

大腿骨頭壊死症に対するMetal-on-Metal表面置換型人工股関節全置換術

菅野 伸彦、西井 孝、三木 秀宜

小山 毅、高尾 正樹、吉川 秀樹

(大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学)

中村 宣雄、山村 在慶 (協和会病院整形外科)

坂井 孝司、李 勝博、大園 健二

(国立病院大阪医療センター整形外科)

耐摩耗性に優れ、最も骨を温存できる人工股関節であるMetal-on-Metal表面置換型のBirminghamシステムを大腿骨頭壊死症に対し1998年より導入した。2年以上経過した16例18関節の成績を評価した。2-5年(平均3.2年)の経過で、臨床成績は日整会股関節スコアで術前57点から術後99点に改善し、X線学的にインプラントの移動なく、骨との界面に透亮像や骨溶解の所見はなかった。

A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ON)は、変形性股関節症(OA)に比較して若年で人工関節手術を施行せざるを得ない症例が多く、人工関節の生存率がOAよりも劣っているという報告が多い。従って、人工関節摺動部が耐摩耗特性に優れ、なおかつ再置換術に至った場合でも骨が温存できているということを考慮した人工関節の選択がONには必要である。様々な人工股関節のなかで、表面置換型は最も骨を温存することが可能¹⁾、高カーボン含有コバルトクロム合金のMetal on Metal表面置換型人工股関節(BHR)は摺動部の低摩耗特性を持ち合わせており、上述の条件に合致している²⁾。今回、ONに対しBHRを施行した症例の2年以上の短期成績を調査し、その有効性を検証した。

B. 研究方法

ONに対してBHRを用いて手術を行い2年以上経過した16例18関節の追跡調査を行った。女性4例4関節、男性12例14関節で、手術時年齢は20歳から59歳(平均41歳)で、アルコール性ONが10関節、ステロイド性が8関節であった。術前病期は3Aが4関節、3Bが7関節、4が7関節であった。病型はBが1関節、C1が6関節、C2が11関節であった。壊死領域が骨頭の50%を超えるものは適応外としたが、病期4となり壊死部

が新生骨に置換されてきたと判断された症例では、元の壊死領域が50%を超える症例にもBHRを適応とした。

C. 研究結果

追跡期間は2年から5年(平均3.2年)で、股関節機能スコアは術前56.4から最終調査時99.2と著明な改善を認めた。骨折、脱臼、感染などの合併症はなく、X線学的にも骨とインプラントの間隙やインプラントの移動なく、全例強固な固定と良好な股関節機能再建ができていた。

D. 考察

ONに対するインプラント手術は、大腿骨頭側のみを置換する人工骨頭または表面置換骨頭があるが、バイポーラー型でも臼蓋側への埋入移動や痛みの点で全置換術に比較して劣る³⁾。耐摩耗性能の高い摺動部を持つのであれば、全置換術の方が長期的にも優れていると考えられるが、表面置換型で耐摩耗性能が優れていれば更に良いと思われる。今回の調査により、病期3以降のONに対するBHR手術は、非常に良好な短期成績が得られることが明らかとなった。本症例の更なる長期成績の追跡は必要であるが、BHRの耐摩耗特性から良好な長期生存率も期待でき、今後注目されるべきONの治療の一つである。

F. 参考文献

- 1) Kishida Y, Sugano N, et al: Preservation of bone mineral density at the proximal femur after surface replacement of the hip. J Bone Joint Surg (in press).
- 2) McMinn D, Treacy R, Lin K, Pynsent P: Metal on metal surface replacement of the hip. Experience of the McMinn prosthesis. Clin Orthop. 1996;(329 Suppl):S89-98.
- 3) Lee SB, Sugano N, Nakata N, Matsui M, Ohzono K: Comparison between bipolar hemiarthroplasty and THA for ON of the femoral head. Clin Orthop (in press).

特発性大腿骨頭壊死症に対する 人工股関節置換術の術後成績：多施設共同研究

小林 千益、堀内 博志 (信州大学)
山本 卓明、本村 悟朗、神宮司誠也 (九州大学)
佛淵 孝夫、重松 正森 (佐賀大学)
樋口富士男 (久留米大学)
大園 健二、坂井 孝司 (国立病院大阪医療センター)
菅野 伸彦、高尾 正樹 (大阪大学)
進藤 裕幸、榎本 寛、岡野 邦彦 (長崎大学)
大橋 弘嗣、高岡 邦夫 (大阪市立大学)
久保 俊一、井上 重洋、藤岡 幹浩 (京都府立医科大学)
松本 忠美、杉森 端三 (金沢医科大学)

特発性大腿骨頭壊死症（以下ION）に対する人工股関節置換術（以下THA）の長期耐用性を、他の股関節疾患と比較した。1986-1987年に9施設で行った初回THA617関節を対象とした。手術時年齢は平均61歳で、女性が89%を占めた。診断は股関節症が80%で、IONは3.4%（21関節）を占めた。平均経過観察期間は10年であった。IONのTHAの耐用性は、大腿骨コンポーネントには差がなかったが、ソケットは股関節症より劣った。ソケットの耐用性がIONで劣ることは、さらなる調査研究を要する。

A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症（以下ION）に対する人工股関節置換術（以下THA）の長期耐用性を、他の股関節疾患と比較した。

B. 研究方法

1986-1987年に9施設で行った初回THA617関節を対象とした。手術時年齢は平均61歳で、女性が89%を占めた。診断は股関節症が80%で、IONは3.4%（21関節）を占めた。平均経過観察期間は10年であった。

（倫理面への配慮）

個人情報管理を徹底し、プライバシーの保護を厳守する。

C. 研究結果

IONのTHAの耐用性は大腿骨コンポーネントには差がなかったが、ソケットは股関節症より劣った。

D. 考察

これまでに、IONに対するTHAでは、ソケットの耐用性が不良との報告がある。股関節症に比べ、患者が若く、活動性が高いため、ソケットのポリエチレンを摩耗して、破綻に至ることが多い。さらに、股関節症の象牙化した臼蓋と比べ、IONの臼蓋の強度が低いことも関連しているものと考えられる。

E. 結論

IONに対するTHAは、ソケットの耐用性が股関節症に対するTHAと比べ、劣る。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kobayashi S et al: Total hip arthroplasty with bulk femoral head autograft for acetabular reconstruction in

developmental dysplasia of the hip. J Bone Joint Surg
85A:615-621, 2003

- 2) Kobayashi S et al: Trabecular minimodeling in human iliac bone. Bone 32: 163-9, 2003
 - 3) Ohta H, Kobayashi S et al: Sequential changes in periprosthetic bone mineral density following total hip arthroplasty. J Bone Miner Metab 21: 229-233, 2003
 - 4) 小林千益ほか：セメント固定人工股関節の臨床成績. New Mook整形外科 13: 232- 238, 2003
2. 学会発表
- 1) Kobayashi S et al: Bipolar femoral head replacements are less durable than total hip arthroplasties in patients with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head. Association of Bone & Joint Surgeons, Paris, 2003

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

アレンドロネート投与による特発性大腿骨頭壊死症の 骨頭圧潰進行の予防効果に関する研究

西井 孝、菅野 伸彦、三木 秀宣
高尾 正樹、小山 毅、吉川 秀樹

(大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学)

特発性大腿骨頭壊死症患者11例14股関節に対しアレンドロネート連日投与を開始後1年間、臨床症状、単純X線評価、MRI評価および骨代謝マーカ測定を施行し、骨頭圧潰進行の予防効果を調査した。アレンドロネート非投与骨壊死症患者6例11股関節をコントロール群とした。コントロール群に対し、アレンドロネート投与群では有意に股関節疼痛の悪化例および大腿骨頭圧潰進行例の比率が低く、アレンドロネート投与による骨頭圧潰進行予防における臨床的有用性が示唆された。

A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症における骨頭圧潰の発生および進行には、壊死領域における骨吸収などの組織学的修復反応が強く関連することが示唆されている^{1,2)}。強力な骨吸収抑制作用を有するアレンドロネート療法による、骨頭圧潰進行の予防効果について臨床研究を行った。

B. 研究方法

特発性大腿骨頭壊死症患者11例14股関節に対しアレンドロネート連日投与を開始し、投与前と投与後3・6・12ヶ月時に、臨床症状、単純X線評価、骨代謝マーカ(N-telopeptide of type I collagenおよびbone alkaline phosphatase)を調査した。投与前と投与後12ヶ月時にMRI評価を施行し、壊死領域の信号変化を調査した。アレンドロネート非投与骨壊死症患者6例11股関節をコントロール群とし、同様の追跡調査をおこなった。

(倫理面への配慮)

研究開始前に患者にアレンドロネート投与による期待される効果と可能性のある合併症・副作用、および拒否しても治療における損失のないことを説明し、了承の得られた患者にアレンドロネート投与をおこなった。

C. 研究結果

骨代謝マーカはアレンドロネート投与3ヶ月後に低下し、その後明らかな変化傾向はみられなかった。投与後12ヶ月時、骨形成マーカbone alkaline phosphataseが投与前の平均80%であったのに対し、骨吸収マーカN-telopeptide of type I collagenは平均60%と、骨吸収マーカがより強く抑制されていた。

股関節疼痛は、コントロール群で開始時より不変が6関節、悪化が5関節であったのに対し、アレンドロネート投与群では不変が11関節、改善が3関節で、悪化例はなかった。X線評価において、コントロール群で圧潰進行例は11関節中4関節にみられたのに対し、アレンドロネート投与群では14関節中圧潰進行例はなかった。アレンドロネート投与群は、コントロール群に対し、股関節疼痛悪化および圧潰進行の頻度は有意に低かった(P=0.0087およびp=0.026, Fisher's exact probability test)。

12ヶ月時MRI評価で、開始時に比較し壊死部信号変化を認めた症例は、コントロール群で5関節、アレンドロネート投与群で1関節と、アレンドロネート投与群で変化が乏しかった。

D. 考察

近年、動物実験モデルを用いビスフォスフォネート剤投与による壊死骨骨吸収抑制や圧潰予防効果を示す報告がみられる^{3,4)}。本研究は、はじめてア

アレンドロネート剤の臨床症例における治療効果をアレンドロネート投与群とコントロール群の対比下に明らかにした。経過観察期間は1年と短期であるが、アレンドロネート投与による臨床症状悪化と骨頭圧潰進行の予防効果が示された。MRIの経時的追跡では、アレンドロネート投与による壊死領域の縮小や内部質的变化などはみられず、骨吸収などの修復組織活動性の抑制を作用機序とする従来の実験的報告に合致する結果であった。

E. 結論

アレンドロネート投与は特発性大腿骨頭壊死症における有効な薬物学的治療法の一つになりうる可能性が示唆され、大規模症例での無作為選択投与による長期経過追跡などの今後の研究が期待される。

F. 参考文献

- 1) Plenk H, Jr., Gstettner M, Grossschmidt K, Breitenseher M, Urban M, Hofmann S: Magnetic resonance imaging and histology of repair in femoral head osteonecrosis. Clin Orthop:42-53, 2001
- 2) Glimcher MJ, Kenzora JE: The biology of osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implications. III. Discussion of the etiology and genesis of the pathological sequelae; comments on treatment. Clin Orthop:273-312, 1979
- 3) Astrand J, Aspenberg P: Systemic alendronate prevents resorption of necrotic bone during revascularization. A bone chamber study in rats. BMC Musculoskelet Disord 3:19, 2002
- 4) Little DG, Peat RA, McEvoy A, Williams PR, Smith EJ, Baldock PA: Zoledronic acid treatment results in retention of femoral head structure after traumatic osteonecrosis in young Wistar rats. J Bone Miner Res 18:2016-22, 2003。

D) 遺伝子解析

GR/APIクロストーク依存的な新規転写共役因子複合体同定の試みと解析

加藤 茂明、高田伊知郎（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、リガンド依存性転写制御因子である核内受容体を介した標的遺伝子群の転写調節により発揮される。また、近年の研究により、ステロイドホルモンの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の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、グルココルチコイド受容体（GR）に着目した。本研究ではGR強制発現細胞株を用いた新たな転写共役因子群の単離・同定を行った。更に骨代謝に重要な転写因子APIの活性がGRによって抑制される事象に着目し、GR/API複合体の構成因子の同定の試みと候補因子について報告する。

A. 研究目的

大腿骨頭壊死症の原因の1つであるグルココルチコイド受容体（GR）の転写制御にはリガンド結合依存的に相互作用する転写共役因子複合体群が鍵となる。またGRはリン酸化シグナルで制御される転写因子APIの転写活性化能を抑制し、抗炎症作用や骨粗鬆症促進作用をもたらすが、その分子機構は未解明である。そこで本研究ではGRと複合体形成する転写共役因子群やGR/APIのクロストークに關与する複合体因子群を単離・同定し、GRの機能解明を試みた。特に骨代謝関連因子のAPI標的遺伝子発現制御に着目し、クロストークの分子機構の解明を行った。

B. 研究方法

まずGRに結合する因子群を取得するために、Flagタグ融合GRタンパク質の発現ベクターを作成し、この発現ベクターを恒常的に発現させる浮遊HeLa細胞を樹立した。更に抽出した細胞質・核タンパク質画分においてGRとAPIを含む産物を同定し、Flagタグ抗体カラムを用いて精製した。得られた精製産物に關し可能な量であればTOFMS法でタンパク質を同定し、GR/APIクロストークに含まれる因子を同定した。その後GR/APIクロストークに關連する標的遺伝子のプロモーターにおける複合体形成能を検討した。

（倫理面への配慮）

全ての実験材料の取り扱いには東京大学実験取り扱い規約に則って行った。

C. 研究結果

まずGRを強制発現させた浮遊HeLa細胞株の樹立を試みた。発現をGR抗体によるウェスタンブロッティングで確認した結果、GRを十分量発現した細胞を取得する事に成功した。更にこの細胞で発現させたGRが、GRリガンドであるデキサメタゾン（Dex）添加後30分で核内に移行する事を免疫染色法で確認した。次にこの細胞株の大量培養を行い、細胞質タンパクと核タンパクを分離・抽出し、APIの活性化剤TPAとDex添加時にGRがどちらの画分に局在するか検討を行った。その結果、TPA・Dex存在下でGRは細胞核に強く発現する事を見出した。

次に得られたFlagGRを含む核タンパク質をFlag抗体カラムと結合させ、FlagペプチドでGR複合体を溶出した。更にこの溶出産物をグリセロール密度勾配遠心法を用いて複合体の大きさで分画した結果、200kD前後の比較的小さい分子量の画分にGRとAPIが存在する事を見出した。この分離画分に含まれる因子を検討した結果、ヒストン脱アセチル化酵素であるHDAC2を見出した。

現在骨代謝に關与するAPIの標的遺伝子としてサイトカインシグナルであるIL11等が知られている。そこでこのプロモーターをクローニングし、ルシフェラーゼレポーターを用いて細胞内でのプロモーター活性を調べたところ、Dex依存的なAPI活性の抑制が観察された。更にHDAC酵素活性阻害剤であるTSAを添加すると、この抑制が解除される事を見出した。

D. 考察

以上の結果から、GR/AP1クロストークに關与する複合体因子としてHDAC2を見出した。現在までGR全長の発現ベクターを強制発現させた浮遊HeLa細胞の例はなく、今回樹立した細胞株が初めてである。GRと複合体形成する転写共役因子群の同定は、リガンド依存的な転写活性化能を担うC末端のDE/F領域を用いた系で行われるのが殆どであった。そのため今回樹立した細胞株は、リガンド非依存的な転写活性化能を担うN末端のA/B領域や、シグナル依存的な複合体を分離・同定するのに最適と思われる。

現在この系を用いたGRの精製は未だ進展中であるが、既に候補因子としてHDAC2を見出した。この遺伝子産物はヌクレオソームの構造因子であるヒストンのアセチル化を脱アセチル化する作用を持つ。近年このヒストンの修飾が転写活性と密接に關わる事が知られており、今回見出したHDACがGRやAP1の活性とどの様に関わるのか、組織特異的な作用はどの様な機構によるのか、今後の研究の発展が期待出来る。

E. 結論

FlagGR強制発現させた浮遊HeLa細胞の樹立に成功した。

Dex、TPA依存的なGR/AP1複合体の条件を見出した。

GR/AP1複合体の構成因子として、ヒストン脱アセチル化酵素HDAC2を見出した。

F. 研究発表

- 1) 発表論文 (原著)
- 1) Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., Nakagawa, T., Ito, T., Ishimi, Y., Nagasawa, H., Matsumoto, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: Promoter targeting of a nuclear receptor with an ATP-dependent chromatin remodeling complex related to Williams syndrome. *Cell*, 113, 905-917, 2003.
- 2) Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Modulation of estrogen receptor signalin by an association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423, 545-550, 2003.
- 3) 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 PPARg function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, 5, 224-230, 2003.
- 4) Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Kato, S.: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 9416-9421, 2003.
- 5) Ishitani, K., Yoshida, T., Kitagawa, H., Ohta, H., Nozawa, S., Kato, S.: p54nrb acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 660-665, 2003.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Taketani, Y., Nomoto, M., Yamamoto, H., Isshiki, M., Morita, K., Arai, H., Miyamoto, K., Kato, S., Takeda E.: Increase in IP3 and intracellular Ca²⁺ induced by phosphate depletion in LLC-PK1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 287-291, 2003.
- 9) Fujishima, T., Kittaka, A., Yamaoka, K., Takeyama, K., Kato, S., Takayama, H.: Synthesis of 2, 2-dimethyl-1, 25-dihydroxyvitamin D3: A-ring structural motif that modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1863-1869, 2003.
- 10) Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., Kajita, Y., Uehara, M., Tanaka, S., Sakai, A., Kato, S., Nakamura, T., Suzuki, K.: Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 1217-1226, 2003.
- 11) Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T.,

- Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003 (in press).
- 12) Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., Akaike, M., Yoshizawa, T., Kato, S., Matsumoto, T.: Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology*, 2003 (in press).
- 13) WuQiang, F., Yanase, T., Yin, W., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol.*, 2003 (in press).

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に関する研究

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、リガンド依存性転写制御因子である核内受容体を介した標的遺伝子群の転写調節により発揮される。また、近年の研究により、ステロイドホルモンの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の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。本研究では、グルココルチコイド受容体等の核内受容体の転写活性化に必須の転写共役因子であるSRC-1 (steroid receptor coactivator-1) に着目し、SRC-1 KOマウスの作出と骨における表現型の結果について報告する。

A. 研究目的

大腿骨頭壊死症の原因の1つであるグルココルチコイド受容体 (GR) の転写制御にはリガンド結合依存的に相互作用する転写共役因子複合体群が鍵となる。SRC-1 (steroid receptor coactivator-1) は、性ホルモンやグルココルチコイドなどのステロイド受容体と結合する転写共役活性化因子として初めてクローニングされた分子である。本研究ではSRC-1の生体内機能を解析するために、ノックアウトマウスを作成し、骨代謝調節におけるSRC-1の機能を検討した。

B. 研究方法

従来の遺伝子組み換え法により作出されたSRC-1 KOマウスは既に報告されているが、骨代謝調節に関する解析はなされていない。今回我々は特定遺伝子の欠損を時期特異的・細胞種特異的に誘導できるCre/lox P systemを用いて、その遺伝子座をloxP配列で挟んだマウス (SRC-1^{lox}マウス) を作出し、これを全身性にCreを発現するCMV-Creマウスと交配させてSRC-1欠損マウス (SRC-1KO) の作成に成功した。これら雌雄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扱い規約に則って行った。

C. 研究結果

SRC-1KOは、雌雄共に発生・成長に異常なく生殖も可能であったが、DEXAを用いて骨量、脂肪重量について解析した結果、脂肪重量が増加している反面、大腿骨の骨密度が同胞野生型マウス (WT) と比較して約20%低下していた。さらに、3D-CTにより検討したところ、骨量減少は皮質骨・海面骨ともに認められた。骨組織形態計測では、SRC-1KOにおいて骨形成および骨吸収の指標が共に上昇しており、血中ALP、オステオカルシンおよび尿中デオキシピリジノリン濃度も増加していた。一方、雌の血中estradiol濃度が約40%、雄の血中testosterone濃度が約30%、WTに比べて上昇していた。雌雄ともに4ヶ月齢で性腺除去 (OVXおよびORX) を行ったところ、6ヶ月齢でWTとSRC-1KOの骨密度は同程度にまで低下した。これにそれぞれestradiolおよびDHTの徐放ペレットを投与すると、WTは無処置群と同程度まで骨量が回復したのに対し、SRC-1KOでは雌雄とも低下分の約半分の回復しか示さなかった。一方、prednisolone投与による骨量低下はWTとSRC-1KOで同程度に見られた。

D. 考察

SRC-1KOは雌雄ともに性ホルモンの骨量維持作用の低下に基づく高代謝回転型の骨粗鬆化を呈することが明らかになり、生体内におけるSRC-1の骨量維持機構における重要性が示された。また、アンドロ

ゲン、エストロゲン負荷実験より、SRC-1の欠損はエストロゲンおよびアンドロゲンによる骨量維持作用を抑制していることが明らかになった。今後はエストロゲン受容体またはアンドロゲン受容体ヘテロ欠損との二重欠損マウスを作成、解析することで、性ステロイドホルモン受容体を介した骨代謝制御におけるSRC-1機能の必須性を明確にする予定である。一方、prednisolone投与による骨量低下はWTとSRC-1KOで同程度に見られたことより、骨におけるグルココルチコイドシグナルにはSRC-1は関与していないことが示された。

全身性のSRC-1欠損では血中アンドロゲン、エストロゲン濃度の上昇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を発現させたノックインマウス及び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SRC-1KOマウスを作出し、SRC-1の骨細胞特異的機能の詳細を明らかにする必要がある。

E. 結論

1. Cre-loxP systemを用いて雌雄のSRC-1KOマウスのラインを確立した。
2. SRC-1KO雌雄マウスは高回転型の骨量減少を呈した。
3. SRC-1はエストロゲンおよびアンドロゲンによる骨量維持作用に必須の因子であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文 (原著)
- 1) Kitagawa, H., Fujiki, R., Yoshimura, K., Mezaki, Y., Uematsu, Y., Matsui, D., Ogawa, S., Unno, K., Okubo, M., Tokita, A., Nakagawa, T., Ito, T., Ishimi, Y., Nagasawa, H., Matsumoto, T., Yanagisawa, J., Kato, S.: Promoter targeting of a nuclear receptor with an ATP-dependent chromatin remodeling complex related to Williams syndrome. *Cell*, 113, 905-917, 2003.
- 2) Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S.: Modulation of estrogen receptor signalin by an association with the activated dioxin receptor. *Nature*, 423, 545-550, 2003.
- 3) 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 γ function through the TAK1/TAB1-NIK mediated cascade. *Nature Cell Biol.*, 5, 224-230, 2003.
- 4) Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Metzger, D., Chambon, P., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Kato, S.: Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 9416-9421, 2003.
 - 5) Ishitani, K., Yoshida, T., Kitagawa, H., Ohta, H., Nozawa, S., Kato, S.: p54nrb acts as a transcriptional coactivator for activation function 1 of the human androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 306, 660-665, 2003.
 - 6) 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-1 (ChM-1) is a bone remodeling factor. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 636-644, 2003.
 - 7) 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.
 - 8) Taketani, Y., Nomoto, M., Yamamoto, H., Isshiki, M., Morita, K., Arai, H., Miyamoto, K., Kato, S., Takeda E.: Increase in IP3 and intracellular Ca²⁺ induced by phosphate depletion in LLC-PK1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 305, 287-291, 2003.
 - 9) Fujishima, T., Kittaka, A., Yamaoka, K., Takeyama, K., Kato, S., Takayama, H.: Synthesis of 2, 2-dimethyl-1, 25-dihydroxyvitamin D3: A-ring structural motif that modulates interactions of vitamin D receptor with transcriptional coactivators. *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1863-1869, 2003.
 - 10) Masuyama, R., Nakaya, Y., Katsumata, S., Kajita, Y., Uehara, M., Tanaka, S., Sakai, A., Kato, S., Nakamura, T., Suzuki, K.: Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J. Bone Miner. Res.*, 18, 1217-1226, 2003.
 - 11) Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T.,

- Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003 (in press).
- 12) Endo, I., Inoue, D., Mitsui, T., Umaki, Y., Akaike, M., Yoshizawa, T., Kato, S., Matsumoto, T.: Deletion of vitamin D receptor gene in mice results in abnormal skeletal muscle development with deregulated expression of myoregulatory transcription factors. *Endocrinology*, 2003 (in press).
- 13) WuQiang, F., Yanase, T., Yin, W., Kawate, H., Saitoh, M., Oba, K., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Yanagisawa, J., Kato, S., Takayanagi, R., Nawata, H.: Protein kinase A potentiates Ad4BP/SF-1 transactivation by re-integrating the subcellular dynamic interactions of the nuclear receptor with its cofactors, GCN5/TRRAP, and suppressor, DAX-1: a laser confocal imaging study in living KGN cells. *Mol Endocrinol.*, 2003 (in press).

炎症とアポトーシスシグナル伝達制御に関するASC 遺伝子の研究

谷口 俊一郎 (信州大学大学院医学研究科)

炎症とアポトーシスシグナル伝達制御に関わる新規遺伝子ASCを見出した。ASCはN末に家族性地中海熱の原因遺伝子pyrinと相同性を有する領域PYDとC末にカスパーリクルート領域CARDを有している。最近、ASCはカスパー1を活性化因子として機能すること、IL-1 β 産生を制御していることが判明している。ASC遺伝子はメチル化によって発現が低下することが認められた。

A. 研究目的

特発性大腿骨骨頭壊死は炎症、アポトーシス制御の乱れの結果と捉え、炎症とアポトーシスシグナル伝達制御に関わる新規遺伝子ASCの発現制御をCpG-islandsのメチル化に着目して調べる。

B. 研究方法

悪性黒色腫などヒト癌の培養細胞株や手術材料からDNAを抽出し、bisulfate処理後、メチレーション特異的PCR、染色体DNAの塩基配列決定によって、ASC遺伝子のメチル化を、抗ASC抗体によるWestern blot解析、免疫組織染色でASC蛋白質の発現を調べた。

(倫理面への配慮)

手術材料の実験使用については、患者さんの同意を得ると同時に信州大学医学部ヒト遺伝子解析に関する倫理委員会の審査を受け、承諾を受けた。

C. 研究結果

ASCはヒト悪性黒色腫細胞株および組織の60%において、発現が低下していた。一方、メラノサイト細胞や良性色素性母斑組織では強く発現していた。

ASC遺伝子CpG islandsのメチレーションは細胞株の50%でみられ、メチレーションがみられた細胞株の70%においてASC発現の低下がみられた。Bisulfate処理染色体DNAについて、塩基配列を調べ、ASCのメチレーションの程度と発現の程度を比較してみたところ、メチレーションの多寡はASC蛋白質の発現の多寡と逆相関することが、分かった。メチル化を示した細胞株を5-aza-2deoxycytidineで処理し、脱メ

チル化を試みたところ、メチル化の減少に伴い、ASC発現が増強した。ヒト大腸癌、肺癌などでも、癌細胞株と組織におけるメチル化が観察され、全てではないが、ASC発現の低下の原因のひとつとして、ASC遺伝子のメチル化が関与していることが明らかとなった。

D. 考察

材料として、ヒト悪性黒色腫を用いて、炎症、アポトーシス制御分子であるASC蛋白質の癌における発現低下とそれを誘導するものとしてASC遺伝子のメチレーションが明らかになった。遺伝子のメチル化はepigenetic eventsのひとつであり、生活環境によってその多寡が変化すると考えられる。炎症に関連する種々の病態における個人差を理解する上で、ASC発現と遺伝子のメチレーションに着目することは重要である。

ASCの個体レベルでの機能をさらに解明するために、現在ASC欠失マウスを作成し、その形質を解析中である。

E. 結論

種々の後天的環境因子と特発性大腿骨骨頭壊死発症との関係が示唆されているが、炎症反応、アポトーシス制御系のホメオスタシスの乱れとして特発性大腿骨骨頭壊死発症を捉えると、血管内皮、炎症細胞におけるASCのメチレーションとそれに依存するASC蛋白質発現の程度は環境因子に対する宿主側の感受性の程度を左右する因子のひとつとなる可能性がある。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Masumoto J, Weibin Zhou, Felicia F.Chen,Fengyun Su, John,Y.Kuwada, Hidaka E, Katsuyama T, Sagara J, Taniguchi S, Phuong Ngo-,Hazelett, John H.Postlethwait, Gabriel Nunez, Inohara N. Caspy:A Zebrafish caspase activated by ASC oligomerization required for pharyngeal Arch development J.Biol.Chem,278(6):4268-76,2003.
- 2) Masumoto J, Theresa A.Dowds, Philip Schaner, Felicia F.Chen, Ogura Y, Katsuyama T, Sagara J, Taniguchi S, Deborh L.Gumucio, Gabriel Nunez, Inohara N: ASC is an activating for caspase-8-dependent apoptosis. BBRC 303:69-73,2003.
- 3) Guan X,Sagara J, Yokoyama T, Koganehira Y, Oguchi M, Saida T, Taniguchi S:ASC/TMS-1, a caspase-1 activating adaptor, is down-regulated by aberrant metylation in human melanoma. Int. J. Cancer 107:202-208,2003
- 4) Yokoyama T, Sagara J, Guan X, Masumoto J, Takeoka M, Komiyama Y, Miyata K, Higuchi K, Taniguchi S: Methylation of ASC/TMS1, a proapoptotic gene responsible for activating procaspase-1, in human colorectal cancer. Cancer Letters (in press)

2. 学会発表

メラノーマにおけるCaspase-1活性化因子ASCの発現低下とメチル化について：関 新、相良淳二、横山太郎、小金平容子、小口美抄枝、斎田俊明、谷口俊一郎、日本癌学会総会、2003年（名古屋）。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特開2001-275681

アポトーシス関連蛋白質、その抗体及びそのDNA

ステロイド投与患者におけるステロイドホルモン感受性の検討

中島 滋郎 (大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学小児発達医学)

昨年度までに我々が健常日本人での分布を確かめ大腿骨頭壊死症発症との関連が示唆された遺伝子多型について、ステロイド抵抗性ネフローゼ患者および系統的に骨塩量を測定したステロイド投与患者で検討することで、ステロイドホルモン薬の作用あるいは副作用発現との関係をそれぞれ解析した。今回の検討では、まだ患者数が非常に少ないことから明らかな結果は得られなかった。今後、11 β HSD 2遺伝子プロモーター領域の解析を含めて、さらに検討を進めていく予定である。

A. 研究目的

ステロイドホルモン薬の作用あるいは副作用の出現には個人差が存在し、それには何らかの遺伝的因子が影響していると考えられる。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おり、それらの遺伝子多型がステロイドホルモン薬の反応性を規定している可能性が考えられる。昨年度までに我々は、健常日本人および腎移植後の大腿骨頭壊死症発生患者において検討を行い、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) 日本での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。このうちJST032069多型についてはTアレルを持つ患者がCアレルを持つ患者に比べて腎移植後の大腿骨頭壊死症の発症が少ない傾向を認めた。一方JST006606では、アレル間に差を認めなかった。
2. CYP3A4遺伝子のJST89336多型は、腎移植患者での大腿骨頭壊死症発生と明らかな関連は認めなかった。
3. p-糖タンパクをコードするMDR-1遺伝子多型と腎移植後の大腿骨頭壊死症発生には優れた関連を認めた (Asano T et al. Pharmacogenetics 13: 675, 2003)
4. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase (11 β HSD 2) 遺伝子については (1) 健常日本人ではイントロンを含むエクソン2から5までの部分には、欧米で既報のG534A多型を含め遺伝子多型は認めなかった。

今回はこれらの遺伝子多型とステロイドホルモン

の作用の関連についてステロイド抵抗性ネフローゼ患者で、ステロイドホルモンの副作用との関連を慢性糸球体腎炎患者での骨粗鬆症について、それぞれ検討した。また、11 β HSD 2遺伝子についてはプロモーター領域の検索を試みた。

B. 研究方法

1. 当科および関連病院で加療中のステロイド抵抗性／依存性ネフローゼ症候群患児12名 (抵抗性 8、依存性 4名) におけるGRおよびMDR 1遺伝子多型の分布を健常日本人と比較した。
2. 当科で加療中の、ステロイドホルモン薬を長期投与した慢性糸球体腎炎 (IgA腎症、非IgAメサンギウム増殖性腎炎、紫斑病性腎炎) 患児9名における骨塩量 (全身、腰椎) および骨代謝マーカー (血清アルカリフォスファターゼ、尿中デオキシピリジノリン) の変化と遺伝子多型の関連を検討した。各パラメーターの変化は投与開始前の値と投与開始1および2ヶ月後の値の変化率で検討した。
3. 11 β HSD2遺伝子のプロモーター領域の増幅は以下のように行った。まず、ヒト株化骨芽細胞SaOS-2細胞、ヒト末梢血リンパ球およびヒト株化腎尿細管細胞HEK293細胞より総RNAを抽出した。各RNAの5' CAP部に既知の配列のオリゴRNAを結合した後、SuperScript IIIを用いて逆転写反応を行った。CAP部分に結合させたDNA配列および11 β HSD 2遺伝子エクソン2上のDNA配列に対するプライマーセットを用いてPCR反応を行った。

C. 研究結果

1. 難治性ネフローゼ患児でのMDR 1遺伝子多型 (Exon26 C3435T多型) の分布はT/T 8.3% (1/12)、T/C 83.4% (10/12)、C/C 8.3% (1/12) であった。以前検討した健常日本人での分布はT/T 25%、T/C 62%、C/C 13%であった。また、GR遺伝子のJST032069多型の分布はT/T 27.2% (3/11)、T/C 9.2% (1/11)、C/C 63.6% (7/11) であった (1名は未同定)。また我々の検討では、健常日本人での分布はT/T 7.7%、T/C 17.9%、C/C 74.4%であった。

2. ステロイドホルモン薬投与患者9名では、GR遺伝子のJST06606多型の分布はT/T 7名、T/C 2名、C/C 0名で、MDR 1遺伝子C3435T多型の分布はT/T 0名、T/C 4名、C/C 5名であった。投与開始後2ヶ月時の腰椎骨塩量の低下率とGR06606多型の関係において、C/Tでの低下率が少ない傾向が見られた。しかしながら、骨形成マーカーである血清アルカリフォスファターゼや骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリンの変化とは関連は認めなかった。また、MDR 1遺伝子C3435T多型と骨塩量 (全身、腰椎) および骨代謝マーカー (血清アルカリフォスファターゼ、尿中デオキシピリジノリン) の変化には相関は見られなかった。

3. 11 β HSD 2遺伝子の発現が少ないと思われるヒト株化骨芽細胞SaOS-2細胞およびヒト末梢血リンパ球では特異的なPCR産物のバンドは認めなかった。ヒト株化腎尿管細胞HEK293細胞より抽出したRNAでは10Kb付近に薄いPCR産物のバンドを認めたため、現在さらにnested PCR反応を行いさらなる増幅を試みている。

D. 考察

現在、ステロイドホルモン薬は各種疾患の治療に非常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) は大きな問題となる。ステロイドホルモン薬の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、ステロイド感受性に遺伝的因子が関与していると考えられるが、その詳細なメカニズムは依然不明である。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。そこで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、GR遺伝子やCYP3A4遺伝子、MDR 1遺伝子、11 β HSD 2遺伝子などの日本人での多型出現頻度を明らかにし、さらに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てきた。このうち、MDR 1遺伝子C3435T多型と腎移植後の大腿骨頭壊死症の発症の関連が認められ、またGR遺伝子のJST032069多型も、統計学的には有意ではないものの、関連の存在を示唆する結果が得られた。今回さらにステロイドホルモン薬の作用あるいは副作用の出現との関連を検討したが、明らかな結果は得られなかった。これはいずれの患者数もまだ非常に少ないためであるが、前述のようにグルココルチコイドの代謝や作用発現には数多くの蛋白が関与していることを考えると、単一の遺伝子多型の影響は限定的なものである可能性が高い。今後は、検討例数を増やすとともに、遺伝子多型だけでなく遺伝子発現量との関連を検討できる系を確立する必要がある。

11 β HSD 2は近年、ステロイド代謝あるいは高血圧との関係で注目を集め始めている重要な酵素である。我々の以前の検討で、日本人では蛋白翻訳領域には明らかな多型を見いだせなかったため、現在はプロモーター領域に注目し、同定を試みている。まず発現量の多い細胞、組織で検索し、その後、骨や血管内皮で検討する予定である。

E. まとめ

従来、健常日本人での分布が確かめられ、大腿骨頭壊死症発症との関連が示唆された遺伝子多型について、ステロイド抵抗性ネフローゼ患者と健常人の分布を比較することでステロイドホルモン薬の作用発現との関係を、ステロイド投与患者での骨塩量の減少と検討することでステロイドホルモン薬の副作用発現との関係をそれぞれ解析した。今回は、患者数が非常に少ないことから明らかな結果は得られなかった。今後、11 β HSD 2遺伝子プロモーター領域の解析を含めて、さらに検討を進めていく予定である。

ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子多型解析 —輸送タンパクを対象にして—

久保 俊一、浅野 武志、高橋 謙治、藤岡 幹浩
井上 重洋、平田 哲朗

(京都府立医科大学大学院医学研究科運動器機能再生外科学)

里見 佳子、西野 輔翼 (京都府立医科大学大学院医学研究科分子生化学)

高岡 邦夫 (大阪市立大学大学院医学研究科整形外科学)

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)

中島 滋郎 (大阪大学大学院医学系研究科生体統合医学小児発達医学講座)

特発性大腿骨頭壊死症 (Idiopathic osteonecrosis of the femoral head; ION) の病態は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剤が危険因子であることが知られている。ION発症予防のためには、ステロイド感受性の個人差を明らかにし、ステロイド投与前からハイリスク患者を選別する必要がある。本研究ではステロイド感受性に影響を与える因子として、薬物の吸収過程に重要である輸送蛋白P-glycoprotein (P-gp) をコードするABCB1 (別名multidrug resistance gene 1; MDR1) の一塩基変異多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) に着目してION発症との関連を検討した。ABCB1 3435 TTおよび2677 (T, A) (T, A) の遺伝子型で統計学的有意にION発症が抑制された (adjusted odds ratio=0.10、P=0.034)。本検討からステロイド性IONの発生にP-gpが関与している可能性が判明した。

A. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症 (Idiopathic osteonecrosis of the femoral head; ION) の発症のメカニズムは不明であるが、ステロイド投与、アルコール多飲、喫煙および脂質代謝異常などが危険因子になることが現在までの研究から明らかになっている^{1,2)}。なかでもステロイド性IONの占める割合が高い。

ステロイド性ION発生にはステロイドの体内動態に影響をあたえるステロイド感受性タンパク (ステロイド代謝酵素、ステロイド受容体、あるいは輸送タンパク)、疾患発生に関連するタンパクが関与していると考えられ、ION発生の個体差にこれらの遺伝子多型が関係している可能性がある。遺伝子多型の解析の際に、多型の頻度の高さやマーカーとしての利用しやすさにより近年注目されているのが一塩基変異多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) である。

輸送タンパクであるP-glycoprotein (P-gp) は、薬物の吸収過程および体内分布に重要な働きを担う。P-gpはadenosine 5'-triphosphate (ATP) をエネルギー

源として、基質を細胞内から細胞外へ排出する膜蛋白として機能している⁴⁾。临床上使用されるステロイド剤はP-gpの基質であることが報告されている⁵⁾。

P-gpをコードする遺伝子はABCB1 (別名multidrug resistance gene 1; MDR1) であり、ABCB1には現在までに多くのSNPが存在することが判明している⁶⁾。ABCB1の遺伝子多型により、ステロイドおよびその代謝産物の細胞内・外の分布や体内動態が変化し、ステロイド感受性に個人差を与える可能性がある。また、ABCB1のSNPのなかで表現型に影響を与える機能的なSNPとしてexon26 (C3435T) およびそれと連鎖不均衡状態にあるG2677T/A (exon21) がある⁷⁾。

本研究の目的は、ABCB1のSNPと腎移植後のステロイド性ION発生との関連を検討することである。

B. 研究方法

〈対象〉

〈研究デザイン〉

京都府立医科大学では1970年から現在までに600例

以上の腎移植が施行されている。これらの患者のうち、移植後にION発生が確認され、定期的に当院に通院している30例のION患者を症例とし、移植後2年以上経過例で定期的に単純X線写真、磁気共鳴画像法（MRI）、骨シンチグラフィで全身に骨壊死が発生していないことを確認している患者106例を対照とした。IONの診断には厚生労働省特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会の診断基準を用いた⁸⁾。

なお以下の患者は除外した。1) 移植腎の機能が廃絶し、透析にいたっている患者 2) 移植前からION発生が確認された患者 3) MRIによる信号強度の変化は示すものの、診断基準（T1強調画像における大腿骨頭内帯状低信号像）に合致しない非典型的なMRI像を示す患者 4) 臼蓋形成不全や変形性股関節症など移植前から股関節疾患を有する患者 5) 研究に対する同意が得られなかった患者。

〈ABCB1 exon 26 (C3435T) およびexon 21 (G2677T/A) の遺伝子型決定〉

同意を得た患者の末梢血より、ゲノムDNAをDNeasyTMTissue Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany)を用いて抽出した。PCRに用いたプライマーはABCB1 C3435Tに対して5'-TTCAGCTGCTTGATGGCAAA-3'および5'-AGGCAGTGAAGG-3'であり、G2677T/Aに対して5'-CAGGCTTGCTGTAATTACCC-3'および5'-TAGTTTGAAGTACCTTCCCA-3'である。PCR条件は94℃5分の熱変性、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 (Applied Biosystems, PerkinElmer, Inc., MA)を用い、塩基配列決定をおこなった。

臨床情報：

ABCB1の遺伝子型のほかに、性別、移植時年齢、移植腎の種類（生体腎あるいは死体腎）、急性拒絶反応の有無、移植後に用いた免疫抑制剤の種類（cyclosporin、tacrolimus）、ステロイド投与プロトコールについての情報を収集した。当院ではcyclosporinを1982年から導入し、それによりステロイド投与量を大幅に減量することができた。さらに1996年を境に、ステロイド投与量を減量するプロトコールを導入した。本検討ではcyclosporin導入後の2つのプロトコール別に患者を分類した。

統計解析：

統計解析には、unconditional logistic regression model (SAS software ver 8.2)を用いた。ABCB1

C3435TおよびG2677T/Aの遺伝子型と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、移植腎の種類（生体腎、死体腎）、急性拒絶反応の有無、移植後に用いた免疫抑制剤の種類（cyclosporin、tacrolimus）、およびステロイド投与プロトコール（少量、大量）に基づいた多変量解析を施行し、ION発生との関連を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究を開始するにあたり、京都府立医科大学における人間を対象とする医学倫理審査委員会の承認を得た。また、患者に対して専用の同意書を作成し、文書による同意を得た。

C. 研究結果

〈対象の一般特性〉

Table 1に対象の一般特性を示す。性別、移植時年齢、移植腎の種類（生体腎、死体腎）、急性拒絶反応の有無については、ION発生群・非発生群で有意差は認められなかった。ステロイド投与プロトコールの比較では大量投与プロトコールで有意にION発生が多かった。

Table 2にロジスティック解析の結果を示す。性別、移植腎の種類（生体腎、死体腎）、急性拒絶反応の有無については単変量・多変量解析ともに、ION発生との有意差は認めなかった。移植時年齢については、多変量解析でION発生との統計学的有意な関連が認められた (Adjusted OR=1.06、95%CI: 1.01-1.11)。ステロイド投与プロトコールについて単変量解析では、大量投与プロトコールで統計学的有意にION発生の危険性が上昇した (Crude OR=2.82、95%CI: 1.20-6.61、p=0.017) が、多変量解析では有意差は認められなかった (Adjusted OR=2.54、95%CI: 0.83-7.81、p=0.10)。また移植後に用いた免疫抑制剤の種類については、単変量解析において、tacrolimusでION発生が抑制されている傾向を認めたが (Crude OR=0.43、95%CI: 0.16-1.14、p=0.09)、多変量解析では有意差は認められなかった (Adjusted OR=0.51、95%CI: 0.14-1.79、p=0.29)。

〈ABCB1 C3435TおよびG2677T/AとION発生〉

本研究のABCB1 C3435Tの出現頻度は、CC 33.8%、CT 48.5%、TT 17.6% (アレル頻度C: 0.58、T: 0.42) であり日本人の頻度に関する過去の報告とほぼ一致

した⁸⁾。ION発生に関して、3435TTの症例ではION発生は24例中わずかに1例のみであった。3435TTでは3435CCと比較して、単変量解析で境界領域の有意差 (Crude OR=0.12、95%CI: 0.02-1.01、p=0.052)、多変量解析で統計学的有意差 (Adjusted OR=0.10、95%CI: 0.01-0.89、p=0.039) をもって、ION発生が少なかった (Table 2)。

G2677Tの各遺伝子型の出現頻度は、GG 22.1% (n=30)、GT 35.3% (n=48)、GA 14.0% (n=19)、

TT 17.6% (n=24)、TA 9.6% (n=13)、AA 1.5% (n=2) であり (アレル頻度, G: 0.47、T: 0.40、A: 0.13)、過去の日本人を対象とした研究とほぼ一致した⁹⁾。C3435Tと同様、2677 (T、A) (T、A)、つまり変異型のホモ接合体で、単変量解析で、統計学的有意にIONリスクは減少を認め (crude OR=0.27、95% CI: 0.07-0.98、p=0.046)、多変量解析でもIONリスクは減少する傾向を認めた (Adjusted OR=0.26、95% CI: 0.06-1.03、p=0.056)。

Table 1. 対象の一般特性

		<u>Idiopathic osteonecrosis of the femoral head (ION)</u>		
		ION 発生群	ION 非発生群	p
性別: n (%)	女性	10 (33.3)	28 (26.4)	0.458*
	男性	20 (66.7)	78 (73.6)	
移植時年齢	平均 (範囲)	40.5 (25~63)	36.2 (9~62)	0.168 [#]
	中央値	37.5	35.5	
免疫抑制剤	Cyclosporin: n (%)	24 (80.0)	67 (63.2)	0.086*
	Tacrolimus: n (%)	6 (20.0)	39 (36.8)	
移植腎: n (%)	生体腎	24 (80.0)	92 (86.8)	0.385**
	死体腎	6 (20.0)	14 (13.2)	
急性拒絶反応: n (%)	なし	27 (90.0)	87 (82.1)	0.405**
	あり	3 (10.0)	19 (17.9)	
ステロイドプロトコール	少量	10 (33.3)	62 (58.5)	0.015*
	大量	20 (66.7)	44 (41.5)	

Statistical analysis were done by using *Chi square test, [#]Wilcoxon's rank sum test, **Fisher's exact test or [§]Mantel extension method.