

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 細井孝之

平成15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	骨粗鬆症の薬物療法による骨折予防 QOL 低下予防における個人差に関する研究	
	堀内敏行 - - - - -	11
2	骨粗鬆症治療薬に対する反応性決定遺伝子の探索	
	井上 聡 - - - - -	15
3	骨粗鬆症治療薬反応性決定遺伝子スクリーニング解析	
	白木正孝 - - - - -	21
4	体系的 SNP 解析に基づく骨粗鬆症の治療薬感受性に関する遺伝的要因の解明	
	江見 充 - - - - -	25
III	研究成果の刊行に関する一覧表 - - - - -	33

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、臨床データベースをもとに骨粗鬆症治療薬に対する反応性の個人差とその臨床的決定要因を検討した。また、従来の研究から掲げられた候補遺伝子の多型性と骨粗鬆症治療薬の効果との関連を解析するとともに、体系的SNPsの中から、治療効果と関連のある遺伝子をスクリーニングし、あらたな候補遺伝子を抽出した。さらに *in vitro* の系を用いて骨粗鬆症治療薬に反応して変動する遺伝子群を明らかにした。

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、ヒスホスホネート製剤、イプリフロン、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かできれば、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か期待される。

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、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か期待される。本年度はこれまでに作成した臨床データベースをもとに骨粗鬆症治療薬に対する反応性の個人差とその臨床的決定要因を検討した。また、従来の研究から掲げられた候補遺伝子の多型性と骨粗鬆症治療薬の効果との関連を解析するとともに、体系的SNPsの中から、治療効果と関連のある遺伝子をスクリーニングし、あらたな候補遺伝子を抽出した。さらに *in vitro* の系を用いて、骨粗鬆症治療薬に反応して変動する遺伝子群を明らかにした。

B 研究方法

1 骨粗鬆症の薬物療法による骨折予防 QOL 低下予防における個人差に関する研究 対象 東京都老人医療センター骨粗鬆症外来高齢骨粗鬆症71名（男性2名）、平均年齢71歳。平均BMI21.3kg/m²。これらの患者に骨折予防目的で投与されたヒスホスホネート（タイトロネル、EHDP200mg/日）とαカルシトール（0.5μg/日）での1年間における骨密度が5%増加した群と5%未満群両群間での、カルシウム調節ホルモン、骨代謝マーカー、喫煙、アルコール摂取、散歩などの日常の運動といった因子の差について検討した。

各項目は以下の方法で測定した。1) 腰椎骨密度（DXA法）をルナーIQを用いて測定。2) カルシウム調節ホルモン、PTHはIRMA法、1,25(OH)₂DはRIA法にて測定。3) 骨代謝マーカーは、1) 骨形成マーカー、骨型アルカリ

フォスファターゼ (BAP) は EIA、オステオカルシンは IRMA、II) 骨吸収マーカー、尿中デオキシピリシノリン (DPD)、I 型コラーゲンテロペプチド (NTx) は共に EIA 法で測定した。4) 喫煙、アルコール摂取、運動量は質問にて行った。5) QOL 評価は、我々が独自に、脊椎圧迫骨折患者からのキーワードから作成した高齢者かつ骨粗鬆症に特異的な QOL 質問票 (EOQOL) を用いた。質問票は、痛み、室内動作制限、室内移動、気分、転倒骨折不安、生理的活動、義務的活動、自由時間の 8 つの項目で構成された。QOL の良いほうが高得点句点となるようにリッカートスケールにした。脊椎圧迫骨折患者にエルカトニン投与し、その前後での QOL の変化をみた。

2 骨粗鬆症治療薬に対する反応決定遺伝子の探索 ① 骨芽細胞におけるサイトカイン応答遺伝子の探索、初代培養骨芽細胞に TGFβ 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 0 分に採取した RNA に比して 30 分、60 分、120 分後に共通して上昇する遺伝子、ならびに 0 分に採取した RNA に比して 60 分、120 分後に共通して上昇する遺伝子をリストアップした。② 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の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 DNA チップ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。その結果、得られた遺伝子に関して、ノザン法、ウエスタン法を用いて、発現調節を確認した。一方、野生型の初代培養骨芽細胞をもちいて、エストロゲンかその増殖能、細胞周期調節因子とその生理活性にもたらす影響を生化学的に解析した。

3 骨粗鬆症治療薬反応性決定遺伝子スクリーニング解析、研究対象は成人病診療研究所骨粗鬆症長期介入試験 (RIPID-OFIS) に登録した 3024 例の女性集団より、各種遺伝子多型解析が行われた 982 例の閉経後女性である。各症例からは遺伝子解析および骨代謝の調査に関する文書による同意を取得しており、研究計画は成人病診療研究所倫理委員会において審査、承認を取得

している。表 1 には本研究の対象症例の背景について示した。また表 2 には本研究において行われた治療方法別に検討した遺伝子多型を一覧した。

表 1 症例背景

項目	平均±SD
年齢 (才)	64.3±9.9
体重 (Kg)	49.6±7.7
身長 (cm)	150.1±6.3
閉経後期間 (年)	15.62±10.1
平均腰椎骨密度 (g/cm ²)	0.852±0.176

表 2 治療方法と遺伝子多型 (例数)

治療法	ER	Apo E	VDR	PTH
No	170	202	202	167
CEE	62	75	82	61
BP	83	117	94	83
VD3	111	129	122	110
VK2	64	118	73	64

ここで ER は Pvu 多型と Xba 多型を、Apo E は ε 2、3、4 を、VDR は Bsm 多型と Apa 多型を、また PTH は Bst 多型と Dra 多型をそれぞれ検討した。

4 体系的 SNP 解析に基づく骨粗鬆症の治療薬感受性に関する遺伝的要因の解明 5 種類の骨粗鬆症治療薬 (ヒタミン K、ヒタミン D、エストロゲン、エチドロネート、アレントロネート) による単独治療をおこない、インフォームドコンセントを取るとともに臨床経過を辿ることの出来た骨粗鬆症患者 297 例の末梢血液白血球からゲノム DNA を調整した。これらの検体の身体検査、血液検査、骨密度測定値、それぞれの治療薬に対する応答性についてデータベース構築を行い、J-SNP データベースから選択された 50 SNP について、患者群 192 検体の SNP タイピングを行った。解析した SNP は、全ゲノムにわたりほぼ均一に選ばれた日本人の SNP データベース (J-SNP) に登録された約 17 万 SNP の中から 特に遺伝子の翻訳領域でアミノ酸置換をとまなうものと、遺伝子上流約 2Kb までの調節領域に存在するものに限って抽出された約 2,000 SNP の中で、我々が既に収集した一般日本人のスクリーニング用検体 384 例で骨密度との相関解析を行い、年齢および肥満指数で補正した橈骨骨密度値と有意な相関を示した 50 SNPs を選択した。タイピング法は原則としてインベーター法® (Third Wave 社) を用いて行い、場合によりわれわれの開発・改良をおこ

なったアレレル特異的 PCR 増幅法 (Sd-PCR 法) を利用した。多型頻度を用いた応答者対非応答者間の関連性解析、または薬剤応答性を段階的に評価したスコアをもとにおこなうロジスティック回帰分析によって 骨粗鬆症および骨量減少抑制または骨形成促進・カルシウム代謝改善に作用する 5 つの骨粗鬆症治療薬の応答性を左右する複数の感受性遺伝子候補を同定する試みを行った。

1. 結果と考察

1 骨粗鬆症の薬物療法による骨折予防 QOL 低下予防における個人差に関する研究 1)EHDP の腰椎骨密度に対する効果、腰椎骨密度が 5% 以上増加群では、5% 未満に較べて投与前の腰椎骨密度が有意に低かった。また骨吸収マーカーの DPD の変化率が大きかった。2)アルファカルシトロールの効果、EHDP 同様に 5% 以上増加群と 5% 未満群を比較したところ、増加群は、未満群に較べて、飲酒期間が短く、体操する頻度が多いなどの点が明らかとなった。3) エルカトニンの QOL への効果、①痛みでは、エルカトニンの投与にて 1.4 点から 2.1 点に増加、②室内動作制限は 1.0 点から 1.3 点に、③室内移動は 6 点から 1.1 点に ④気分は 1.2 点から 2.5 点に、⑤転倒骨折不安では 6 点から 1.1 点に ⑥生理活動では変化なし、⑦義務的活動も変化なし、⑧自由時間は 7 点から 1.0 点となった。

2 骨粗鬆症治療薬に対する反応決定遺伝子の探索 ①初代培養骨芽細胞における TGFβ 応答遺伝子の検索、分担研究者井上は TGFβ による骨芽細胞の細胞増殖においてシグナル伝達における最終段階である細胞周期制御因子変化を誘導することを明らかにしてきた。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 を用いてマイクロアレイ法により TGFβ 応答遺伝子の探索を行った。時間経過を追って、再現性の高いデータを得ている。これらのうち smad2 ならびに smad3 をはしめとする 10 個の遺伝子は既に TGFβ 応答遺伝子として報告のある遺伝子であった。このことはこの実験系において TGFβ 下流シグナルがオンになっていることを示す positive control として重要であり、実験の確実性を示す指標ともなる。興味深いことに、GAS6, TRAIL, LIGHT, Adrenomedullin といった細胞増殖や分化に関

与する液性因子が多く含まれていた。②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 DNA チップを用いて行い、発現変化のある遺伝子をリストアップした。トランスジェニッククラット頭蓋骨由来の初代培養骨芽細胞は野生型に比して 増殖能が損なわれていた。リストアップした遺伝子のうち cyclinD2 に注目した。サイクリン D2 は細胞周期の止の進行役として 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時にサイクリン 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、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。このように骨芽細胞における TGFβ 応答遺伝子の探索を行ったか、興味深いことに TGFβ 応答遺伝子中には多くのサイトカイン 液性因子が含まれていた。このことは TGFβ が様々なサイトカインとのクロストークを介してそのオートクライン、パラクラインの効果により骨芽細胞自身ならびに破骨細胞に影響を及ぼし、骨のモテリング、リモテリングに影響を及ぼしていることが示唆された。今回明らかになった TGFβ 応答性のサイトカイン、液性因子である、TRAIL、LIGHT、GAS6、Adrenomedullin が骨芽細胞や破骨細胞に与える影響を探求することは TGFβ による骨形成ならびに骨リモテリングの分子機構の解明に重要であると考えられる。

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 D3 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 TGFβ 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テ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、治療反応性予測から見た薬剤選択法の開発へのよい指標となる。

3 骨粗鬆症治療薬反応性決定遺伝子スクリーニング解析, 各治療方法により腰椎骨密度変化率は大きく異なっていた。無治療群の腰椎骨密度変化率におよぼす遺伝子多型の効果は4候補遺伝子の genotype 別にみた骨密度減少率はいずれの遺伝子型においても差を認めなかった。一方、VDR 遺伝子型を Apa I 多型と Bsm I 多型のくみあわせから AB, Ab, ab の三群に分類し、それぞれの群の活性型ビタミン D₃ 治療に対する骨密度反応を比較した。全体として ab 群は他群に比へ反応が良好な傾向を得た。例えば治療一年後の骨密度は前値に比へ、ab 群では $17 \pm 0.6\%$ 増加したのに対し、AB 群は $0.6 \pm 0.9\%$ 、Ab 群は $-0.8 \pm 0.9\%$ であり、ab 群は Ab 群に比へ有意 ($p=0.0242$) に高値であった。この傾向は治療かより長期におよんでも同様であった。その他の候補遺伝子と活性型ビタミン D₃ 治療反応性との間には有意の関連はみいだせなかった。

ビタミン K₂ 治療は一般的には骨密度増加効果を伴わず骨折予防効果を示すと考えられている。しかし、治療後の骨密度はある程度維持されるので、まったく骨密度効果かないとはいえない。今回の検討では Apo E 遺伝子多型とビタミン K 治療反応との間に一定の関連を見出した。すなわち、Apo E $\epsilon 4$ を一つでももつ骨粗鬆症例はこれをもたない例に比へ明らかに骨密度減少速度が早かった。この関係には時間依存性があり、治療期間が延長するほどこの傾向は強まった。Apo E は血中でビタミン K の結合白であると考えられており、細胞内への移行段階で Apo E 多型により LRP への結合が変化するといわれる。Apo E₄ 型は LRP への結合が弱いとされ、従って、この遺伝子型では細胞内へのビタミン K₂ の取り込みが通常の遺伝子型に比へ低いかもしれない。この非効率性は絶対的な異常ではないので、遺伝子型の効果が発揮されるには時間が必要なかもしれない。その他の候補遺伝子とビタミン K₂ 治療効果との間には関連はみいだせなかった。

結合型エストロゲン治療反応性と遺伝子多型。結合型エストロゲン (premarin 0.3125mg/day) の投与により骨密度は顕著に増加するか、この反応性に対し ER genotype の Xba 多型かわすかに影響を与える傾向があったか、有意な影響とはいえなかった。他の遺伝子多型はこの薬剤反応に対し何の影響もなかった。ヒスフォスフォネート製剤の骨密度に対する効果と遺伝子多型との関連についてはエチトロンとアレ

トロンートの骨密度効果に対する遺伝子多型の影響を検討したか、有意な association はみられなかった。今回の検討から、ある種の治療方法の有効性を前もって知るための手段として候補遺伝子の多型解析が有効である可能性が示された。しかし、遺伝子効果は比較的わずかであり、一例、一例の反応性が確実に予測できるほど強固な関連ではなかった。これは今回検討した多型の多くが遺伝情報上のアミノ酸置換を起こすものではなく (Apo E を除いて)、ほとんどが機能的異常を伴わない多型であったことから、これらの遺伝子多型が直接的に治療反応性を決定していないからかもしれない。連鎖不均衡状態にある、他の機能遺伝子多型をさかす努力が必要であると考えられた。また治療反応性を規定する遺伝子 (群) かほかにあるかもしれない。今後とも治療反応性に関与するマーカー遺伝子を探索し、より効率のよい遺伝子をさかす努力も必要と思われた。

4 体系的 SNP 解析に基づく骨粗鬆症の治療薬感受性に関する遺伝的要因の解明 5 種類の骨粗鬆症治療薬の単独療法で経過を追跡して、インフォームドコンセントの得られた 297 名の患者について血液採取およびデータベース構築を完成した。タイピングを行う SNP として、一般人 DNA 検体 384 例で骨密度との相関を認められた 50 個の機能的 SNP を選別した。SNP による関連性解析の手法として前述のごとく多段階検定を考案したか、その初期スクリーニングとして DNA 調整の完了した 192 例分の DNA 検体を使用し、遺伝子型とそれぞれの治療薬に対する治療応答性との相関解析をおこなった。相関解析の結果、有意な相関を示した SNP はエストロゲン治療応答に 1 SNP、ビタミン D 治療応答に 3 SNP のみであった。

単一薬剤で治療を受けた骨粗鬆症患者の DNA 調整および治療経過のデータベース構築は、約 297 名分を完成したか、目標とした 1,000 例には達しなかった。検討する SNP の選択については、骨密度との相関の示された 50 個の SNP を選択したか、治療経過との相関解析により、有意な相関を示した SNP は 4 個であった。その理由として薬剤感受性の相関解析に利用してきた検体数の不足により相関解析の検出力が十分でなかったかもしれない。今後、症例の蓄積により検体数を追加することで、より検出力の高い解析を計画したい。また検討する SNP

の選出方法を薬物代謝経路に関連した遺伝子群から選択することも検討したい。今後計画されるべき、網羅的な SNP のタイピングとこれら SNP の相関の再現性、さらにそれぞれの薬剤応答性における機能的意義と相互作用について検討を考えていく必要がある。

感受性遺伝子の存在する候補染色体領域の特定化をマイクロサテライトマーカーのタイピングを用いる同胞対連鎖解析法も考慮される。感受性遺伝子領域の特定により、領域内の候補遺伝子群についてさらに多数の遺伝子多型を同定し、それらを用いた症例対照関連性解析により、複数の疾患感受性遺伝子を追加して同定することか出来るかもしれない。有力な疾患感受性遺伝子多型・変異については細胞実験動物レベルでの解析を導入することにより、骨代謝および薬剤作用機序における機能的意義を解明し、種々の薬物療法等に対する治療効果予測法の開発と、新規ドラッグターゲットの開発に役立つ情報を確立したい。

D 結論

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、臨床データベースをもとに骨粗鬆症治療薬に対する反応性の個人差とその臨床的決定要因を検討した。また、従来の研究から掲げられた候補遺伝子の多型性と骨粗鬆症治療薬の効果との関連を解析するとともに、体系的 SNP s の中から、治療効果と関連のある遺伝子をスクリーニングし、あらたな候補遺伝子を抽出した。さらに *in vitro* の系を用いて、骨粗鬆症治療薬に反応して変動する遺伝子群を明らかにした。

E 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。

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 Horiiuchi 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 Iwasaki, H, Ezura, Y, Ishida, R, Kodaira, M, Kajita, M, Knight, J, Daniel, S, Shi, M, Emi, M Accuracy of Genotyping for Single Nucleotide Polymorphism Typing Method Involving hybridization of Short Allele-Specific Oligonucleotides DNA Res 2002, 9 59-62
 - 15 Takada, D, Emi, M, Nobe, Y, Kawamura, K, Ino, Y, Katayama, Y, Xin, Y, Wu, LL, Larringa-Shum, S, Stephenson, SH, Hunt, SC, Skolnick, MH, Lalouel, JM, Hopkins, PN Interaction between the LDL-receptor gene bearing a novel mutation and a variant in the apolipoprotein A-II promoter Molecular study in a 1135-member familial hypercholesterolemia kindred J Hum Genet 2002, 47 656-664
 - 16 Yoshida, S, Harada, H, Nagai, H, Fukino, K, Takahashi, H, Teramoto, A, Emi, M Head-to-head Juxtaposition of Fas-Associated Phosphatase-1 (FAP-1) and c-Jun NH2-terminal Kinase 3 (JNK3) genes genomic structure and five polymorphisms of FAP-1 gene J Hum Genet 2002, 47 614-619
 - 17 Shimizu, M, Kosaka, N, Shimada, T, Nagahata, T, Iwasaki, H, Nagai, H, Shiba, T, Emi, M Universal Fluorescent Labeling (UFL) Method for Automated Microsatellite Analysis DNA Res 2002, 9 173-178
 - 18 Takada, D, Ezura, Y, Ono, S, Iino, Y¹⁾, Katayama, Y, Xin, Y, Wu, LL, Larringa-Shum, S, Stephenson, SH, Hunt, SC, Hopkins, PN, Emi, M Apolipoprotein H Variant Modifies Plasma Triglyceride Phenotype in Familial Hypercholesterolemia A molecular study in an eight-generation hyperlipidemic kindred J Atherosclerosis, Thrombosis 2003, 10 (in press)
 - 19 Hattori, H, Nagano, M, Kawamura, K, Ishii, J, Tsuji, M, Iwata, F, Yamamura, T, Miyake, Y, Egashira, T, Okada, T, Cooper, J A, Miller, NE, Emi, M, Yamamoto, A A Flow Cytometric Procedure to Measure Functional LDL Receptors for Diagnosis of Familial Hypercholesterolemia Atherosclerosis Risk Factors, Diagnosis, and Treatment 2002, 1 357-363
 - 20 Tsuneizumi, M, Nagai, H, Harada, H, Kazui, T, Emi, M A highly polymorphic CA repeat marker at the EBAG9/RCAS1 locus on 8q23 that detected frequent multiplication in breast cancer An Hum Bio 2002, 29 457-460
 - 21 Shinohara, Y, Ezura, Y, Iwasaki, H, Nakazawa, I, Ishida, R, Nakajima, T, Kodaira, M, Kajita, M, Shiba, T, Emi, M Three TNF α single nucleotide polymorphisms in the Japanese population An Hum Bio 2002, 29 579-583
 - 22 Hattori, H, Hirayama, T, Nobe, Y, Nagano, M, Kujiraoka, T, Egashira, T, Ishii, J, Tsuji, M, Emi, M Eight Novel Mutations and Functional Impairments of the LDL Receptor in Familial Hypercholesterolemia in the North of Japan J Hum Genet 2002, 47 80-87
 - 23 Harada, H, Yoshida, S, Nobe, Y, Ezura, Y, Atake, T, Koguchi, T, Emi, M Genomic Structure of the Human NLK (nemo-like kinase) Gene and Analysis of its Promoter Region Gene 2002, 20, 175-182
 - 24 Nakajima, T, Jorde, BL, Ishigami, T, Umemura, S, Emi, M, Lalouel, JM, Inoue, I Nucleotide Diversity and Haplotype Structure of the Human Angiotensinogen Gene in Two Populations Am J Hum Genet 2002, 70 108-123
 - 25 Fujiwara, H, Emi, M, Nagai, H, Nishimura, T, Konishi, N, Kubota, Y, Ichikawa, T, Takahashi, S, Shuin, T, Habuchi, T, Ogawa, O, Inoue, K, Skolnick, MH, Swensen, J, Camp, NJ, Tavtigian, Association of common missense changes in ELAC2 (HPC2) with prostate cancer in a Japanese case-control series J Hum Genet 2002, 47 641-648
 - 26 Omasu, F, Emi, M, Ezura, Y, Kajita, M, Ishida, R, Kodaira, M, Yoshida, H, Suzuki, T, Hosoi, T, Inoue, S, Shiraki, M, Orimo, H Association of Genetic Variation of a Gene Encoding a PDZ-LIM Domain Protein, *RIL* Localized in 5q31.1 with low Bone Mineral Density in Adult Japanese Women J Hum Genet (in press)
 - 27 Ishida, R, Ezura, Y, Emi, M, Kajita, M, Yoshida, H, Suzuki, T, Hosoi, T, Inoue, S, Shiraki, M, Ito, H, Orimo, H Association of a

- promoter haplotype (-1542G/-525C) in the Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor-Interacting Protein (I-TRAF) Gene with Low Bone Mineral Density in Japanese Postmenopausal Women Bone (in press)
- 28 Takada, D, Ezura, Y, Ono, S, Iino, Y, Katayama, Y, Xin, Y, Wu, LL, Larringa-Shum, S, Stephenson, HS, Hunt, CS, Hopkins, HP, Emi, M Growth Hormone Receptor Variant (L526I) Modifies Plasma HDL Cholesterol Phenotype in Familial Hypercholesterolemia Intrafamilial Association study in an eight-generation hyperlipidemic kindred Am J Med Genet 2003, (in press)
- 29 Ezura, Y, Nakajima, T, Kajita, M, Ishida, R, Inoue, S, Yoshida, H, Suzuki, T, Shiraki, M, Hosoi, T, Emi, M, Orimo, H Association of molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human vitamin D-binding protein (DBP) gene with postmenopausal bone mineral density J Bone Miner Res 2003, (in press)
- 30 Fujita, Y, Ezura, Y, Emi, M, Ono, S, Takada, D, Iino, Y, Katayama, Y, Bujo, H, Saito, Y Hypertriglyceridemia associated with amino acid variation Asn985Tyr of RP1 gene J Hum Genet 2003, (in press)
- 31 Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi 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
- 32 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 28, 213-223, 2002
- 33 Sugiyama H, Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S Ethnic difference in contribution of alleles of the interleukin-1 receptor antagonist gene to preposition to osteoporosis Geriatric Gerontol Int 2, 87-90, 2002
- 34 Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S Association of amino acid variation (Trp64Arg) in the beta3-adrenergic receptor gene with bone mineral density Geriatric Gerontol Int 2, 138-142, 2002
- 35 Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S Association of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density

〈和文総説〉

- 1) 岩崎公典、江面陽一、江見 充 ケノム研究各論 DNA チップ、マイクロアレイ分子心血管病 2002, 3 (3) 109-114
- 2) 高田大輔、飯野靖彦¹⁾、片山奏朗¹⁾、江見 充¹⁾ (第二内科) 高血圧関連遺伝子は何か成人病と生活習慣病 2002, 32 515-519
- 3) 江面陽一、江見 充 骨粗鬆症のケノム解析 リウマチ科 2002, 28(2) 142-147
- 4) 江面陽一、岩崎公典、石田良太、江見 充 骨粗鬆症の遺伝子解析 遺伝子医学別冊 2003, 265-271
- 5) 折茂肇 (編集代表) ちょっと気になること困った時のアトハイス。9 げかひとい。生涯健康ハントブック。48-49、2002
- 6) 土井賢 西村幸 深井希、小澤直子、萩原康二 松下美加、岩科将虎、今井泰平 七里真義、堀内敏行、平田結喜緒 内科的にコントロールされ、経過観察中の原発巣不明の異所性 ACTH 症候群の一例。ACTH Related Peptide 12,147-153,2002
- 7) 堀内敏行。浅見昌子、高橋麗子 高齢者のケアガイドライン 低栄養 Gerontology 14,382-387 2002
- 8) 堀内敏行、風間広仁、荒木厚、井上潤一郎 腰原康子、折茂肇 糖尿病骨減少症におけるヒタミンK代謝障害。第5回 Vitamin K & Bone 研究会記録集。5, 41-46 2002

〈学会発表〉

(シンポジウム 教育講演)

- 1) 江見 充、江面陽一 骨粗鬆症の体系的 SNP 解析 第 11 回国際医療協力シンポジウム 2002 11 7 東京
- 2) 江見 充 ケノム情報に基づく先端医学の進歩 日本医科大学同窓会学術講演会 2003 2 22 大阪
- 3) Inoue S [Workshop] Differential growth control of cells via multiple estrogen-responsive pathways 12th International vascular biology meeting, Karuizawa, Japan (2002 5 12-16)
- 4) Inoue S [Symposium] Mechanism of Estrogen Action in Breast Cancer and Vascular Cells 5th Vascular Biology Conference, Osaka (2002 8 3)
- 5) Inoue S [Symposium] Role of estrogen responsive RING finger protein in growth control of breast cancer 11th International Congress on Hormonal Steroids and 7th

International Congress on Hormones and Cancer, Fukuoka, Japan (2002 10 21-25)

- 6) Inoue S [Symposium] Estrogen responsive RING finger protein controls breast cancer growth, 2nd International Nuclear Receptor Meeting, Osaka (2003 2 15-16)
- 7) Inoue S [Symposium] Estrogen responsive genes and breast cancer, International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2003, Kanazawa (2003 3 12-13)
- 8) 井上聡 [シンポジウム]エストロゲン受容体とその標的因子の作用メカニズム (2002 6 28-30) 第 75 回日本内分泌学会 (大阪)

(一般演題)

- 1) Ishida, R, Ezura, Y, Yoshida, H, Iwasaki, H, Suzuki, T, Hosoi, T, Inoue, S, Shiraki, M, Orimo, H, Ito, H, Emi, M A Single Nucleotide Polymorphism of Interleukin-1-receptor-associated kinase Associate with Bone Mineral Densities of Adult Women 骨代謝学会 ASBMR (San Antonio) 2002 9 20-24
- 2) Amano H, Suzuki K, Nara A, Takahashi K, Tomita T, Urano T, Inoue S, Yamada S The role of p57^{kip2} gene in bone metabolism American Society of Bone and Mineral Research, San Antonio, Texas, USA (2002 9 20-24)
- 3) Emi, M, Inoue, K, Namiki, T, Carlile, R, Fujiwara, H Association of Common Missense Changes in ELAC2(HPC2) with Prostate Cancer in A Japanese Population Sample 2nd The Showa & University of Hawaii Conference (Hawaii, USA), 2002 10 25
- 4) 長幡武光、清水将史、小坂夏紀、岩崎公典、永井尚生、江見 充 Universal Fluorescent Labeling 法によるマイクロサテライト DNA 分析の自動化 第 12 回 Medical Genetics 研究会 2002 6 20-21 東京
- 5) 高田大輔、江見 充、飯野靖彦、片山泰朗 家族性高脂血症における修飾因子の遺伝的解析 第 12 回 Medical Genetics 研究会 2002 6 20-21 東京
- 6) 小野秀二、江見 充、梅村 敏 家族性高脂血症の表現型に及ぼす ApolipoproteinH の修飾効果 第 12 回 Medical Genetics 研究会 2002 6 20-21 東京
- 7) 石田良太、江面陽一、大益史弘、梶田満子、

白木正孝、井上 聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見 充 Interleukin-1-Receptor-Associated Kinase 遺伝子多型は成人女性の骨密度を規定する 第 12 回 Medical Genetics 研究会 2002 6 20-21 東京

- 8) 江面陽一、石田良太、大益史弘、梶田満子、吉田祥子、白木正孝、井上 聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見 充 コナトトロピン遊離ホルモンのシグナルペプチド遺伝子多型は成人女性の橈骨および腰椎骨密度を規定する 第 12 回 Medical Genetics 研究会 2002 6 20-21 東京
- 9) 大益史弘、江面陽一、石田良太、梶田満子、吉田祥子、白木正孝、井上 聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見 充 Brain Natriuretic Peptide 遺伝子のプロモーター領域 SNP と成人橈骨骨密度値との相関 第 12 回 Medical Genetics 研究会 2002 6 20-21 東京
- 10) 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 骨芽細胞老化に伴う TGF β 1 応答性低下における分子機構の解析 第 20 回日本骨代謝学会 2002 7 25-27 岡山
- 11) 江面陽一、石田良太、大益史弘、梶田満子、吉田祥子、小平美奈、江見 充 骨粗鬆症の体系的 SNP 解析 第 70 回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 12) 梶田満子、江面陽一、石田良太、大益史弘、吉田祥子、小平美奈、江見 充 コナトトロピン遊離ホルモンのシグナルペプチド遺伝子多型は骨密度を規定する 第 70 回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 13) 大益史弘、江面陽一、石田良太、梶田満子、吉田祥子、小平美奈、江見 充 Brain Natriuretic Peptide 遺伝子のプロモーター領域 SNP と成人橈骨骨密度値との相関 第 70 回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 14) 野辺由紀子、小野秀二、高田大輔、江見 充 HDL-C レベルへの LDL 受容体とアホリの遺伝子相互作用 第 70 回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 15) 高田大輔、江見 充、飯野靖彦、片山泰 家族性高脂血症における LDL 受容体と apoA-II 変異の遺伝子相互作用 第 70 回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 16) 石田良太、江面陽一、大益史弘、梶田満子、

- 伊藤博元、江見 充 Interleukin-1-Receptor-Associated Kinase(IRAK1)遺伝子多型は成人女性の骨密度を規定する 第70回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 17) 小野秀二、高田大輔 藤田有子、江見 充 高脂血症家系における FSHR 遺伝子の修飾効果 第70回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 18) 藤田有子、高田大輔、江見 充、飯野靖彦、片山泰朗 家族性高脂血症の表現型に及ぼす Apolipoprotein H の修飾効果 第70回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 19) 島田隆史、清水將史、小坂夏紀、長幡武光、岩崎公典、永井尚生、柴 忠義、江見 充 Universal Fluorescent Labeling 法によるマイクロサテライト DNA 分析 第70回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 20) 小平美奈、江面陽一 横田 隆、石田良太、梶田満子、江見 充 SNP 依存性 PCR (SNP-dependent PCR) による SNP 解析方法の開発 第70回日本医科大学医学会総会 2002 9 7 東京
- 21) 江見 充、江面陽一、梶田満子、石田良太、小平美奈、吉田英世、細井孝之、井上 聡、鈴木隆雄、白木正孝 骨粗鬆症の体系的 SNP 解析 日本人類遺伝学会第47回大会 2002 11 13-15 名古屋
- 22) 江面陽一、梶田満子、石田良太、大益史弘、吉田祥子、白木正孝 井上 聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見 充 ビタミン D 結合蛋白 (DBP) 遺伝子領域の遺伝子多型と成人女性橈骨骨密度値との相関の検討 日本人類遺伝学会第47回大会 2002 11 13-15 名古屋
- 23) 高田大輔、江見 充 飯野靖彦、片山泰朗 家族性高脂血症の表現型に及ぼす Apolipoprotein H の修飾効果 日本人類遺伝学会第47回大会 2002 11 13-15 名古屋
- 24) 梶田満子、江面陽一、石田良太、大益史弘、吉田祥子、白木正孝、井上 聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見 充 ゴナトトロピン遊離ホルモン(GnRH)のシグナルペプチド遺伝子多型と成人女性の橈骨 腰椎骨密度との相関 日本人類遺伝学会第47回大会 2002 11 13-15 名古屋
- 25) 石田良太、江面陽一、大益史弘、梶田満子、白木正孝、井上 聡、細井孝之 鈴木隆雄 江見 充 Interleukin-1-Receptor-Associated Kinase 遺伝子多型と成人女性の骨密度の相関 日本人類遺伝学会第47回大会 2002 11 13-15 名古屋
- 26) 小野秀二、高田大輔、江見 充、梅村 敏 家族性高脂血症の表現型に及ぼす成長ホルモン受容体の効果について 日本人類遺伝学会第47回大会 2002 11 13-15 名古屋
- 27) 中川内哲治、副島英伸、佐藤勇司、松倉史朗、北島吉彦、原田晴仁、中別府雄作、関口睦夫、宮崎耕治、江見 充、向井常博 プロモーター領域のメチル化による O6メチルグアニン DNA メチルトランスフェラーゼ(MGMT)の転写制御 第25回日本分子生物学会 2002 12 11-14 横浜
- 28) 浦野友彦、斉藤智之 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)
- 29) 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 TGF- β 1 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)
- 30) 井上聡 標的分子からみたエストロゲン作用メカニズム (2002 7 31) 第7回 CREST 「内分泌かく乱物質」研究会 (東京)
- 31) 井上聡 [ランチョンセミナー]抗エストロゲン作用を標的とした乳癌増殖制御と SERM の臨床応用 (2002 7 6) 第10回日本乳癌学会総会 (名古屋)
- 32) 井上聡 ホルモン依存性癌の増殖制御と SERM の臨床応用 (2002 10 19) 第9回滋賀更年期セミナー (滋賀)
- 33) 江見充、江面陽一、梶田満子、石田良太、小平美奈、吉田英世、細井孝之、井上聡 鈴木隆雄、白木正孝 骨粗鬆症の体系的 SNP 解析 Systematic analysis of osteoporosis susceptibility SNPs- (2002 11 13-15) 第47回日本人類遺伝学会大会 (名古屋)
- 34) 江面陽一、梶田満子 石田良太、大益史弘、吉田祥子、白木正孝、井上聡、細井孝之

- 鈴木隆雄、江見充 ヒタミン D 結合蛋白 (DBP) 遺伝子領域の遺伝子多型と成人女性 橈骨 骨密度値との相関の検討 (2002 11 13-15) 第 47 回日本人類遺伝学会大会 (名古屋)
- 35) 梶田満子、江面陽一 石田良太、大益史弘、吉田祥子、白木正孝 井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見充 コナトトロピン遊離ホルモン (GnRH) のαグナレリンヘプチド遺伝子多型と成人女性の橈骨 腰椎骨密度との相関 (2002 11 13-15) 第 47 回日本人類遺伝学会大会 (名古屋)
- 36) 石田良太、江面陽一、大益史弘、梶田満子、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見充 Interleukin-1-Receptor-Associated Kinase 遺伝子多型と成人女性の骨密度の相関 (2002 11 13-15) 第 47 回日本人類遺伝学会大会 (名古屋)
- 37) 津久井通、清水省志、大羽沙弥佳、久武幸司、禾泰壽、村松正實、井上聡 Gain of function によるエストロゲンの生体作用機構の解析 (2002 12 11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
- 38) 池田和博、小川純人 井上聡 エストロゲン受容体 (ER) と相互作用する ERIF の機能解析 (2002 12 11-14) 第 25 回日本分子生物学会年会 (横浜)
- 39) 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)

3 出版物

【和文】

- 1 井上聡 核内受容体研究の最近の進歩 日本老年医学会雑誌編集委員会編 老年医学 update2002 メディカルレビュー社 199-207 (2002)
- 2 井上聡 骨粗鬆症の分子病態 石川冬木編 老化研究の最前線 シュプリンガーフェアラーク東京 77-86 (2002)

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

骨粗鬆症の薬物療法による骨折予防と
QOL 低下予防における個人差に関する研究

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

骨粗鬆症の骨折一次、二次予防目的で、ビスホスホネート アルファカルシトール、メナテトレノン、カルシトニン等が投与されている。ビスホスホネートは、骨折の予防だけでなく、骨折による疼痛を軽減する効果もあり、QOL 改善をもたらす。これらの治療薬の追跡結果を基にした骨粗鬆症患者に対する治療薬の個別効果および遺伝子 SNP から将来の骨粗鬆症テーラーメード治療に役立つデータベースを構築した。その中から、本研究においてはビスホスホネートであるエチドロンート（EHDP）とアルファカルシトールの効果を腰椎骨密度の1年間におよぶ縦断的調査を行った分について解析した。またエルカトニンによる QOL の改善効果についても解析を行った。これらの薬物療法における効果の個人差に影響を与える因子について見当した。

A 研究目的

高齢者骨粗鬆症に対する薬物の骨折予防効果を確立するため1年間の縦断調査を行う。また QOL の改善効果については、我々のグループが作成した QOL 質問票を使用し、骨粗鬆症外来受診者に関するデータベースを作成する。高齢者骨粗鬆症患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高齢骨粗鬆症71名（男性2名）、平均年齢71歳。平均 BMI21.3 kg/m²。これらの患者に、骨折予防目的で投与されたビスホスホネート（ダイドロネル、EHDP200mg/日）と α カルシトール（0.5 μ g/日）での1年間における骨密度が5%増加した群と5%未満群両群間での、カルシウム調節ホルモン、骨代謝マーカー、喫煙、アルコール摂取、散歩などの日常の運動といった各因子の差について検討した。各項目は以下の方法で測定した。1) 腰椎骨密

度（DXA 法）をルナーIQを用いて測定。2) カルシウム調節ホルモン、PTH は IRMA 法、1,25(OH)₂D は RIA 法にて測定。3) 骨代謝マーカーは、1) 骨形成マーカー、骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）は EIA、オステオカルシンは IRMA、2) 骨吸収マーカー、尿中デオキシピリシノリン（DPD）、I 型コラーゲンテロペプチド（NTx）は共に EIA 法で測定した。4) 喫煙 アルコール摂取、運動量は質問にて行った。5) QOL 評価は、我々が独自に、脊椎圧迫骨折患者からのキーワードから作成した高齢者かつ骨粗鬆症に特異的な QOL 質問票（EQOL）を用いた。質問票は、痛み、室内動作制限、室内移動、気分、転倒骨折不安、生理的活動、義務的活動、自由時間の8つの項目で構成された。QOL の良いほうか高得点句点となるようにリッカートスケールにした。脊椎圧迫骨折患者にエルカトニン投与し、その後での QOL の変化をみた。

C 結果と考察

【結果】1)EHDP の腰椎骨密度に対する効果、腰椎骨密度が5%以上増加群では、5%未満に較べて投与前の腰椎骨密度が有意に低い（図1）。また骨吸収マーカーの DPD の変化率が大きかった（図2）
2)アルファカルシトールの効果、EHDP 同様に5%以上増加群と5%未満群で比較したところ、増加群は、未満群に較べて、飲酒期間が短い（図3）
3) 体操する頻度が多い（図4）などの点か

明らかとなった。

3) エルカトニンの QOL への効果,

①痛みでは、エルカトニンの投与にて14点から21点に増加、②室内動作制限は10点から13点に、③室内移動は6点から11点に、④気分は、12点から25点に、⑤転倒骨折不安では6点から11点に ⑥生理活動では変化なし、⑦義務的活動も変化なし、⑧自由時間は7点から10点となった(表1)。

【考案】ヒスホスホネート製剤のEHDPは、腰椎骨密度を増加させるか 今回検討した71名中38名に腰椎骨密度増加か1年間で5%未満の群が存在し、その原因について腰椎骨密度5%以上増加群と比較検定したところ、投与前のBMD基礎値の低いこと、骨吸収マーカーの反応も良いこと、飲酒歴、運動頻度も治療効果に寄与し、基礎値が既に高い場合、飲酒歴のある患者ではEHDPが効きにくいことか判明した。今後、EHDP治療開始する際問診し、飲酒、喫煙、運動について聞く必要がある。活性型ビタミンDであるアルファカルシトールでは従来報告と一致していた。一方、骨密度増加効果は少ないと報告されているエルカトニンは治療2ヶ月で、痛み、動作、気分、生きがいなどのQOL質問表の各大項目の改善をもたらした。しかし義務的活動、生理活動では変化がなかった。現在個別の遺伝子SNPとヒスホスホネート、アルファカルシトール、エルカトニンの治療効果について解析している。

D 結論

ビスホスホネートとアルファカルシトールにおいて、腰椎骨密度の増加する群と増加の低い群が存在すること、骨粗鬆症の治療薬において反応性に相違があることか判明した。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SNPを基に個別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) Horuchi 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 48,103-108,2002

2)折茂肇(編集代表) ちょっと気になること困った時のアトバイス。9 汗かひとい。生涯健康ハントブック。48-49、2002

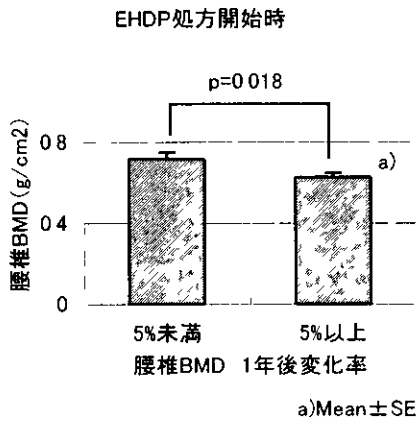
3)土井賢、西村幸、深井希、小澤直子、萩原康二、松下美加、岩科将虎、今井泰平、七甲真義、堀内敏行、平田結喜緒、内科的にコントロールされ、経過観察中の原発巣不明の異所性ACIH症候群の一例。ACIH Related Peptide 12,147-153,2002

4)堀内敏行。浅見昌子、高橋麗子 高齢者のケアガイドライン 低栄養 Gerontology 14,382-387 2002

5)堀内敏行、風間広仁、荒木厚、井上潤一郎、腰原康子、折茂肇 糖尿病骨減少症におけるビタミンK代謝障害。第5回 Vitamin K & Bone 研究会記録集。5, 41-46 2002

1) EHDP

図1



2) αカルシトール

図3

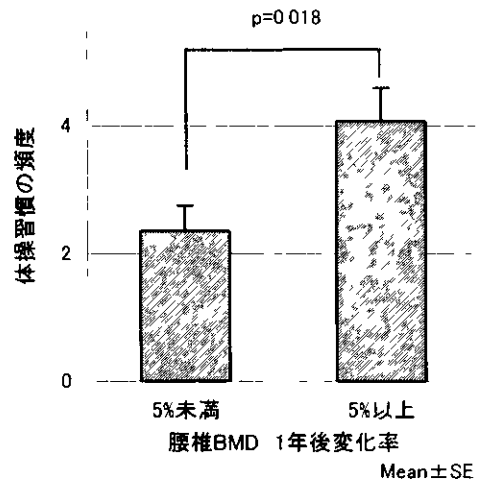


図2

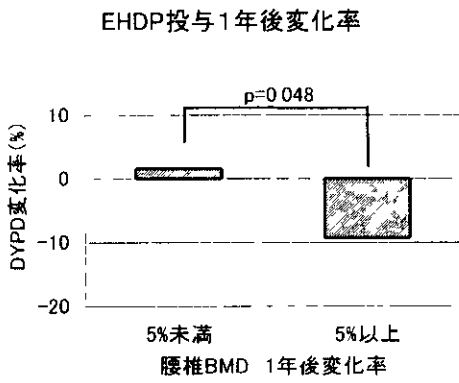


図4

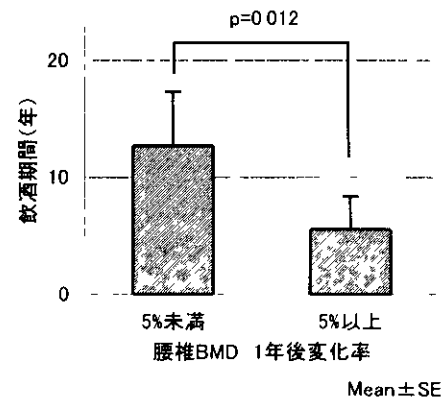


表 1

エルトニン投与前後のQOL	前	後
痛み	13	21
室内動作制限	10	14
室内移動	6	10
気分	12	25
転倒骨折不安	6	11
生理的活動	10	10
社会生活上の義務的活動	5	5
自由時間	6	6
生きがい	7	10
合計	85	112

分担研究報告書

骨粗鬆症治療薬に対する反応決定遺伝子の探索

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講師

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、骨粗鬆症治療薬応答遺伝子の探索を行った。本年は、特に閉経後骨粗鬆症の中心であるエストロゲンシグナル、老人性骨粗鬆症の鍵を担うと考えられる TGF β シグナルを詳細に解析した。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決定遺伝子マーカーとしての分子標的が得られた。

A 研究目的

高齢ならひ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ひ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か考えられる。前年度まで、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 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報告してきた。今回初代培養骨芽細胞における TGF β 応答遺伝子に関してマイクロアレイ法を用いた Gene profiling に

ついてさらに再現性を高め、より詳細な解析を行い、分子標的としての検討を加えた。

高齢者骨粗鬆症に対して閉経後骨粗鬆症における主な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対しては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 DNA チップ法を用いて、遺伝子改変動物を用いた初代培養骨芽細胞におけるエストロゲン応答遺伝子に関して Gene profiling を行い、その詳しい生化学的解析結果よ

リエストロケンシグナルにサイクリン D2、D3 が関与していることを明らかにした。

B 研究方法

1 骨芽細胞におけるサイトカイン応答遺伝子の探索

初代培養骨芽細胞に TGFβ 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 0 分に採取した RNA に比して 30 分、60 分、120 分後に共通して上昇する遺伝子、ならびに 0 分に採取した RNA に比して 60 分、120 分後に共通して上昇する遺伝子をリストアップした。

2 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の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 DNA チップ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。その結果、得られた遺伝子に関して、ノサン法、ウエスタン法を用いて、発現調節を確認した。一方、野生型の初代培養骨芽細胞をもちいて、エストロゲンかその増殖能、細胞周期調節因子とその生理活性にもたらす影響を生化学的に解析した。

C 研究結果

1 初代培養骨芽細胞における TGFβ 応

答遺伝子の検索

分担研究者は TGFβ による骨芽細胞の細胞増殖においてシグナル伝達における最終段階である細胞周期制御因子変化を誘導することを明らかにしてきた。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 を用いてマイクロアレイ法により TGFβ 応答遺伝子の探索を行った。時間経過を追って、再現性の高いデータを得ている。これらのうち smad2 ならびに smad3 をはしめとする 10 個の遺伝子は既に TGFβ 応答遺伝子として報告のある遺伝子であった。このことはこの実験系において TGFβ 下流シグナルがオンになっていることを示す positive control として重要であり、実験の確実性を示す指標ともなる。興味深いことに、GAS6、TRAIL、LIGHT、Adrenomedullin といった細胞増殖や分化に関与する液性因子が多く含まれていた。

2 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 DNA チップを用いて行い、発現変化のある遺伝子をリストアップした (表 1)。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は野生型に比して、増殖能が損なわれていた。リストアップした遺伝子のうち、cyclinD2 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か知られている。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、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か示した。

D 考察

今回、骨芽細胞における TGFβ 応答遺伝子の探索を行った。興味深いことに TGFβ 応答遺伝子中には多くのサイトカイン、液性因子が含まれていた。このことは TGFβ が様々なサイトカインとのクロストークを介してそのオートクライン、パラクラインの効果により骨芽細胞自身ならびに破骨細胞に影響を及ぼし、骨のモテリンク、リモテリングに影響を及ぼしていることか示唆された。今回明らかになった TGFβ 応答性のサイトカイン、液性因子である、TRAIL、LIGHT、GAS6、Adrenomedullin が骨芽細胞や破骨細胞に与える影響を探索することは TGFβ による骨形成ならびに骨リモテリングの分子機構の解明に重要であると考えられる。

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、D3 が細胞周期制御において中心的な役割を果たしている。同じ骨芽細胞の増殖因子である TGFβ 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テリンクへのシグナル伝達に対しても異なる影響を及ぼすことか示唆され、骨形成の促進を目指した新しい骨粗鬆症治療薬開発、治

表 1 (ER ドミナントネガティブ体過剰発現骨芽細胞にて発現変化する遺伝子)

発現上昇する遺伝子

Angiotensin receptor (AT1)
 Vascular type 1 angiotensin II receptor
 Proenkephalin
 Tropoelastin mRNA, 3' end
 Catechol O methyltransferase mRNA 3' flank
 dUTPase mRNA, complete cds
 Clathrin associated adaptor protein homolog (p47A)
 Insulin growth factor binding protein
 BRL 3A binding protein
 Cell cycle progression related D123
 MRC OX 45 surface antigen

発現低下する遺伝子

MHC class II A beta RT1 B b-beta
 angiotensinogen gene-inducible enhancer binding protein 1
 calcium/calmodulin dependent protein kinase II delta subunit
 NF1 B2
 Fibronectin
 Mucin
 Transfer RNA Valine synthetase mRNA partial
 NF1 X1 partial
 Plectin
 MHC class II antigen RT1 B 1 beta chain
 Olfactory receptor like protein (SCR D 9)
 Moesin
 Mitogenic regulation SSeCKS (322)
 Type XI collagen alpha 1 chain (COL11A1)
 Protocadherin 5 partial cds
 R2 cerebellum DDRT-T PCR
 Glycoprotein CD44 (CD44)
 NF1 X1
 cyclin D2, complete cds
 Entactin
 85kDa sialoglycoprotein (LGP85)
 Cytoplasmic dynein heavy chain (MAP 1C)
 CL2AA
 140-kD NCAM polypeptide

療反応性予測から見た薬剤選択法の開発へのよい指標となる。

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発現制御の分子機構の探索を DNA チップ・マイクロアレイ法を用いて行い、特に TGFβ 応答遺伝子、エストロゲン応答遺伝子の探索から、新たな骨粗鬆症治療薬開発の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

【英文原著】

- 1 Fujita M, Urano T, Horie K, Ikeda K, Tsukui T, Fukuoka H, Tsutsumi 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
- 2 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
- 3 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* 28, 213-223, 2002
- 4 Sugiyama H, Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S Ethnic difference in contribution of alleles of the interleukin-1 receptor antagonist gene to preposition to osteoporosis *Geriatric Gerontol Int* 2, 87-90, 2002
- 5 Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S Association of amino acid variation (Trp64Arg) in the beta3-adrenergic receptor gene with bone mineral density *Geriatric Gerontol Int* 2, 138-142, 2002
- 6 Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector T, 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* 17, 1744-1751, 2002
- 7 Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S Association of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) gene polymorphism with bone mineral density *Geriatric Gerontol Int* (in press)

2 学会発表

【国際学会】

- 1 Inoue S [Workshop] Differential growth control of cells via multiple estrogen-responsive pathways 12th International vascular biology meeting, Karuizawa, Japan (2002 5 12-16)