココルチコイド受容体 (GR) と結合し核内に入った後、標的遺伝子と結合しその作用を発現する。

我々は本班研究において過去2年間、GR遺伝子や11-HSD2遺伝子の多型とグルココルチコイドの反応性との関連について主に欧米において報告されている遺伝子情報に基づいて検討してきた。しかしながら、遺伝子多型には人種差が存在するため、白人あるいは黒人を中心とする欧米での検討結果は日本人患者に適用しにくいことが多い。今回我々は、日本人での遺伝子多型 (SNP) データベースに基づいてステロイドホルモン関連遺伝子について健常人およびステロイド骨粗鬆症患者で検討を行った。

## B. 研究方法

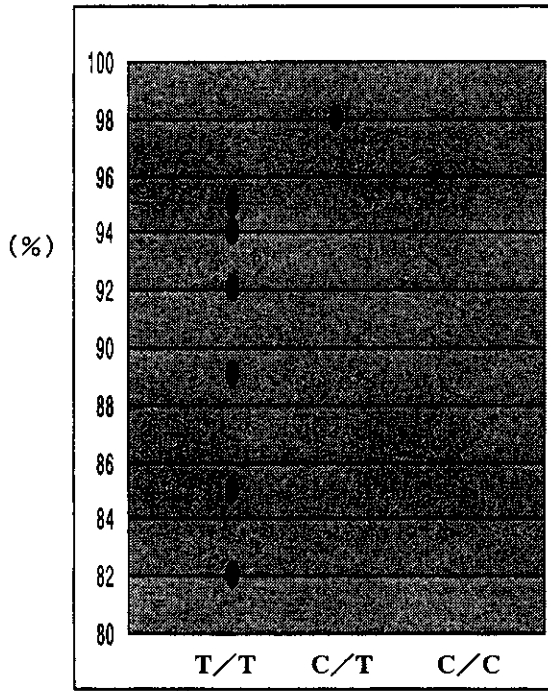
GR遺伝子、11 $\beta$ -HSD 2 遺伝子およびCYP3A4遺伝子の日本人におけるSNP情報について、東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターと科学事業振興事業団の共同プロジェクトであるJSNPのデータベースを検索した。得られた情報に基づき、各々のSNP部位を含むPCRプライマーを設定し、ゲノムDNAを増幅後ダイレクトシーケンシング法によりSNPの有無について検討した。対象として、健常日本人50名および文書による同意の得られたステロイド投与患者7名を用いた。全員、ステロイド投与前および投与開始後1-2ヶ月ごとに骨塩量を系統的に測定している。なお、患者の遺伝子解析については大阪大学医学部付属病院倫理委員会の承認を得て行われた。

JSNPに登録されている遺伝子多型は、GR遺伝子上にはSNPは3ヶ所 (JST006606, 032069, 057143)、CYP3A4遺伝子上にはSNPは2ヶ所 (JST014730, 089336)で、11 $\beta$ -HSD2遺伝子上には認めなかった。このうち、今回はGR遺伝子上の3ヶ所について検討した。

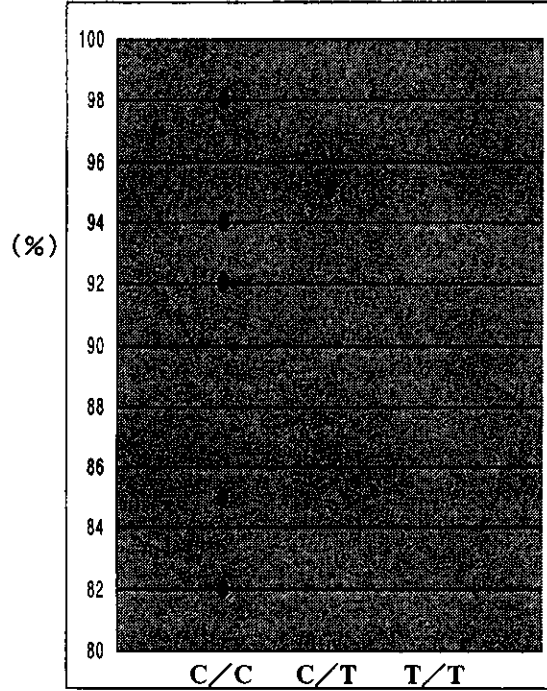
## C. 研究結果

我々の検討では健常日本人での分布は、JST006606はT/T 93.3%、C/T 6.7%、C/C 0%、JST032069はT/T 7.7%、C/T 17.9%、C/C 74.4%、JST057143はT/T 0%、C/T 0%、C/C 100%であった。

骨塩量減少率と GR 遺伝子多型



JST006606



JST 032069

ステロイド投与患者での骨塩量の最大低下率（投与開始前の測定値に対する％）を各多型別に比較した結果を図に表わす。JST006606ではC/Tを有する患者で低下率が小さかった。JST032069では特定の傾向は認めなかった。また、JST057143の多型は患者群でも見られなかった。

D. 考察

従来、遺伝子多型と疾患あるいは薬物の反応性の検討は欧米での結果に基づくものが多く、遺伝子多型人種差が大きいことから日本人での検討が困難なことが多かった。ステロイドホルモン感受性に関与する遺伝的素因の検討でも同様の問題点があり、いくつかの候補遺伝子における日本人での多型の検討から必要であった。今回、日本人でのSNPデータベースを用いることで、いくつかのポイントに絞っての検討が可能となった。GR遺伝子上にはSNPは3ヶ所（JST006606, 032069, 057143）のSNPが登録されているが、我々の検討ではJST057143は認めなかった。従ってこの多型の頻度は非常に少ないものと考えられる。一方、JST006606と 032069では前者がエクソン上の非翻訳領域、後者がイントロン上に存在するため、後者の発現頻度が高かった。また、昨年度の本研究での結果でも日本人では11β-HSD 2 遺伝

子のエクソンおよびイントロンにはSNPは認めなかったが、データベースでも登録されていない。今後はプロモーター領域を含めた検討が必要であると思われる。

骨塩量を投与前から系時的に検討し得たステロイド投与患者での検討では、JST006606でC/Tを有する患者で骨塩量の低下率が小さかった。一方、JST032069では特定の傾向は認めなかった。しかしながら、両者とも検討した症例数が非常に少ないため、現段階では、明確な結論は導けるものではない。今後、検討症例を増やすと共に、今回確認できたGR遺伝子-SNPとステロイド投与患者での大腿骨頭壊死発症の関連について検討する必要がある。さらに、CYP 3 A 4 遺伝子の2種類のSNPについても検討する予定である。

E. 結論

日本人のSNPデータベースを用いて、ステロイドホルモン感受性に関与すると思われる遺伝子のうち、今回はGR遺伝子多型について検討した。ステロイド投与患者での検討では、JST006606でC/T多型を有する患者で骨塩量の低下が軽度であった。今後は症例数を増やすとともに、他の関連遺伝子の検討も進め、最終目標としてステロイド投与患者での

大腿骨頭壊死発症に関与する遺伝的素因について解明したい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) A novel activating mutation (C129S) in the calcium-sensing receptor gene in a Japanese family with autosomal dominant hypocalcemia. H. Hirai, S. Nakajima, A. Miyauchi, K. Nishimura, N. Shimizu, M. Shima, T. Michigami, K. Ozono, S. Okada  
Journal of Human Genetics, 46: 41-44, 2001
- 2) A patient with Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome who developed hyperkalemia in the recovery period. A. Honda, M. Shima, H. Hirai, N. Shimizu, K. Nakamura, S. Nakajima, T. Nagai, T. Yamamoto, S. Okada  
Clinical and Experimental Nephrology, 5: 44-46, 2001
- 3) Isolation of baculovirus-expressed human vitamin D receptor: DNA responsive element interactions and phosphorylation of the purified receptor. P.W. Jurutka, P. N. MacDonald, S. Nakajima, J.C. Hsieh, P. D. Thompson, G.K. Whitfield, M. A. Galligan, C. A. Haussler, M.R. Haussler. Journal of Cellular Biochemistry, in press
- 4) Development of hyperthyroidism in a patient with idiopathic nephrotic syndrome. T. Kubota, H. Hirai, N. Shimizu, A. Sawada, H. Kondou, S. Nakajima, T. Harada, M. Shima. Pediatric Nephrology, in press
- 5) 薬物療法と骨代謝異常 中島滋郎 小児内科、33(2): 233-237, 2001
- 6) Fanconi症候群 中島滋郎 腎と透析、50(6): 853-856, 2001
- 7) 生直後に発症したCaffey病の臨床経過 島 雅昭、西村久美、平井治彦、志水信彦、中島滋郎、岡田伸太郎、安井夏生 第18回小児代謝性骨疾患研究会報告書、7-10, 2001
- 8) 低カルシウム血症を主所見とした乳児早期のビタミンD欠乏症—母親のビタミンD欠乏の関与— 島 雅昭、平井治彦、志水信彦、中島滋郎、西村久美、小林めぐみ、田川哲三、田中能久、安部治郎、岡田伸太郎 日本小児科学会雑誌、105(9): 964-869, 2001
- 9) ステロイドホルモン感受性に関与する遺伝子

多型の検討

中島滋郎、田村京子、平井治彦、山藤陽子、島 雅昭

ホルモンと臨床、49 (増刊号): 87-89, 2001

### 2. 学会発表

- 1) 第9回 代謝性骨疾患研究会 2001年3月17日(土) 於:千里 新生児ビタミンD欠乏症と母体ビタミンD代謝の関係 中島滋郎、島 雅昭
- 2) 第46回 関西カルシウム懇話会 2001年4月7日(土) 於:大阪 低カルシウム血症を主所見とした乳児早期のビタミンD欠乏症 島 雅昭、平井治彦、志水信彦、中島滋郎、田中能久、阿部治郎、小林めぐみ、田川哲三
- 3) 第2回 DNAチップ技術研究会 2001年6月16日(土) 於:京都 腎移植後大腿骨頭壊死症のDNAチップを用いた遺伝子解析—チトクロームP450を対象にして— 浅野武志、高橋謙治、藤岡幹浩、上島圭一郎、久保俊一、里見佳子、西野輔翼、吉村了勇、吉川敏一、高岡邦夫、中島滋郎、田中 隆、廣田良夫
- 4) 第19回 日本骨代謝学会 2001年8月8日(水)~11日(土) 於:名古屋 ステロイドホルモン感受性に関与する遺伝子多型の検討 中島滋郎、田村京子、平井治彦、島 雅昭
- 5) 妊婦ビタミンD欠乏における妊娠後期長期入院の果たす役割—新生児ビタミンD欠乏との関連— 島 雅昭、平井治彦、松本小百合、中島滋郎
- 6) 第3回 日本骨粗鬆症学会 2001年9月13日(木)~15日(土) 於:大阪 ステロイド骨粗鬆症におけるステロイドホルモン感受性に関与する遺伝子多型の検討 中島滋郎、田村京子、平井治彦、島 雅昭
- 7) 第19回 小児代謝性骨疾患研究会 2001年12月8日(土) 於:東京 ステロイド骨粗鬆症重症例におけるビスホスホネート治療 中長摩利子、山藤陽子、平井治彦、志水信彦、松本小百合、中島滋郎、島 雅昭

# 特発性大腿骨頭壊死症におけるグルココルチコイド受容体の 遺伝子多型性解析

高岡 邦夫、堀内 博志、五明 広樹、若林 真司  
斎藤 直人、小林 千益、縄田 昌司、四本 直樹

(信州大学医学部整形外科)

谷口俊一郎 (信州大学医学部加齢適応センター環境適応分野)

中島 滋郎 (大阪大学大学院医学系小児科)

橋本 博史、津田 裕士、深沢 徹

(順天堂大学医学部膠原病内科)

特発性大腿骨頭壊死症発生の素因としてhuman glucocorticoid receptor (HGR) の遺伝子多型性の関与を検討している。制限酵素Bcl Iで規定されるRFLP (restriction fragment length polymorphism,制限酵素断片長多型) について検討を開始した。日本人健常人とステロイド性骨壊死症例との間に多型の存在頻度は差がなかった。それゆえステロイド性骨壊死発生の素因にこの部分の多型性が関与している可能性は低いと考えた。また、本症に関連する未知のHGRのmutationを検索するために、ステロイド性骨壊死症例においてHGRのExon部分のdirect sequenceを行っている。

## A. 研究目的

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。我々は主としてステロイド剤がHuman glucocorticoid receptor (HGR) を介して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HGRの polymorphism が存在するのではないかと考えた。HGRにはいくつかの polymorphism が存在することが報告されている<sup>1)</sup>。そのうちのひとつにステロイド剤の感受性と関連性があるとされているExon 2の codon 363の point mutationがある<sup>2)</sup>。既に報告した通り、我々は日本人においてはこの point mutationの頻度が低いことを見出し、この部分の mutationが骨壊死に関与している可能性がないことを明らかにした。

今年度は、ステロイドでの皮膚の血管収縮やリンパ球の反応に関連性があるとの報告がある、制限酵素Bcl Iで規定される polymorphism<sup>3)</sup> について検討した。さらに、未知のHGRの mutationが特発性大腿骨頭壊死症症例で存在するのか検討するため、ステロイド性骨壊死症例においてHGRのExon部分の sequenceを調べる研究を行っている。

## B. 研究方法

研究1 (制限酵素Bcl IによるRFLP)

対象の末梢血から白血球を分離しgenom DNAを抽出した。10 $\mu$ gのDNAを制限酵素Bcl Iで切断した後、standard technique を用いsouthern blotを行った。probeはhGRの全てのcording lesionを含む約2.4kbのhGR cDNAを用いた。

研究2 (HGRのExon部分におけるmutationの検索)

Exon 2は、一部overlapする部分を持つ5つの部分に分けてprimerを設定した。Exon 3からExon8およびExon9 $\alpha$ はintron部分にprimerを設定した。noncoding lesionであるExon1とExon9 $\beta$ は検索しないこととした。それぞれの範囲でPCR条件を設定した。SequenceはABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) を用い決定した。

本研究に際しては、信州大学医学部医倫理委員会および順天堂大学医倫理委員会の承認を受けた。また、研究協力者 (骨壊死症例および健常者) にはinformed consentを行って承諾を得た。



### C. 研究結果

#### 研究 1

HGR cDNAを用いてhybridizationすると、Bcl IによるRFLPとしてA:4.5kb,a:2.8kbのバンドが確認された(図1)。現在までに健常者40例、特発性大腿骨頭壊死症症例25例(ステロイド性:21例、アルコール性:3例、狭義の特発性:1例)について解析を行っている。alleleの頻度は表の如くであり、健常人とステロイド性骨壊死症例の間でallele頻度はほぼ同程度である。

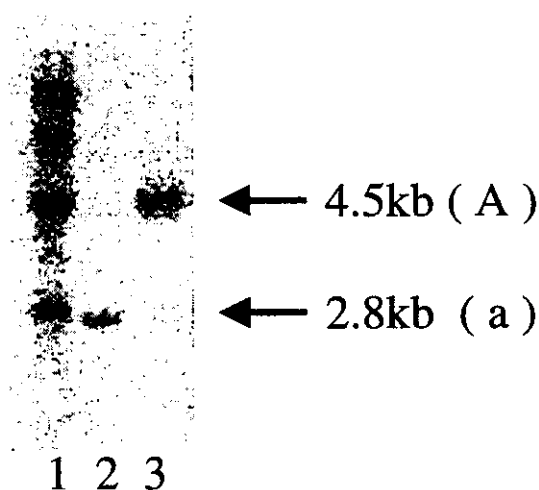


図1: Bcl Iで規定されるHRGのRFLP (サザンプロット法)

HGR cDNAを用いてhybridizationすると、Bcl IによるRFLPとしてA:4.5kb,a:2.8kbのバンドが確認された。1:Aa, 2:aa, 3:AAと判定した。

#### 研究 2

現在まで、Exon 4以外の部分はprimer及びPCR条件の設定ができ、sequenceを確認している(図2)。現在、ステロイド性骨壊死症症例でのスクリーニングを開始しているが新たな点変異は確認されていない。

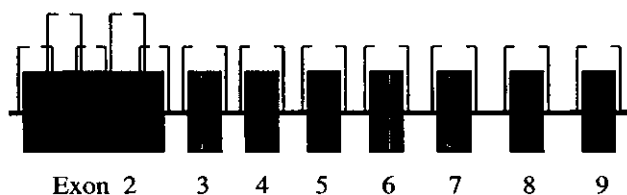


図2: HGRのExonをsequenceするために、intron部分にprimerを設定した。Exon 2は5つに分割してprimerを設定した。

表: 制限酵素Bcl Iにより規定されたallele別の頻度: 症例数 (%)

	AA	Aa	aa
健常者(非骨壊死)	1 (2.5%)	19 (47.5%)	20 (50%)
ステロイド性骨壊死	1 (4.7%)	9 (42.9%)	11 (52.4%)

### D. 考察

特発性大腿骨頭壊死症は、未だ病態が不明な疾患のひとつである。長年の疫学的研究からステロイド剤やアルコール多飲が本症を誘発することが広く認められている。しかし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く、骨壊死発生には何かしらの素因の存在が示唆される。様々な観点からこの素因について検討されてきたが、現在まで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、human glucocorticoid receptor (HGR)<sup>4)</sup>に着目し研究している。

昨年度まで我々はglucocorticoidのhypersensitivityを誘導する可能性のあるHGR codon 363のpoint mutationについて検討した。その結果、日本人ではこの部分のmutationの存在頻度が低いことが明らかになり、本症への関与もないと報告した。さらに、本年度は制限酵素Bcl Iで規定されるpolymorphism<sup>3)</sup>について検討を進め症例を増やした。我々の検討でこの部分のpolymorphismは、日本人において一定頻度存在することが明らかになった。しかし、ステロイド高感受性とされるalleleの存在頻度はステロイド性骨壊死症例でも少なく(4.7%)、この部分の日本人健常人でのallele頻度とステロイド性骨壊死症例でのallele頻度はほぼ同程度であった。従って、この部分の遺伝子多型性が骨壊死発生に関係している可能性は低いと考えた。グルココルチコイドに対する高感受性を起こすとされるHGRの遺伝子多型性がステロイド性骨壊死発生の素因となっている可能性は低いことが、今回の検討から明らかになった。

そこで特発性大腿骨頭壊死症に特異的な新たなHGRの点変異の存在を探る目的で、HGRのExon部分のsequenceを行っている。現在までの検討では新たな点変異は存在していない。今後、promoter領域の解析も行いHGRの骨壊死発生への関与を検討する予定である。

**E.**

- 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) M. Holloway CD. Fraser R. Connell JM. Ingram MC. Anderson NH. Kenyon CJ. **Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction, and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 83:1846-52, 1998 .
- 4) Hollenberg S. et al. **Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA.** *Nature.* 1985 ; 318 : 635-641

## 特発性大腿骨頭壊死症の遺伝子解析 —CYP450を対象にして—

久保 俊一、浅野 武志、高橋 謙治、藤岡 幹浩  
上島圭一郎、井上 重洋、柴谷 匡彦、中村 文紀  
小嶋 晃義、末原 洋（京都府立医科大学整形外科学教室）  
里見 佳子、西野 輔翼（京都府立医科大学学生化学教）  
高岡 邦夫（信州大学整形外科）  
中島 滋郎（大阪大学大学院医学系小児科）  
田中 隆、廣田 良夫（大阪市立大学公衆衛生）

本研究班で現在までに大腿骨頭壊死症（以下ION）について、MRIを用いた研究により、以下の事実が明らかになった。つまりIONは、ステロイド投与後、きわめて早期に発生している。また、ステロイドを継続していても、壊死領域が拡大する事はなく、再発もほとんど認められない。以上の事実より基礎疾患治療開始前よりIONのリスク患者を同定することがION発生の予防を考える上で重要である。一方、ステロイド代謝酵素であるCYP450には酵素活性に影響を与える一塩基多型（以下SNP）が存在することが近年明らかになりつつある。われわれはステロイド代謝酵素であるCYP450のSNPが原因でステロイドが体内に蓄積し、その結果合併症としてIONが発生するのではないかと考えた。そこでCYP450のSNPをタイピングの指標として基礎疾患治療開始前のリスク患者の同定に使用できるかどうかを検討した。SNPを短時間で再現性よく大量に解析可能な技術として近年DNA Chipが注目されている。今回Affymetrix社製Gene Chipを用い、CYP450の代表的な分子種であるCYP2D6およびCYP2C19遺伝子のSNP解析を行った。その結果CYP2D6\*2ホモ接合体でIONリスクが10倍の上昇傾向を示した。CYP2D6の遺伝子型決定により、基礎疾患治療前から、末梢血を少量採取することにより、IONリスク患者の同定ができる可能性がある。さらにIONの発生には様々な環境因子とともに、多数の遺伝因子が関与していると考えられる。今後、同様の手法でステロイド代謝に関与する遺伝子群のSNPを解析する。そして危険因子となるSNP情報を集積し、その結果を基に臨床の場でリスク患者のスクリーニングを目指す。それにより基礎疾患治療の際のステロイド量の個人レベルでの調節が可能になり、ION発生子防につながると思われる。

### A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死（以下ION）は大腿骨頭の無菌性、阻血性壊死をきたす疾患である。大腿骨頭圧潰が生じると股関節機能が著しく低下し、ADLは障害される。通常、進行性の経過をとり、骨切り術、人工関節置換術が必要となることが多い。青壮年期に発生頻度が高く、発生機序については完全に解明されていないが、ステロイド投与、アルコール多飲歴、喫煙歴、脂質代謝異常などの関与が示唆されている<sup>1)2)</sup>。なかでもステロイド投与に関連して発生

するステロイド性IONの占める割合が高い。ステロイドが治療に大量に用いられる疾患としては、膠原病、ネフローゼ症候群、臓器移植などがあり、近年これらの疾患に対する治療機会は増していることから、今後もステロイド性IONの発生は増加していくと考えられる。同一プロトコールで治療されたのにもかかわらず、ステロイドによるION発生を見る症例と見ない症例があることは、ステロイド感受性の個体差が存在していることを示唆している<sup>3)</sup>。薬剤反応性の個体差が生じる原因として、ステロイド代

謝酵素の遺伝子多型、ステロイド受容体遺伝子多型、シグナル伝達に関与する諸因子の遺伝子多型などが考えられる。近年、遺伝子多型のなかでもDNA配列上の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism, 以下SNP) が注目されており、種々の疾患との関連性が報告されはじめている<sup>4) 5)</sup>。腎移植患者のION発生例は、非発生例に比してプレドニゾロン半減期が33%延長、クリアランスが33%低下を示したという報告があり<sup>6)</sup>、本研究ではステロイド代謝酵素の遺伝子多型に着目した。チトクロームP450 (CYP450) はステロイドをはじめとするほとんどの脂溶性薬物の代謝過程に関わっており、ヒトの薬物代謝に関係するだけでも50種類以上の分子種が知られている。ステロイドの代謝についてはCYP3A4、CYP2C19、CYP2C9、およびCYP2D6など複数の分子種が関与するとされているが、これらの分子種についてもSNPが存在する。このようなステロイド代謝と関係した分子種の遺伝子多型が、ステロイド代謝の個体差の原因となり、IONの発生にも関与している可能性がある。つまり代謝が遅い遺伝子型では過剰にステロイドが残存し、合併症であるIONが生じやすくなると予想される。本研究では大量、高速にSNPの解析が可能であるGene Chip (Affymetrix社製) を用いて、CYP450のSNPとIONの発生との関連を明らかにすることを目的とする。そしてSNPのタイピングを指標として、個人・遺伝子レベルで基礎疾患に対する適正なステロイド投与量を調節するtailor-made medicineの開発を目指す。tailor-made medicineの開発が成功すれば、侵襲の大きな外科的治療も避けられ、増大する医療費削減にも貢献し、生産年齢層の社会的損失も減少すると考えられる。

## B. 研究方法

本学移植内分泌外科において1981年から2000年に腎移植を施行された71例 (ION発生群21例, ION非発生群50例) を対象とした。IONの発生の診断は1986年大腿骨頭壊死症診断基準に従った<sup>7)</sup>。患者の末梢血より、ゲノムDNAをDNeasy (tm) Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Germany) を用いて採取し、GeneChip CYP450 assay (Affymetrix Inc, CA., USA) を手順に従って用い、解析した。GeneChip CYP450 assay ではCYP450の中でSNPと代謝活性の関連が報告されている分子種であるCYP2D6およびCYP2C19のSNP解析が可能である。これにより同定できる対

立遺伝子 (アレル) はCYP2D6に関して\*1, \*2, \*3, \*4A, \*4B, \*4C, \*4D, \*4E, \*5, \*6A, \*6B, \*7, \*8, \*9, \*10A, \*10B, \*11, CYP2C19に関して\*1, \*2, \*3である。おのおのの患者の表現型は、それぞれのアレルの代謝活性に関する報告に従い<sup>8) 9) 10)</sup> 以下のように分類した。CYP2D6に関して、CYP2D6\*1あるいは\*2を両アレルに少なくとも一つ持つ症例をextensive metabolizer (EM)、上記以外で、CYP2D6\*9, \*10A, あるいは\*10Bを両アレルに持つ症例をintermediate metabolizer (IM)、どちらのallelesともCYP2D6\*3, \*4A, \*4B, \*4C, \*4D, \*4E, \*5, \*6A, \*6B, \*7, \*8, あるいは\*11である症例をpoor metabolizer (PM) とした。CYP2C19に関しては、CYP2C19\*1のホモ接合体あるいはヘテロ接合体をEM、\*2あるいは\*3を両アレルに持つ症例をPMとした。以上のSNPの情報のほかに、それぞれの症例に関して、性別、移植時年齢、移植後のステロイドのパルス療法の有無および移植後9週までのステロイド総使用量 (プレドニゾロン換算) に関する情報を収集した。統計解析にはunconditional logistic regression model (SAS software) を用いodds ratio (OR) および、95%信頼区間(CI)を計算した<sup>11)</sup>。性別、移植時年齢、移植後のステロイドのパルス療法の有無および移植後9週までのステロイド総使用量 (プレドニゾロン換算) を変数に組み込んだ多変量解析を施行した。

(倫理面への配慮)

研究に先立ち本学の医学研究審査委員会の承認および患者の承諾を得た。

## C. 研究結果

今回の全症例でのCYP2D6 アレル頻度はCYP-2D6\*1 (40.9%), CYP2D6\*2 (20.4%), CYP2D6\*10B (38.7%)であり、その他のアレルは認めなかった。CYP2C19に関してはCYP2C19\*1(63.4%), CYP2C19\*2 (25.3%), CYP2C19\*3(11.3%)であった。CYP2D6の多型による代謝活性の表現型はEM(81.7%), IM(18.3%), PM(0%)であり、EMとIM間で、ION発生に有意な差を認めなかった (表1)。CYP2C19の多型による代謝活性の表現型はEM(90.2%), PM(9.8%)であり、これもEMとPM間で、ION発生に有意な差を認めなかった (表1)。一方、それぞれのアレルで他の因子を考慮したunconditional logistic regression modelによる検討を行うと、CYP2D6\*2ホモ接合体(CYP2D6\*2/

表 1

## CYP2D6 表現型

	N(%)	N(%)	odds ratio(95%CI)	
	case	reference	Crude	adjusted
EM	16(22.5)	42(59.1)	1	1
IM	5(7.0)	8(11.3)	1.6(0.5-5.8)	1.7(0.4-7.1)

## CYP2C19 表現型

	N(%)	N(%)	odds ratio(95%CI)	
	case	reference	Crude	adjusted
EM	19(26.8)	45(63.4)	1	Not done.
PM	2(2.8)	5(7.0)	0.9(0.2-5.3)	

The model includes SEX,MP,SL,PSL.

表 2

## CYP2D6 \*2/\*2 の ION リスク

	N(%)	N(%)	odds ratio(95%CI)	
	case	reference	Crude	adjusted
*2/*2以外の遺伝子型	18(25.4)	49(69.0)	1	1
*2/*2	3(4.2)	1(1.4)	8.0(0.8-82.0)	10.0(0.8-25.3)

The model includes SEX,MP,SL,PSL.

CYP2D6<sup>\*2</sup>) で他の場合と比較して、IONリスクの上昇傾向があった(OR:10.0, p=0.07) (表 2)。

## D. 考 察

われわれの施設では、現在までに多数の腎移植が施行されてきている。そして、それに伴うIONを数多く経験してきている。腎移植後に発生するIONでは、免疫抑制に用いるステロイドとの関連が明らかにされており、ステロイド性IONの病態を探るにはよい対象である。また、腎移植に伴うIONでは、腎移植を契機として、経過を綿密に追う事ができるため、臨床的にきわめて重要な壊死発生初期の病態を明らかにできる利点がある。一方、1980年代後半に、磁気共鳴画像法(MRI)が臨床的に使用できるようになり、X線学的診断法では確認できなかった時期に、IONの病変が明瞭に描出できることが可能になった。そこで、われわれは1988年から、腎移植後の患者を対象として、本学移植外科において腎移植を施行され、同意を得られた症例に対して、MRIを移

植直後から定期的実施するprospective studyを行ってきた。その結果、以下の事実を明らかにすることができている。

1. IONは、ステロイド投与後12週以内、早い例では2週以内に発生していた。ステロイド投与後、従来から考えられているよりもきわめて早期に発生している事実は、本症が心筋梗塞や脳梗塞のように急性の阻血性変化で成立してくる疾患であると推測される。またIONを予防できる時期はステロイド投与前あるいは投与開始後のごく限られた時間しかないことを示している。
2. ステロイドを継続していても、壊死領域が拡大する事はなく、再発もほとんど認められない。すなわち、ION発生時にステロイド投与の減量・中止を行う必要のないことを示していると同時に、この時期に壊死の拡大予防を目的として施行されている治療法は効果のないことを示唆している<sup>12)</sup>。人工関節の適応が躊躇される青壮年期で、一旦IONの臨床症状が出現すると、骨頭温存が困難な場合や、基礎疾

患が存在する場合には治療にきわめて難渋する。社会的損失も大きい。このような問題点を考えれば、ION発生の予防法の開発が臨床上の大きな課題となってくる。前述したION発生の特徴から考えて、ステロイド投与前から、壊死発生を予測していくためには、患者個人の体質を見極めていく必要がある。

今回、解析に用いたDNA Chipはガラス基盤上に多種類の異なったDNAプローブを整列し固定して、その上で標識DNAのハイブリダイゼーションを行い、プローブ上の蛍光シグナルを検出する技術である<sup>13)</sup>。

DNA Chipを用いることにより、短時間で簡便に多くのSNPの解析が可能である。SNPと疾患の関連性が明らかになると、1) 疾患の病態が分子レベルで詳細に解明される。2) 疾患の原因を標的とした、薬剤開発が可能となる。3) 個々の症例の違いを考慮に入れた薬剤の使い分けなど医療の個別化が可能となる。など、医療・予防医学に多大な貢献をもたらすと考えられている。そしてDNA Chipは遺伝子診断と治療を早く、確実に結びつける最新の技術として注目されている。

Affymetrix社製Gene ChipではCYP450の代表的なisoformであるCYP2D6およびCYP2C19遺伝子の18の既知変異を同時に短時間で解析することが可能である。今回、日本人の腎移植患者71例を対象にCYP2D6およびCYP2C19のSNP解析を施行した。出現したアレルの頻度は文献的に報告されている頻度とほぼ一致した<sup>14) 15)</sup>。今回の71例はCYP2D6およびCYP2C19遺伝子のアレルの頻度に関しては、日本人の典型的な集団であった。

本検討では、代謝活性の分類で、CYP2D6ではPMは出現しなかった。文献的に報告されている日本人でのPM出現率は1%以下であり<sup>5)</sup>、本検討の症例数を考えると妥当と考えられた。また、CYP2C19ではPMの出現率は9.5%であった。この出現率も文献的な報告とほぼ一致した<sup>10)</sup>。性別、移植時年齢、移植後のステロイドのパルス療法の有無および移植後9週までのステロイド総用量を考慮したunconditional logistic regression modelを用いた解析では、CYP2D6、CYP2C19の代謝活性の分類とIONリスクとの関連は認められなかった。遺伝子型ではCYP2C19に関してはIONリスクとの関連は認められなかったが、CYP2D6\*2ホモ接合体で他と比較してIONリスクの上昇傾向をみとめた。(odds ratio:10.0,

p=0.07)

CYP2D6は65種類以上の抗鬱薬、抗不整脈薬、抗精神薬などの臨床重要薬物の代謝に関与する。

一方グルココルチコイドの代謝に関して中心的な役割をはたすのはCYP3A4であるとされているが、ステロイド代謝経路にCYP3A4以外の複数の分子種が関与している可能性を示唆した報告もあり、CYP-2D6が何らかの役割をになっている可能性は十分考えられる<sup>16) 17) 18)</sup>。本検討では症例数は少ないもののCYP2D6\*2ホモ接合体でIONリスクが上昇傾向を示した。CYP2D6\*2のステロイド代謝に関する詳細な報告はなく、本酵素とION発生の病態における関与は現在のところ不明であるが、CYP2D6\*2の報告されている酵素活性として、野生型よりやや活性が減弱するという報告がある<sup>8)</sup>。このような酵素活性の低下によりステロイドが体内に蓄積され、合併症としてのIONを起こす事が考えられる。また、一般的に酵素の中間代謝産物が活性を持つ場合があり、変異が存在する遺伝子により生成された酵素蛋白の不完全な酵素活性(代謝活性化)がION発生に関与している可能性は十分考えられる。今後さらに症例数をふやし、ION発生とCYP2D6\*2ホモ接合体との関連を追求する。

IONの発生には様々な環境因子とともに、多数の遺伝因子が関与していると考えられる。本研究ではCYP2D6\*2ホモ接合体の遺伝子型がION発生の危険因子の一つである可能性が示された。今後、同様の手法でステロイド代謝に関与する遺伝子群、具体的には、CYP450の中でもグルココルチコイド代謝に中心的な役割をはたすCYP3A4関連遺伝子、グルココルチコイドレセプター遺伝子などの遺伝子群を解析する。そして危険因子となるSNP情報を集積し、その結果を基に臨床の場でリスク患者のスクリーニングを目指す。それにより基礎疾患治療の際のステロイド量の個人レベルでの調節が可能になり、ION発生予防につながると思われる。

## E. 結論

本研究でCYP2D6\*2ホモ接合体の遺伝子型がION発生の危険因子の一つである可能性が示された。今後、さらに危険因子となるSNP情報を集積し、その結果を基に臨床の場でリスク患者のスクリーニングを目指す。それにより基礎疾患治療の際のステロイド量の個人レベルでの調節が可能になり、ION発生

予防につながると考える。

## F. 研究発表

### 学会発表

- 1) 浅野武志、高橋謙治、藤岡幹浩、上島圭一郎、久保俊一、里見佳子、西野輔翼、吉村了勇、吉川敏一、高岡邦夫、中島滋郎、田中 隆、廣田良夫：腎移植後大腿骨頭壊死症のDNAチップを用いた遺伝子解析—チトクロームP450を対象にして—。第2回DNAチップ技術検討会、京都、2001.6.16.
- 2) 浅野武志、高橋謙治、藤岡幹浩、上島圭一郎、久保俊一、平澤泰介、里見佳子、西野輔翼：腎移植後大腿骨頭壊死症のDNAチップを用いた遺伝子解析—チトクロームP450を対象にして—。第16回日本整形外科学会基礎学術集会、広島、2001.10.18. (パネルディスカッション)
- 3) 浅野武志、高橋謙治、藤岡幹浩、上島圭一郎、城守国斗、山添勝一、大塚悟朗、志賀俊樹、清水長司、中西源和、久保俊一、田中 隆、廣田良夫：腎移植後大腿骨頭壊死症のDNAチップを用いた遺伝子解析—チトクロームP450を対象にして—。第28回日本股関節学会、埼玉、2001.11.8.

### 参考文献

1. Cruess RL. Osteonecrosis of bone: current concepts as to etiology and pathogenesis. Clin Orthop 1986;208:30-9.
2. Hirota Y, Hirohata T, Fukuda K, Mori M, Yanagawa H, Ohno Y, Sugioka Y. Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. Am J Epidemiol 1993;137:530-8.
3. Kubo T, Fujioka M, Yamazoe S, Yoshimura N, Oka T, Ushijima Y, Hasegawa Y, Hirasawa Y. Relationship between steroid dosage and osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation on magnetic resonance imaging. Transplant Proc 1998;30:3039-40.
4. Mamiya K, Ieiri I, Miyahara S, Imai J, Furuumi H, Fukumaki Y, Ninomiya H, Tashiro N, Yamada H, Higuti S: Association of polymorphisms in the cytochrome P450(CYP)2C19 and CYP2C18 genes in Japanese epileptic patients. Pharmacogenetics .1998;8:87-90.
5. Chida M. Genetic polymorphism of CYP2D6 in the Japanese population. Pharmacogenetics. 1999;9:601-5.
6. Lausten G.S. et al., Metabolism of prednisolone in kidney transplanted patients with necrosis of the femoral head. Pharmacology and Toxicology 1993;72:78-83.
7. Ono K. Diagnostic criteria, typing, and staging of avascular necrosis of the femoral head. In: Ono K, ed. Annual report of the Idiopathic Avascular Necrosis of the Femoral Head Research Committee. (In Japanese). Tokyo: Ministry of Health and Welfare of Japan, 1986:330-6.
8. Daly AK. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. Pharmacogenetics 1996;6:193-201.
9. Johansson I, Oscarson M, Yue QY, Bertilsson L, Sjoqvist F, Ingelman-Sundberg M. Genetic analysis of the Chinese cytochrome P4502 D locus : characterization of variant CYP2D6 genes present in subjects with diminished capacity for debrisoquine hydroxylation. Mol Pharmacol. 1994;46:452-459.
10. De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Meyer UA, Nakamura K, Goldstein JA. Identification of a new genetic defect responsible for the polymorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese. Mol Pharmacol. 1994;46:594-8.
11. Harrell FE Jr. The LOGIST procedure. In: Joyner SP (ed), SUGI supplemental library user's guide. Cary, North Carolina: SAS Institute, 1983: 181-202.
12. Kubo T, S. Yamazoe, N. Sugano, M. Fujioka, S. Naruse, N. Yoshimura, T. Oka, Y. Hirasawa: Initial MRI findings of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head in renal allograft recipients. Magn Reson Imaging, 15: 1017-23, 1997.
13. Pease AC et al. Light generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proc Natl Acad Sci. 1994;91:5022-5026.
14. T. Kubota, Y. Yamamura, N. Ohkawa, H. Hara, K. Chiba. Frequencies of CYP2D6 mutant alleles in a normal Japanese population and metabolic activity of dextromethorphan O-demethylation in different CYP2D6 genotypes. Br J Clin Pharmacol. 2000

:50;31- 34.

15. Nisida Y, Fukuda T, Yamamoto I, Azuma J. CYP2D6 genotypes in a Japanese population: low frequencies of CYP2D6 gene duplication but high frequency of CYP2D6\*10. *Pharmacogenetics*. 2000;10:567-70.
16. Stuesser D M, Kupfer D. Prosubstrates of CYP3A4, the major human hepatic cytochrome P450: transformation into substrates by other P450 isoforms. *Biochem Pharmacol*. 1998;1:1861-71.
17. Yamazaki H, Shimada T. Progesterone and testosterone hydroxylation by cytochromes P450 2C19, 2C9, and 3A4 in human liver microsomes. *Arch Biochem Biophys*. 1997;346:161-9.
18. Gentile DM, Tomlinson ES, Maggs JL, Park BK, Back DJ. Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;277:105-112.



## E) 臟器移植

# 臓器移植での特発性大腿骨頭壊死症の 発症頻度と危険因子に関する研究

腎移植におけるタクロリウムスの薬物動態と大腿骨頭壊死症

久保 俊一、上島圭一郎、藤岡 幹浩、浅野 武志  
柴谷 匡彦、濱口 裕之 (京都府立医科大学整形外科)  
岡本 雅彦、吉村 了勇 (京都府立医科大学移植内分泌外科)  
杉岡 信彦、国府 孝敏、西田 克次 (京都府立医科大学薬剤部)

薬剤投与と副作用、合併症の発現には、薬物代謝酵素の遺伝子多型による感受性や薬物代謝の個人差が関与している可能性がある。タクロリウムスは投与後の血中濃度（トラフ値）により投与量を決定する薬剤であるため、その薬物動態を調べることが、個人の薬物代謝の指標になりうる。壊死発生群では、薬剤半減期の移植前後での延長率が非壊死群に対して大きく、移植後3カ月以降6カ月までの間では血中濃度が非壊死発生群と比較し高くなる傾向がみられた。このことから薬物動態の差が、薬剤血中濃度の上昇を招き、骨壊死発生に関与する可能性が示唆された。

タクロリウムスおよびステロイドの主な代謝酵素はともにCYP3A4と考えられており、タクロリウムスの代謝が低い症例は同様に、ステロイド代謝が低く薬剤の血中濃度が上昇し副作用が発現することが推察できる。現在のところ、免疫抑制剤としてのステロイドの使用は不可欠な状況であり、壊死発生の機序も解明されていない。ステロイドの骨壊死発生機序の解明と平行して本研究を進めることで、ステロイド代謝能の低い症例には投与量を減量し骨壊死発生の危険性をなくすための個人に応じたtaylor made medicineの開発につながると考える。

## A. 研究目的

臓器移植法の成立に伴い、本邦では平成11年に脳死移植が再開された。今後は種々の臓器移植が日常の医療として定着していくものと考えられ、従来から行われている腎移植や骨髄移植に加えて、肝移植や心臓移植なども増加することが予想される。

臓器移植に際しては一般にステロイドを含めた免疫抑制剤の投与が行われることが多い。腎移植において、ステロイドの投与を誘因として特発性大腿骨頭壊死症（idiopathic osteonecrosis of femoral head, 以下ION）が発生することはよく知られている。腎移植と同様に他の臓器移植にもIONが合併する可能性が危惧され、臓器移植患者のQOLを考えるうえではその予防法や治療法の確立が重要である。

腎移植後の大腿骨頭壊死症の発生に、薬剤に対する感受性や薬物代謝の個人差が影響している可能性

が考えられる。われわれは、ステロイドの代謝酵素（チトクロームCYP450）の遺伝子多型（SNP）の解析を進めていく一方で、腎移植症例の薬物動態の個人差に注目した。腎移植の際にステロイドはどの症例でもプロトコールに従い一定量を投与されているのに対し、併用免疫抑制剤であるタクロリウムスは個々の血中濃度（トラフ値）により投与量を決定していく。このことからタクロリウムスの薬物動態の個人差と骨頭壊死発生との関連を調べた。

## B. 研究方法

1996年5月から2000年5月までに京都府立医科大学移植・内分泌外科において施行した腎移植症例中、移植前後のタクロリウムスの血中動態を測定し、かつ術後6カ月以上の時点でMRI T1強調画像による骨壊死発生の判定がおこなえた症例28例（男性19

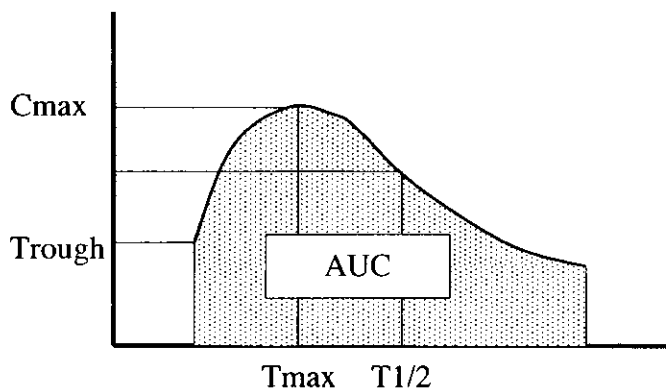


Fig 1. Pharmacokinetic Parameters

例、女性 9 例) を対象とした。年齢は 17 歳から 63 歳、平均 35.4 歳であった。ION 発生例は 7 例 (男性 6 例、女性 1 例)、ION 非発生例は 21 例 (男性 13 例、女性 8 例) であった。

移植前、移植後 6 カ月までのタクロリムスの投与量、血中濃度の変化、および薬物動態の指標として移植前、移植後 3 週でのタクロリウムス投与後 9 時間までの AUC、Cmax (血中最高濃度)、Tmax、T1/2 (半減期) (Fig.1) を測定した。ION の有無は、移植後 6 カ月以上の経過時点で、MRI の T1 強調画像の冠状断を用いて band 像の有無で判定した。

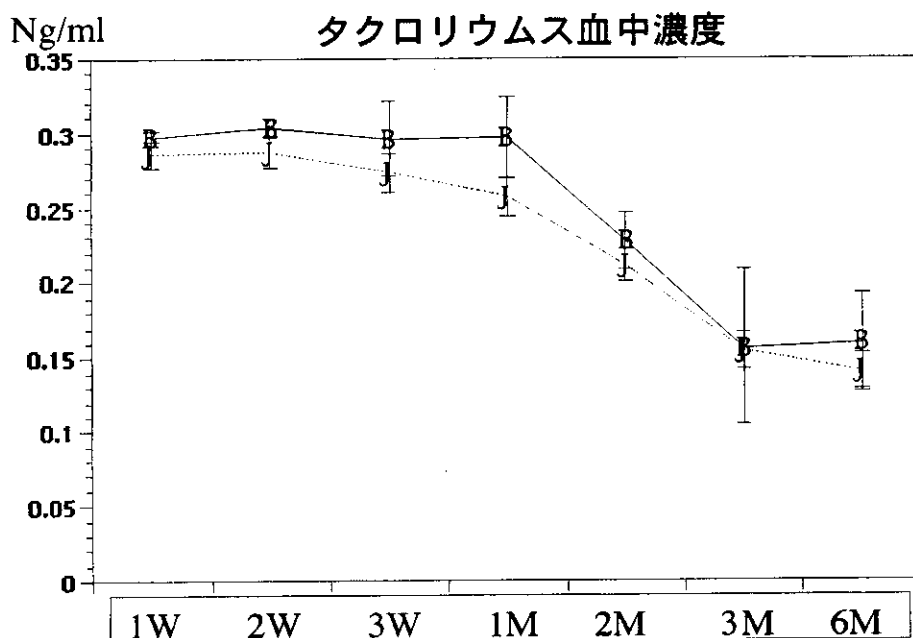
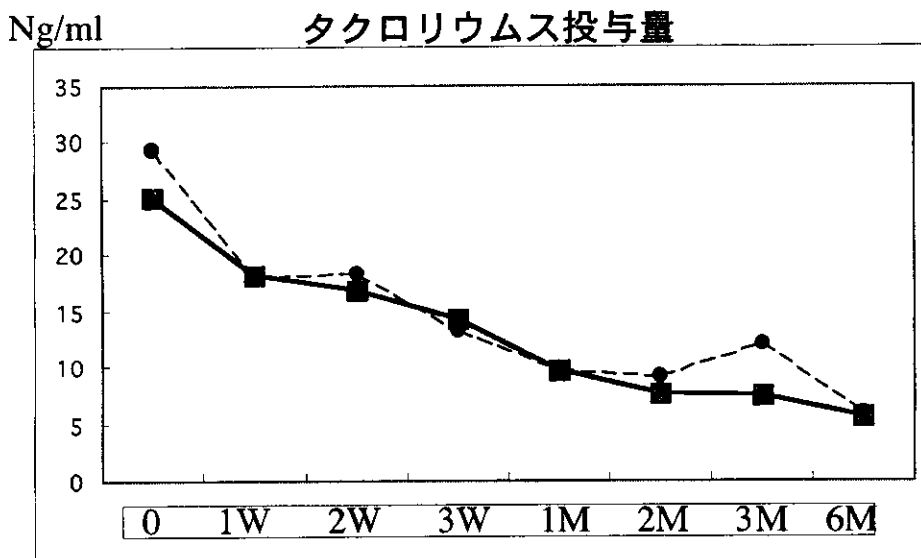


Fig 2

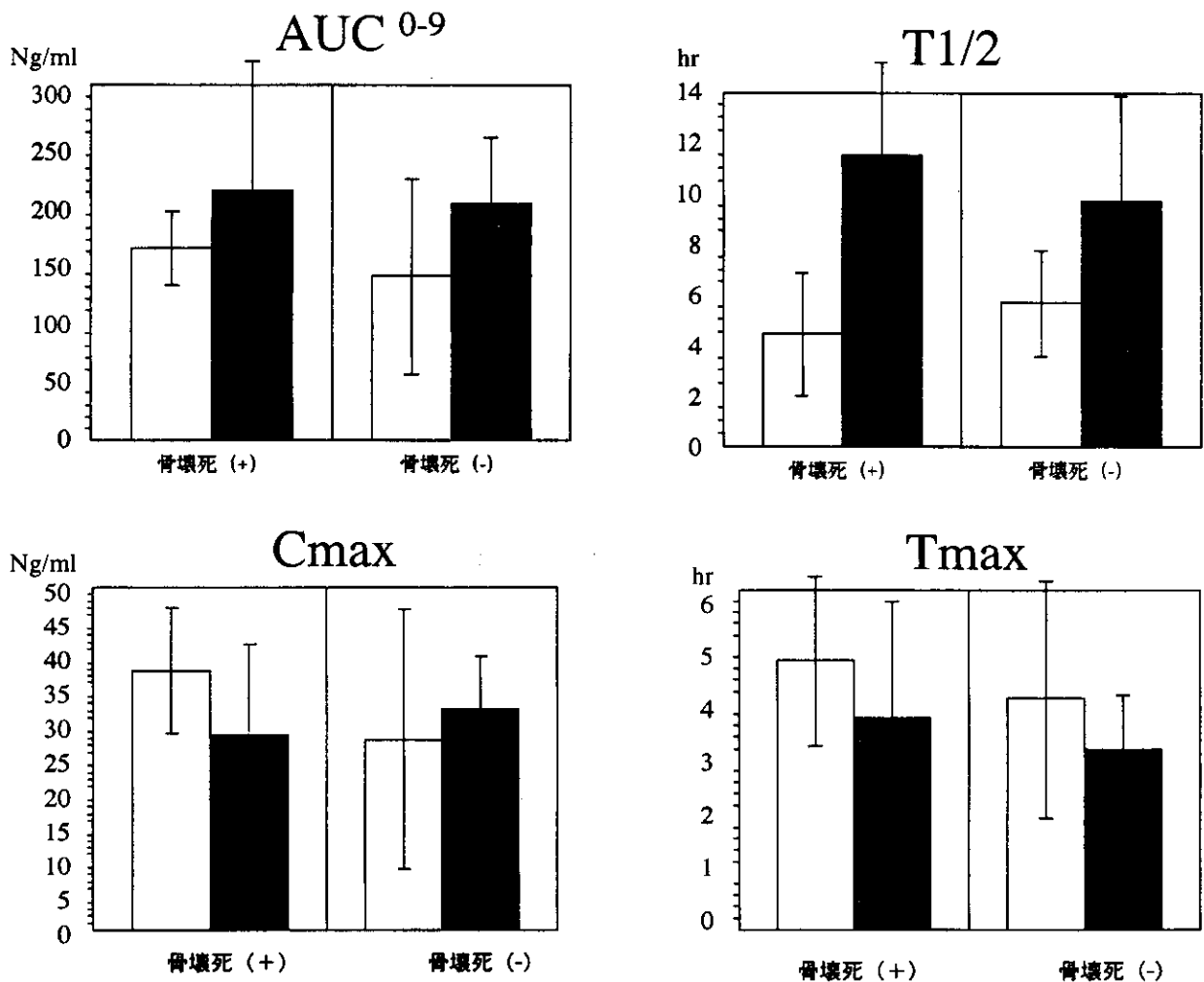


Fig 2

(倫理面への配慮)

タクロリムスの投与と血中濃度の測定は、腎移植に対する薬物療法として施行されている。よって今回の研究のために特別に行われた行為はないが、データは厳重に管理するなど、倫理上問題が生じないように常に配慮した。

C. 研究結果

壊死群、非壊死群ともに一定トラフ値を保つためのタクロリムス投与量は、経時的に減少傾向にあったが、両者で大きな差はなかった。タクロリムス血中濃度の変化について壊死群、非壊死群ともに血中濃度は、経時的に減少傾向にあったが、移植後3カ月以降で壊死群では血中濃度の上昇が認められた。

AUCはここでは、薬剤の投与間隔のため、投与

後9時間までの測定を行った。壊死群と比較し、非壊死群では移植前後での増加率がやや高い傾向にあった。

半減期 (T1/2) は、非壊死群での移植前後でのタクロリムスの半減期の延長率は50.2%であり、これは当院での腎移植症例約60例のタクロリムスの薬物動態を調べた結果での延長率が50.7%であったのとはほぼ同じ数値であったのに対し、非壊死群の延長率は93.8%と有意に高い値を示した。

Cmaxでは骨壊死群は移植後、減少したのに対し、非壊死群では上昇していた。Tmaxについては、両群とも移植後に減少を示し、明らかな差は認められなかった。(Fig 2.)

D. 考察

薬剤投与と副作用、合併症の発現には、薬物代謝