

厚生科学研究補助金
長寿科学総合研究事業

骨粗鬆症における
テーラーメイド医療の確立に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 折茂 肇

平成15年3月31日

目次

I. 総括研究報告書

骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療の確立に関する研究	折茂 肇	1
----------------------------	------	---

II. 分担研究報告書

1. 骨粗鬆症における骨密度変化の個人差に関する研究	白木正孝	17
2. 閉経前における腰椎骨密度減少に関する検討	太田博明	26
3. 安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験によるカルシウム吸収率の推定と臨床応用	上西一弘	28
4. 遺伝子解析からのアプローチ	細井孝之	31
5. in vivo 骨梁構造評価法の検討	伊東昌子	35
6. 骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定	浦野友彦	39
7. 活性型ビタミンD治療に対する反応性を規定する遺伝子群の探索	池田恭治	43
8. 統計手法の基礎的検討	大橋靖雄	47

III. 研究成果の刊行に関する一覧表		52
---------------------	--	----

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

総括研究報告書

骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療の確立に関する研究

主任研究者 折茂 肇 東京都老人医療センター名誉院長

研究要旨 骨粗鬆症の予防と治療において、個人レベルでの最適化をおこなうための総合的研究を行なった。研究は大きく、①治療に対する反応性の個人差を骨密度の推移やカルシウム推移からとらえること、②これらの個人差を遺伝子多型性から明らかにすること、③骨の力学的特性を臨床的に評価するための新しい放射線学的手法を確立すること、④骨粗鬆症治療薬に対する応答遺伝子群を捉えること、さらには⑤骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療を評価するための統計手法の基礎的検討、からなる。本年度はこれらのサブテーマに関する基礎検討が行なわれ、次年度からの研究の基盤が得られた。

A. 研究目的

骨粗鬆症は骨量の病的減少が骨微細構造を破綻させ、易骨折性をもたらす疾患である。とくに加齢にともなう骨量減少を背景として発症する退行期骨粗鬆症は高齢者人口の飛躍的な増加にともない、患者数の増加が著しい。脊椎圧迫骨折、前腕骨折、大腿骨頸部骨折などの骨折が本症の合併症であり、骨粗鬆症治療の目的はこれらを予防することである。近年、骨量、臨床所見や骨代謝マーカーなどを参考にした治療方針の決定、骨折発症の有無に関するフォローアップなどからなる骨粗鬆症診療の体系が構築されてきた。治療の方法は運動療法や食事療法からなる非薬物療法を基礎治療とし、それに薬物療法を加える。従来の治療効果の判定は、各治療を行った群間で比較され、個人差が存在することを考慮に入れていない。骨粗鬆症における治療効果には個人レベルでのばらつきが大きく、より効率のよい治療を進めるためにはテーラーメイド医療の立

場から、これまでの治療法を再評価し、再構築することが必要である。本研究では骨粗鬆症における食事療法、薬物療法について個人レベルでの最適化をおこない、より効率のよい治療を行うための新しい診療体系を確立することを目的とする。本研究の成果が高齢者一人一人のADLやQOLの向上にむすびつき、さらに骨粗鬆症診療における医療経済面の改善をもたらすことが期待される。

B. 研究方法

①骨粗鬆症における骨密度変化の個人差に関する研究：多因子疾患である骨粗鬆症診療を個人ごとに最適化するためには、第一に当該患者の病態を詳細に考察し、病態に見合った治療を行わなければならない。近年、カルシウム代謝や骨代謝回転の状態を把握することや既存骨折の有無を検査することで、ある程度将来の骨折危険性を予知することができるようになった。さらに個人レベルで最適な骨粗鬆症診療を行うためには治療後の反応性を見極める手段を得る

ことが必要である。通常、骨粗鬆症治療に対する反応性は骨密度の推移で判定するか、もしくは骨代謝マーカーの反応性で評価するが、それらのいずれも、どの程度変動すれば有意な治療効果として認識しうるかの検討がない。そこで今回は無治療例の骨密度推移からみて、どの程度の治療反応性が確保されれば、当該治療が有効とみなしうるか、という点を検討することにした。成人病診療研究所骨粗鬆症骨折予防長期介入試験に登録された閉経後女性で一年以上腰椎骨密度の経過が観察されているものを対象とした。これらの対象者について、無治療下での骨密度推移における個人差を解析し、それにもとづいて骨密度に対する薬剤効果の有効性判定について検討した。無治療群、治療群ともに3年間の経過観察を行い、各年度の変化率と次ぎの年度の変化率の相関関係を調査した。

②閉経前における腰椎骨密度減少に関する検討:閉経後や卵摘後の早期に骨密度の減少が加速することは周知の事実である。一方、閉経前女性における骨量減少の有無については未だ一致した結果をみていない。本研究では48.2±2.3歳の閉経開始婦人197例について、12ヵ月間のL2-4BMDの変化率(%L2-4BMD)を検討した。

③安定同位体⁴⁴Ca経口負荷試験によるカルシウム吸収率の推定と臨床応用:カルシウムの摂取不足は多因子疾患である骨粗鬆症の原因の一つである。カルシウムは消化管での吸収率が低い栄養素であり、しかもその吸収率は年齢や個人間でも異なる。カルシウム吸収率の個人差を推定する。

若年成人女性20名(年齢20~23歳)

を対象に朝食摂取時に安定同位体⁴⁴Caを経口負荷し、その後12時間後まで2時間ごとに採尿、ついで12時間後から24時間後まで蓄尿し、尿中の⁴⁴Ca排泄量を測定、カルシウム吸収率を推定した。対象者の腰椎骨密度(Hologic QDR2000)、血中1.25(OH)₂D、 intact PTH、および尿中骨代謝マーカー(NTx、DPD)を測定し、尿中⁴⁴Ca排泄との関係を検討した。さらに24時間尿と2時間ごとの尿での測定値を比較検討した。

④遺伝子解析からのアプローチ:骨粗鬆症はその発症に生活習慣因子のみならず、複数の遺伝的素因とが関与することが知られている。さらにその治療に対する反応性の個人差も遺伝的に決定されていることが予想される。本研究では、骨粗鬆症の治療、とくに薬物療法における個人差を決定する遺伝子多型性を見出すために、本年度は個人ごとの薬剤反応性を検討するための対象集団を確定し、候補遺伝子の多型性を検索した。さらに染色体全領域をカバーする系統的SNPsを用いた検討に向けて準備を行った。成人病診療研究所(白木所長)を受診した骨粗鬆症患者について、治療開始前後の骨量(L2-4BMD by DXA)を測定し、その変化率をもとめた(%change/year)。治療方法としては、活性型ビタミンD3製剤、ビタミンK2製剤、女性ホルモン製剤、ビスフォスフォネート製剤について検討した。これらの対象者からは、インフォームドコンセントを得た後に、遺伝子解析に用いる血液の採取が行われた。治療薬ごとの作用機序を勘案し、薬剤反応性を規定する候補遺伝子群を選定した。それぞれの遺伝子における多型性をデータベースまたは、

degenerative HPLCによるスクリーニングによって検索した。活性型ビタミンD3 (1 α -vitamin D3) に対してはVDR, vitamin D binding protein, alkaline phosphatase, calbindin, ビタミンK2製剤 (vitaminK2) に対してはapolipoprotein E, γ -carboxylase, CYP2C9, 女性ホルモン製剤に対してはestrogen receptors (α , β), ef p, etidronateやalendronateなどのbisphosphonates に対して farnesyl diphosphatase synthaseを候補遺伝子として取り上げた。さらにgenome-wideに分布する約1200SNPsを共同研究者の日本医科大学江見らとともにタイピングし、薬物療法との関連を検討する準備をした。

⑤ *in vivo* 骨梁構造評価法の検討：骨粗鬆症の診断において骨密度測定は中核的な存在であり、その測定値に基づく診断体系が構築されている。一方で、この方法による骨脆弱性の推定には限界があることも示唆されている。近年マイクロCT装置が開発され、その装置を用いて高い解像度で生検材料や小動物の摘出骨の三次元データを得て、骨の解剖学的構造および海綿骨梁構造の解明が進んできた。骨梁構造定量化パラメータは、骨力学特性と強く関連しており、その評価は骨折リスク予知に貢献できると考えられる。しかし、マイクロCTは*in vitro*の検査であり臨床に適用できない。また骨梁構造を*in vivo*に評価する方法としては、従来からのレントゲン写真による骨梁構造の視覚的(主観的)評価法があり、骨折リスクや骨粗鬆症治療効果の評価には十分ではない。magnetic resonance imaging (MRI)は、骨梁構造を評価するには被曝もなく適切な評価法と期待されているが、現在の一般臨床で用いられる装置では解像度の限界と、躯幹骨における計測の困難さが問題である。そこで、我々は放射線学的な技術を用いて、骨密度以上の感度で骨折リスクを評価できる*in vivo* 骨梁構造評価シス

テムを構築し、その有用性を確認することを研究の目的とした。

マルチスライスCT(Multi-detector-row CT=MDCT)装置は、シーメンス社製SOMATOMPlus4を用いた。マイクロCT装置はSCANCOMedical社CT40である。三次元骨梁構造解析プログラムには、市販のプログラムであるRATOC TRI/3D-BONを使用した。MDCTから得られたDICOMデータを非圧縮にて直接読み込み、median filterでノイズ除去し、関心領域を設定、二値化し、ラベリングを行い、各種パラメータを得た。

ヒト脊椎(第1, 2, 3椎体)をマイクロCTでスキャンする場合に用いるホルダー(径39mm)にゼラチンにて包埋固定し、マイクロCTで解像度を変化させてスキャンした。ホルダーに固定した状態で、水等価ファントム内に固定し、撮像条件を変化させてスキャンした。撮像条件は管電圧120kV(一定)とし、管電流に250, 300, 350mAsの3段階を設定した。0.5mmスライス厚でスキャンするが、500ミクロンのgaplessと(200ミクロンオーバーラップ)300ミクロンスライス厚の2種の解像度で再構成を行った。被曝線量測定は、水等価ファントム内の摘出骨を管電圧250, 300, 350 mAs (120kV, 54sec, 0.5 mmスライス厚は一定)と変化させてスキャンした際の、脊椎部の被曝線量を測定した。線量計はPTW社製CT用電離箱検出器Model77336であり、1cmスライス幅での被曝線量dose length product (DLP: mGycm)を算出した。

さらに新鮮脊椎圧迫骨折10例(年齢66.6 \pm 2.2歳、閉経時年齢48.5 \pm 4.1歳、骨粗鬆症治療薬投与6ヶ月未満)と骨折既往のない対照例12例(年齢66.1 \pm 6.7歳、閉経時年齢49.3 \pm 4.3歳)について臨床的な意義を検討した。摘出骨ファントムで検討した適切な撮像条件によりスキャンし、得られたDICOMデータはTRI/3D-BONを用いて、二値化(骨梁と骨梁以外の成分に分離する)のための閾値を変化させて、得られる計測値の変動をみた。コンピュータの二値化自動設定プログラ

ムをもちいても解析した。解析領域は椎体の皮質骨と栄養孔を含まない最大の立方体とした。全症例は、dual X-ray absorptiometry (DXA) (GE 社 EXP5000)で第2-4腰椎骨密度を求め、また同X線 CT 装置を用いて B-MAS200 により quantitative computed tomography (QCT)で第3腰椎骨密度を測定した。

⑥骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定:エストロゲン受容体(ER)低応答性ラットならびに野生株ラット由来の胎児頭蓋骨を酵素処理することにより初代培養骨芽細胞を作成、培養した。ER 低応答性ラットは ER α ならびに ER β 両者を介するエストロゲンシグナルを遮断する ER ドミナントネガティブ体を過剰発現させたモデル動物であり、分担研究者が所属する研究室にて作成した。すでにこのラットは卵巣摘出後に誘導される低骨量に対して、エストロゲンを添加しても骨量の回復が誘導されないことが示されている(Ogawa S *et al. J Biol Chem* 2000)。実験に際しては継代数を 2nd passage に限定した。これら細胞を 10%血清にて培養し、この時の細胞増殖能を BrDU ラベリング法を用いて評価した。

次にこれら初代培養骨芽細胞から RNA を採取した。これら RNA から DNA チップ法(Affimetrix)を用いて野生株骨芽細胞に比ベトランスジェニックラット由来の骨芽細胞にて発現に差違のある遺伝子をリストアップすることにより、骨芽細胞によるエストロゲン応答遺伝子を探索した。

これら応答遺伝子が生理的濃度(10^{-9} M)にて実際に応答することを野生株骨芽細胞にエストロゲンを添加後、細胞抽出液を採取し、Western blot 法により確認した。

さらに骨形成制御遺伝子として注目され

ている LRP5 遺伝子の多型性が骨量に及ぼす影響を検討した。JSNP に報告のある LRP5 の遺伝子のイントロン中に存在する遺伝子多型 5 種類に関し、SNP-dependent PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 310 人を対象として BMD との関連を解析した。

⑦活性型ビタミンD治療に対する反応性を規定する遺伝子群の探索:活性型ビタミンDは、わが国において骨粗鬆症の治療薬として広く用いられており、一定の骨折予防効果も報告されているが、個人により薬物反応性に大きな差があり、作用メカニズムにも不明の点が多い。一般に活性型ビタミンDは、腸管からのカルシウム吸収を促進する作用が主であり、これが骨に対する薬理効果の基盤であるとする考えが支配的であるが、カルシウム吸収作用が強すぎると高カルシウム血症や高カルシウム尿症・腎障害などの副作用が問題となる。

本研究では、ビタミンD治療の薬物反応性を規定する遺伝要因の解明に向けて、腸管からのカルシウム吸収に必須であるビタミンD受容体(VDR)を欠失したマウスと正常マウスの十二指腸での遺伝子発現の比較解析から、転写因子であるVDRの下流で働きカルシウム吸収に関わる遺伝子群を同定するとともに、ビタミンDの骨吸収に対する直接効果とその作用メカニズムの解明を行った。

8週齢のC57BL/6CrSlcマウス♂5匹および8週齢VDR-KOマウス5匹からそれぞれ十二指腸粘膜を採取し total RNA を調製した。なおVDR KOマウスは、低カルシウム血症を示し死にいたるため、高カルシウム食で飼育した動物を用いた。また卵巣摘除(OVX)あるいは8週齢の若年に対してカルシウム吸収能がかなり低下した6か月齢の成熟マウスの結果とも比較検討した。

さらに Total RNA を試料とし Affymetric 社の開発した技術であるプローブアレイを

用いて網羅的に約 14,000 の遺伝子発現を解析した。使用した遺伝子発現解析用プローブアレイは GeneChip Murine Genome U74A Ver.

また、活性型ビタミン D の破骨細胞形成抑制用を検討するために OPG KO マウスに活性型ビタミン D である $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を経口投与し、骨吸収や骨密度に対する効果を調べた。骨髄から M-CSF 依存的に増殖する破骨細胞の前駆細胞を単離し、M-CSF と RANKL 依存的に起こる破骨細胞形成に対する $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を調べた。RANK 受容体以下その破骨細胞分化シグナルに関わる多くの分子を western blot で解析した。レトロウイルスを用いて c-Fos タンパク質を強制発現させた。

⑧統計手法の基礎的検討：骨折に骨量変化が及ぼすリスクを評価する場合、区間打ち切りと、骨量変化についての測定誤差を考慮した統計解析が望ましい。区間打ち切りとは、骨折までの正確な時間がわからず、前回の検査から次の検査までのいずれかの時点で骨折イベントが発症した、というデータのみ得られる型の打ち切りである。区間打ち切りと測定誤差のいずれかを考慮した統計手法は存在するが、両者を同時に考慮した方法はこれまで提案されていない。本研究では、区間打ち切りデータにおいて時間依存性共変量に伴う測定誤差の影響を考慮する統計手法を提案し、実データへの適用を通してこの手法の評価を行う。

複数イベント（再発）を考慮した解析としては、これまでに Cox 回帰を拡張したモデル (AG,PWP-T, PWP-G,WLW,LWA モデル) が提案されているが、それぞれには解析の前提があり、その適用には慎重であるべきである。他に一般化推定方程式 (GEE) を用いたポアソン回帰の適用が示唆されているが、その有用性の検証はまだなされていない。一方、治療効果が認められず骨折イベントを繰り返

すと対象者が試験終了以前に脱落することがある。そのような場合でも治療効果の推定結果への影響が小さく、頑健かつ簡便な解析方法が求められている。そこで、各モデルをシミュレーションデータ及び実際の再発事象を対象とした臨床試験データへ当てはめることで比較検討し、早期脱落を考慮した場合でも治療効果の推定に適切な解析方法を提案することを本研究の目的とした。

なお、事例の検討のためには、わが国では十分な骨折臨床試験のデータが存在しないため、区間打ち切りと測定誤差については糖尿病網膜症の臨床試験データ (JDC 研究)、複数イベントについては多発性硬化症 (MS) 臨床試験データを用いた。

測定誤差によるバイアスを減少させる方法である 2 段階法を、通常の Cox 回帰から区間打ち切りデータに対応できる区分指数モデルに拡張した。まず、第 1 段階でリスク因子の真値を変量効果モデルによって予測し、その値を用いてリスクをモデル化した (JDC データについては糖尿病罹病から現在までの「平均」及び「累積」、空腹時血糖値 126mg/dl、HbA_{1c} 値 8.1%以下を無視する「閾値」の 3 モデル)。次に、第 2 段階でこれらの予測値及びリスク変数を共変量として、区分指数モデルによるリスク評価を行った。通常、区分指数モデルではポアソン回帰によってパラメータ推定を行うが、区間打ち切りの下ではデータを完全な形で得られないため、不完全データから最尤推定値を得るための反復計算法である EM アルゴリズムを用いてパラメータ推定を行った。以上の統計手法により、空腹時血糖値及び HbA_{1c} 値の予測値及びモデル化したリスク変数を用いて、測定誤差と区間打ち切

りを同時に考慮したりリスク比の推定を行った。予測値を共変量とするモデルでは、測定誤差を考慮することの影響を相対的に評価するため、区分指数モデル（区間打ち切りを考慮）とCox回帰（生存時間を区間の midpointで補完）のそれぞれにおいて、2段階法により測定誤差を考慮した解析としない解析による結果の比較を行った。さらに、第1段階でモデル化したリスク変数（平均、累積、閾値）を共変量とする解析を行い、デビアンズによってモデルの適合度を評価した。

Cox回帰やポアソン回帰モデルはいずれもハザード(再発率)をモデル化している。AGモデルは再発を起こした対象者も観察が継続していればリスク集合にあるとするモデルである。PWP-T,PWP-Gモデルは*j*回目の再発に対するリスク集合は(*j*-1)回目の再発を起こした対象者に限定する条件付モデルであり、時間軸をPWP-Tモデルは試験開始時からの時間、PWP-Gモデルは(*j*-1)回目からの時間とする点が異なる。WLW,LWAモデルは各再発の生起時間の周辺分布をモデル化しており、LWAモデルは基準ハザードを共通とするのに対してWLWモデルは異なるとしている。ポアソン回帰に関しては、再発率は全観察期間を通じて必ずしも一定とはいえないため、観察期間を再発率が十分に一定だとみなせる区間に区切り、対象者内の各区間の間に存在する再発率の相関をGEEで考慮した。評価はシミュレーションで行った。シミュレーションの設定は、MSの自然経過を表すとされる実データのプラセボ群のデータ及び先行研究をもとにした。想定する臨床試験の対象者は試験薬群とプラセボ群各100例の計200例、期間は3

年、プラセボ群に対する試験薬群の再発率比を1/1.3に設定し、治療効果を表すパラメータは再発が何回目かによらず一定であると仮定した。打ち切りまでの時間(観察期間)には、ワイブル分布を仮定した。再発までの時間は、先行研究やMSにおいて考えられている空間的・時間的多発という病態から、個人の中に潜在病巣がいくつか存在して早く悪化したものから順に1回目、2回目、...の再発が生じるとみなして発生させた。この設定は骨折にも当てはまると考えられる。[設定1]では1回目再発までの時間にワイブル分布を仮定した。[設定2]では投与開始前1年間の再発回数を考慮し、対象集団中に再発のしやすさに関する個人差が存在する場合の検討を行った。発生させたデータに対して各モデルを適用して比較した。GEEを用いた区分ポアソン回帰では、再発率が一定であるとする区間の長さを1年・6ヶ月・3ヶ月・1ヶ月・2週間と想定して(GEEモデル①~⑤)解析を行った。同時に、再発を2回あるいは3回起こした対象者をその時点で脱落とした場合の治療効果推定への影響も検討した。シミュレーションは1000回ずつ行い、結果はバイアス及びバイアスと精度を考慮した平均二乗誤差(MSE)で評価した。

C. 結果と考察

①骨粗鬆症における骨密度変化の個人差に関する研究：無治療で3年間腰椎骨密度の推移を観察した閉経後女性例の0-1年度の変化率(%1Y)と1-2年度の変化率(%2Y)ならびに2-3年度の変化率(%3Y)および%2Yはいずれの変化率も極めてよい相関を示した。また%1Yと%2Yの相関は活性型VD3(VD)、ビタミンK2(VK)、EHDP、結合型女性ホル

モン(CEE)、第三世代ビスフォスフォネート(BP)による治療のいずれにおいても腰椎骨密度変化率は年度間でよい相関を示した。このことは、腰椎骨密度の自然低下においても、また治療の反応性においても個人差が存在し、その個人差は少なくとも3年間程度は持続することを示していると考えられた。腰椎骨密度変化率は治療方法により異なった変動を示した。従って、骨密度変化率から薬物療法の有効性を論ずるには以下の三つの場合が考えられる。

第一に測定機器の精度からみて、精度以上の変化を示した場合、有効、または無効を判定できるという考え方である。

第二の判定方法は対照群の低下を阻止できれば有効であり、対照群と差がない変化を示した場合、無効と考える考え方である。

第三には各治療群の一般的骨密度変化率を求め、その薬剤の分布からみて有効、無効を決定する方法である。第一の方法に従って薬効を評価する場合、腰椎骨密度測定精度は一般的に±3%程度と考えられているので、+3%以上の変動を認めた場合を有効とし、-3%以下を無効、その中間は維持と判定する場合が一般的である。本研究においても、この基準をまず採択した(機器精度判定)。

第二の方法に準じて有効、無効を論ずる場合、無治療群の75percentile値以上の変動を示せば、少なくとも無治療群における骨密度の低下は阻止できたと考えられるので、1-3年間のいずれの時点でもそれに対応する対照群の75percentile値以上をもって有効と判断した(対対照判定)。

各骨粗鬆症治療薬の骨密度に対する効果は薬剤により大きく異なる。ゆえに第一か

ら第二の方法のように相互の有効性を比較できる方法の他にある薬剤投与例のなかで相対的にみて有効であるか否かを検討するための判定基準も必要となる。従って、第三の判定方法としては当該薬剤の骨密度効果の分布から25percentile以下を無効、25-75percentile間に含まれる例を有効、75percentile以上を示す例を著効と判定することとした(薬剤内判定)。

本来、観察期間ごとに基準値をしめさなければならぬが、一年目についてのみ見ると、CEE、EHDP、BP群の有効率が高く、一方VDやVKでは有効率が低かった。VD、VKおよびBP治療群において、各種方法により治療反応性を求め、その反応性からみて、有効例と無効例に分類し、その反応を規定する因子が合理的に抽出できるか否かを検討した結果、VD治療群の骨密度反応を規定している因子はAl-Pが有意の因子として抽出できた。薬剤内反応基準ではまた、PTHが高値であるものほど反応が良好である傾向が伺えた。VK治療群では明らかに血清オステオカルシン値が反応規定因子となっており、どのような測定系においてもオステオカルシンが低いものの方が反応は良好であった。また血清PTHが低い例の方が反応は良好であった。BP治療群においてはPTHが高値なものほど反応が良好であった。これらの結果は対対照を基準とした場合にはこのことを抽出できなかった。

以上の結果は機器精度からみた反応基準と薬剤内で反応を基準化する方法が比較的同等の感度で薬剤反応規定因子を抽出できることを示しており、対照の変動から基準を作成すると感度が低下することを示している。抽出された反応規定因子も合理的で

あり、理解可能であった。従って、骨粗鬆症治療の有効性を議論する場合には測定に使用された骨密度測定装置の最小検出感度を自施設で求めておくことと、大きなデータベースを用いてある薬剤の骨密度反応の大きさを決定しておくべきである。

今後、骨粗鬆症のテーラーメイド医療は ALP, PTH, オステオカルシンなどのカルシウム骨代謝マーカーを測定してあらかじめ治療方針を決定するやりかたにこれら代謝因子の変動を制御している遺伝子の多型を検討することでより完全なものとなるであろう。このことが可能となれば医療の効率化には大きく寄与するであろうとおもわれる。

② 閉経前における腰椎骨密度減少に関する検討：全例における%L2-4BMD は $-1.5 \pm 8.5\%$ と有意な変動はなかった。しかし、卵巣機能の低下を示唆する月経周期が12ヵ月間に2周期以上不順な症例に限定すると12ヵ月間の%L2-4BMD は $-2.2 \pm 3.9\%$ と有意な骨量減少を認めた。月経不順を呈することは、月経正順に比べて E2 値および FSH 値は各々有意 ($p < 0.05$) な低下および上昇を認めた。さらにこれらを反映して血清 Ca 値, ALP 値および intact osteocalcin 値は各々有意な ($p < 0.05$) 上昇を認めた。一方これらの月経不順例における%L2-4BMD 値は、FSH 値と負相関 ($r = -0.238$, $p = 0.077$) を intact osteocalcin 値とも負相関 ($r = -0.194$, $p = -0.0479$) を呈した。すなわち、FSH 値が高い卵巣機能不全を呈している例では骨量の低下が著しく、また intact osteocalcin 値が高い、骨代謝が亢進している例では骨量の低下が著しいことが判明した。

結論として、閉経前婦人では一過性であれ E2 値が低下し、FSH 値が上昇する卵巣機能に低下がみられる例では、12ヵ月間で

明らかな骨量の低下が認められる。このようにエストロゲン低下により骨吸収の抑制不全を呈している例では、Alp および intact osteocalcin 値が高値を呈する、いわゆる骨代謝が亢進しているため、骨量の低下が著しいことが判明した。

閉経後の骨量低下が必至であることを考えると、閉経前の骨量低下も無視できるものではなく、この時期に十分な対応を行うことが、閉経後の骨量低下を減じ、後年における骨折防止にもつながる筈である。従って、閉経前の僅かな骨量減少も無視しないものであり、それを同定し、個別的に対応するテーラーメイド医療は将来の骨粗鬆症罹患の防止に

③ “安定同位体 ^{44}Ca 経口負荷試験によるカルシウム吸収率の推定” の臨床応用への検討： ^{44}Ca 排泄量（排泄率）と各指標の相関をみたところ、尿中総カルシウム排泄量、リン排泄量および腰椎骨密度との間に正の相関がみられた。カルシウム出納がほぼ平衡状態にあると考えられる人では、24時間 ^{44}Ca 排泄量と出納試験によるカルシウム吸収率が相関することがこれまでの研究で明らかであるため、今回の検討はこのことを前提にした。今回の対象者は健康な若年女性であり、しかも対象者数が少ないこともあり、尿中 ^{44}Ca 排泄と骨代謝マーカーの間には明確な関係はみられなかったが、尿中 ^{44}Ca 排泄量と腰椎骨密度の間には正の相関がみられた。これは尿中 ^{44}Ca 排泄量が多いことは、カルシウム吸収率が良く、その結果、骨密度が高いと推定される。

2時間ごとの尿中 ^{44}Ca 排泄量と24時間尿中 ^{44}Ca 排泄量の相関をみたが、特に相関はみられなかった。採尿時間を長くするほど、

みかけの吸収率との相関が高くなることから、現時点では24時間の尿の採取が望ましいと考えられる。

③ 遺伝子解析からのアプローチ

骨粗鬆症に対する治療効果をDXA法による腰椎骨密度の変化で見た場合、その個人差の分布が各薬剤ごとに得られた。活性型ビタミンD3製剤やビタミンK2製剤における治療効果には個人差が大きかったものの、bisphosphonate製剤の無効例は極めてすくなかった。これらのデータが候補遺伝子の多型性との関連を検討する基盤が得られた。しかしながら、responderとnon-responderの定義については①BMDの変化について4分割位をとり、1位をresponder、4位をnon-responderとする、②BMDの変化が正の者をresponder、負のものをnon-responderとする、③BMDが3%以上増加したものをresponder、その他をnon-responderとする、などいくつかの考えかたがあり、この点をどうとりあつかうかが、大きな課題として残された。骨折予防が骨粗鬆症治療の目的であり、骨折予防効果をもって薬物療法の有効性を判定すべきであるが、そのためには期間、症例数を飛躍的に長くあるいは多くする必要があり、本研究のなかでは困難なエンドポイントである。今後、これらの3つの考え方それぞれに沿った解析を試みていくが、実際には③の手法が用いられるべきであろう。

④ in vivo 骨梁構造評価法の検討：撮像条件の検討結果管電圧 250mAs, 300mAs, 350mAs でのそれぞれの DLP は 2547, 3070, 3584 mGycm であり、管電圧増加に

伴って直線的に増加した。300mAs での被曝線量は、腹部 CT 撮影で単純CT・造影CT（動脈相）、造影CT（静脈相）の3シリーズ撮影に比較して、やや多いくらいのレベルであり、通常の臨床検査として問題のないレベルであると考えられた。ファントムでの実験結果をもとに、管電圧、解像度、閾値のそれぞれが各種パラメーターにおよぼす影響を検討した。

骨折症例群と対照群の2群間には、DXA腰椎骨密度には有意差は認められなかった。QCT腰椎骨密度には軽度の有意差 ($p<0.05$) を認めた。骨梁構造パラメーターのうち、有意差を認めたものは、BS/BV ($p<0.05$), BV/TV ($p<0.005$), Tb.Th ($p<0.05$), Tb.N ($p<0.01$), Tb.Sp ($p<0.05$), Fractal D ($p<0.05$), Euler N ($p<0.01$), TBPf ($p<0.05$), SMI ($p<0.05$), N.Nd/T ($p<0.01$), TSL/TV ($p<0.005$), NdNd/TV ($p<0.005$) であり、DXA骨密度よりも骨折例と非骨折例を分離する能力は有意であった。

⑤ 骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定：エストロゲン低応答性ラット由来の骨芽細胞の増殖能は野生株に比べ低下していた。エストロゲン低応答性トランスジェニックラット由来初代培養骨芽細胞を用いて、野生株と比して変化のあった遺伝子をリストアップし、この中からサイクリンD2に注目した。サイクリンD2は細胞周期の正の進行役としてCDK4ならびにCDK6と複合体を形成し、その酵素活性を上昇させることが知られている。そこで、骨芽細胞に生理的濃度のエストロゲンを添加し、その増殖が誘導されるときにサイクリンD2の発現変化をWestern blot法を用いて検討したところサイクリンD2の発現

増加が確認された。さらにそのファミリーであるサイクリン D3 の発現も同時に増多することも確認した。同時に免疫沈降法を用いてエストロゲン添加により骨芽細胞内でサイクリン D2 と D3 が CDK4 ならびに CDK6 と複合体を形成し CDK4 ならびに CDK6 の酵素活性を上昇させることも確認した。以上よりエストロゲンによる骨芽細胞増殖にはサイクリン D2,D3/CDK4,CDK6 を介した経路が機能していることが示された。

今回解析した遺伝子多型のうち LRP5 遺伝子のイントロンに存在する遺伝子多型 5 種類中、一種類の多型では、全身骨ならびに腰椎骨密度(Z score)において有意差を呈していた。特に全身骨密度(Z score)においては 2 群間で $p=0.0051$ と強い相関係数を示した。それ以外でも腰椎骨密度(Z score)のみで有意差を呈する遺伝子多型、全身骨密度(Z score)において有意差を示す遺伝子多型がそれぞれ一 종류ずつ存在していた。

エストロゲン低応答性ラット由来の骨芽細胞の増殖能は野生株に比べ低下していた。既報にて、初代培養骨芽細胞においてエストロゲンは増殖を刺激することが報告されている。このことはエストロゲンが骨芽細胞においてエストロゲン受容体を介し、増殖因子として機能することを示唆させる。実際に DNA チップを用いた解析においても増殖の制御因子であるサイクリン D2 が同定され、実際に増殖システムにおいて重要な役割を果たしていることが示された。近年、シグナル伝達研究において DNA チップ法を用いたアプローチにより様々な応答遺伝子が同定されており。今回の報告においてもエストロゲンを介した増殖における

応答遺伝子が同定出来ている。今後、この手法を用いて、骨形成に関与するサイトカインならびに内分泌ホルモンでの応答遺伝子を探索し、骨形成のメカニズムを解明してゆく予定である。

LRP5 と骨形成に関連した研究は 2001 年と 2002 年の 2 年間で、飛躍的に進歩した。2001 年には遺伝性の骨量減少を認める、骨粗鬆症-偽神経膠腫症候群の原因遺伝子であることが報告された。さらに 2002 年には高骨量の家系調査の結果、LRP5 遺伝子において活性型変異体が発見されたことから LRP5 は骨芽細胞の分化を介した骨形成における Key regulator であることが他のグループから示されてきた。さらに興味深いことに LRP5 のノックアウトマウスでも骨量減少が認められ、骨芽細胞の機能異常も認められたが、この経路においては今まで骨芽細胞の分化において中心的な役割をはたしていると考えられてきた Cbfa1 を介していないことが示されている。今回我々は、LRP5 のイントロン中に存在する遺伝子多型が骨量に劇的な変化を及ぼすことを世界にさきがけて示した。本研究にて日本人女性における LRP5 遺伝子のヘテロ、ホモを合わせた出現頻度は約 47%と非常に高頻度であることから、骨量を規定する遺伝子マーカーとして有用である可能性が高い。

来年度以降、この多型での薬剤による反応性の相違を検討することでこの Wnt-LRP5 に関与する薬剤と関与しない薬剤との判別が明らかとなる可能性がある。さらにこの遺伝子多型によって反応性があった薬剤に関しては、骨芽細胞による添加実験を行い Wnt-LRP5 経路のシグナル伝達にどのような影響を与えるかを *in vitro*, *in vivo*

の系を用いて明らかにする予定である。

⑥活性型ビタミンD治療に対する反応性を規定する遺伝子群の探索：VDRによって発現が誘導されるカルシウム輸送タンパク質として、ECaCが同定されているが、そのノックアウトマウスも含めてin vivoでの機能はまったく不明である。腸管でのカルシウム吸収能は、加齢に伴う骨粗鬆症の発症に大きく関係しており、個人差や人種差、薬物に対する反応性のばらつきなどが報告されている。腸管からのカルシウム吸収の分子メカニズム、とりわけVDRによって制御される下流遺伝子とその機能を明らかにし、これらを基盤にカルシウム吸収の個人差や薬物奏功性の差にアプローチする目的で、VDRを遺伝的に欠損し腸管からのカルシウム吸収が著名に抑制されているマウスを用いて遺伝子発現解析を行った。VDRがないことで発現レベルが1/10以下に低下する、すなわちVDRの存在によって発現が10倍以上上昇する遺伝子群を14同定した。今後は、これらのうちでも細胞間情報伝達、細胞内の物質輸送、転写因子に焦点を絞り、タンパク質レベルでの発現の変化や細胞内蓄財、機能解析を進める予定である。

活性型ビタミンDは、ストローマ細胞でのRANKLの発現を誘導することにより、破骨細胞の形成を促進し骨吸収を刺激するホルモンと一般的には認識されている。我々はこれまでOVXラットモデルを用いて、活性型ビタミンDの薬理作用は、高まった骨吸収を抑制することであると主張してきた。このコンセプトをさらに確固たるものにしましたその作用機序にもアプローチする目的で、OPGを遺伝的に欠損する結果RANKLからRANKへのシグナルが亢進することによって、著明な骨吸収と骨粗鬆症を呈するOPG KOマウスを用いて活性型ビタミンDである $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果調べた。その結果、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は用量依存性に骨吸収を抑制し骨密度を上昇させることが明らかになった。またこのことは、VDRがRANK系のシグナルに対して拮抗的に作用することを示唆する。

そこで、骨髄からM-CSF依存的に増殖する破骨細胞の前駆細胞を単離し、M-CSFとRANKL

依存的に起こる破骨細胞形成に対する作用を調べたところ、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はこれを用量依存性にかつ著名に抑制すること、この作用はVDR KOマウス由来の細胞ではまったく認められず、VDR依存的な薬理効果であることが明らかになった。

さらに、RANK受容体の下流で破骨細胞分化シグナルに関わる多くの分子を解析したところ、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によってタンパク質レベルあるいは活性が変化するのは、c-Fosタンパク質のみであった。つまり $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はRANKLによって誘導されたc-Fosタンパク質のレベルをベースライン程度にまで抑制した。レトロウイルスでc-Fosタンパク質を強制発現させると、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による破骨細胞形成の抑制効果はブロックされたことから、c-Fosタンパク質の減少が薬理効果を説明する解釈される。

以上から、c-Fosは活性型ビタミンDが骨作用とりわけ骨吸収抑制作用を発揮するにあたって重要な標的分子であると考えられる。

⑥統計手法の基礎的検討：JDC研究解析対象1,051例のうち394例（37%）が網膜症を発症し、観測された区間幅は 394 ± 418 日（平均 \pm SD）だった。第1段階における血糖コントロール指標の予測の結果、 HbA_{1c} 値に比べて空腹時血糖値の測定誤差が大きいことが示された。第2段階のリスク評価の結果、 HbA_{1c} 値1%増加について、誤差を考慮したリスク比は1.20となり、誤差を考慮しない場合の1.14に比べて大きな値となった。同様に空腹時血糖値20mg/dl増加のリスク比は誤差を考慮することにより1.07から1.17と大きく増加した。測定誤差を考慮することによる適合度の増加は HbA_{1c} 値では僅かだったが、より誤差の大きい空腹時血糖値では顕著だった。これらリスク比は、区間打ち切りを考慮しないCox回帰の結果との

間に大きな差異はなかった。また、モデル化したリスク変数を共変量とする解析での適合度は、HbA_{1c}値に関して平均、累積モデルで極めて高く、閾値モデルで低かった。空腹時血糖値に関しては、平均モデルの適合度は必ずしも高くはなかったが、累積モデルは極めて高くなり、閾値モデルの適合度は改善されなかった。

複数イベントについては、同様の結果が得られたものは省き、結果を表に示す。GEEを用いた区分ポアソン回帰は、全般的に薬剤効果を過小評価する結果となった。早く脱落するほどバイアスは小さくなり MSE は増大したが、他のモデルに比べると MSE は小さくなった。

区分指数モデルにおいて測定誤差を考慮した解析の結果、測定誤差を無視した解析に比べてリスク比が大きく推定され、その傾向は誤差の分散が大きい場合ほど顕著だった。この結果は右側打ち切りデータに対する先行研究と一致しており、区間打ち切りデータにおいても、測定誤差を考慮することによりリスク比の推定に伴うバイアスが減少したと考えられる。また、中点で補完した Cox 回帰の結果との間に顕著な差異は見られなかったことは、対象者間で区間幅のバラツキの少ない区間打ち切りだったことが原因と考えられ、JDCS のようにイベントの発生が時間的に規則正しく確認されているデータでは、必ずしも区間打ち切りを考慮しない手法でも妥当な推定値が得られることが示唆された。

血糖コントロールのリスクについて、予測値を用いたモデルに比べ平均モデル、累積モデルで適合度が大きく改善したことから、糖尿病罹病期間における平均的な血糖

コントロール状況（高血糖への曝露）及びその累積が、網膜症発症のリスクであることが示唆された。また閾値モデルの適合度から、HbA_{1c}値は 8.1%以下でも網膜症の発症に影響があり、逆に空腹時血糖値では、その影響が殆ど 126mg/dl 以上の部分によるものと考えられた。これらの結果は概ねこれまでの大規模研究の結果と一致しており、第 1 段階で予測した値からリスク変数を作成し共変量とすることで、临床上より有意義なリスク評価が可能になることが示された。このようなモデルの当てはまりは領域やリスク因子のメカニズムに依存する。骨折についても大規模データにより妥当なモデルの検討を行うことが必要である。

再発については、GEE を用いた区分ポアソン回帰では薬剤効果を過小評価する傾向にあったが、バイアスや MSE は総合的に比較的小さい結果となっており、他のモデルと比べて相対的に性能が良いと判断できる。さらに、早期脱落の影響を大きく受けないため、他のモデルと比較して頑健であるといえる。

現在のわが国には方法論の検討を行えるだけの大規模骨折データが存在しない。複数試験のメタアナリシスを行い、より詳細な方法論の検討と実際の骨量のリスク因子としての評価を行うことが今後の課題である。

D. 結論

骨粗鬆症の予防と治療において、個人レベルでの最適化をおこなうための総合的研究を行なった。本年度は複数のサブテーマに関する基礎検討が行なわれ、次年度からの研究の基盤が得られた。

E.健康危険情報

今年度の研究においては健康危険情報は得られなかった。

F.研究発表

論文発表

1. Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Kodaira M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Swensen J, Orimo H. Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR typing. *Bone*. 2003 Feb;32(2):185-90.
2. Ishida R, Emi M, Ezura Y, Iwasaki H, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Orimo H. Association of a haplotype (196Phe/532Ser) in the interleukin-1-receptor-associated kinase (IRAK1) gene with low radial bone mineral density in two independent populations. *J Bone Miner Res*. 2003 Mar;18(3):419-23.
3. Hosoi T, Yoda T, Yamaguchi M, Amano H, Orimo H. Elderly women with oral exostoses had higher bone mineral density. *J Bone Miner Metab*. 2003;21(2):120-2.
4. Kajita M, Ezura Y, Iwasaki H, Ishida R, Yoshida H, Kodaira M, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M. Association of the -381T/C promoter variation of the brain natriuretic peptide gene with low bone-mineral density and rapid postmenopausal bone loss. *J Hum Genet*. 2003;48(2):77-81.
5. Kazama H, Usui S, Okazaki M, Hosoi T, Ito H, Orimo H. Effects of bezafibrate and pravastatin on remnant-like lipoprotein particles and lipoprotein subclasses in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2003 Mar;59(3):181-9
6. Ota N, Nakajima T, Ezura Y, Iwasaki H, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H, Inoue S, Ito H, Emi M. Association of a single nucleotide variant in the human tumour necrosis factor alpha promoter region with decreased bone mineral density. *Ann Hum Biol*. 2002 Sep-Oct;29(5):550-8.
7. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, Kawaguchi H. Klotho gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2002 Oct;17(10):1744-51.
8. Ogata N, Koshizuka Y, Miura T, Iwasaki M, Hosoi T, Shiraki M, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Association of bone metabolism regulatory factor gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity. *Spine*. 2002 Aug 15;27(16):1765-71.
9. Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet*.

2002;47(8):400-6

10. Ogata N, Matsumura Y, Shiraki M, Kawano K, Koshizuka Y, Hosoi T,

Nakamura K, Kuro-O M, Kawaguchi H Association of klotho gene polymorphism with bone density and spondylosis of the lumbar spine in postmenopausal women. *Bone*. 2002 Jul;31(1):37-42

11. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature*. 2002 Jun 20;417(6891):871-5

12. Horiuchi T, Onouchi T, Inoue J, Shionoiri A, Hosoi T, Orimo H A strategy for the management of elderly women with primary hyperparathyroidism: a comparison of etidronate therapy with parathyroidectomy. *Gerontology*. 2002 Mar-Apr;48(2):103-8.

13. Hashimoto M, Miyao M, Akishita M, Hosoi T, Toba K, Kozaki K, Yoshizumi M, Ouchi Y Effects of long-term and reduced-dose hormone replacement therapy on endothelial function and intima-media thickness in postmenopausal women. *Menopause*. 2002 Jan-Feb;9(1):58-64.

14. Hiroshi Jinnai, Masako Ito, et al. Surface Curvatures of Trabecular Bone Microarchitecture *Bone* 30: 191-194,2002

15. Masako Ito, et al. Differences of three-dimensional trabecular microstructure in osteopenic rat models caused by ovariectomy and neurectomy *Bone* 30:594-598, 2002

16. Ayako Shiraishi, Masako Ito, et al. A comparison of alfacalcidol and menatetre-

none for the treatment of bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis *Calcif Tissue Int* 71: 69-79,2002

17. Masako Ito, et al. Contribution of tabecular and cortical components to the mechanical properties of bone and their regulating parameters *Bone* 31: 351-358,2002

18. S. Komukai, H. Ohta, K. Makita, S. Yanamoto, K. Takamatsu, H. Okano, M., Yajima, S. Nozawa One-Year Spinal Bone Change in Pre- and Perimenopausal Japanese Women. A Prospective Observational Study *Horm Res* 59: 79-84, 2003

19. Uchiyama Y, Higuchi Y, Takeda S, Masaki T, Shira-ishi A, Sato K, Kubodera N, Ikeda K, Ogata E: ED-71, a vitamin D analog, is a more potent inhibitor of bone resorption than alfacalcidol in an estrogen-deficient rat model of osteoporosis. *Bone* 30:582-588, 2002

20. Shibata T, Shira-ishi A, Sato T, Masaki T, Sasaki A, Masuda Y, Hishiya A, Ishikura N, Higashi S, Uchida Y, Saito M, Ito M, Ogata E, Watanabe K, Ikeda K: Vitamin D hormone inhibits osteoclastogenesis *in vivo* by decreasing the pool of osteoclast precursors in bone marrow. *J Bone Miner Res* 17:622-629, 2002

21. Watanuki M, Sakai A, Sakata T, Tsurukami H, Miwa M, Uchida Y, Watanabe K, Ikeda K, Nakamura T: Role of inducible nitric oxide synthase in the skeletal adaptation to acute increases in mechanical loading. *J Bone Miner Res* 17:1015-1025, 2002

22. Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K: A RING finger protein Praja 1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-

interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1. *J Biol Chem* 277:22541-22546, 2002

23. Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N: FOXO Forkhead transcription factors induce G2-M checkpoint in response to oxidative stress. *J Biol Chem* 277:26729-26732, 2002

24. Takai H, Naka K, Okada Y, Watanabe M, Ikeda K, Motoyama N: Chk2-deficient mice exhibit increased resistance to ionizing radiation and defective p53-mediated transcription. *EMBO J* 19:5195-5205, 2002

25. Kobayashi Y, Watanabe M, Okada Y, Takai H, Sawa H, Nakanishi M, Suzuki H, Nagashima K, Ikeda K, Motoyama N: Hydrocephalus, situs inversus, chronic sinusitis, and male infertility in DNA polymerase β -deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. *Mol Cell Biol* 22:2769-2776, 2002

学会発表

1. 伊東昌子、ほか。アルファカルシドールの骨梁構造に及ぼす作用特性の検討 —アルファカルシドールはエストロゲン欠乏による骨梁構造の脆弱化に対してアナボリック作用を示し骨強度の増強に寄与する— 第20回日本骨代謝学会

2. 西田暁史、伊東昌子、ほか。不動化およびエストロゲン欠乏ラットの骨梁構造に対するエチドロネートの治療効果 第20回日本骨代謝学会

3. 有田 忍、伊東昌子、ほか。卵巣摘除ラットの hPTH(1-34)間歇投与による腰椎骨強度の回復は皮質骨量の増加に依存する 第20回日本骨代謝学会

4. 白石綾子、伊東昌子、ほか。骨粗鬆症病態モデルラットにおけるアルファカルシドールの薬理効果と経口的カルシウム負荷

との作用比較 第20回日本骨代謝学会

5. S. Arita, M Ito, et al. Intermittent hPTH administration increase bone strength in rat lumbar vertebral body after ovariectomy with cortical bone mass increase Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

6. A. Shiraishi, M Ito, et al. Pharmacological efficacy of alfacalcidol for the treatment of osteoporosis is not achieved by the use of a calcium supplement Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

7. M. Ito, et al. Anabolic effect of active Vitamin D3 analog, alfacalcidol, is strongly related to bone strength through thickening of transverse trabeculae Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

8. A. Nishida, M Ito, et al. Effect of etidronate on three-dimensional trabecular structure of ovariectomized or immobilized rats Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

9. M.M. Hurley, M Ito, et al. The anabolic effect of parathyroid hormone is impaired in bones of Pgf2 Null mice Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

10. M. Ito, et al. Anabolic effect of active Vitamin D3 analog, alfacalcidol, is strongly related to bone strength through thickening of transverse trabeculae Th24 Annual Meeting of American Society of Bone Mineral Research

11. 西田暁史、伊東昌子、ほか。老齢卵巣摘出ラットに対するアルファカルシドール、アレンドロネートおよびその併用療法の骨梁構造に対する治療効果 第4回日本骨粗鬆症学会

12. 菱谷彰徳、伊東昌子、池田恭治、渡辺研: Ataxia Telangiectasia Mutated (Atm) ノックアウトマウスにおける骨形成の低下をともなう骨量減少 日本骨代謝学会第20回年会 岡山 7月25日—27日

13. Hishiya A, Ito M, Ikeda K, Watanabe K: Decreased bone formation in ataxia telangiectasia mutated (ATM) knockout

mice. The 24th annual meeting, Am. Soc.
Bone Miner. Res., San Antonio, USA,
September 20-24, 2002

14. Ikeda K: Mode of action of alfacalcidol
versus plain vitamin D on bone remodeling and
bone quality, World Congress on Osteoporosis,
Lisbon, May 10-14, 2002

長寿科学総合研究事業：骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療の確立に関する研究
分担研究報告

骨粗鬆症における骨密度変化の個人差に関する研究

分担研究者 白木正孝 成人病診療研究所所長

研究要旨

骨粗鬆症治療への反応性には個人差があり、その反応の大小は長期の治療継続でも一貫した反応を示す。この反応が骨粗鬆症治療として有効であるか否かを判定するための基準を作成した。結果的に基準値は測定機器の精度からみた基準かまたはある治療への反応のばらつきからみた基準を採用するのが適切と考えられた。これらの基準により判定した有効、無効の結果に寄与する因子がいくつか抽出されたが、いずれも合理的であった。

A. 研究目的

骨粗鬆症は老年期女性を主としておかす退行期疾患であるが、その病因は多様であり、多因子疾患であると考えられている。ゆえに、骨粗鬆症診療に当たっては、第一に当該患者の病態を詳細に考察し、病態に見合った治療を行わなければならない。このことが骨粗鬆症診療の第一の Tailoring であると考えられる。この第一の tailoring に関しては、カルシウム代謝調節系の状態を把握したり、骨代謝回転の状態を検討したり、また既存骨折の有無を検査することで、ある程度将来の骨折危険性を予知することができるようになってきてい

る。骨粗鬆症診療における第二の tailoring は治療後の反応を見極める

点にある。この点において我が国の骨粗鬆症治療はいまだに tailoring が行われていない。通常、治療の反応性は骨密度の推移で判定するか、もしくは骨代謝マーカーの反応性で評価するが、それらのいずれも、どの程度変動すれば有意な治療効果として認識しうるかの検討がない。従って、今回、我々は骨密度の推移における個人差の問題をとりあげ、無治療例の骨密度推移からみて、どの程度の治療反応性が確保されれば、当該治療が有効とみなしうるか、という点を検討することにした。

治療反応性に包含される事象として考えられるのは患者の服薬コンプライアンスおよび、当該薬剤が患者体内に取り込まれ、代謝変化を起こし、結果的に骨粗鬆症に代表的な表現型の

変化を起こすまでの全代謝過程の個人差であるといえる。問題はこの代謝過程の個人差をどのように予知するかであり、この予知因子として現在考えられているのは、投薬前代謝状態や代謝過程に含まれる種々の遺伝子多型などが期待されている。

これら期待される因子は存在するものの、それら因子の治療反応性に寄与する程度を評価する際に、どの程度の治療反応性をもって有効とし、どの程度を無効とするかの判定基準が存在しないため、各薬剤の評価が困難であるばかりでなく、反応に影響を与える因子の解析もまた統一された基準で行われていない。

今回我々は骨粗鬆症の表現型のなかでも代表的なものである骨密度の推移を評価基準として、この推移における個人差を検討し、さらにどの程度の変動が治療有効性を示しうるかを検討した。

B. 研究方法

1. 骨密度推移の個人差の評価: 骨密度推移に個人差があるとすれば、その変化量や変化率はある個人で一定の幅のなかに収束するものと考えられる。従って、骨密度変化を経年的に追求し、各年度の変化率が常にある個人で一定の値をとるか否かを検討することにした。閉経後女性を対象として、無治療群、治療群に分類し、3年間の経過観察を行い、各年

度の変化率と次ぎの年度の変化率の相関関係を調査した。

2. 骨密度変化に対する薬剤効果の有効性の検定: ある薬剤を骨粗鬆症に応用した場合、その反応を有効とするか無効とするかの基準はいくつかの基準が考案できる。即ち、無治療群の変動に比べ、それを凌駕していれば有効と考える考え方と、もう一方ではある薬剤の一般的な反応を十分なサンプル数で検討し、その分布のなかで有効、無効を判定するという方法である。この二つの方法のうちいずれがより病態の差による反応性の差をより合理的に示しうるかを検討した。

C. 研究対象

研究対象は成人病診療研究所骨粗鬆症骨折予防長期介入試験 (Research Institute and Practice for Involutional Diseases Osteoporosis Fracture Interventional Study: RIPID-OFIS) に登録された 3024 名の女性対象者(1993-2003 一月現在)から、閉経後女性で一年以上腰椎骨密度の経過が観察されているもの 1641 例を選択し、解析対象とした。

D. 結果

1. 椎骨密度変化の個人差について: 図1および2に無治療で3年間腰椎骨密度の推移を観察した閉経後女性例の0-1年度の変化率(%1Y)と1-2年度の変化率(%2Y)の相関(図1)および同様に2-3