

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

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
—骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定—

分担研究者 浦野友彦 東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座

研究要旨 臨床において積極的な骨形成促進薬は開発されていないことは骨粗鬆症治療の多様性を制限しており、テーラーメイド医療を確立するためにも重要な問題である。そこで本研究では DNA チップを用いて骨芽細胞における骨形成制御因子を新たに同定することを行った。さらに骨形成に関与する遺伝子に存在する SNP と骨量の関連を検討することにより、骨形成を主眼においた新規遺伝子マーカーを検索した。前者においてはエストロゲンからエストロゲン受容体を介した骨芽細胞増殖応答遺伝子としてサイクリン D2 とサイクリン D3 を同定した。後者においては近年注目されている Wnt- LRP 経路における key regulator である LRP5 遺伝子上に存在する SNP を骨量を規定する遺伝子マーカーとして同定した。来年度以降、この手法を発展、応用することにより骨形成に主眼をおいた骨粗鬆症でのテーラーメイド医療の確立を目指す。

A. 研究目的

骨粗鬆症とそれに伴う骨折は高齢者が寝たきりとなる主要な原因であり、老人医療において重要な問題として知られている。この治療においては積極的に骨芽細胞の機能を制御し、骨形成を亢進させて骨量増加作用をおこすことが理想ではあるが現在まで強力な骨形成促進薬は存在していない。しかしながら、*in vitro* で骨芽細胞の分化、増殖を制御するサイトカインや内分泌ホルモンは複数存在することから、これらの下流シグナルを詳細に検討、解明することは骨粗鬆症の病態解明、ひいては骨形成を主眼においたテーラーメイド医療の確立において最も重要なステップであると考えた。

エストロゲンは内分泌ホルモンとして骨代謝に関与していることは知られており、この

ホルモンの欠落が女性での骨粗鬆症の大きな要因であることは周知の事実である。特に骨吸収に関してはエストロゲンが破骨細胞の機能を抑制することによりその作用を制御することが *in vitro*、*in vivo* において明らかにされてきた。その一方でエストロゲンの作用を媒介するエストロゲン受容体(ER)はそのサブタイプである ER α ならびに ER β の両者が破骨細胞ばかりでなく骨芽細胞にも存在することが示されている。このことはエストロゲンが骨芽細胞においても増殖と分化の制御を行っていることを示唆させる。しかしながらその下流シグナルに関しては未だ十分な検討がなされていなかった。そこでこの下流に位置するシグナル伝達を解明することがエストロゲンをモデルとした内分泌ホルモンによる骨形成制御の解明において最も重要な研究と考

え、その応答遺伝子の探索を DNA チップ法を用いて行った。

また近年、脊椎動物のシグナル伝達においては Wnt シグナル伝達経路が様々な細胞の増殖と分化を制御していることが明らかにされており重要視されてきた。特に骨芽細胞における骨形成のシグナル伝達においては Wnt に対するレセプターとして機能する LRP5 が注目されてきた。そこで本研究ではこの LRP5 の遺伝子多型が骨量に与える影響に対して検討を加えた。

B. 方法

1, エストロゲン受容体低応答性ラットを利用した骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の検索

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べ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。

2, LRP5 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響

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 との関連を検討した。

C. 研究結果

1, エストロゲン受容体低応答性ラットを利用した骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子の検索

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。

この時の遺伝子変化を検討するため表 1 のように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た。この中からサイクリン D2 に注目した(表 1、下線)。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。

2. LRP5 の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響

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種類ずつ存在していた。

D. 考察

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。

E. 結論

本年度は ER を介した骨形成制御の応答遺伝子としてはサイクリン D2 ならびにサイク

リン D3 を同定した。今回同定された遺伝子に関しては来年度以降はそのゲノム上における SNP が骨量に与える影響に関して検討を加える。LRP5 において今回、骨量に影響を与えることが明かとなった SNP に関しては前述したように薬剤応答性との関連を検討する。以上より骨形成でのシグナル伝達を通じて、骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療の確立を目指してゆく。

F. 研究発表

1. 論文発表

【英文原著】

1. Urano T, Saito T, Tsukui T, Fujita M, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S: Efp targets 14-3-3sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth. *Nature* 417, 871-875, 2002
2. Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsui O, Ouchi Y, Inoue S: Estrogen activates cyclin-dependent kinases 4 and 6 through induction of cyclin D in rat primary osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 299, 222-228, 2002
3. Jin GB, Inoue S, Urano T, Cho S, Ouchi Y, Cyong JC: Induction of anti-metallothionein antibody and mercury treatment decreases bone mineral density in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 185, 98-110, 2002

2. 学会発表

1. 浦野友彦、齊藤智之、大内尉義、井上聡：[YIA 受賞]エストロゲンによる乳癌細胞の増殖機構における estrogen-responsive finger protein の役割 (2002.6.28-30) 第 75 回日本内分泌学会 (大阪)

2. 浦野友彦、藤田雅代、細井孝之、長幡武光、岩崎公典、江見充、大内尉義、井上聡：[優秀ポスター賞] 骨芽細胞老化に伴う TGFβ1 応答性低下における分子機構の解析 (2002.7.25-27) 第 20 回日本骨代謝学会 (岡山)

星野眞二郎、浦野友彦、関根絵美子、白木正孝、井上聡、大内尉義：骨粗鬆症未病者における骨形成に関わる遺伝子解析の応用 (2003.1.11-12) 第9回日本未病システム学会 (佐賀)

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

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

分担研究者 池田恭治(長寿医療研究センター 老年病研究部長)

研究要旨 活性型ビタミンDは、転写因子であるビタミンD受容体(VDR)との結合を介して腸管からのカルシウム吸収に必須のホルモンであるが、間接的あるいは直接的に骨の細胞機能を調節している。活性型ビタミンDはわが国でもっとも頻繁に内服されている骨粗鬆症治療薬でありながら、その作用メカニズムには不明の点が多く、薬効の基盤となる標的遺伝子群の同定や治療の個別化・適正化も遅れている。本研究では、VDR ノックアウトマウスと正常マウスの十二指腸粘膜由来 RNA の DNA チップを用いた発現解析から、カルシウム吸収作用を及ぼすにあたって VDR によって制御される 10 数個の遺伝子を同定した。また、骨吸収の著名な亢進から骨粗鬆症を呈する OPG ノックアウトマウスを用いて、活性型ビタミンDが骨吸収を抑制することによって骨量を増加させること、さらにその標的細胞は破骨細胞の前駆細胞で、c-Fos タンパク質のレベルを低下することによって破骨細胞の分化を抑制することを明らかにした。腸管において VDR の下流で働く遺伝子群や c-Fos は、活性型ビタミンD治療に対する反応性を規定する遺伝的要因の候補であると考えられる。

A. 研究目的

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的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。

B. 方法

1. 動物: 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。

2. Gene chip による遺伝子発現解析: 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.2 (Amersham 社)である。

3. 活性型ビタミン D の破骨細胞形成抑制作用: 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。

さらに、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。

C. 結果と考察

1. ビタミン D による腸管カルシウム吸収に関わる遺伝子群: 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 がい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。それらは、gap junction membrane channel protein beta 1: connexin 32 をコードし、Charcot-Marie-Tooth 病の原因遺伝子でもある。VDR KO で 22 倍低下し、OVX でも 7 倍低下した。troponin I, skeletal, slow 1: VDR KO で 12 倍低下し、OVX でも 6 倍低下した。cathepsin C: lysosomal protease で、VDR KO で 18 倍低下した。epoxide hydrolase 1, microsomal: xenobiotic 酵素で、VDR KO で 70 倍低下した。histocompatibility 2, class II, locus Mb1:

VDR KO で 20 倍低下した。

fibroblast growth factor regulated protein: aldo-keto reductase family 1 と呼ばれるもので、VDR KO で 28 倍、OVX でも 41 倍、middle age でも 5 倍低下した。

"Cluster Incl AJ242830: Mus musculus HemT gene, exons 1-3: GPI アンカーの膜分子で、VDR KO で 15 倍、OVX で 11 倍、middle age でも 4 倍低下した。

"Cluster Incl AF010405: HNF-3/forkhead homolog 1 like: Foxq1 と呼ばれる転写因子で、VDR KO で 31 倍、OVX でも 4 倍低下した。

"Cluster Incl AL078630: Mus musculus genomic DNA sequence from clone 573K1 on chromosome 17. Contains the gene for gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1, five 7 transmembrane receptor (rhodopsin family, olfactory receptor like) protein genes and one p": いくつかの遺伝子を含んでいるので、遺伝子は特定できないが、VDR KO で 12 倍、OVX で 7、middle age で 6 倍の低下が見られた。

claudin 2: tight junction の構成要素で、VDR KO で 14 倍低下していた。

ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1: Tangier 病の原因遺伝子で、コレステロールの細胞外への輸送に関わり、CERP (cholesterol efflux regulatory protein) と呼ばれる。VDR KO で 15 倍、OVX で 15 倍の低下が見られた。

pancreatic and duodenal homeobox gene 1: insulin promoter factor 1 あるいは PDX1 と呼ばれる膵臓におけるインスリン発現に必須の転写因子で、VDR KO で 20 倍、OVX でも 4 倍の低下が見られた。

granzyme C: 活性化 T 細胞などで発現する serine protease で、VDR KO で 25 倍の低下が認められた。

calbindin-D9K: すでに VDR 依存的に転写が活性化されることが知られているカルシウム結合タンパク質で、VDR KO で 12 倍、OVX でも 3 倍の低下が確認された。今回の

遺伝子発現解析結果の妥当性を証明する結果と考えられる。

今後は、以上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。

2. ビタミン D による骨吸収抑制効果とその作用メカニズム: 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、著名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 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の効果を調べた。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、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ はこれを用量依存的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。

D. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

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

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

F. 知的所有権の取得状況
特許取得
なし

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

2. 実用案登録
なし
3. その他
なし

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 δ -deficient mice: possible implication for the pathogenesis of immotile cilia syndrome. **Mol Cell Biol** 22:2769-2776, 2002

D. 結論

骨粗鬆症治療の個別化を遺伝子多型性の観点から解析するためのシステムが構築された。

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。

2. 学会発表

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

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., Sam Antonio, USA, September 20-24, 2002

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

厚生労働省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)

分担研究報告書
統計手法の基礎的検討

分担研究者 大橋靖雄 東京大学医学系研究科教授

研究要旨：骨折データ解析のための統計的方法論の基礎的検討を行った。骨折は画像によって判定され、1. 画像撮影の間にイベント発生があったか否かの区間打ち切りの形でデータが得られる。また、2. 時間とともに変動するパラメータであり誤差が伴う骨量を、リスク因子としてどう評価するかが問題となる。3. 複数骨折の評価についても、合意を得た標準的解析法は存在しない。これらについて、1については区間の中点でイベント発生とする近似法とEMアルゴリズムの比較を行い、臨床試験のように測定間隔が揃っている場合には近似でも十分なことを示した。2についてはリスク因子の変動パターンに関数を当てはめる方法(変量モデル)の検討を行い、これが有効であることを示した。3については複数の方法の比較を行い、ポアソン回帰が有効であることを示した。

A. 研究目的

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生した、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。

B. 研究方法

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（生存時間を区間の中点で

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س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. 研究結果

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。

	全データ		2回再発時点で脱落	
	バイアス*	MSE	バイアス*	MSE
1回目再発までのCox回帰	-0.002	0.049	-	-
AGモデル	0.044	0.014	0.007	0.026
PWP-Tモデル	-0.063	0.038	-0.034	0.042
PWP-Gモデル	0.007	0.017	0.005	0.027
WLWモデル	-0.162	0.076	-0.054	0.048
LWAモデル	0.001	0.017	-0.011	0.030
GEEモデル③	0.046	0.014	0.019	0.025
ポアソン回帰	0.044	0.016	0.024	0.025

表：[設定1]のシミュレーション結果

D. 考察

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が

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、臨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。

E. 文献

Watanabe H, Fukunaga M, Ohashi Y :
Model-fitting and Prediction of Bone

Mineral Density in Postmenopausal Women
Using an Exponential-type nonlinear
Mixed-effect Model. Japanese Journal of
Biometrics 2001 ; 22 (1&2) : 15-35.

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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 SepOct; 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 hyperparathyroid-ism: 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 postmeno-pausal women. *Menopause*. 2002 Jan-Feb;9(1): 58-64.
14. Hiroshi Jinnai, Masako Ito, et al. Surface Curvatures of Trabecular Bone Microarchitec-ture *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. Komukai S, Ohta H, Makita K, Yanamoto S, Takamatsu K, Okano H, Yajima M, Nozawa S One-Year Spinal Bone Change in Pre- and Perimeno-pausal 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まなう骨量減少 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., Sam 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