

# 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。また、近年の研究により、ステロイドホルモン受容体の転写制御能は転写共役因子群との相互作用に基づいていることが明らかとなっている。我々はステロイドホルモン受容体と転写共役因子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成・解析している。現在解析を進めているandrogen receptor KOマウス、steroid receptor coactivator-1 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1つであるGlucocorticoid receptor (GR) と同じ核内受容体スーパーファミリーに属するandrogen receptor (AR) のノックアウトマウス (KOマウス) を用いてその生体内高次機能を解析する。さらに、グルココルチコイド受容体の転写制御に必須の転写共役因子であるsteroid receptor coactivator-1 (SRC-1) のKOマウスにおいても同様の解析を行い、骨代謝調節におけるAR及びSRC-1の生体内機能を明確にする。

## B. 研究方法

エストロゲンシグナルの生体内での骨代謝調節機構はestrogen receptor (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。

同様にCre/lox P systemを用いてGR、ER、ARに共通の転写共役因子であるSRC-1 KOマウスを作成した。骨組織におけるAR、SRC-1の機能を分子レベルで解明するため、これら雄KO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

ARKO雄マウス (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、ARKO雄においてBV/TVが29%減少、骨形成の指標と骨吸収の指標がともに上昇していた。一方、ARKO雄では精巣の萎縮に伴い血中テストステロン (T) 濃度が著しく低下していることから、ARの欠損による直接的な影響以外に、骨細胞内でテストステロンから変換されるエストロゲン量の低下が骨量低下に関与している可能性も考えられた。そこで、8週齢のARKO去勢雄にTまたは非芳香化アンドロゲンであるジヒドロテストステロン (DHT) を徐放ペレットにより投与し骨量への効果をWTと比較した。WTでは去勢により骨量低下と骨形成、骨吸収の指標の上昇が観察されたが、TまたはDHT投与により回復を示した。一方、ARKOの骨量、代謝回転はDHT投与により回復を示さなかった。また、T投与によりARKOの骨量、代謝回転は一部回復を示したが、回復の程度はWTの約半分にとどまった。また、ARKOにおける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。

SRC-1 KOマウスでは雌雄共に、8週齢では骨形態、骨量の異常は観られなかった。一方、16週齢のSRC-1 KO雌についてDEXAを用いて全身の骨量、脂肪重量について解析した結果、SRC-1 KO雌では脂肪重量が増加しているにも関わらず、骨量の低下が観察された。

#### D. 考察

AR欠損雄マウスは、高回転型の骨量減少を呈し、この骨量減少はAR欠損の直接的影響によりもたらされることが明らかとなった。また、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判明した。一方、全身性のAR欠損では血中アンドロゲン濃度の低下などの副次的な要因により骨代謝が影響を受けるという問題も浮き彫りとなった。今後は骨細胞種特異的なプロモーター下でCreを発現させたトランスジェニックマウスを開発・利用することにより、破骨細胞および骨芽細胞特異的ARKOマウスを作出し、ARの骨細胞特異的機能の詳細を明らかにする必要がある。

SRC-1欠損雌マウスにおいて脂肪増加を伴う骨量の低下が観察された。これは卵巣摘出雌マウスの表現型と類似しており、ERシグナルの減少による可能性が考えられる。この点を明らかにするため、今後はERヘテロ欠損マウスとの二重欠損マウスの作出やエストロゲン負荷実験を行う予定である。また、予備データではあるが、24週齢のSRC-1欠損雄においても雌同様の骨量の減少が観察されている。今後さらにグルココルチコイド、アンドロゲンの負荷実験を行い、SRC-1が骨代謝調節においてどのステロイドホルモン受容体情報伝達系に必須であるか検討する必要がある。

#### E. 結論

1. Cre-loxP systemを用いて雌雄のARKO、SRC-1KOマウスのラインを確立した。
2. ARKO雄マウスは高回転型の骨量減少を呈した。
3. 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。
4. SRC-1 KO雌マウスでは脂肪増加を伴う骨量減少を呈した。

#### F. 研究発表

##### 1. 発表論文 (原著)

- 1) Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., Kato, S.: Inhibition of adipogenesis by cytokines with suppression PPAR function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, 2003 (in press).
- 2) Nakamichi, Y., Shukunami, C., Yamada, T., Aihara, K., Kawano, H., Sato, T., Nishizaki, Y., Yamamoto, Y., Shindo, M., Yoshimura, K., Kawaguchi, H., Hiraki, Y., Kato, S.: Chondromodulin-I (ChM-I) is a bone remodeling factor. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 636-644, 2003.
- 3) Sato, T., Matsumoto, T., Yamada, T., Watanabe, T., Kawano, H., Kato, S.: Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (ARKO) mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 300, 167-171, 2003.
- 4) Yanagisawa, J., Kitagawa, H., Yanagida, M., Wada, O., Ogawa, S., Nakagomi, M., Oishi, H., Yamamoto, Y., Nagasawa, H., MacMahon, S. B., Cole, M. D., Tora, L., Takahashi, N., Kato, S.: Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol. Cell*, 9, 553-562, 2002.
- 5) Takeyama, K., Ito, S., Yamamoto, A., Tanimoto, H., Furutani, T., Kanuka, H., Miura, M., Tabata, T., Kato, S.: Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in drosophila. *Neuron*, 35, 855-864, 2002.
- 6) Furutani, T., Watanabe, T., Tanimoto, K., Hashimoto, T., Koutoku, H., Kudoh, M., Shimizu, Y., Kato, S., Shikama, H.: Stabilization of androgen receptor protein is induced by agonist, not by antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294, 779-784, 2002
- 7) Kato, S.: Androgen receptor structure and function from Knock-out Mouse. *Clin Pediatr Endocrinol*, 11, 1-7, 2002
- 8) Kato, S., Yoshizawa, T., Kitanaka, S., Murayama, A., Takeyama, K.: Molecular Genetics of Vitamin D-Dependent Hereditary Rickets. *Hormone Research*, 57, 73-78, 2002.
- 9) Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Fuse, H., Ogawa, S., Yogiashi, Y., Okuno, A., Nagasawa, H., Nakajima, T., Matsumoto, T., Kato, S.: Ligand selective potentiation

- of rat mineralocorticoid receptor activation function-1 (AF-1) by a CBP-containing HAT complex. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 3698-3706, 2002.
- 10) 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 Res.*, 30, 1387-1393, 2002.
- 11) Sakaue, H., Konishi, M., Ogawa, W., Asaki, T., Mori, T., Yamasaki, M., Takata, M., Ueno, H., Kato, S., Kasuga, M., Itho, N.: Requirement of fibroblast growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes & Development*, 16, 908-912, 2002.
- 12) Nawata, H., Goto, K., Morinaga, H., Yanase, T., Yanagisawa, J., Kato, S., Nomura, M., Okabe Taijiro, Takayanagi, R.: Molecular mechanisms underlying the action of environmental endocrine-disrupting chemicals. *Environmental Sciences*, 9, 057-070, 2002.
- 13) Shimosawa, T., Shibagaki, Y., Ishibashi, K., Kitamura, K., Kangawa, K., Kato, S., Ando, K., Fujita, T.: Adrenomedullin, an endogenous peptide, counteracts cardiovascular damage. *Circulation*, 105, 106-111, 2002.
- 14) Mailleux, A. A., Spencer-Dene, B., Dillion, C., Ndiaye, D., Savona-Baron, C., Itoh, N., Kato, S., Dichson, C., Thiery, J. P., Bellusci, S.: Role of FGF 10/FGFR2b signaling during mammary gland development in the mouse embryo. *Development*, 129, 53-60, 2002.
- 15) Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K., Ohuchi, H.: FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*, 129, 1533-1541, 2002.
- 16) Suzawa, M., Tamura, Y., Fukumoto, S., Miyazono, K., Fujita, T., Kato, S., Takeuchi, Y.: Stimulation of smad1 transcriptional activity by ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. *J. Bone Miner. Res.*, 17, 240-248, 2002.
- 17) Lee, H.-S., Miyauchi, K., Nagata, Y., Fukuda, R., Sasagawa, S., Endoh, H., Kato, S., Horiuchi, H., Takagi, M., Ohta, A.: Employment of the human estrogen receptor ligand-binding domain and co-activator SRC1 nuclear receptor-binding domain for the construction of a yeast two-hybrid detection system for endocrine dis-
- rupters. *J. Biochem.*, 131, 399-405, 2002.

# ステロイド感受性に関与する遺伝子の検討

中島 滋郎、田村 京子

(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)

日本人のSNPデータベースを基にCYP3A4遺伝子多型の出現頻度を健常日本人において検討した。その結果、2種類 (JST089336, JST014730) の解析可能なSNPが確認できた。このうち、JST089336多型とステロイド投与による骨塩量低下率の関連について、7名のステロイドホルモン薬投与患児で検討したが、明らかな関係は認めなかった。今後、これらのCYP3A4遺伝子多型およびGR遺伝子の2種類 (JST006606, JST032069) の多型とステロイドホルモン性大腿骨頭壊死発症の関連について検討を進めていく予定である。

## A. 研究目的

グルココルチコイドの生体内での代謝および作用発現には様々な蛋白が関与している。昨年度までに我々はステロイドホルモン薬の反応性に関与すると考えられる健常日本人の遺伝子多型について検討を行い、以下の結果を得た。

1. グルココルチコイド受容体 (GR) については (1) 欧米で既報のN363S多型は存在しない。 (2) BclIIによる多型は存在するが、臨床的意義は未確定。 (3) プロモーター領域にも明らかな多型は見つからなかった。 (4) SNPデータベースに報告されている3種類のSNPのうち2種類 (JST006606, 032069) について存在を確認した。

2. 11 $\beta$ HSD2遺伝子については (1) 欧米で既報のG534A多型は存在しない。 (2) 健常日本人ではイントロンを含むエクソン2から5までの部分に遺伝子多型は認めなかった。

一方、肝臓でのステロイド代謝に重要な役割を果たしているCYP3A4遺伝子については欧米を含めて、遺伝子多型の報告はごく少ない。そこで今回我々はSNPデータベースの情報を基に日本人でのCYP3A4遺伝子多型の出現頻度について検討した。

## B. 研究方法

健常成人50名およびステロイド投与患児7名末梢血を採取しリンパ球を分離後、常法によりゲノムDNAを精製した。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のデータベースに基づきCYP3A4遺伝子多型 (JST089336, JST014730) について、多型部位を含む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多型の有無について検討した。また、ステロイドホルモン薬投与開始前および開始後経時的に骨塩量を測定している腎疾患患児7名においてJST089336多型と骨塩量の低下 (前値に対する%) の関連について検討した。

## C. 結果

健常日本人での検討では、JST089336についてはA/A 55.3%、A/G 36.2%、G/G 8.5%、JST014730についてはC/C 59.4%、C/T 25.0%、T/T 15.6%であった (図1)。また、ステロイド薬投与患者において

健常日本人におけるCYP3A4遺伝子多型の分布

JST089336	A/A	A/G	G/G
	55.3%	36.2%	8.5%
JST014730	C/C	C/T	T/T
	59.4%	25.0%	15.6%

図1

JST089336多型はA/A 5名、A/G 2名、G/G 0名であったが、ステロイドホルモン薬投与による骨塩量率とこの多型には明らかな関連は認めなかった（図2）。

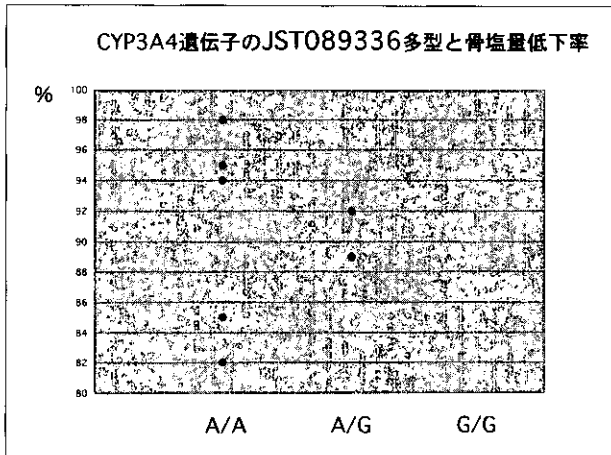


図2

#### D. 考察

ステロイドホルモン薬は各種疾患の治療に幅広く使用されているが、その副作用、特に骨に対する影響（骨粗鬆症や大腿骨頭壊死）は患者のQOLの維持に大きな問題となる。このような作用あるいは副作用の出現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と考えられるが、その詳細は不明であった。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、遺伝子多型に人種差が非常に大きいことから日本人での解析が困難であった。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、白人あるいは黒人において関係が示唆されているGR遺伝子や11 $\beta$ HSD2遺伝子の多型は日本人では存在していなかった。昨年度までに我々は日本人におけるSNPデータベースに登録されているGR遺伝子多型3種類の内2種類のSNPが日本人で解析可能なことを明らかにした。今回の検討では同じデータベースに登録されているCYP3A4遺伝子の2種類のSNP（JST089336, JST014730）について健常日本人での発現頻度を検討し、両者が日本人での解析に利用可能であることが確認できた。さらに、このうちJST089336多型とステロイド投与による骨塩量低下率の関連について7名のステロイドホルモン薬投与患児で検討したが、今回の検討では明らかな関係は

認めなかった。今後、これらのCYP3A4遺伝子多型とおよびGR遺伝子の2種類（JST006606, JST032069）の多型とステロイドホルモン性大腿骨頭壊死発症の関連について検討を進めていく予定である。

#### E. まとめ

日本人におけるSNPデータベースを基に、CYP3A4遺伝子多型の出現頻度を検討した。2種類（JST089336, JST014730）の解析可能なSNPが確認できた。今後、これらとGR遺伝子の2種類（JST006606, JST032069）の多型と大腿骨頭壊死発症の関連について検討を進めていく予定である。

# 大腿骨頭壊死症の発生とCYP3A4 activityの相関に関する研究

高岡 邦夫、金城 養典、大橋 弘嗣、政田 俊明  
(大阪市立大学大学院整形外科)  
小田 裕 (大阪市立大学大学院麻酔・集中治療医学)

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。我々はこのCYP3A4の活性及び発現量の個体差と大腿骨頭壊死症の発症が関係するのではとの仮説の下に、大腿骨頭壊死症発症患者のCYP3A4活性及び発現量をcompetitive RT-PCR法、midazolam clearanceを用いての測定を試みた。その結果、発症患者のclearanceは $7.9 \pm 2.5$  mg/kg/minと従来報告された健常人の $9.4 \pm 3.4$  mg/kg/minと比しclearanceの低下を認め、IONF発症との関連が示唆された。発現量に関しては現在検索中である。

## A. 研究目的

大腿骨頭壊死症(IONF)は青壮年期に好発し、その罹患によって股関節が破壊され起立歩行障害によりQOLが著しく侵される疾患である。本疾患の病因は必ずしも明らかではないが、ステロイド性、アルコール性との関連が示唆されており、ステロイド剤がIONFを誘発することが疫学的調査から判明している。しかし、ステロイド治療を受けた症例すべてに本症が発症するわけではなく、このことは骨壊死発生の素因の存在を強く示唆している。そこで我々はステロイド代謝の個体差がIONFの発生と関連があるのではと考えた。体内に吸収されたglucocorticoidは肝臓で主に薬物代謝酵素であるCYP450の中のCYP3A4により代謝され一部が標的細胞に至る。我々は、この肝臓におけるCYP3A4の個体間の活性の違いがIONFの発症に関係するのではと仮説をたてた。そこで、大腿骨頭壊死症の発生と個体間のCYP3A4活性に相関性があるかどうかについて調べた。

鎮静剤であるmidazolam(MDZ)は体内でglucocorticoidと同様に、肝臓のCYP3A4のみによって1'-OH MDZに代謝され、CYP3A4活性の指標となる<sup>1)</sup>。そこでこのmidazolamを用いてIONF患者のCYP3A4活性を評価した。また、IONFの予防を念頭におくと、なるべく低侵襲な方法でこのCYP3A4活性を把握したい。近年、肝臓中に発現するCYP3A4 mRNAと末梢血リンパ球中に発現するCYP3A4 mRNAに相関性

があるとの報告があり<sup>2)</sup>、これを参考にして末梢血リンパ球中CYP3A4 mRNAの発現が確認できるかどうかをRT-PCR法を用いて検討した。

## B. 研究方法

1) 大腿骨頭壊死症の発生と個体間のCYP3A4活性の相関性についての研究

(対象) 大腿骨頭壊死症患者4例、ステロイド性3例、特発性1例について調べた。性別は、男3例、女1例で、平均年齢は $38.0 \pm 7.0$ 歳であった。なお、ステロイド性は全て1日平均投与量16.6mg以上の投与歴を有していた。

(方法) 手術麻酔導入の際、midazolam 0.25mg/kgにて導入する。その後、経時的に採血を行い血中midazolam濃度、および1'-OH midazolam濃度をHPLCにて定量する。その結果より濃度曲線を作成し、それより血中濃度曲線下面積(AUC)、clearance(CL)を算出した。

2) 末梢血リンパ球中のCYP3A4mRNAの発現の確認  
健常人サンプルのヒト末梢血よりリンパ球を分離した。そのリンパ球よりISOGEN変法でRNAを抽出し、RT-PCR法にてCYP3A4 mRNAの発現の確認を試みた。

(倫理面への配慮) 本研究は大阪市立大学医学部倫理委員会の承認を受け、指針に沿って行った。

### C. 研究結果

#### 1) 大腿骨頭壊死症の発生と個体間のCYP3A4活性の相関性

濃度曲線より血中濃度曲線下面積、clearanceを算出した(表1)。ステロイド性3例中2例でAUCの増大、clearanceの低下を認めた。また、特発性1例においても同様にAUCの増大、clearanceの低下を認めた。

#### 2) 末梢血リンパ球中のCYP3A4mRNAの確認

ヒト末梢血リンパ球から、RT-PCR法にてCYP3A4mRNAの発現を確認した(図1)。同サンプルをplasmidにcloningし、sequenceにて、既知であるCYP3A4mRNAの配列と一致していることを確認した。

PT	AUC ml/kg/min	CL Mg/kg/min
T.S#	117.2	6.54
T.O#	124.0	6.18
M.M#	58.7	13.0
Y.T	126.4	6.06

#はステロイド性大腿骨頭壊死症患者

表1

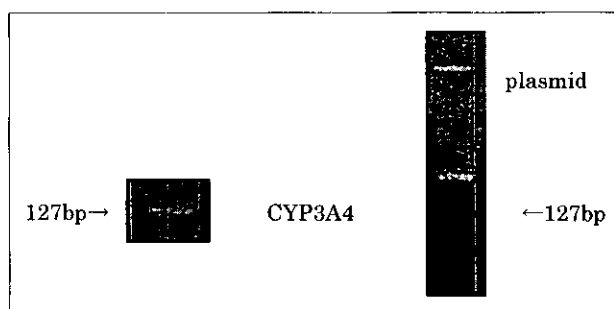


図1

### D. 考察

1999年のHamaokaら<sup>3)</sup>によって、同一プロトコルでの健常人のAUC、CLが報告されている(表2)。この報告と比べると、今回計測した大腿骨頭壊死症患者の一部は、非発症患者に比べAUC、clearanceの低下を認め、midazolam代謝が低下しており、CYP3A4活性が低下していることが示唆された。現在、大腿骨頭壊死症患者の約半数がステロイド性であるが、この原因として一部の患者では薬物代謝酵素である

	control	IONF
AUC( $\mu$ mol/L $\cdot$ min)	73.1 $\pm$ 23.8	106.6 $\pm$ 23.9
Clearance(mL/min/kg)	9.4 $\pm$ 3.4	7.9 $\pm$ 2.5

表2

CYP3A4の活性が低下しており、ステロイド代謝能が低く、比較的低用量であっても暴露量という面では高用量を投与されている可能性が考えられ、大腿骨頭壊死症の発生の危険性が高まることが考察された。

また、ヒトの場合ではCYP3A4活性の把握のために肝組織を得ることは侵襲が大きく、ほとんど不可能であり、CYP3A4活性を把握する方法としては、erythromycin breath test、本研究で用いたmidazolam clearance等があるがこれらは薬物投与に伴う問題がある。低侵襲的にCYP3A4活性を把握する方法として、今回の研究から末梢血リンパ球よりCYP3A4mRNAの発現を確認できた。現在その定量性、肝臓におけるCYP3A4活性との相関性について検討中である。低侵襲的にCYP3A4活性を把握する方法が確立できれば、ステロイド投与前にCYP3A4活性を把握しておき治療効果と副作用を考慮した治療法、いわゆるテーラーメイド医療が可能になり大腿骨頭壊死症の発生の予防につながると考えられる。

### E. まとめ

1. 大腿骨頭壊死症の発生と個体間のCYP3A4活性との関連性が示唆された
2. 低侵襲な方法でCYP3A4活性を把握する方法として、末梢血リンパ球からのCYP3A4mRNAの発現が確認できた。大腿骨頭壊死症の発症の予測法として応用できる可能性があるため、その定量性および肝臓のCYP3A4活性との相関性については現在検討中である。

### F. 文献

- 1) Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, Kunze KL, Trager WF, Hartwell PS, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe. *In vivo-in vivo correlations in liver transplant patients.* J Pharmacol Exp Ther 1994;271:549-56
- 2) Nakamoto T, Hase I, Imaoka S, Hiroi T, Oda Y, Asada A and Funae Y. Quantitative RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: induction of CYP3A4 in lymphocytes and in liver by rifampicin. Pharmacogenetics 2000;10:571-575
- 3) Hamaoka N, Oda Y, Hase I, Mizutani K, Nakamoto T, Ishizaki T, Asada Akira. Propofol decreases the clearance of midazolam by inhibiting CYP3A4: An in vivo and in vitro study. Clin Pharmacol 1999;66:110-117

## ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子解析

浅野 武志、高橋 謙治、藤岡 幹浩  
井上 重洋、久保 俊一 (京都府立医科大学整形外科)  
里見 佳子、西野 輔翼 (京都府立医科大学学生化学教室)  
高岡 邦夫 (大阪市立大学大学院医学研究科整形外科)  
中島 滋郎 (大阪大学大学院医学系研究科・医学部小児発達医学)  
田中 隆、廣田 良夫 (大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学)

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) は、ステロイド投与後、きわめて早期に発生していることから、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。同一プロトコールでステロイドを投与されているにもかかわらず、ION発生について同じ結果をたどらないことを臨床経験する。このようなステロイド反応性の個体差にステロイドの体内動態に関与する蛋白質の遺伝子多型が関与している可能性がある。本検討では、腎移植後患者を対象とした。そしてステロイドの代謝酵素であるCYP450および輸送蛋白P-glycoproteinの遺伝子多型とION発生との関連について検討した。

### A. 目的

特発性大腿骨頭壊死 (以下ION) の病態についてはまだ明らかではないが、基礎疾患治療のために使用されるステロイドが危険因子であることが知られている。臓器移植後など、同一プロトコールで治療されたにもかかわらず、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>1)</sup>。このような薬剤反応性の個体差に薬物の体内動態に関係する蛋白質の遺伝子多型が関与する可能性がある。遺伝子多型の解析の際に、多型の頻度の高さや解析の容易さにより近年注目されている遺伝子マーカーが一塩基変異多型 (single nucleotide polymorphism, 以下SNP) である。

本研究ではION発生と関連するSNPのタイピングを指標として、基礎疾患治療前、つまりステロイド投与前からIONリスク患者を同定することを目的とした。腎移植患者を対象とし、ステロイド代謝酵素であるCYP450および輸送蛋白P-glycoprotein (P-gp) をコードするMDR1のSNPとION発生の関連について、さまざまな遺伝子学的手法 (直接塩基配列決定法、PCR-restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP, DNA chip) を用い検討した。

### B. 方法

研究に先立ち、本学の人間を対象とする医学研究審査委員会の承認を得た。また対象患者に対して文書による同意を得た。IONの診断は厚労省大腿骨頭壊死症研究班診断基準に従った<sup>2)</sup>。患者の末梢血より、ゲノムDNAをDNeasy™ Tissue Kit (QIAGEN GmbH, Germany) を用いて抽出し、以下の解析に使用した。

〈CYP3A4\*4, \*5, \*6の検討〉

临床上使用されるステロイドの代謝はCYP450のなかでもCYP3A4が中心的な役割を果たす<sup>4)</sup>。CYP3A4\*4 (III118Val in exon 5)、CYP3A4\*5 (Pro218Arg in exon 7)、CYP3A4\*6 (A17776 Insertion in exon 9) はHsieh K-Pらにより、はじめて報告されたSNPである。彼らは中国人を対象とした研究においてこれらのalleleが $6\beta$ -hydroxycortisol to free cortisol ratioを低下させると報告している<sup>3)</sup>。われわれは、ステロイド性IONの発生にこれらのalleleが関与している可能性を考え、PCR-RFLPを用い検討した。対象は本学移植内分泌外科において腎移植を施行された80例 (ION発生群26例、ION非発生群54例) である。プライマーの設定等SNP検索の条件はHsieh K-Pらの報告に準じておこなった<sup>3)</sup>。



#### 〈CYP3A4プロモータ領域のSNPの検索〉

本検討ではCYP3A4のプロモータ領域で、酵素誘導に重要な役割を果たすことが報告されているER6、XREM<sup>5)</sup>のSNPの有無を検索した。対象は本学移植内分泌外科において腎移植を施行された80例(ION発生群26例、ION非発生群54例)である。PCRに用いたプライマーはER6に対して5'-GACAAGGGCAAGAGAGAGGC-3'(f)、5'-TGCTAGAGAAGGAGGCAGGG-3'(r)であり、XREMに対して5'-AGATAACCATGTAACCGATC-3'(f)、5'-CCTTCTTAGTGTTTACCATG-3'(r)である。PCR条件は94℃5分の変性の後、94℃1分の熱変性、58℃1分のannealing、72℃1分の伸長反応を1サイクルとして35サイクルおこなった。ABI PRISM377シーケンサーを用い、直接塩基配列決定法(direct sequencing)で塩基配列決定をおこなった。

#### 〈CYP2D6, CYP2C19のSNPの検討〉

ステロイドの代謝に中心的な役割を果たすのはCYP3A4であるが、ステロイド代謝にその他の分子種が関与している可能性が示唆されている<sup>6)7)</sup>。そこでわれわれは、CYP450のなかでもSNPにより薬物代謝の個人差が出現することが知られている分子種であるCYP2D6およびCYP2C19について、GeneChip CYP450 assay(Affymetrix Inc, CA, USA)を用い検討した。対象は本学移植内分泌外科において腎移植を施行された80例(ION発生群26例、ION非発生群54例)である。

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Allele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。

#### 〈MDR1C3435T(exon 26)の検討〉

MDR1は細胞内輸送タンパクp-glycoproteinをコードする遺伝子である。現在までにMDR1には複数のSNPが同定されているが、近年MDR1の発現量や機能に影響を与える“functional”なSNPとしてC3435T(exon 26)が報告され、さまざまな疾患との関連が報告されている<sup>8)</sup>。C3435TとION発生との関連を検討した。

対象は本学移植内分泌外科において腎移植を施行された54例(ION発生群24例、ION非発生群30例)である。PCRに用いたプライマーは5'-

TTCAGCTGCTTGATGGCAAA-3'(f)および5'-AGGCAGTGAAGG-3'(r)である。PCR条件は94℃5分の変性の後、94℃1分の熱変性、58℃1分のannealing、72℃1分の伸長反応を1サイクルとして35サイクルおこなった。ABI PRISM377シーケンサーを用い、直接塩基配列決定法(direct sequencing)で塩基配列決定をおこなった。

#### 〈統計解析〉

unconditional logistic regression model(SAS software ver 6.12)を用いた。CYP2D6、CYP2C19、およびMDR1のSNPとION発生との関連をodds ratio(OR)および、95%信頼区間(CI)を算出することから評価した。

さらに性別、移植時年齢、移植後のステロイドの Puls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(プレドニゾン換算)を変数に組み込んだ多変量解析を施行し、さらに詳細にION発生との関連を検討した。

## C. 結果

#### 〈CYP3A4\*4, \*5, \*6の検討〉

\*4に関してION非発生群で1例のみhetero variant typeを認めたが、その他全例homo wild typeであった。\*5に関しては全例homo wild typeであった。\*6に関してION発生群で1例のみhetero variant typeを認めたが、その他全例homo wild typeであった。

#### 〈CYP3A4プロモータ領域のSNPの検討〉

本検討でER6、XREMにSNPの存在は認めなかった。

#### 〈CYP2D6, CYP2C19のSNPの検討〉

今回の全症例でのCYP2D6 allele頻度はCYP2D6\*1(41.2%)、CYP2D6\*2(21.3%)、CYP2D6\*10B(37.5%)であり、その他のallele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\*2 homo variantのION発生のORはそれ以外の遺伝子型と比較して4.7と上昇したが、統計学的有意差は認められなかった(表1, Adjusted OR=4.7, 95%CI:0.6~39.1)。またCYP2D6\*10B homo variantについてもORは1.8と上昇したが統計学的有意差は認められなかった(Adjusted OR=1.8, 95%CI:0.5~2.9)。

CYP2C19に関しては統計学的有意差は認められなかった。

#### 〈MDR1C3435Tの検討〉

今回の54例を対象とした遺伝子型の出現頻度は

CYP2D6 *2/*2 の ION リスク				
	N(%)	N(%)	odds ratio(95%CI)	
	case	reference	Crude	Adjusted*
others	23(28.8)	51(63.8)	1	1
*2/*2	3(3.8)	3(3.8)	2.2(0.8-11.8)	4.7(0.6-39.1)

\* This model includes genotype, total oral dose of steroid up to 9 week, sex, age, type of kidney, and presence or absence of acute rejection.

表 1

MDR1C3435T の ION リスク				
	N(%)	N(%)	odds ratio(95%CI)	
	case	reference	Crude	Adjusted*
C/C	9(16.7)	8(14.8)	1	1
C/T	14(25.9)	12(22.2)	1.0(0.3-3.5)	0.9(0.2-3.8)
T/T	1(1.9)	10(18.5)	0.09(0.01-0.86)#1	0.08(0.01-0.87)#2

\* This model includes genotype, total dose of steroid, sex, age, type of kidney, and presence or absence of acute rejection.

#1 P=0.036

#2 P=0.038

表 3

MDR13435CC (homo wild type) 31.5%, MDR13435CT (hetero variant type) 48.1%, MDR13435TT (homo variant type) 20.4% であり、過去の報告と出現頻度はほぼ一致した<sup>9)</sup>。単変量解析、多変量解析ともに MDR13435TT の遺伝子型で統計学的有意に ION 発生の OR 低下を認めた (表 3, Crude OR = 0.09, 95%CI: 0.01~0.86, p = 0.036. Adjusted OR = 0.08, 95%CI: 0.01~0.87, p=0.038)。

#### D. 考察

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。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、患者個人の体質つまりステロイド感受性を知ることが必要である。

ステロイド感受性に、ステロイドの体内動態に関係する蛋白質の遺伝子多型が関与している可能性があり、本研究ではステロイド代謝酵素である CYP450 の複数の分子種の SNP およびステロイドの膜輸送に重要である P-glycoprotein をコードする遺伝子である MDR1 の SNP について検討した。

CYP450 は临床上使用されるほとんどの脂溶性薬物の代謝に関与しており、現在までに 50 種類以上の分子種の存在が報告されている<sup>10)</sup>。ステロイド代謝に中心的な役割を果たすのは CYP3A4 であり、この酵素では現在までに複数の SNP の報告がある<sup>10)</sup>。本

検討では、Hsieh K-Pらにより報告されたSNPであるCYP3A4\*4, \*5, \*6について検討した。これらのSNPは中国人を対象として同定されたSNPで、ヒトにおいて6β-hydroxycortisol to free cortisol ratioを低下させると報告されている<sup>3)</sup>。われわれはこれらのSNPがION発生に関連している可能性を考え検討したが、allele頻度は低く、関連の可能性は低いと考えた。

さらに近年CYP3A4の酵素誘導に関する研究が進み、核内受容体のひとつであるプレグナンX受容体(PXR)が重要な役割を果たすことが報告されている<sup>11)</sup>。CYP3A4のプロモータ領域にPXR結合配列が同定され、ヒトではER6、XREMと名付けられた領域がCYP3A4の転写に重要であることが報告されている<sup>5)</sup>。ER6、XREMにSNPが存在すれば、酵素誘導の個人差の原因になることが考えられる。そこで直接塩基配列決定法を用い、これらの領域のSNPの有無を検索したが、明らかなSNPを同定することは出来なかった。これらの領域に関してはKuehl Pらが白人を対象にした報告をしているが、彼らの研究でも同様にSNPの存在は認められなかった<sup>12)</sup>。つまりER6、XREMは白人のみならず、日本人においても非常に保存された領域であることが判明した。

またステロイドをはじめとする脂溶性薬物の代謝に複数の分子種が関与する例が多く報告されており、今回われわれはSNPにより薬物代謝の個人差が出現する代表的な分子種であるCYP2D6、CYP2C19に関してもDNA chipを用いて検討した。DNA Chipはガラス基盤上に多種類の異なったDNAプローブを整列化し固定して、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。Affymetrix社製Gene ChipではCYP450の代表的な分子種である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。

本検討ではCYP2D6で1(wild type)、\*2、\*10Bの3種類のalleleが出現した。\*10Bは日本人をはじめとする東洋人に頻度の高いSNPで代謝活性が中間型を示すことから、さまざまな薬物代謝を考える上で非常に重要なSNPであるとされている<sup>14)</sup>。しかし、本検討では\*10B homo variantでION発生のodds ratioは上昇したが統計学的に有意差は認められなかった(表2、Adjusted OR = 1.8, 95%CI : 0.5~2.9)。また、\*2の酵素活性はwild typeよりやや劣るとされている<sup>15)</sup>。\*2によりステロイド代謝能が低下し、ION発生の原因になる可能性があるが、本検討では\*2 homo variantでION発生のOdds ratioが上昇したものの、統計学的有意にはいたらなかった(表1、Adjusted OR = 4.7, 95%CI : 0.6~39.1)。同様にCYP2C19に関してもION発生との統計学的有意差は認められず、ION発生との関連の可能性は低いと考えた。

次にわれわれは、輸送蛋白質であるP-glycoproteinに着目した。P-glycoproteinは、ATPをエネルギー源として薬物を能動的に細胞内から細胞外へ輸送する細胞膜蛋白として機能している。基質となる薬物には多くのものが報告されているが、临床上使用されるステロイドも基質になる<sup>16)</sup>。P-glycoproteinをコードする遺伝子はMDR1である。MDR1には現在までに複数のSNPが報告されている<sup>17)</sup>。

今回検討したC3435Tはexon26に存在し、MDR1の表現型を変化させる“functional”なSNPであると報告されている。しかし、その表現型に関しては、

CYP2D6 * 10B / * 10B の ION リスク				
	N(%)	N(%)	odds ratio(95%CI)	
	case	reference	Crude	Adjusted*
others	21(26.3)	45(56.3)	1	1
* 10B / * 10B	5(6.3)	9(11.3)	1.2(0.4-4.0)	1.8(0.5-2.9)

\* This model includes genotype, total oral dose of steroid up to 9 week, sex, age, type of kidney, and presence or absence of acute rejection.

表 2

“MDR1の機能を低下させる”という報告<sup>17)</sup>や逆に“MDR1の機能を上昇させる”という報告<sup>18)</sup>があり、一定の見解を得ていない。

本検討ではMDR13435TT (homo variant) でIONの発生リスクが統計学的有意差をもって低下した (表3、Adjusted OR = 0.08, 95%CI : 0.01~0.87, p=0.038)。ステロイドの細胞内蓄積がIONを誘発すると仮定すると、この結果はMDR1TTの遺伝子型ではMDR1の機能が上昇しており、その結果ION発生が抑制されたという仮説が成り立つ。しかし、本検討では症例数が54例と少なく、今後さらに症例数を増やし、統計学的有意性を確認する必要がある。またMDR1TTの表現型を実験系で確認することも必要である。

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。本研究からMDR1がION発生に深く関与する可能性が示された。今後、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. 参考文献

- 1) Kubo T, Fujioka M, Yamazoe S, et al. Relationship between steroid dosage and osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation on magnetic resonance imaging. *Transplant Proc* 1998;30:3039-40.
- 2) 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.
- 3) Hsieh K-P, Lin Y-Y, Cheng C-L, et al. Novel mutations of CYP3A4 in Chinese. *Drug Metab Dispos* 2001; 29: 268-73.
- 4) Gentile DM, Tomlinson ES, Maggs JL, et al. Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 277: 105-12.
- 5) Goodwin B, Hodgson E, Liddle C. The orphan human pregnane X receptor mediates the transcriptional activation of CYP3A4 by rifampicin through a distal enhancer module. *Mol Pharmacol* 1999; 56: 1329-39.
- 6) Stresser DM, Kupfer D. Prosubstrates of CYP3A4, the major human hepatic cytochrome P450: transformation into substrates by other P450 isoforms. *Biochem Pharmacol* 1998; 1: 1861-71.
- 7) 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.
- 8) Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K. MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 1391-400.
- 9) Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, et al. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet* 2001;358:383-4.
- 10) <http://www.imm.ki.se/CYPalleles/>
- 11) Kliewer SA, Moore JT, Wade L, et al. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell* 1998; 92: 73-82.
- 12) Kuehl P, Zhang J, Lin Y, et al. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 2001; 27: 383-91.
- 13) Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5022-6.
- 14) Chida M, Yokoi T, Kosaka Y, et al. Genetic polymorphism of CYP2D6 in the Japanese population. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 601-5.
- 15) Daly AK, Brockmoller J, Broly F, et al. Nomenclature for human CYP2D6 alleles. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 193-201.
- 16) Kim RB, Wandel C, Leake BF, et al. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-glycoprotein. *Pharm Res* 1999;16:408-14.
- 17) Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:3473-8.
- 18) Kim RB, Leake BF, Choo EF, et al. Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. *Clin Pharmacol Ther* 2001;70:189-99.

## E) 臟器移植

# ステロイド性大腿骨頭壊死症における遺伝子多型解析

中島 滋郎、田村 京子

(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)

浅野 武志、久保 俊一 (京都府立医科大学整形外科)

田中 隆、廣田 良夫

(大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学)

ステロイドホルモン薬を投与している腎移植患者56名においてステロイド性大腿骨頭壊死症発症とGR遺伝子多型 (JST6606、32069) およびCYP3A4遺伝子多型 (JST89336) の関連を検討した。JST32069多型のTアレルを有する患者で大腿骨頭壊死症発症が少ない傾向があるが、多変量解析の結果では今回の症例数では統計学的な有意差は認められなかった。今後、検討を進めていく予定である。

## A. 研究目的

グルココルチコイドの生体内での代謝および作用発現には様々な蛋白が関与している (図1)。ステロイドホルモン薬の作用あるいは大腿骨頭壊死症 (ION) を始めとする副作用の出現の個人差にはこれらをコードする遺伝子の多型が関与していると考えられているが、その詳細は依然明らかではない。昨年度までに我々はステロイドホルモン薬の反応性に関与すると考えられるグルココルチコイド受容体GR) や、CYP3A4、11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (11 $\beta$ -HSD) 遺伝子多型について健常日本人での出現頻度を明らかにしてきた。また、存在が確認された遺伝子多型とステロイド骨粗鬆症の関連について検討し

てきた。今回、それらのデータをもとに、ステロイドホルモン薬を投与されている腎移植後患者におけるIONの発症と上記遺伝子多型との関連について検討したので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 対象

検討対象は京都府立医科大学において腎移植を受けた患者56名 (男性39名、女性17名) で全員ステロイドホルモン薬とシクロスポリンを投与されている。移植時年齢は16から62歳 (平均37歳) であった。対象のうちION発症群は23名、ION非発症群は33名であった。

### 2. 方法

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ISNPのデータベースに基づき我々が健常日本人で検討してその存在が確認された遺伝子多型、すなわちGR遺伝子上の2ヶ所 (JST006606, 032069) (図2)、CYP3A4遺伝子上の1ヶ所 (JST89336) についての検討を行った。

書面による同意を得た患者より末梢血を採取しリンパ球を分離後、常法によりゲノムDNAを精製した。多型部位を含む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ス法により多型の有無について検討した。

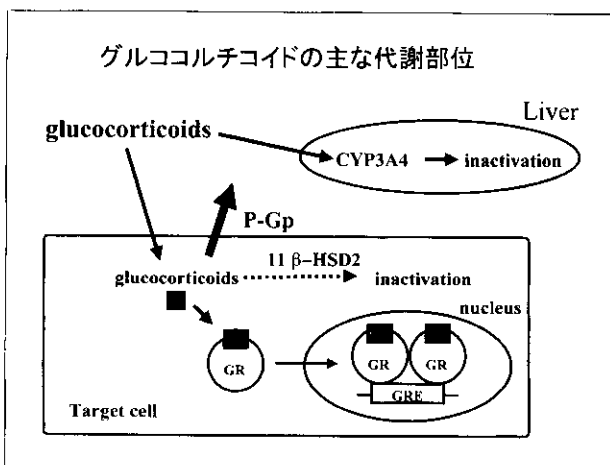


図1

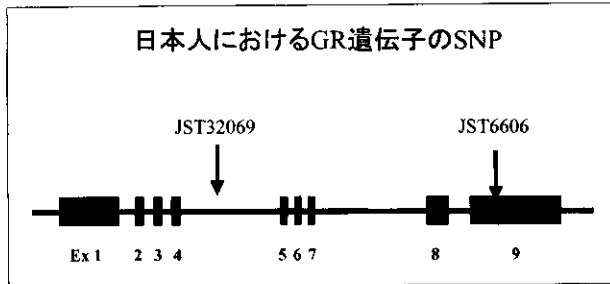


図2

**C. 結果**

GR遺伝子のJST6606多型の出現頻度はION発症群ではT/T 90.9%、T/C 9.1%、C/C 0%で、一方ION非発症群ではT/T 93.5%、T/C 6.5%、C/C 0%であった。両群間には差は認めなかった(図3)。また、両群とも以前報告した健常日本人での分布(T/T 93.3%、T/C 6.7%、C/C 0%)とほぼ一致している。

JST32069多型の出現頻度はION発症群ではT/T 4.5%、T/C 4.5%、C/C 90.9%でION非発症群ではT/T 6.1%、T/C 18.2%、C/C 75.8%であった(図4)。ION発症群はION非発症群や健常人(T/T 7.7%、T/C 17.9%、C/C 74.4%)の分布に比較して、Tアレルを有する率が低い傾向が見られた(図5)。ION非発症群は健常

**GR遺伝子多型と大腿骨頭壊死発症の関連**

GR6606	T/T	T/C	C/C
	ION(+)	90.9%	9.1%
ION(-)	93.5%	6.5%	0%
Normal	93.3%	6.7%	0%

図3

**GR遺伝子多型と大腿骨頭壊死発症の関連**

GR32069	T/T	T/C	C/C
	ION(+)	4.5%	4.5%
ION(-)	6.1%	18.2%	75.8%
Normal	7.7%	17.9%	74.4%

図4

人とほとんど同じ分布を示した。しかしながら、多変量解析の結果(図6)、Odds RatioはC/T0.2(95%CI, 0.02-1.9)、T/T 0.6(0.05-7.4)およびC/T+T/T0.3(0.06-1.6)で、今回の症例数では統計学的な有意差は認めなかった。

CYP3A4遺伝子のJST89336多型の出現頻度はION発症群ではA/A 77.2%、A/G 27.3%、G/G 0.5%で、ION非発症群ではA/A 62.5%、A/G 37.5%、G/G 0%であった。また、健常日本人での出現頻度はA/A 55.3%、A/G 36.2%、G/G 8.5%であった。

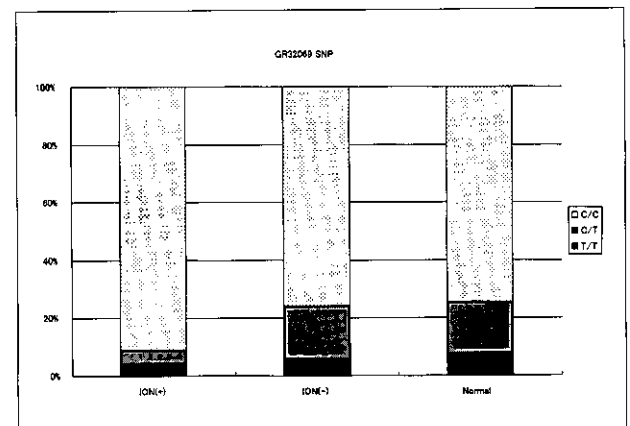


図5

**GR32069遺伝子多型**

3-stage analysis	ION		Odds ratio (95%CI)	
	+	-	Crude	Adjusted <sup>#</sup>
C/C	20	25	1	
C/T	1	6	0.2 (0.02-1.9)	Not performed
T/T	1	2	0.6 (0.05-7.4)	
2-stage analysis				
C/C	20	25	1	1
T/T+C/T	2	8	0.3 (0.06-1.6)	0.4 (0.07-2.4)

<sup>#</sup> This model includes GR32069 genotype, a kind of steroid protocol, sex, age, type of kidney, and presence or absence of acute rejection.

図6

**D. 考察**

ステロイドホルモン薬は各種疾患の治療に幅広く使用されているが、その副作用、特に骨に対する影響(骨粗鬆症や大腿骨頭壊死)は患者のQOLの維持に大きな問題となる。このような作用あるいは副作用の出現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と考えられるが、

その詳細は不明であった。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、遺伝子多型に人種差が非常に大きいことから日本人での解析が困難なであった。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、我々はまずグルココルチコイドの代謝や機能発現に重要である蛋白をコードする遺伝子を候補として選び、公開されているデータベースなどを参考にして日本人でのGR遺伝子やCYP3A4遺伝子などの多型出現頻度を明らかにしてきた。これらの結果に基づき、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発症に関与している因子を検討した。

現在のところ、GR遺伝子の2個の多型についての解析が終了し、引き続きCYP3A4遺伝子の検討を進めている。GR遺伝子のJST6606多型の出現頻度はION発生群、ION非発生群とも以前報告した健常日本人での分布とほぼ一致しており、ION発症との関連は否定的である。一方、JST32069多型に関してはION発生群はION非発生群に比較して、Tアレルを有する率が低い傾向が見られた。ION非発生群は健常人とほとんど同じ分布を示したことから、GR遺伝子のJST32069多型のTアレル保有者はIONを発症しにくい（グルココルチコイドの作用が弱い）可能性が考えられた。しかしながら、多変量解析の結果では、今回の症例数では統計学的な有意差は認めなかった。今後さらに症例数を増やして解析するとともに他の因子との関連についても検討する必要があると考えられる。

## E. まとめ

1. 腎移植患者56名においてステロイド性大腿骨頭壊死症発症とGR遺伝子多型（JST6606、32069）およびCYP3A4遺伝子多型（JST89336）の関連を検討した。
2. JST32069多型のTアレルを有する患者で大腿骨頭壊死症発症が少ない傾向があるが、統計学的な有意差は認められなかった。今後、例数を増やす予定である。
3. また、他のCYP3A4遺伝子多型（JST14730）についても現在さらに検討を進めている。