

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

F. 研究発表

1. 論文発表

【英文原著】

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

2. 学会発表

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

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

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

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

活性型ビタミンD治療に対する反応性を規定する遺伝子群の探索

分担研究者 池田恭治(長寿医療研究センター 老年病研究部長)

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

A. 研究目的

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

本研究では、ビタミンD治療の薬物反応性を規定する遺伝的要因の解明に向けて、腸管からのカルシウム吸収に必須であるビタミンD受容体(VDR)を欠失したマウスと正常マウスの十二指腸での遺伝子発現の比較解析から、転写因子であるVDRの下流で働きカルシウム吸収に関わる遺伝子群を同定する

とともに、ビタミンDの骨吸収に対する直接効果とその作用メカニズムの解明を行った。

B. 方法

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

2. Gene chip による遺伝子発現解析: Total RNA を試料とし Affymetric 社の開発した技術であるプローブアレイを用いて網羅的に約 14,000 の遺伝子発現を解析した。使用した遺伝子発現解析用プローブアレイは GeneChip Murine Genome U74A Ver.2 (Amersham 社)である。

3. 活性型ビタミンDの破骨細胞形成抑制作用: OPG KO マウスに活性型ビタミンDである $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を経口投与し、骨吸収や骨密

度に対する効果を調べた。骨髄から M-CSF 依存的に増殖する破骨細胞の前駆細胞を単離し、M-CSF と RANKL 依存的に起こる破骨細胞形成に対する $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ の作用を調べた。

さらに、RANK 受容体以下その破骨細胞分化シグナルに関わる多くの分子を western blot で解析した。レトロウイルスを用いて c-Fos タンパク質を強制発現させた。

C. 結果と考察

1. ビタミン D による腸管カルシウム吸収に関わる遺伝子群: VDR によって発現が誘導されるカルシウム輸送タンパク質として、ECaC が同定されているが、そのノックアウトマウスも含めて *in vivo* での機能はまったく不明である。腸管でのカルシウム吸収能は、加齢に伴う骨粗鬆症の発症に大きく関係しており、個人差や人種差、薬物に対する反応性のばらつきなどが報告されている。腸管からのカルシウム吸収の分子メカニズム、とりわけ VDR によって制御される下流遺伝子とその機能を明らかにし、これらを基盤にカルシウム吸収の個人差や薬物奏功性の差にアプローチする目的で、VDR を遺伝的に欠損し腸管からのカルシウム吸収が著名に抑制されているマウスを用いて遺伝子発現解析を行った。

VDR がいないことで発現レベルが 1/10 以下に低下する、すなわち VDR の存在によって発現が 10 倍以上上昇する遺伝子群を 14 同定した。それらは、gap junction membrane channel protein beta 1: connexin 32 をコードし、Charcot-Marie-Tooth 病の原因遺伝子でもある。VDR KO で 22 倍低下し、OVX でも 7 倍低下した。troponin I, skeletal, slow 1: VDR KO で 12 倍低下し、OVX でも 6 倍低下した。cathepsin C: lysosomal protease で、VDR KO で 18 倍低下した。epoxide hydrolase 1, microsomal: xenobiotic 酵素で、VDR KO で 70 倍低下した。histocompatibility 2, class II, locus Mb1:

VDR KO で 20 倍低下した。

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

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

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

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

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

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

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

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

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

遺伝子発現解析結果の妥当性を証明する結果と考えられる。

今後は、以上のうちでも細胞間情報伝達、細胞内の物質輸送、転写因子に焦点を絞り、タンパク質レベルでの発現の変化や細胞内曲財、機能解析を進める予定である。

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

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

さらに、RANK 受容体の下流で破骨細胞分化シグナルに関わる多くの分子を解析したところ、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ によってタンパク質レベルあるいは活性が変化するのは、c-Fos タンパク質のみであった。つまり $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ は RANKL によって誘導された c-Fos タンパク質のレベルをベースライン程度にまで抑制した。レトロウイルスで c-

Fos タンパク質を強制発現させると、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ による破骨細胞形成の抑制効果はブロックされたことから、c-Fos タンパク質の減少が薬理効果を説明する解釈される。

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

D. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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

Sasaki A, Ikeda K, Watanabe K: A RING finger protein Praja 1 regulates Dlx5-dependent transcription through its ubiquitin ligase activity for the Dlx/Msx-interacting MAGE/Necdin family protein, Dlxin-1. **J Biol Chem** 277:22541-22546, 2002

Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N: FOXO Forkhead

transcription factors induce G2-M checkpoint in response to oxidative stress. **J Biol Chem** 277:26729-26732, 2002

F. 知的所有権の取得状況
特許取得
なし

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

2. 実用案登録
なし
3. その他
なし

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

D.結論

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

E.健康危険情報

今年度の研究においては健康危険情報は得られなかった。

2. 学会発表

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

Hishiya A, Ito M, Ikeda K, Watanabe K: Decreased bone formation in ataxia telangiectasia mutated (ATM) knockout mice. The 24th annual meeting, Am. Soc. Bone Miner. Res., Sam Antonio, USA, September 20-24, 2002

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

厚生労働省長寿科学総合研究事業
 (骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療の確立に関する研究)
 分担研究報告書
 統計手法の基礎的検討

分担研究者 大橋靖雄 東京大学医学系研究科教授

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

A. 研究目的

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

複数イベント(再発)を考慮した解析としては、これまでに Cox 回帰を拡張したモ

デル(AG, PWP-T, PWP-G, WLW, LWA モデル)が提案されているが、それぞれには解析の前提があり、その適用には慎重であるべきである。他に一般化推定方程式(GEE)を用いたポアソン回帰の適用が示唆されているが、その有用性の検証はまだなされていない。一方、治療効果が認められず骨折イベントを繰り返すと対象者が試験終了以前に脱落することがある。そのような場合でも治療効果の推定結果への影響が小さく、頑健かつ簡便な解析方法が求められている。そこで、各モデルをシミュレーションデータ及び実際の再発事象を対象とした臨床試験データへ当てはめることで比較検討し、早期脱落を考慮した場合でも治療効果の推定に適切な解析方法を提案することを本研究の目的とした。

なお、事例の検討のためには、わが国で

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

B. 研究方法

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

補完）のそれぞれにおいて、2 段階法により測定誤差を考慮した解析としない解析による結果の比較を行った。さらに、第 1 段階でモデル化したリスク変数（平均、累積、閾値）を共変量とする解析を行い、デビアンズによってモデルの適合度を評価した。

Cox 回帰やポアソン回帰モデルはいずれもハザード（再発率）をモデル化している。AG モデルは再発を起こした対象者も観察が継続していればリスク集合にあるとするモデルである。PWP-T, PWP-G モデルは j 回目の再発に対するリスク集合は $(j-1)$ 回目の再発を起こした対象者に限定する条件付モデルであり、時間軸を PWP-T モデルは試験開始からの時間、PWP-G モデルは $(j-1)$ 回目からの時間とする点が異なる。WLW, LWA モデルは各再発の生起時間の周辺分布をモデル化しており、LWA モデルは基準ハザードを共通とするのに対して WLW モデルは異なるとしている。ポアソン回帰に関しては、再発率は全観察期間を通じて必ずしも一定とはいえないため、観察期間を再発率が十分に一定だとみなせる区間に区切り、対象者内の各区間の間に存在する再発率の相関を GEE で考慮した。評価はシミュレーションで行った。シミュレーションの設定は、MS の自然経過を表すとされる実データのプラセボ群のデータ及び先行研究をもとにした。想定する臨床試験の対象者は試験薬群とプラセボ群各 100 例の計 200 例、期間は 3 年、プラセボ群に対する試験薬群の再発率比を 1/1.3 に設定し、治療効果を表すパラメータは再発が何回目かによらず一定であると仮定した。

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

C. 研究結果

JDC 研究解析対象 1,051 例のうち 394 例(37%)が網膜症を発症し、観測された区間幅は 394 ± 418 日(平均 \pm SD)だった。第 1 段階における血糖コントロール指標の予測の結果、HbA_{1c} 値に比べて空腹時血糖値の測定誤差が大きいことが示された。第 2 段階のリスク評価の結果、HbA_{1c} 値 1%増加について、誤差を考慮したリスク比は 1.20 とな

り、誤差を考慮しない場合の 1.14 に比べて大きな値となった。同様に空腹時血糖値 20mg/dl 増加のリスク比は誤差を考慮することにより 1.07 から 1.17 と大きく増加した。測定誤差を考慮することによる適合度の増加は HbA_{1c} 値では僅かだったが、より誤差の大きい空腹時血糖値では顕著だった。これらリスク比は、区間打ち切りを考慮しない Cox 回帰の結果との間に大きな差異はなかった。また、モデル化したリスク変数を共変量とする解析での適合度は、HbA_{1c} 値に関して平均、累積モデルで極めて高く、閾値モデルで低かった。空腹時血糖値に関しては、平均モデルの適合度は必ずしも高くはなかったが、累積モデルは極めて高くなり、閾値モデルの適合度は改善されなかった。

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

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

表：[設定 1]のシミュレーション結果

D. 考察

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

血糖コントロールのリスクについて、予測値を用いたモデルに比べ平均モデル、累積モデルで適合度が大きく改善したことか

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

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

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

E. 文献

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

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

長寿科学総合研究事業：骨粗鬆症におけるテーラーメイド医療の確立に関する研究
平成 15 年度分担研究報告

骨粗鬆症における骨密度変化の個人差に関する研究

分担研究者 白木正孝 成人病診療研究所所長

研究要旨

骨粗鬆症治療の現場においてはその診断と治療効果の判定にとって重要な骨部位である腰椎にしばしば変性変形が合併しており、このことが骨粗鬆症診療の精度を減弱させている。従って今年度の研究においては変性変形が骨粗鬆症診療のどのような局面に影響を与え、かつ変性変形が発生する要因について検討を加えた。変性変形は軟骨にその病変の主座が存在する椎間板狭小、椎体終板に病変が存在する終板硬化および椎体被殻に病変が存在する骨棘形成に分類できる。これらの病変は単独で存在する場合もあるが、多くは互いに合併し、また骨粗鬆症にも合併する。これらの変化は加齢とともに増加し、個人の経時的観察からは増悪するものと自然に改善するものおよび短時間では変化しないものなど経過は単純ではなかった。これは骨粗鬆症のように経時的に増悪する一方である病態とは傾向を異にした。変性変形の存在は骨密度を高めたが、その傾向は特に骨棘形成例で全身的にみられた。すなわち変性変形のある形質の基本には骨形成の亢進がみられる。このためか、変性変形例では経時的な骨密度の減少が抑制されており、このことから骨粗鬆症治療薬の反応性の判断は変性変形例では過剰判断が下されている可能性が考えられ、一方変性変形が存在しない例では過少評価されている可能性が考えられた。変性変形の発生に関与する要因として栄養摂取、職業および遺伝が重要であることが判明した。変性変形の存在の評価は骨粗鬆症治療の個別化にとって重要であると考えられた。

A. 研究目的

高齢化社会の到来をひかえ、種々の退行期疾患の効率的治療方法の開発が望まれている。骨粗鬆症は老年期の女性に主として表れる退行期疾患疾患

であり、骨折を介して患者の生活の質(QOL)を低下させる疾患である。現在では骨粗鬆症治療薬が種々開発され日常診療で幅広く利用されている。しかし、現在に至るも、各種治療薬でど

の程度の骨密度改善が期待できるかについての報告はない。このような基礎検討が存在しないと、治療現場において患者の治療薬に対する反応性を検討できないので、例え無効であっても漫然たる治療継続がなされる可能性があり、医療経済に対する損失も発生する可能性がある。さらにもしも反応性を規定する因子があらかじめ明らかであるならば、治療前にそれら因子を検討することにより、より効率的に治療を実施することが可能となる。このような作業が真のテーラーメイド医療であり、このような観点から骨密度推移に関するより詳細な検討を企図するに至った。今年度においては主として変性変形を伴った際にどのような影響を骨密度推移に与えるかを検討した。これは一般的にいて、変性変形が存在する場合、当該部位の骨密度は正確性に欠け、利用できないとされるからである。このような場合は脊椎骨密度の測定に代わって大腿骨頸部の測定が利用されるが、この部位は代謝が活発ではないので、脊椎骨に比べ、その変動が認知されにくい。従って脊椎骨の骨密度から治療効果を判定するほうが変動を認識しやすい。もしも骨粗鬆症治療が変性変形の程度そのものに影響を与え、骨密度の変化に過剰判定もしくは過小判定をもたらすのであれば問題は大きい。今

年度においてはこれらの諸点も検討した。

B 研究方法

- 1) 研究機関：成人病診療研究所をその機関とした。本研究所においては 1993 年度より現在まで骨粗鬆症長期介入試験が行われており、現在までに 3227 名の閉経後婦人が同意取得ののちに研究に登録されている(Nagano cohort)。登録された骨粗鬆症患者は無作為に各種治療に割り付けられ、一方非骨粗鬆症患者は介入なしに経過観察されている。登録時には年齢、身長、体重、骨密度(腰椎)が測定され、脊椎レントゲン撮影が行われ、脊椎既存骨折の有無が検討されている。脊椎レントゲン撮影と腰椎骨密度は 1-2 年間隔でくり返され、新規骨折の発生の有無と腰椎骨密度の推移が検討されている。
- 2) この Nagano cohort より 962 例の閉経後婦人をランダムに選択し、これらの症例の脊椎変性変形の有無、および程度を半定量的に評価した。ここで変性変形の評価はまず三つの成分に分類された。すなわち椎間板の狭小化(Disc narrowing)、終板の硬化(end plate sclerosis)および骨棘形成(osteophyte formation)の三成分

である。これら個々の成分は定量することができないので、目視判定にて、その有無を確認し、それが存在する椎体の数を数えることにより半定量化した。すなわち、ここで言う変性変形の重症度とは変性変形の広がりを表すものであり、必ずしも個々の成分の局所における重症度を反映したものではない。

- 3) 変性変形の加齢変化について。一般に、変性変形は骨粗鬆症と同様、加齢とともにその頻度をますることが知られている。今回の検討では、変性変形を三つのコンポーネントに分類して検討するという新しい試みを行ったので、まず、これら三つのコンポーネントが加齢とともにどのような頻度で出現するかを検討した。
- 4) 変性変形の経時的変化。つぎに前述の 962 例からさらに無介入により経過を観察した 150 例を選択し、変性変形の程度が経時的にどのように変化するかを検討した。ここで個々の症例のレントゲンフィルムは患者情報を与えられないまま、複数の整形外科医により個別に評価されたのち、個々の医師の評価基準のかたよりが合議により調整された。これらのレントゲンフィルムの評価は研

究協力機関である産業医大整形外科において行われた。

- 5) 変性変形の骨密度に対する影響。前述の 962 例について変性変形の程度がどの程度骨密度に影響を与えるかを検討した。すなわち、変性変形の三つのコンポーネントをさらに重症度（病変のひろがり）から変性変形を伴わないもの(0-2 椎体)、わずかに(3-5 椎体)伴うもの、中程度に伴うもの(6-8 椎体)および高度に伴うもの(9 椎体以上)の 4 群に分類し、各群の腰椎骨密度および全身骨密度を ANOVA にて比較検討した。
- 6) 観察開始時変性変形の程度と骨密度の経時的変化。無介入で経過を検討できた 241 例を OA なし(0-5 椎体)とし、中程度から重度のものを OA ありに二分しその骨密度の変化を検討した。

B. 結果

- 1) 変性変形の加齢変化について。
図 1 に三つのコンポーネントに分類した場合のそれぞれの変性変形の出現頻度の年齢変化を示した。同じ集団の骨粗鬆症の出現頻度も示した。図から明らかなようにこれらの変化はいずれも加齢とともにそれらの頻度が増した。問題はそれぞれのコンポーネ

ントの出現頻度の高さであり、このことからこれらの形質は互いに合併しあってひとりの患者に存在することが考えられる。従って、骨粗鬆症における変性変形の存在は特に骨密度の判定において無視できないことが分かる。

- 2) 変性変形の経時的変化。加齢とともに変性変形の出現頻度がますますことは前述の横断研究で判明した。このことを個人レベルで経時的に検討した。無治療で経過を観察した 150 例の閉経後婦人において平均 3.0 ± 0.1 年間経過観察した前後の脊椎レントゲンフィルムにおいて、椎間板狭小化、終板硬化、および骨棘形成がみられる椎体数をカウントし、観察終了時のカウントから開始時のカウントを減じ、観察年数で除した。これによりある集団の単位観察年数あたりの進行した変性変形椎体数が算出できる。図 2 はこの検討結果を示している。興味深いことに、各変性変形コンポーネントはいずれも 60・70 才代でその変化が悪化の方向に変動するが、80 才代ではいずれもマイナスの方向、すなわち改善の方向に変化した。このことはある個人の変性変形は年代により悪化と改善をみられることを示している。これは予想

外のことで、とくに一度形成された変性変形が改善する可能性があることは驚きであった。80 才代を除けば年間に約 0.1-0.2 椎体が所見を悪化させていることになる。変性変形の経時的変化は baseline の変性変形の程度に強く関連していた。すなわち baseline の変性変形が強いものほどその後改善がみられた (表 1—3)。

- 3) 変性変形の骨密度に対する効果。従来から変性変形においては全身的に骨密度が高いのではないかと、換言すると、変性変形は加齢に伴い骨密度が増加する疾患であり、一方骨粗鬆症は全身の骨密度が減少する疾患であり、両者は対極の疾患であるとする意見がしばしばみられる。しかしこのことを明らかにした報告はなく、印象のレベルにとどまっていた。今回の検討の結果を図 3—5 に示す。一般に終板の硬化は局所の骨密度が高く観察されるので、全身の骨密度も高いかのように印象付けられるが、事実は逆で、椎間板間隙の狭小や骨棘形成が局所骨密度 (LBMD) と全身骨密度 (TBMD) の両者が変性変形の程度に比例しているのに対し (図 3、5)、終板の硬化は局所の骨密度

のみ変性変形の程度に比例し、全身の骨密度とは相関しなかった(図4)。この観察結果は変性変形のコンポーネントのなかでも終板の硬化が特異な位置を占めていることを示しているものと考えられた。これらの所見から、変性変形のうち終板の硬化は骨粗鬆症診断に干渉し、これが存在する例では腰椎以外の部位で骨密度の判定を行わなければならないことを示している。しかしその他の変性変形は基本的には骨粗鬆症とは対極の病態を示すものと考えられた。つぎに Base line における変性変形の程度が評価され、無介入で腰椎骨密度の経過が観察できた 241 例において局所の変性変形の内容と骨密度の推移について検討した。結果を図 6-8 に示す。ここで変性変形がないか、または軽度なものを変性変形なし(OA-)とし、変性変形が中程度から高度なものを変性変形あり(OA+)とした。変性変形のあるものはどのような局所所見であっても骨密度の減少を抑制したが、特に抑制度が高かったものは終板の硬化所見(図7)と骨棘形成であり(図8)、椎間板の狭小化については傾向に留まった。この所見は骨粗鬆症の経過

観察上重要な所見であって、変性変形を有する例では治療の結果が過剰診断される可能性を示している。

- 4) 変性変形に影響を与える要因解析。以上の結果から変性変形の存在は骨粗鬆症診療に多大な影響を与えると考え、変性変形の発生要因解析を行うこととした。まず変性変形の発生要因として生活習慣との関連を検討した。はじめに、変性変形の広がりや程度と食事摂取状況を検討した。ここで食事摂取状況は食品摂取頻度調査により行い、解析は研究協力者である、女子栄養大学上西一弘により行われた。表 4-6 に結果を示す。結果的に食事摂取状況が最も大きな効果を示すものが骨棘形成(表 4)であり、椎間板狭小化(表 5)と終板硬化(表 6)については食事効果が少ないと判断された。従来検討において変性変形と食事の影響は検討されたことがなく、今回初めて変性変形のなかのあるコンポーネントが食事依存性に発生する可能性が示された。つぎに職業と変性変形の関係について検討した。表 7 には対象の職業を農婦と家婦に分類した際の対象の背景を示す。この二群に分類した理由は日常生活に

におけるエネルギー消費量の差を考慮した分類であり、一部の症例において加速度計つきライフコーダーでエネルギー消費を測定したところ、農婦は約 1800Kcal のエネルギー消費であったのにくらべ、家婦においては約 1300Kcal と後者においてよりエネルギー消費が少なかった。このことから、脊椎に対する圧負荷は日常的に農婦で家婦にくらべ大きいと推定された。表 7 からわかるように日常的なエネルギー消費態度の違いの影響は体組成に顕著に表れており、農婦は家婦に比べ体脂肪率が低く、lean mass が多かった。一般にエネルギー消費が大きい集団においては骨密度が増加するといわれるが表 8 に示すようにこれら二群間では骨密度には全く差を認めなかった。運動が骨密度に与える影響は若年者ほど顕著な効果が得られるとされているので、今回のようにエストロゲン欠乏状態にある老年女性では運動の効果が骨密度には反映されないのかもしれない。このことは換言すると、巷間によくいわれる骨粗鬆症の予防または治療としての運動療法の限界を示しているのかもしれない。ところが同じ集団で変性変

形の程度を比較した表 9 においては農婦において家婦に比べ明らかな変性変形の進展を観察した。従って、閉経後の日常的エネルギー消費は weight bearing bone site においては形態の変化に直結し、骨粗鬆症の予防方法としては効果がないか、または限定的なものであると推定された。

- 5) 遺伝子解析による変性変形の予測。本研究班の浦野らが報告するように WNT pathway の受容体である LRP5 遺伝子は骨密度を規定する遺伝子として極めて効率的な予測遺伝子である。WNT は細胞分化にかかわる遺伝子であるといわれているが圧刺激により WNT 遺伝子が発現し、LRP5 遺伝子の mutation により WNT 刺激が抑制されない方向となると骨密度が高くなり、逆に WNT 刺激が伝達できない mutation であると骨密度が低くなることが報告されている。この遺伝子の種々の多型は表 10 に示すように変性変形中骨棘形成に強く association していた。従って LRP5 遺伝子は骨系統疾患の発現形質を予測する有力な候補遺伝子であると考えられ、今後の骨粗鬆症診療のテーラーメイド医療には欠かせないツールと

なることが予想される。

C. 結論

骨粗鬆症治療の現場においてはその診断と治療効果の判定にとって重要な骨部位である腰椎にしばしば変性変形が合併しており、このことが骨粗鬆症診療の精度を減弱させている。従って今年度の研究においては変性変形が骨粗鬆症診療のどのような局面に影響を与え、かつ変性変形が発生する要因について検討を加えた。変性変形は軟骨にその病変の主座が存在する椎間板狭小、椎体終板に病変が存在する終板硬化および椎体被殻に病変が存在する骨棘形成に分類できる。これらの病変は単独で存在する場合もあるが、多くは互いに合併し、また骨粗鬆症にも合併する。これらの変化は加齢とともに増加し、個人の経時的観察からは増悪するものと自然に改善するものおよび短時間では変化しないものなど経過は単純ではなかった。これは骨粗鬆症のように経時的に増悪する一方である病態とは傾向を異にした。変性変形の存在は骨密度を高めたが、その傾向は特に骨棘形成例で全身的にみられた。すなわち変性変形のある形質

の基本には骨形成の亢進がみられる。このためか、変性変形例では経時的な骨密度の減少が抑制されており、このことから骨粗鬆症治療薬の反応性の判断は変性変形例では過剰判断が下されている可能性が考えられ、一方変性変形が存在しない例では過少評価されている可能性が考えられた。変性変形の発生に関与する要因として栄養摂取、職業および遺伝が重要であることが判明した。変性変形の存在の評価は骨粗鬆症治療の個別化にとって重要であると考えられた。

D. 健康危険情報：とくになし。

E. 研究発表：平成 16 年度関連学会にて発表後論文文化予定。

F. 知的財産権の出願・登録：とくになし。

図 1

Prevalence of osteoarthritis and osteoporosis in women

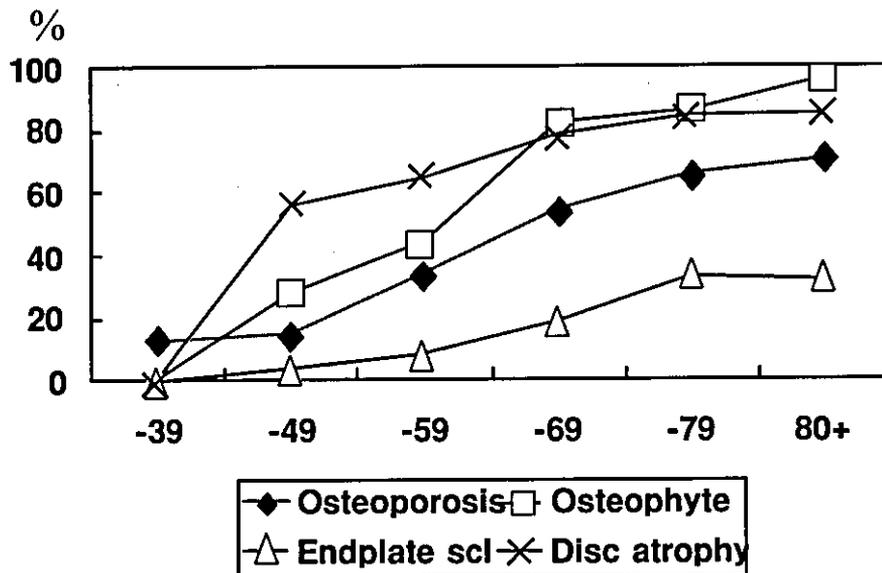
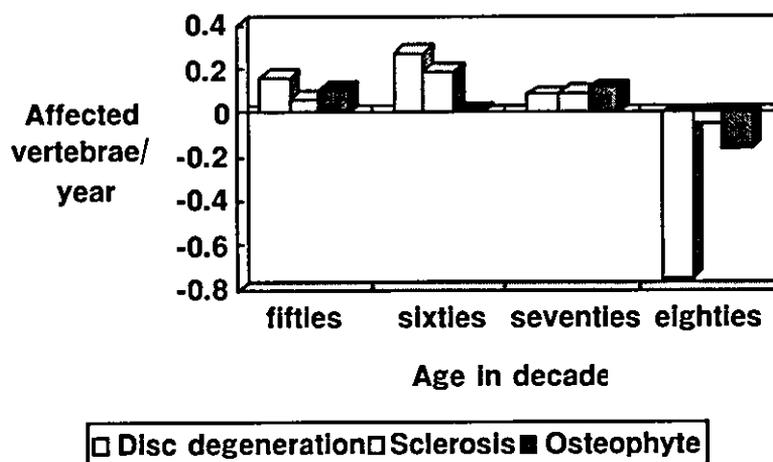


図 2

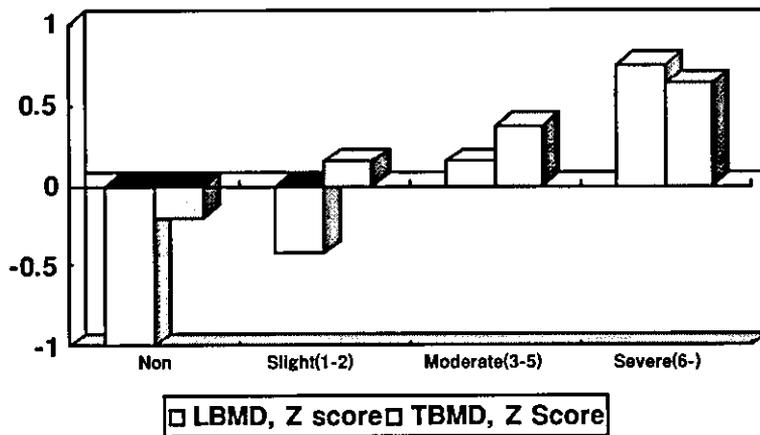
Time course changes in vertebral osteoarthritis



Progression of Disc degeneration, $p=0.0208$ in ANOV.

図 3

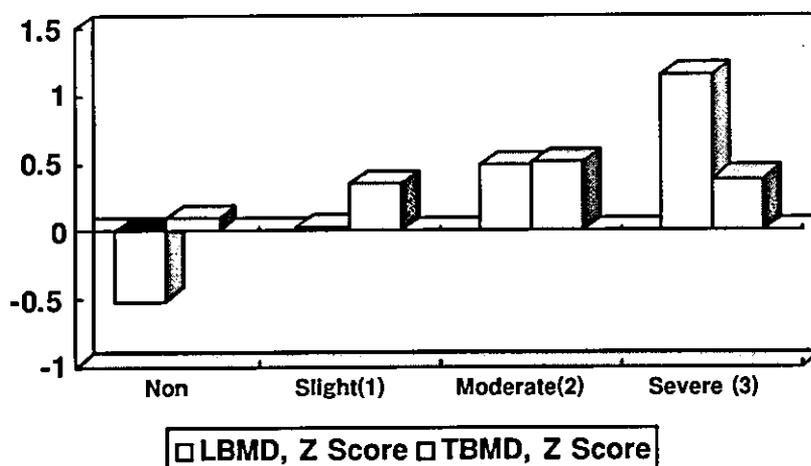
Disc degeneration and BMD



P < 0.0001 in ANOVA for LBMD and TBMD

図 4

Endplate sclerosis and BMD



P < 0.0001 for LBMD , ns for TBMD

図 5

Osteophyte formation and BMD

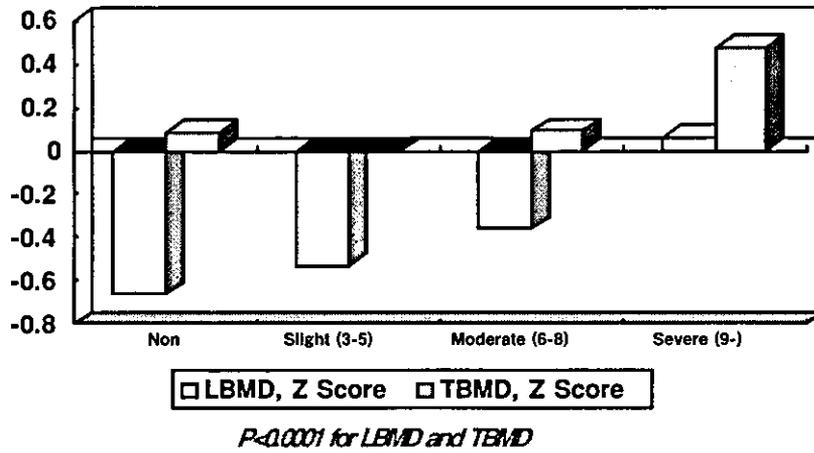


図 6

Baseline disc degeneration and changes in LBMD

