

表2

各因子と骨密度の関係-1

		H-group (n=102)		L-group (n=36)		p
		mean	SD	mean	SD	
背景	年齢	21.1	0.1	21.0	1.2	0.84
	身長	159.6	0.5	156.6	5.0	0.00
	体重	55.8	0.7	48.8	6.4	<.0001
	BMI	21.9	0.3	19.9	2.4	0.00
	初経年齢	11.9	0.1	12.4	1.0	0.06
	出生時体重	3158.1	49.6	2932.0	422.1	0.03
血液	Ca	9.6	0.0	9.6	0.3	0.95
	P	3.8	0.0	3.7	0.4	0.13
	IOC	8.8	0.3	9.4	2.3	0.30
	NTX	13.5	0.4	13.5	3.6	0.98
	BAP	21.9	0.7	22.1	5.8	0.88
	ALB	4.8	0.0	4.8	0.2	0.52
	OPG	2.9	1.0	3.0	1.1	0.87
	sRANKL	0.14	0.12	0.18	0.18	0.36

各因子と骨密度の関係-2

		H-group (n=102)		L-group (n=36)		p
		mean	SD	mean	SD	
PA	総エネルギー (mets)	33.9	0.3	32.5	3.1	0.02
	ライフコーダー (kcal)	1875.0	18.1	1693.0	159.6	<.0001
DHQ	Protein (g)	64.8	1.2	60.3	11.5	0.05
	Ca (mg)	538.9	18.1	473.4	147.6	0.06
	VD (IU)	12.7	0.7	12.3	8.2	0.78
	Bean (g)	46.5	3.1	40.4	29.5	0.31
	Seaweed (g)	12.6	1.1	9.1	7.8	0.09
	VK (μ g)	288.7	13.6	265.7	131.9	0.38
	VA (IU)	767.0	34.7	653.0	266.3	0.09
	VB2 (mg)	1.5	0.0	1.3	0.3	0.05
	Cholesterol (mg)	295.3	8.9	252.0	70.8	0.01
	P (mg)	1013.9	22.4	906.6	168.9	0.01

表3

	リスクファクター-回答別骨密度 (g/cm ²)						p
	no			yes			
	mean	SD	n	mean	SD	n	
家族歴あり	0.99	0.10	125	0.98	0.11	10	0.94
ダイエット	1.00	0.11	77	0.97	0.08	58	0.04
乳製品嫌い	0.99	0.10	113	0.98	0.10	22	0.73
やせ型	0.99	0.10	125	0.95	0.11	10	0.21
低身長	1.00	0.10	103	0.93	0.10	32	0.00
不活動	1.00	0.10	46	0.98	0.10	89	0.40
喫煙習慣	0.99	0.10	114	0.96	0.10	21	0.26
飲酒	0.98	0.10	119	1.01	0.08	16	0.33
コーヒー	0.98	0.10	90	0.99	0.12	45	0.61
ST薬の服用	0.99	0.10	132	1.05	0.08	3	0.28

表4

ロジスティック (ステップワイス) 解析

要 因		p	odds	95%CI	
背景	BMI vs1	0.03	0.74	0.55	0.96
	初経年齢(歳) vs1	0.01	1.89	1.19	3.19
	出生時体重(g) vs100	0.08	0.65	0.44	0.89
PA	総エネルギー(mets) vs1	0.01	1.01	38.51	4.35
	過去の運動歴 yes/no	0.01	3.65	1.47	11.04
DHQ	Energy (kcal) vs100	0.07	0.90	0.79	1.01
	Ca (mg) vs100	0.03	0.66	0.45	0.93
	Seaweed (g) vs1	0.05	0.93	0.86	1.00

年齢補正済み

図1

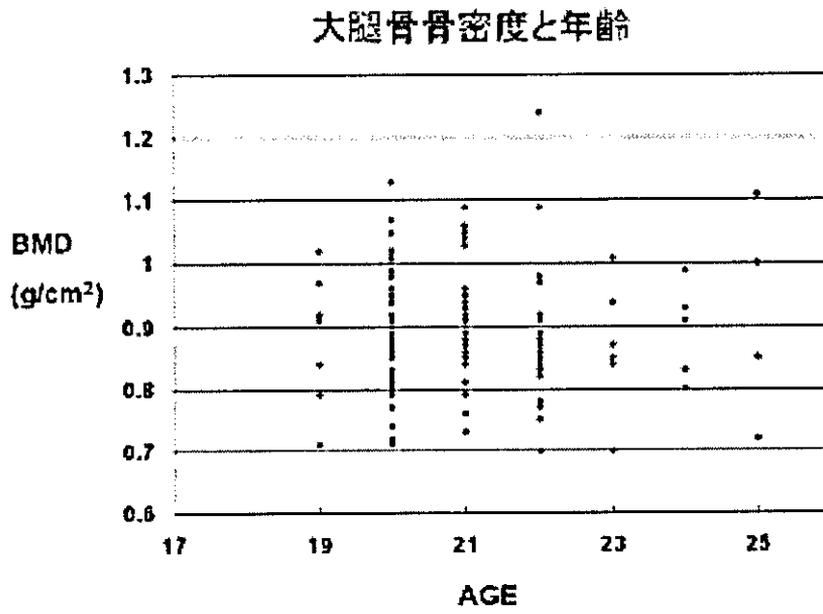
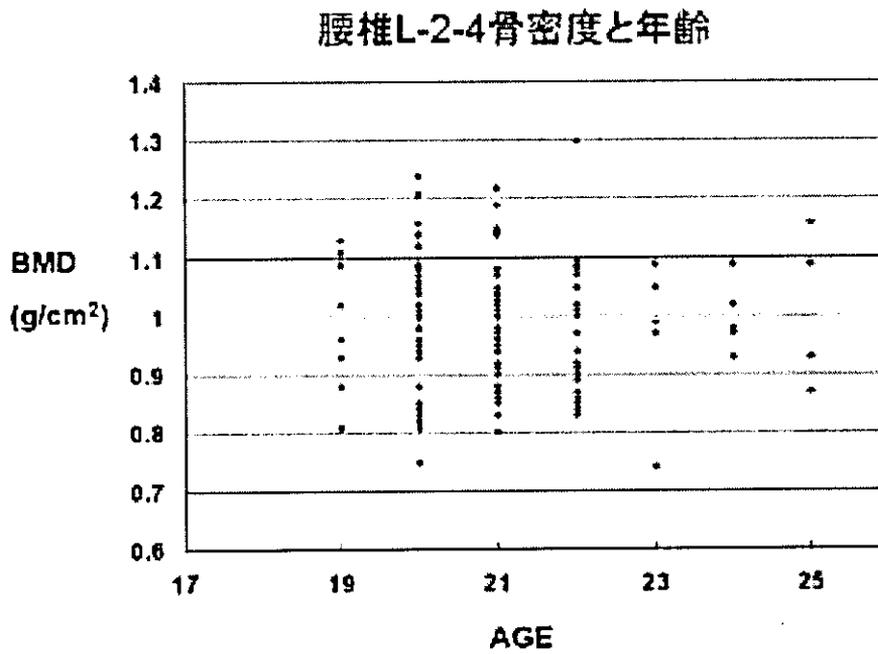


図2



厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

骨芽細胞における新たな骨形成制御因子の同定

分担研究者 浦野友彦 東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座助手

研究要旨 骨粗鬆症の治療においては積極的な骨形成促進薬は存在せず、また骨形成を制御し骨粗鬆症発症へと関与する原因遺伝子群に関しても十分な解明はなされていない。このことは骨粗鬆症治療の多様性を制限しておりテーラーメイド医療の確立において重要な問題である。骨芽細胞における骨形成のシグナル伝達においては Wnt- β -カテニンシグナルにおけるレセプターとして機能する LDL receptor-related protein 5(LRP5)が近年、注目されてきた。昨年度の研究報告書において、我々はこの LRP5 のイントロン 17 における一塩基置換遺伝子多型(single nucleotide polymorphisms: SNPs)が骨量に与える影響に対して検討を行い、閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーとして有用である可能性を示した。近年、Wnt- β -カテニンシグナル伝達を制御する因子が哺乳動物において多数同定されているにもかかわらず Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の骨代謝に与える影響に関しては LRP5 遺伝子以外に検討、報告がなされていない。本年度、Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子である Kremen1 ならびに sFRP4 に存在する SNP を骨量を規定する新たな遺伝子マーカーとして同定した。来年度以降、これら Wnt- β -カテニンシグナル遺伝子群を遺伝子マーカーとして発展させ、骨形成に主眼をおいた骨粗鬆症でのテーラーメイド医療の確立を目指す。

A. 研究目的

骨粗鬆症とそれに伴う骨折は高齢者が寝たきりとなる主要な原因であり、老人医療において重要な問題として知られている。骨粗鬆症の大きな原因は、以下の二つである。

- 1) エストロゲン欠乏による骨吸収の上昇(閉経後骨粗鬆症)
- 2) 骨芽細胞老化による骨形成の低下(老人性骨粗鬆症)

このような骨量減少は骨吸収量に骨形成能が追いつかない非共役状態が原因と考えられている。この治療においては積極的に骨形成を亢進させて骨量増加作用をおこす

ことが理想ではあるが現在まで強力な骨形成促進薬は存在していない。しかしながら、*in vitro* で骨芽細胞の分化を誘導する内分泌ホルモンやサイトカインは複数存在することから、これらの下流シグナルを詳細に検討、解明することが骨形成を主眼においた骨粗鬆症の病態解明、ひいては骨形成に主眼をおいたテーラーメイド医療の確立において最も重要なステップであると考えた。

脊椎動物のシグナル伝達においては Wnt- β -カテニンシグナル伝達経路が様々な細胞の増殖と分化を制御していることが多くのグループにより明らかにされ、重要視されてきた。特に骨芽細胞における骨形成

のシグナル伝達においては Wnt に対するレセプターとして機能する LDL receptor-related protein 5 (LRP5) が注目されてきた。昨年度の研究報告書において、我々はこの LRP5 のイントロン 17 における一塩基置換遺伝子多型 (single nucleotide polymorphisms: SNPs) が骨量に与える影響に対して検討を行い、閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーとして有用である可能性を示した。近年、Wnt- β -カテニンシグナル伝達を制御する因子が哺乳動物において多数同定されている。しかしながら骨における Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の発現や骨代謝に与える影響に関しては LRP5 遺伝子以外に検討、報告がなされていない。そこで本年度においては Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の遺伝子多型が骨量にあたる影響ならびに Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の骨芽細胞や破骨細胞における発現パターンに関して検討を行った。

B. 研究方法

1, Kremen1 ならびに sFRP4 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響

JSNP に報告のある Kremen1 遺伝子イントロン 1 における遺伝子多型ならびに、sFRP4 遺伝子エクソン内における Arg262 の SNP (CGC→CGT) に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 379 人を対象として BMD との関連を検討した。

2, 初代培養破骨細胞、骨芽細胞における Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子の発現パターンに関する検討

ラット由来骨髄細胞に M-CSF と RANKL を添加し、破骨細胞に分化誘導させ RNA

を採取した。

ラット頭蓋骨を酵素処理することにより初代培養骨芽細胞を作製した。 β -グリセリン酸ならびにアスコルビン酸を添加し骨芽細胞分化を誘導した。培養後 2 日、4 日、6 日、9 日、16 日、19 日、24 日、30 日後の RNA を採取した。

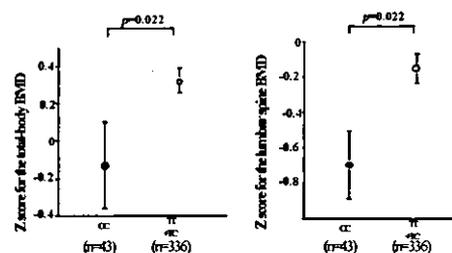
それぞれの時点での LRP5、sFRP4、Kremen1、さらに骨芽細胞の分化マーカーとしてアルカリホスファターゼ (ALP) 遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

C. 研究結果

1, Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子 Kremen1 ならびに sFRP4 の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響

Kremen1 のイントロン 1 に存在する SNP に関して、T アレルを持つ群 (TT+CT; n=336) では持たない群 (CC; n=43) に比べ有意に全身骨ならびに腰椎骨密度が高いことを見出した (Total BMD Z score; 0.33 vs -0.13; p=0.022, Lumbar Spine BMD Z score; -0.14 vs -0.69; p=0.022) (図 1)。

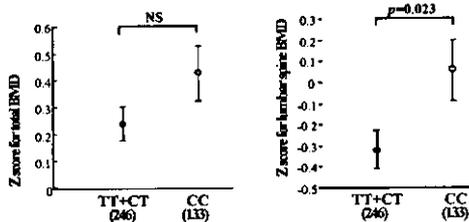
図 1. Kremen1 イントロン 1 における遺伝子多型と骨量との相関



Secreted Frizzled Related Protein 4 (sFRP4) エクソン内の Arg262 の SNP (CGC→CGT) に関して、同様の検討を行ったところ、T

アレルを持つ群(CT+TT; n=246)では持たない群(CC; n=133)に比べ有意に腰椎骨密度が低いことを認めた(Z score; -0.33 vs 0.03;

図2. sFRP4 Arg262 での多型における 遺伝子多型と骨量との相関



p=0.023) (図 2)。

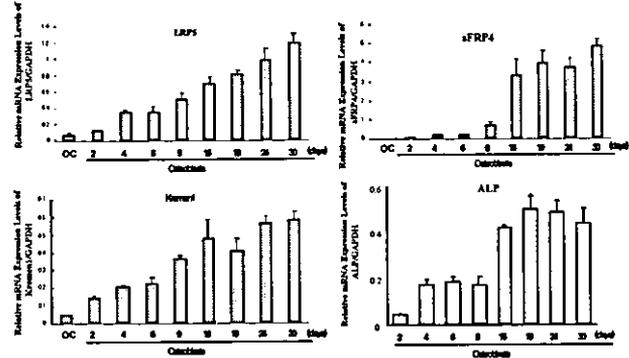
2, 初代培養破骨細胞、骨芽細胞における Wnt-β-カテニンシグナル伝達因子の発現パターンに関する検討

昨年度報告した遺伝子多型と骨量との間に相関があった LRP5 遺伝子と今回、骨量との相関が明らかになった Kremen1 ならびに sFRP4 の骨芽細胞(osteoblasts)分化に伴う mRNA レベルでの発現変化に関して検討を行った。その結果 LRP5、sFRP4 ならびに Kremen1 はともにその発現が培養開始後 16 日以降でピークを迎えることが明らかとなった。これは骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子の発現ピークとほぼ一致していた (図 3)。一方、破骨細胞(osteoclasts: OC)での LRP5、Kremen1 ならびに sFRP4 遺伝子の発現は骨芽細胞に比して劇的に低下していた (図 3)。

D. 考察

Wnt-β-カテニンシグナル伝達経路は哺乳動物での細胞増殖や分化の制御において重要な役割を果たす。近年このシグナル伝達系の構成因子のひとつである LRP5 遺伝子

図3. 初代培養破骨細胞、骨芽細胞における LRP5、Kremen1、sFRP4 の発現パターンに関する検討



は、ヒトでの遺伝子変異やノックアウトマウスの解析から骨芽細胞による骨形成において中心的な役割を果たしていることが明らかにされた。我々は昨年度の研究報告書に示したように、LRP5 の SNP と骨量との関連について検討し、LRP5 が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーである可能性を示した(Urano et al. J. Bone Miner. Metab. in press)。Wnt-β-カテニンシグナル伝達因子は多数同定されており LRP5 のみならず、他の因子に関しても骨量を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。そこで今回、我々は Wnt-β-カテニンシグナル伝達因子における SNP と骨量との関連について検討した。今回 Kremen1 と sFRP4 における SNP が骨量と有意に相関することを明らかとした。Kremen1 は Wnt-β-カテニンシグナルを負に制御する因子である DKK1 のレセプターとして作用し、DKK1 と協調して Wnt-β-カテニンシグナルの伝達を抑制する因子として同定された。また、sFRP4 は、Wnt のレセプターのデコイレセプターとして機能すると考えられ、Kremen1 と同様に Wnt-β-カテニンシグナルの抑制に関与することが示唆される遺伝子である。近年、LRP5 の研究により Wnt-β-カテニンシグナルの骨形成における重要性が注目されるよ

うになってきているが、多数存在する Wnt- β -カテニンシグナル制御因子の中での因子が骨形成を制御しているのかという疑問に関しては LRP5 以外には未だ重要な因子は同定されていない。さらにこのシグナルが骨芽細胞成熟のどの段階において、機能しているかという問いに対してもその詳細は明らかにされていない現状である。今回の解析から Kremen1 や sFRP4 といった Wnt- β -カテニンシグナルを負に制御する因子が骨形成に大きく関与している可能性が考えられる。またこれら因子が初代培養骨芽細胞の系において ALP の発現がピークをむかえる分化中期以降に一致して発現亢進していることから分化のステージによって Wnt- β -カテニンシグナルの活性が変化していることが示唆された。今後、これら遺伝子が骨形成ならびに骨代謝においてはたす役割に関してさらなる検討を行うことが骨形成の分子機構の解明に大いに役立つと考える。

他のグループから LRP5 遺伝子の発現は破骨細胞には無く、骨芽細胞に優位に発現していることが示されていたが、今回の我々の検討において、LRP5 以外の Wnt- β -カテニンシグナルを制御する Kremen1 や sFRP4 といった遺伝子も骨芽細胞特異的に発現することが示唆された。したがって Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子は骨形成特異的な遺伝子マーカーを開発するにあたって有用な遺伝子群であることが示唆され、今後の骨粗鬆症のテーラーメイド医療の発展において重要な因子であることが示唆される。今回の遺伝子多型による解析から Wnt- β -カテニンシグナル伝達因子には閉経後女性の骨量ならびに骨粗鬆症発症を規定

する候補遺伝子が複数含まれていることが示唆された。今後これら制御因子に関してさらなる検索を重ね、骨量を予測する遺伝子マーカー群を確立していく予定である。

E. 結論

骨形成を特異的に制御する遺伝子群である Wnt- β -カテニンシグナル制御因子のなかからその遺伝子多型が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子として、昨年報告した LRP5 に加え新たに Kremen1 ならびに sFRP4 を見出した。来年度以降、これら遺伝子群の骨粗鬆症診断における遺伝子マーカーとしての有用性を検討する予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J. Bone Miner. Metab.* (in press)
2. Takahashi S, Urano T, Tsuchiya F, Fujimura T, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. EBAG9/RCAS1 expression and its prognostic significance in prostatic cancer. *Int. J. Cancer* 2003; 106: 310-315.
3. Horie K, Urano T, Ikeda K, Inoue S. Estrogen-responsive RING finger protein controls breast cancer growth. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2003; 85: 101-104.
4. Aoki T, Inoue S, Imamura H, Fukushima J, Takahashi S, Urano T, Hasegawa K, Ogushi

T, Ouchi Y, Makuuchi M. EBAG9/RCAS1 expression in hepatocellular carcinoma: Correlation with tumour dedifferentiation and proliferation. *Eur. J. Cancer* 2003; 39: 1552-1561.

2. 学会発表

1. Urano T, Fujita M, Hoshino S, Shiraki M, Ezura Y, Hosoi T, Emi M, Ouchi Y, Inoue S: Association of Single Nucleotide Polymorphisms in *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5* Gene with Bone Mineral Density (2003. 11. 24-28) The 7th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology (Tokyo, Japan)

2. 浦野友彦、星野真二郎、白木正孝、江面陽一、江見充、細井孝之、大内尉義、井上聡：骨粗鬆症における LRP5 遺伝子の関与(2003. 6. 18-20) 第 45 回日本老年医学会 (名古屋)

3. 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 (2003. 6. 3-7) 1st Joint Meeting of International bone and mineral society (IBMS) and the Japanese society for bone and mineral Research (JSBMR) 2003 (Osaka, Japan)

4. 藤田雅代、浦野友彦、堀江公仁子、池田和博、津久井通、大内尉義、井上聡：骨芽細胞におけるエストロゲンの分子標的の探索と機能解析 (2003. 12. 10-13) 第 26 回日本分子生物学会年会 (神戸)

G. 知的所有権の取得情報

なし

H. 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。

厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)
 分担研究報告書

骨粗鬆症の生化学マーカーの開発に関する研究

分担研究者 池田恭治 (国立長寿医療センター 研究所 運動器疾患研究部長)

研究要旨

尿中 γ -GTP 排泄量が生体内の骨吸収活性を反映することが示唆された。まず、OPG を欠損することで骨吸収が亢進したマウスにおいて、尿中 DPD の排泄増加とともに、尿中 γ -GTP の排泄も増加していた。骨吸収の選択的な抑制薬であるアレンドロネートを投与すると、尿中 DPD 排泄とともに尿中 γ -GTP 排泄もほぼ対照群レベルにまで減少した。骨粗鬆症患者においても、尿中 γ -GTP 排泄量と DPD あるいは NTx 排泄量に有意な正の相関が認められ、アレンドロネートによる治療によって、DPD あるいは NTx と並行して尿中 γ -GTP 排泄量も減少した。

キーワード： 骨粗鬆症、骨吸収、 γ -GTP

A. 研究目的

骨粗鬆症は、さまざまな遺伝要因に加えて、食事や運動などの生活習慣を背景に発症する多因子疾患であり、予防および治療においてもこれら先天的・後天的要因の個人差に配慮してテーラーメイド医療を推進する必要がある。骨の老化は万人に訪れる生理現象であり、60 歳以上の女性の多くは骨粗鬆症と診断される域にまで骨密度が低下する。寝たきりの原因となる大腿骨頸部骨折の発生件数も、2002 年には 10 万人を超えて増加の一途にあり、効果的な医療の実現には高リスク群の効果的な抽出が重要である。骨折の要因には、転倒と骨の脆弱性が含まれ、後者には骨密度で評価される骨量に加えて、骨の質的な加齢変化が注目されている。骨質を規定する因子はいまだ不明であるが、骨代謝回転の亢進そのものが、骨密度の低下とは独立に、骨折のリスクを高めるという調査結果もあり、骨吸収の亢進が持続することが、単に骨量を低下させるだけではなく、骨の脆弱性に大きく寄与するものと考えられる。

我々は、最近 γ -GTP が破骨細胞の形成因子であることを見いだした (J Biol Chem

2004)。本研究では、尿中への γ -GTP の排泄動態を解析し、骨吸収の指標になりうるか否かについて、動物実験および臨床研究の両面から検討した。

B. 研究方法

Osteoprotegerin (OPG) 遺伝子を欠損したマウスのホモおよびヘテロマウスを飼育し、定期的に 24 時間尿を採取し、尿中 DPD (デオキシピリジノリン)、 γ -GTP 活性およびクレアチニン (Cr) 濃度を測定した。OPG KO マウスにアレンドロネートを投与し、尿中 DPD および γ -GTP 排泄の変化を経時的に追跡調査した。

骨粗鬆症患者の尿を採取し、 γ -GTP 活性 (IU/L) を測定した。尿中 γ -GTP は Cr 濃度で補正し、IU/g Cr で計算した。尿中 γ -GTP 排泄と DPD あるいは NTx との相関について解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、実験動物委員会において承認されており、動物愛護の精神に則って行った。ヒト血液・尿を用いた研究に関しては、すでに当該施設の倫理委員会に提出しており、承認された後、患者からの

書面による同意を得た上で行った。ヒト DNA を用いた研究は含まれない。

C. 研究結果および考察

OPG を欠損し、RANKL-RANK シグナルの亢進から骨吸収の亢進を示すホモのノックアウトマウスにおいて、対照のヘテロマウスと比較して、尿中 DPD 排泄の増加が認められた。これに伴って尿中 γ -GTP の排泄も増加していた。骨吸収の選択的な抑制薬であるアレンドロネートを投与すると、尿中 DPD 排泄は投与後数日以内に減少した。尿中 γ -GTP 排泄も、数日から 1 週間以内にほぼ対照群レベルにまで減少した。以上から、尿中 γ -GTP は生体内の骨吸収活性と相関するものと考えられた。

数十例の検討であるが、骨粗鬆症患者においても、尿中 γ -GTP 排泄量と DPD あるいは NTx 排泄量に有意な正の相関が認められた。またアレンドロネートによる治療によって、DPD あるいは NTx と並行して、尿中 γ -GTP 排泄量も減少したことから、ヒトにおいても尿中 γ -GTP 排泄量が骨吸収活性を反映するものと考えられた。尿中 DPD あるいは NTx 排泄の増加によって診断される骨吸収の亢進状態を、尿中 γ -GTP 排泄量によって診断する場合の感度と特異度を勘案した場合、48 IU/g Cr がひとつの cut-off 値になることがうかがわれた。

γ -GTP は、腎臓や肝臓に発現する細胞外酵素で、重鎖と軽鎖から成り、細胞外においてグルタチオンなどの γ -glutamyl 基を他のアミノ酸に転移する活性を有する。腎臓では近位尿細管に発現しており、細胞膜を 1 回貫通するが、大部分は尿細管側に露出している。骨吸収が亢進した際の尿中 γ -GTP の由来と排泄増加のメカニズムは現在のところまったく不明である。 γ -GTP が 55 kDa と比較的大型のタンパク質であり、糸球体から容易に濾過されにくいことから、骨吸収の亢進に伴って近位尿細管からの γ -GTP の shedding が促進された結果、尿中に遊離型の γ -GTP 分子が流出してく

るのではないかと考えている。予備的な実験であるが、 γ -GTP を発現する細胞に破骨細胞の培養液を添加すると培養液中の γ -GTP 活性が対照群に比較して増加するとの結果も得られており、破骨細胞が分泌する何らかの因子が γ -GTP の shedding を促進する可能性が示唆される。今後、尿中における γ -GTP 活性の本体の証明とともに、 γ -GTP の shedding を促す因子の探索を含めて、骨吸収に伴って尿中 γ -GTP 排泄が増加するメカニズムの解明が必要である。

D. 結論

尿中 γ -GTP 排泄は、骨粗鬆症に対するテラーメド医療を施すにあたって、一次スクリーニングに応用できる可能性がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Niida S, Kawahara M, Ishizuka Y, Ikeda Y, Kondo T, Hibi T, Suzuki Y, Ikeda K, Taniguchi N: γ -Glutamyltraspeptidase stimulates receptor activator of nuclear factor- κ B ligand expression independent of its enzymatic activity and serves as a pathological bone-resorbing factor. J Biol Chem 279: 5752-5756, 2004

2. 学会発表

Niida S, Kondo T, Ishizuka Y. and Ikeda K.: γ -Glutamyl transpeptidase as a novel bone resorbing factor 第 1 回国際骨代謝学会-日本骨代謝学会合同会議 6 月 6 日、大阪

池田恭治: 骨粗鬆症の病態と治療、第 2 3 回日本老年学会総会、6 月 1 9 日、名古屋

Takasu H, Okazaki M, Sugita A, Uchiyama Y, Makishima F, Kubodera N, Ogata E, Ikeda K: c-Fos protein as a target of vitamin D receptor-mediated suppression of osteoclast

development and bone resorption. 12th
Workshop on Vitamin D, July 6-10, Maastricht,
The Netherlands

Ikeda K: Bone resorption as a target of
osteoporosis therapy. UK-Japan Conference:
Horizons in Ageing and Health- New targets
for therapies. July 14-16, New Castle, UK

Niida S, Kondo T, Hibi T. and Ikeda K.:
Gamma-glutamyl transpeptidase as a novel
bone resorbing factor 第 25 回米国骨代謝学
会 9 月 21 日、ミネアポリス、ミネソタ州、
USA.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)
分担研究報告書

骨粗鬆症における遺伝子マーカーの開発
— γ -glutamyl carboxylase の遺伝子多型性と高齢女性における骨量との関連—

分担研究者 細井孝之 東京都老人医療センター医長

研究要旨 骨粗鬆症はその発症に生活習慣因子のみならず、複数の遺伝的素因とが関与することが知られている。さらにその治療に対する反応性の個人差も遺伝的に決定されていることが予想される。本研究では、骨粗鬆症の治療、とくに薬物療法における個人差を決定する遺伝子多型性を見出すことにより、本疾患のテーラーメイド医療確立に寄与することを目指している。本年度は GGCX 遺伝子のアミノ酸置換を伴う SNP と高齢女性における骨量との関連を解析した。

A. 研究目的

骨粗鬆症は多因子遺伝病のひとつとして考えられており、その遺伝的背景の解明が待たれている。これまで我々は多数の候補遺伝子についてそれらの多型性と骨量との関連を解析し、報告してきた。しかしながら未だ、骨粗鬆症の予防や治療に直接的に応用できる多型性は見出されていない。その理由の一つは蛋白質としての機能の多様性に結びつく遺伝子多型性と骨量との関連に関する情報が乏しいことが挙げられる。

本研究ではビタミンK依存性 γ -グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)のエクソン8にあるアミノ酸残基の置換をともなう遺伝子多型性と骨量との関連を検討した。ビタミンK依存性蛋白質であるオステオカルシン(BGP)やマトリックスマググラ蛋白質(MGP)は骨代謝において重要な役割を果たしていると考えられており、これらの蛋白質のグラ化に必要なGGCXの多型性が骨量

の個人差に結びついているか否かを検討した。

B. 方法

- ①対象: 東京都老人医療センター骨粗鬆症外来受診を希望し、遺伝子解析を含む研究に、文書によって同意を得た女性。骨代謝に影響をもたらす疾患や薬剤を使用している者は除外した。
- ②骨量測定: DXA(DPX-L IQ)によって大腿骨近位部を測定した(原則として右側)。
- ③GGCXの遺伝子多型性解析: 静脈血から分離したDNAを用いて、exon 8の missense SNP(Gln325 → Arg)を degenerative HPLC法でタイピングした。

C. 結果と考察

対象は113名であり、アレル型に従って、AA11名、AG54名、GG48名の3群に分けられ、平均年齢、身長、体重、BMIには有意差がなかった(Table 1)。 femoral neck の BMD

は%young adult mean (YAM)、T score、Z score においてAA群で有意に高く、絶対値についても高い傾向が認められた(Table 2)。同様の結果はfemoralのtotal scanでも認められ、AA型が高骨密度に関連することが示唆された(data not shown)。これらの関連はAアレルについて、gene-dosage effectが見られるようであった。

GGCXの375番目のアミノ酸をGlnからArgに置換するSNPが高齢女性において骨量との関連が認められた。今回の対象症例数は少ないものの、年齢分布幅が極めて狭い高齢者の集団であり、意味のある結果が得られたと考える。このSNPによってもたらされる2種類のGGCXが酵素化学的にどのような特性をもっているかに興味をそそがれ、現在in vitroで産生したGGCXの酵素活性を測定するシステムを共同研究者とともに立ち上げ、比較検討することになっている。

今回の研究結果は骨量決定においてビタミンK依存性蛋白質が重要な役割を果たしていることをも示している。BGPやMGPなど既知のものに加えて、骨代謝において機能している未知のビタミンK依存性蛋白質を探索することも必要であろう。

Table 1 Background data of the subjects

genotypes	AA	AG	GG	p value
number	11	54	48	
age	74.3±3.7	74.9±3.3	75.5±4.3	0.56
height	148.5±5.9	148.6±5.3	147.5±6.2	0.59
weight	54.0±8.27	51.2±8.3	50.1±7.4	0.33
BMI	24.4±3.1	23.1±3.3	23.0±3.1	0.43

Table 2 GGCX polymorphism and femoral neck BMD

	AA	AG	GG
number	11	54	48
BMD	0.742±0.087	0.697±0.091	0.670±0.101
%YAM*	85.4±10.2	77.5±12.6	73.7±13.4
Tscore*	-1.08±0.77	-1.68±0.94	-1.98±1.00
%age*	122.1±12.1	112.4±15.4	107.7±17.
Zscore*	1.16±0.67	0.650±0.82	0.408±0.90

* p<0.05

D. 結論

GGCXの遺伝子多型性と骨量との関連が認められた。

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。

F. 研究発表

①著書

1. 細井孝之 骨代謝マーカーによる治療効果のモニター ビタミンK 「実践・骨代謝マーカー」一骨疾患の診療に役立つ骨代謝マーカーの使用法— 福永仁夫 メディカルレビュー社 269-273, 2003
2. 細井孝之 骨粗鬆症—その予防と食生活指導・日常生活指導 エキスパートから学ぶ健康教育・栄養相談・生活習慣改善指導 生活習慣病の予防と管理 日野原茂雄, 和田高士 ライフサイエンスセンター 149-154, 2003
3. 細井孝之 Ca, P異常 老年医学 荻原俊男 朝倉書店 189-192, 2003
4. 細井孝之 遺伝子からみた骨代謝 骨の事典 鈴木隆雄, 林泰史 朝倉書店 297-302, 2003
5. 細井孝之 骨粗鬆症の治療 長寿科学事典 祖父江逸郎 医学書院

- 616-617, 2003
6. 細井孝之 骨粗鬆症の予防 長寿科学事典 祖父江逸郎 医学書院 617, 2003
 7. 細井孝之 骨検診 長寿科学事典 祖父江逸郎 医学書院 618, 2003
 8. 細井孝之 骨粗鬆症の遺伝的背景 整形外科の最新医療 平澤泰介, 井上一, 高岡邦夫 先端医療技術研究所 66-69, 2003
 9. 細井孝之 骨粗鬆症 高齢者診療ポケットメモ 折茂肇 南江堂 273-275, 2003
 10. 細井孝之 ビタミンK 骨粗鬆症診療実践マニュアル 松本俊夫 文光堂 122-125, 2003
 11. 細井孝之 骨粗鬆症 高齢者の病態生理と麻酔の臨床 花岡一雄, 大内尉義真興交易(株)医書出版部 42-45, 2003
 12. 細井孝之 骨粗しょう症の最新治療 講談社 2003
- ②原著論文
1. Iwasaki H, Emi M, Ezura Y, Hosoi T, et al. Association of a Trp16Ser variation in the gonadotropin releasing hormone signal peptide with bone mineral density, revealed by SNP-dependent PCR typing. *Bone* 32 · 185-90, 2003
 2. Kazama H, Usui S, Okazaki M, Hosoi T, et al. Effects of bezafibrate and pravastatin on remnant-like lipoprotein particles and lipoprotein subclasses in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 59 · 181-9, 2003
 3. Araki A, Ito H, Majima Y, Hosoi T, et al. Association between plasma homocysteine concentrations and asymptomatic cerebral infarction or leukoaraiosis in elderly diabetic patients *Geriatrics and Gerontology International* 3 · 15-23, 2003
 4. Honma N, Sakamoto G, Akiyama F, Hosoi T et al. Breast carcinoma in women over the age of 85: distinct histological pattern and androgen, oestrogen, and progesterone receptor status. *Histopathology* 42 · 120-127, 2003 N. Honma
 5. Hosoi T, Yoda T, Yamaguchi M et al. Elderly women with oral exostoses had higher bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 21 · 120-2, 2003
 6. Feng D, Ishibashi H, Yamamoto S, Hosoi T, et al. Association between bone loss and promoter polymorphism in the IL-6 gene in elderly Japanese women with hip fracture *J Bone Miner Metab.* 21 · 225-228, 2003 Y. Koshihara
 7. Ishida R, Emi M, Ezura Y, Hosoi T, et al. 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* 18 · 419-23, 2003
 8. Hirano H, Ezura Y, Ishiyama N,

- Hosoi T, et al. Association of natural tooth loss with genetic variation at the human matrix Gla protein locus in elderly women J Hum Genet 48・288-92, 2003
9. Omasu F, Ezura Y, Kajita M, Hosoi T, et al. Association of genetic variation of the RIL gene, encoding a PDZ-LIM domain protein and localized in 5q31.1 with low bone mineral density adult Japanese women J Hum Genet 48・342-345, 2003
10. Araki A, Ito H, Majima Y, Hosoi T, Orimo H Plasma homocysteine and cognitive function in elderly patients with diabetes mellitus Geriatrics and Gerontology Int 3・86-92, 2003
11. Hoshino S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S Association of tumor necrosis factor receptor 1 gene polymorphism with bone mineral density Geriatrics and Gerontology Int 3・101-105, 2003
12. Hirano H, Ezura Y, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Emi M. Association of natural tooth loss with genetic variation at the SRC locus in elderly women in Japan Geriatrics and Gerontology Int 3・101-105, 2003
13. Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, Suzuki T, Shiraki M, Hosoi T, Orimo H, Emi M 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 18・1642-1649, 2003
14. 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 (-1542/-525C) in the tumor necrosis factor receptor associated factor-interacting protein gene with low bone mineral density in Japanese women Bone 33・237-241, 2003
15. 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
16. Song QH, Kobayashi T, Hosoi T, Cyong JC Effects of traditional Chinese medicines on murine bone metabolism in a microgravity environment Am J Chin Med 31:739-749, 2003
17. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S Association of a single nucleotide polymorphism in low-density

- lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density J Bone and Mineral Metabolism (in press)
18. Fujita M, Urano T, Shiraki M, Momoeda M, Tsutsumi O, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S Association of a single nucleotide polymorphism in the secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) gene with bone mineral density Geriatrics and Gerontology international (in press)
19. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S Lewy body-related γ -synucleinopathy in aging (in press)
- 科の立場からー 今月の治療 11・3-21, 2003
7. 細井孝之 骨粗鬆症の治療ー最近の動向ー 今月の治療 11・59-63, 2003
8. 細井孝之 骨粗鬆症治療最新の話題 東京都病院薬剤師会雑誌 52・183-188, 2003
9. 細井孝之 骨粗鬆症 Medicina vol.40, no.10, p1687-1689, 200
10. 細井孝之 骨粗鬆症の薬物療法 レジデントノート vol.5, no.9, 73-76, 2003

③ 総説

1. 細井孝之 骨粗鬆症とLRP 5の臨床 Molecular Medicine 40・658-663, 2003
2. 細井孝之 骨粗鬆症と遺伝子多型性 Pharma Medica 21・29-34, 2003
3. 細井孝之 骨粗鬆症と遺伝子多型性 Pharama Medica 21・664-667, 2003
4. 細井孝之 運動器科学の基礎と臨床ー新しい臨床医学ー運動器科学の構築に向けて 骨粗鬆症 カレントセラピー 21・53-56, 2003
5. 細井孝之 EBM概論・骨粗鬆症との関連からー 骨粗鬆症治療 2・664-667, 2003
6. 細井孝之, 岡野浩哉, 滝澤 博 骨粗鬆症の治療ー内科、整形外科、産婦人

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：遺伝子情報を利用した統計解析の基礎的検討を行った。ここでは候補となる変数（遺伝子）の数が非常に多いという問題が存在する。骨折発生予後予測モデルを、クロス・バリデーション法により構築する際の適切な説明変数の選択・縮約方法を検討し、一般によく用いられる単変量解析と自動変数選択では不安定な予測モデルを導く可能性があることを確認した。一方、クラスター分析による方法では安定したモデルを導けるものの、その方法の性質上、予後因子としての遺伝子の同定を行うのが難しい。さらなる検討が必要だと思われる。

A. 研究目的

骨折あるいは薬物の治療効果に関する個人間差は非常に大きく、既知の臨床因子のみで予後を正確に予測することには限界がある。昨今の遺伝子測定技術の進歩により、ゲノムワイドな遺伝子発現解析により絞り込まれた多くの関連遺伝子を用いた予後予測の検討が盛んに行われている。しかしながら、遺伝子を用いた予後予測モデル構築の際には、これまでの臨床因子による予測モデル構築の場合と異なり、候補となる変数（遺伝子）の数が非常に多いという問題が存在する。本研究の目的は、遺伝子発現データを用いた予後予測モデルを、クロス・バリデーション法により構築する際の適切な説明変数の選択・縮約方法を検討することである。

B. 研究方法

すでに遺伝子解析を行っている骨折データ

は十分に存在しないので、イベントデータの対象として、肝臓癌再発のデータを用いた。1998年9月から2002年1月の間にA大病院消化器外科で肝細胞癌切除手術を行った患者の内、Stage IV-B 以外かつ根治度 C 以外の肝細胞癌患者 47 人を対象とした。候補遺伝子の数は 113 個で、そのデータは腫瘍部位での遺伝子発現量であり、発現量は定量的 RT-PCR 法 (TaqMan PCR 法) により測定されたものである。

イベント発生予後予測の標準手法である Cox 回帰によって再発予測モデルを構築する。予測モデル構築の際には、one-leave-out クロス・バリデーション法を用いた。説明変数の選択・縮約方法としては、一般的によく用いられる単変量解析と自動変数選択の 2 つの手法に加えて、候補遺伝子を事前にいくつかのクラスターに分類し、そのクラスターの代替変数（第 1 主成分）を新しい説明変数としてモデルに取りこむ方法を新た

に考えた。予測モデルの当てはまりの良さは、デビアンズ残差プロットと一般化 R^2 値により評価した。また、予測モデル（モデルに含まれる説明変数）が既知のもとで、3つの手法がどのような挙動を示すかを擬似データを発生させて比較・検討した。

C. 研究結果

47 人の対象者全例を用いた Cox 回帰の結果、各説明変数に対するハザード比の 95%信頼区間は、最もその幅が広がった変数で、単変量解析では (0.36, 2.19)、自動変数選択では (4.91, 98.34)、クラスター分析による変数縮約法では (0.41, 1.17) となり、自動変数選択によって構築されるモデルが不安定であることが示唆された。クラスター分析による方法において、7 個のクラスター間相関係数の値は、最小で -0.38、最大で 0.75 であった。また、各クラスターにおける第 1 主成分の寄与率は、最小で 0.48、最大で 0.88 であった。

クロス・バリデーションの各過程において、単変量解析と自動変数選択ではともに、選択される予測モデルが毎回異なり、単変量解析では選択される遺伝子の数が多くなる傾向を示した。モデルの当てはまりの良さの指標であるデビアンズ残差プロットを図 1（自動変数選択）、図 2（クラスター分析による方法）に示す（単変量解析のデビアンズ残差プロットは図 1 と同様であった）。デビアンズ残差の絶対値の分布（平均値、メディアン、最大値）は、単変量解析で (3.8, 1.4, 100)、自動変数選択で

(9.4×10^{12} , 1.2, 4.3×10^{14})、クラスター分析による方法で (0.9, 0.7, 2.9) であった。単変量解析と自動変数選択では、予測が大きく外れている対象者が存在したのに対して、クラスター分析による方法では、大きく予測が外れている対象者は存在しなかった。擬似データによる検討においても同様の傾向が確認された。一般化 R^2 値では、単変量解析（平均 0.47）、クラスター分析による方法（平均 0.27）、自動変数選択（平均 0.18）の順にモデルの予測力が大きいという結果になった。

D. 考察

単変量解析、自動変数選択は、実行が容易であり、一般的によく用いられる解析方法であるが、不安定な予測モデルを導いている可能性が示唆された。一方、クラスター分析による変数の縮約方法では、比較的安定した予測モデルを構築できることがわかった。擬似データの解析からも、同様の傾向が確認できた。しかしながら、クラスター分析による方法では、イベント発生に寄与する遺伝子を同定できず、モデルを臨床の場で適用する場合に、113 個の遺伝子すべてを測定しなければならないという問題が生じる。また、全対象者を用いた解析の結果、クラスターの境界が明確でないこと、予後への影響の小さなクラスターの存在が示唆され、今後クラスター分析の手法に改善を加えることが課題である。一般化 R^2 値による 3 つの手法の検討では、単変量解析が最も大きな値を示した。しかしながら、

一般化 R^2 値は取り込まれた変数の数に依存した指標でモデルに多くの変数が取り込まれるほど高い値を示す。単変量解析では平均的に最も多くの変数が選択されたことがその理由と考えられる。

今回用いた Allen のクロス・バリデーション法は、もともと事前いくつか用意された候補モデルから最終モデルを選択するために提案された。本研究では、その方法を説明変数選択の安定性に関する問題へ応用した。そのような試みは初めてである。しかしながら、本研究の目的は変数選択手法の比較であったので、最終的な予測モデルの決定までには至らなかった。解析結果の臨床応用を考えると、最終的な予測モデルをひとつに決定する必要がある。クロス・バリデーションによって得られた複数の変数をもつ異なるモデルから最終的なモデルを選ぶにはどうすればよいかは今後の課題である。

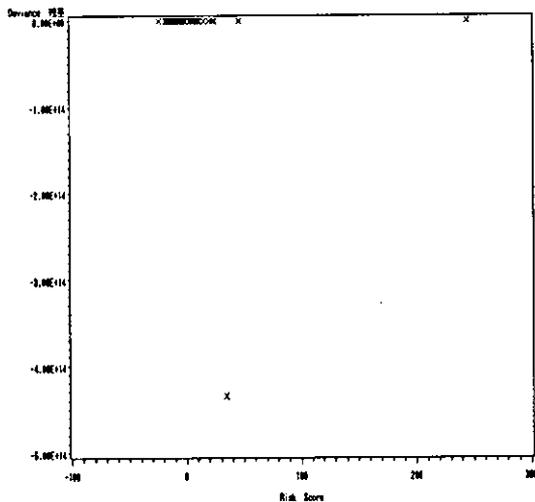


図 1 デビアンズ残差プロット(自動変数選択)

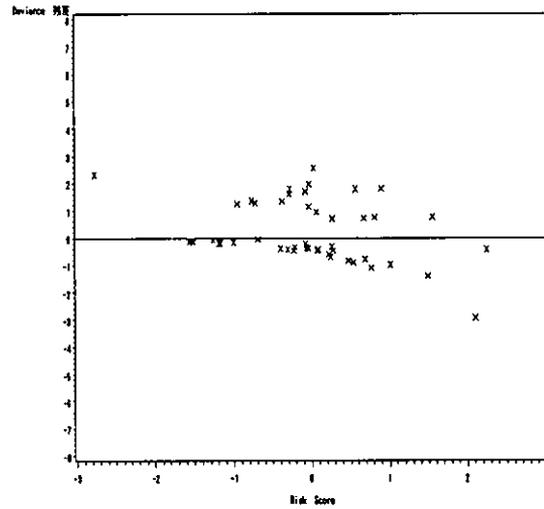


図 2 デビアンズ残差プロット(クラスター分析)

E. 研究発表

1. 大橋靖雄：臨床統計学・臨床試験を中心として。数理科学 2004；3(489)：60-67.
2. 大橋靖雄：「市販後臨床試験」と「市販後の臨床試験」。薬剤疫学 2003；8(1)：45-50.
3. 黒田龍彦、丹澤和雅、木内貴弘、大橋靖雄、他：医師主導研究における多施設臨床データ収集方法の開発。-A-TOP研究会の事例より- 医療情報学 2003；23(4)：325-331.
4. Kawado M. Hinotsu S. Matsuyama Y. Ohashi Y. et al: A Comparison of Error Detection Rates Between the Reading Aloud Method and the Double Date Entry Method. Controlled Clinical Trials 2003;24:560-569.

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

第 4 回大腿骨頸部骨折全国頻度調査成績
—2002 年における新発生患者数の推定と 15 年間の推移—

坂田清美 和歌山県立医科大学公衆衛生学助教授

研究要旨 (1) 2002 年の大腿骨頸部骨折の発生率を全国調査により推定した結果、1 年間の新発生患者数は約 11 万 7900 人であった。(2) 新発生患者数は、女性が男性の約 3.7 倍であった。

(3) 発生率は、40 代までは男性の方が高い傾向にあり、60 歳以降は女性が男性の 2 倍以上であった。(4) 新規患者数は 1987 年度に比べ、1992 年度 1.4 倍、1997 年度 1.7 倍、今回は 2.2 倍まで増加した。15 年間で男は 1.9 倍の増加に対し、女では 2.3 倍増加し、総数で女性が男性の約 3.7 倍となり、格差は拡大した。年齢別発生率を前 2 回に比べると、男では 90 歳以上で、女では 80 歳以上でさらに発生率が高くなっていた。(5) 地域別にみると、四国、九州、近畿地方で高く、東北、北海道、関東地方で低かった。

A. 研究目的

大腿骨頸部骨折は、脳卒中とともにわが国の寝たきりの主要な原因であり、高齢者の quality of life を著しく阻害する。急速に高齢化が進行しているわが国では、予防対策が急務となっている。骨折予防対策を確立するためには、まず実態を把握することが必要である。

わが国では、旧厚生省シルバーサイエンス研究老人性骨粗鬆症の予防及び治療法に関する総合的研究班(班長:折茂 肇)が 1987 年、初めて本疾患に関する全国規模の調査を行った^{1, 2)}。当時、全国の 200 床以上の整形外科

を標榜する全病院について調査を行い、さらに愛知、鳥取、和歌山の 3 県については病院の悉皆調査を行うことによって、200 床以上の病院への受診率を 50%と予測し、全国の年間発生数を 53,000 人と推計した。

5 年後の 1992 年には、厚生省骨粗鬆症の予防に関する総合研究班(班長:折茂 肇)が再度全国調査を行った^{3, 4)}。第 2 回目の調査方法は、初回調査にさらに改良を加えた。すなわち、全国の医療施設をベッド数により層化し、Neyman の最適割付法により、各層からの抽出率を計算して対象施設を選定した。さらに 200 床以上の病院に関しては、初回の調