

ステロイド性大腿骨頭壊死症予防のための予見的研究

長澤浩平、小荒田秀一（佐賀大学医学部内科）

我々は SLE におけるステロイド性大腿骨頭壊死症 (IONF) の発生・発症を予防する目的で、抗凝固薬（ワーファリン）と抗高脂血症薬（スタチン）をステロイド開始と同時に投与する予見的研究を行っている。MRI による IONF 発生の評価可能な登録症例は 14 例に達した。4 例にステロイドパルス療法が行われていたが、これまで IONF の発生はわずか 1 例（7%）に見られるのみで、発症はまだ認められていない。これは従来のワーファリン投与のみ、あるいは何も投与しなかった時の結果に比べて明らかに少なく、優れた成績である。さらに症例の集積が必要であるが、現時点において、この予防法は非常に有望であると考えている。

1. 研究目的

ステロイド性大腿骨頭壊死症 (IONF) を起こす基礎疾患としては、SLE が最も多いことが知られている。我々を含めた多くの研究において、SLE 患者でステロイド投与後、IONF を臨床的に発症するのは約 10%、MRI により診断される発生は約 30%にのぼるとされている¹⁾。ステロイド性 IONF の発症には多くの要因が考えられており、そのためにこれを完全に予防することは困難であるかもしれない。我々は従来より、ステロイドや SLE 自体による血液凝固異常や血管障害を重視し²⁾、ワーファリンを使用することにより IONF の予防を試みてきた。しかしその結果は、ワーファリンはある一定の予防効果を示したものの、有意差を表わすまでには至らなかった¹⁾。

最近、ステロイド性 IONF の発症要因として、急激な脂質代謝異常がクローズアップされている。そして、抗高脂血症薬が実験動物³⁾やヒト⁴⁾の疾患において、ステロイド性 IONF を予防できることが示されているが、特にヒトにおいては極めて不完全な研究結果である。そこで、本研究では大量のステロイドを必要とする SLE 患者において、ワーファリンと抗高脂血症薬であるスタチンを同時投与する予見的研究を行い、IONF の発生・発症を予防することを目的とした。

2. 研究方法

本臨床試験のプロトコールは昨年報告書に示した通りである。すなわち、2002 年以降に新たに SLE を発症した患者のうち、プレドニゾロン(PSL) 40mg/日以上を必要とし、本試験への参加の同意を得た患者を対象とした。出血傾向や血小板減少がある患者、高血圧を有する患者、妊娠中の患者、及び中等度以上の肝、腎障害を有する患者は除外した。PSL 投与開始と同時にワーファリン、及びスタチンの投与も開始した。前者は PT-INR で 1.5 ～2.0 を保つように投与量を調整し、後者はシンバスタチン 10mg/日、あるいはアトルバスタチン 10mg/日をとともに最低 3 ヶ月間投与した。

ステロイド投与開始後、3 ヶ月、1 年、2 年、及び 3 年の時点で股関節の MRI 及び X 線検査を行い、4 年目以降は 1 年ごとに X 線検査を行った。MRI の T1 強調画像で、大腿骨頭部に帯状の低信号域を認めた場合、これを IONF の「発生」とし、これに加え、X 線像で圧潰像や帯状硬化像を認めるか、あるいは持続的な股関節痛を認めた場合に IONF の「発症」と診断した。IONF の発生・発症状況、及び臨床的パラメーターなどは、従来行ったワーファリンによる予防研究の際の成績と比較検討した。

本研究は佐賀大学医学部臨床試験審査委員会(IRB)の承認を受け、患者からは文書による同意を得た。

表1. 患者背景

患者 No	性	年齢	腎症	CNS	抗リン 脂質抗体	Tchol(mg/dl)		PSL 投与量 (mg/d)	パルス 療法	ワーファリン 投与量(mg/d)	スタチン
						前	1M				
1	M	20	-	-	+	94	206	50	-	3	シ
2	F	33	+	-	-	240	216	50	-	2	ア
3	M	19	-	-	-	91	129	40	-	3	ア
4	F	45	+	-	-	194	254	50	-	4	シ
5	F	37	+	-	-	151	169	50	-	2	ア
6	F	22	+	-	-	144	234	50	-	2	ア
7	F	54	-	-	-	158	217	40	-	3	シ
8	F	52	+	+	-	139	185	50	-	3	ア
9	F	28	-	+	+	137	210	50	+	6	ア
10	F	25	+	+	+	136	205	50	+	4	ア
11	F	55	+	+	+	148	233	50	+	5	シ
12	F	67	+	-	-	273	351	50	-	2.5	シ
13	F	50	-	-	-	189	223	40	-	2.5	シ
14	F	23	-	-	-	145	246	50	-	1.5	ア
計 (平均)	M2 F12	38	57%	29%	29%	160	220	48.6	3	3.1	ア8 シ6

ア：アトルバスタチン， シ：シンバスタチン

3. 研究結果

A. 患者背景 (表1)

現在までに登録を行い、3ヵ月以上経過して IONF 発生の有無を評価できたのは 14 例 (男性 2 例、女性 12 例) に達した。年齢は 19 歳~67 歳 (平均 38 歳) であった。うち、腎症を伴っていたのは 8 例 (57%)、中枢神経合併症例は 4 例 (29%)、抗リン脂質抗体陽性者は 4 例 (29%) であった。PSL 初期投与量の平均は 48.6mg/日であり、ステロイドパルス療法を行なったのは 3 例 (21%) であった。ワーファリンの平均使用量は 3.1mg/日、スタチンではシンバスタチン 6 例、アトルバスタチン 8 例であった。

B. IONF の発生状況と従来の成績との比較 (表2)

従来のワーファリンによる IONF 予防試験の際の成績との主な比較を表2に示す。患者背景は今回の症例と大きな差異はないが、今回はステロイドパルス療法が 3 例 (21%) と少ない傾向にある。今回の 14 例のうち、開始 1 年以上を経過した例は 7 例になるが、これまで IONF 発生はわずかに 1 例 (7%) にみられ、

発症は全く起こっていない。

表2 予防方法とIONFの発生

	予防方法		
	(-)	Wa	Wa+Sta
患者数	29(F26, M3)	31(F26, M3)	14(F12, M2)
平均年齢 (歳)	29.8(15~50)	30.2(13~50)	37.8(19~67)
ステロイド 初期量	54.1mg/d	50.6mg/d	48.6mg/d
ステロイド パルス	15例(52%)	14例(45%)	3例(21%)
腎症	21例(72%)	20例(66%)	8例(57%)
抗リン脂 抗体	8例(28%)	4例(13%)	4例(29%)
IONF 発生 (骨頭数)	19(33%)	15(23%)	2(7%)

*Wa: ワーファリン, Sta: スタチン

これは、従来のワーファリン投与のみの群の 23%、及び予防処置をしていないコントロール群の 33%の発生率に比べて明らかに低い(表2、図1)。また、IONFの発生がみられた1例では、ステロイドパルス療法は行なわれていなかった。血清総コレステロール値の平均は、治療直前、1ヵ月後、及び3ヵ月後でそれぞれ160、220、及び195 mg/dl であり、スタチン投与によっても最初の1ヵ月で60mg/dlの上昇がみられた。この値の変化を従来のスタチンを使用していなかった時の変化と比較した成績を図2に示す。今回のスタチン使用群は1ヵ月の時点で、有意差はないが、非使用群に比べて総コレステロール値が約30mg/dl 低いことがわかる。

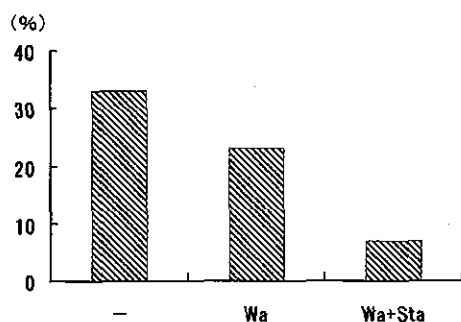


図1. IONF発生頻度(3ヵ月)

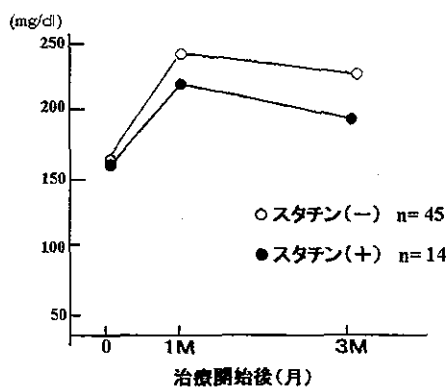


図2 血清総コレステロール値の変化

4. 考察

我々は従来より、ステロイド性 IONF の発生・発症には血液凝固異常が関連することを想定し、初発 SLE 患者に対し、ステロイドとともに抗凝固療法(ワーファリン)を行なうことにより、IONF の発生・発症の予防を試みる予見的研究を行なってきた。しかし、ワーファリンは SLE におけるステロイド性 IONF の発

生・発症の抑制にある一定の効果を示したものの、有意差を認めるまでには至らなかった¹⁾。この過程で、ステロイドを大量投与すると、血清総コレステロール値が急激に上昇すること、そして IONF を発生した例ほどその上昇の程度が大きいことを見いだした⁹⁾。さらに近年、動物モデル³⁾やステロイドを使用するヒトの疾患において、抗高脂血症薬のスタチン類が IONF の発生・発症を抑制できるという報告がなされた。しかし、特に後者のヒトの場合は、方法が臨床試験としては極めて不完全なものであった⁴⁾。

このような状況を背景に、本研究ではステロイド投与に伴う過凝固、及び高脂血症を同時に抑制して IONF の発生・発症を予防することが可能か否かを評価することを目的とした。我々はこれまでの研究で、ステロイド性 IONF が発生する場合は治療開始後3ヵ月以内という早期であることを示してきた⁵⁾。このため、ステロイド開始3ヵ月後か評価の1つの目安となるが、今回のワーファリンとスタチンを使用した研究では、IONF の発生は14例中1例と予想以上の成績を得ることができた。これは従来のワーファリンのみの使用に比べても明らかに低い頻度である。これがスタチンによる効果であるのか、あるいは両薬剤の相乗効果であるのかは、なお今後の検討が必要である。また、今回の14例では、ステロイドパルス療法が行なわれたのは3例で、従来に比べて約半分となっており、このことも IONF 発生が少ない一因となっている可能性がある。我々はすでに、パルス療法が IONF の発生・発症の主要な要因として関わっていることを明らかにしている⁶⁾。

抗高脂血症薬を使用しない場合、大量のステロイド投与により血清総コレステロール値は1ヵ月で約100mg/dl 近くも上昇する。この急激な変化は、生体の脂肪組織や血管系に少なからぬ影響を及ぼすと考えられる。今回、スタチンを使用してもコレステロール値は1ヵ月で60mg/dl 上昇し、完全に上昇を抑制することは困難であった。最近、スタチンは本来の血清脂質低下作用の他に、まだエビデンスは十分とはいえないものの、血管保護作用、抗血栓作用、抗炎症作用、骨粗鬆抑制作用、免疫抑制作用など多面的な効果を有することが指摘されている⁷⁾。今回 IONF 発生時の低下にこのようなスタチンの多面効果が寄与していることも考えられる。さらに症例を集積すると共に、ステロイド性 IONF の予防法の確立に努めたい。

5. 結論

ステロイド性 IONF の発生・発症にはいくつかの要因が関わっていることが考えられるが、ワーファリンとスタチンを同時投与することにより、まだ途中成績ながら、IONF 発生の抑制に好感触を得た。今後、更なる症例の集積とフォローが必要である。

6. 参考文献

- 1) 長澤浩平: ステロイド治療と骨壊死. 日本医事新報 4099: 19-25, 2002.
- 2) Nagasawa K, et al: Avascular necrosis of bone in systemic lupus erythematosus: possible role of haemostatic abnormalities. Ann Rheum Dis 48: 672-676, 1989.
- 3) Cui Q, et al: Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop 344: 8-19, 1997.
- 4) Pritchett, JW: Statin therapy decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. Clin Orthop Rel Res 386: 173- 178, 2001.
- 5) Nagasawa K, et al: Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. Lupus in press.
- 6) Nagasawa K, et al: Imaging study on the mode of development and changes in avascular necrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus: Long term observations. Br J Rheumatol 33: 343-347, 1994.
- 7) Liao JK: Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection Int J Cardiol 86: 5-18, 2002.

ステロイド治療による特発性大腿骨頭壊死症の予防に関する

薬剤の有用性について検討

関谷文男、木村 桂、梁 広石、山路 健、金井美紀、津田裕史、橋本博史

(順天堂大学医学部膠原病内科)

藤岡幹浩

(京都府立医大大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)

川人 豊

(京都府立医大大学院医学研究科 膠原病・リウマチ・アレルギー・内科学)

特発性大腿骨頭壊死症 (Idiopathic osteonecrosis of the femoral head; ION) は青壮年層に多発し、進行性に股関節の変形、破壊をきたして起立・歩行障害を引き起こし、患者の QOL が著しく侵される関節疾患である。本疾患の病因は必ずしも明らかではないが、ステロイド剤の使用やアルコール多飲との関連が示唆されている。その発症患者数は年々増加傾向にあり、特に近年では全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus; SLE) などの免疫異常を伴う疾患、腎疾患、臓器移植後など種々の疾患治療の目的にステロイド剤を使用した患者での ION 患者が増加しており、ION 患者の約半数がステロイド剤投与と関連があると推測されている。しかし、ステロイド剤が本疾患の発生に関連する詳細な機序は不明であり、有効な予防措置がとれないのが現状である。ステロイド投与に関連する骨壊死の発生メカニズムはステロイド剤による脂質代謝の変化、特に骨髓内脂肪蓄積 (骨髓内圧亢進を伴う) や血液凝固機能亢進 (血栓形成)、血管内皮でのアラキドン酸代謝の変化、活性酸素合成亢進による一酸化窒素除去による内皮依存性血管弛緩反応抑制などが指摘されている。また、従来のいくつかの臨床的研究によって、ION はステロイド治療対象疾患でのステロイド剤投与開始から、ほぼ6ヶ月以内に発生し、それ以後の発生はまれであることが示されている。この期間が ION 発生予防の対象時期であると考えられる。この時期に各種薬剤の予防的投与の有用性を検討することが必要であると考えられた。そこで、過去の班会議で有用との報告のある高脂血症剤について非投与群及び、投与する群について検討する。本研究は厚生労働省の「特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会」の中に設けられた「ステロイド治療による特発性大腿骨頭壊死症の予防に関する薬剤の有用性について検討」小委員会を中心に多施設間共同の治療研究として行うこととなる。

1. 研究目的

本研究の目的は高脂血症治療剤を用いて大腿骨頭壊死症発生が予防可能かどうかを検討することである。

2. 現在までの研究結果、基礎的背景

1) SLE 患者 11 名を対象としてステロイドとともにワーファリン+スタチン (シンバスタチンあるいはアトルバスタチン) を投与した結果、3 ヶ月以上の経過で壊死を認めていない。(平成 14~15 年度報告書、佐賀医科大学)。

2) 家兎を用いた動物実験モデルにおいて、ステロイド性骨壊死の発生率は、高脂血症治療剤 プロブコールの使用により、有意に低下 (79%-43%) した (平成 13 年度報告書、九州大学)。

3) SLE 患者 10 名 (初回発症 4 例、増悪 6 例) に対して、抗高脂血症薬アトルバスタチンを同時に投与開始し、血漿交換療法の併用をおこなった。高脂血症のコントロールが不良であった 1 例に骨壊死が発生した (平成 15 年度報告書、順天堂大学)。

3. 方法

患者背景を統一するため、対象を SLE の virgin case に限定して大腿骨頭壊死症に対する予防効果を検討している。初発患者で過去にステロイド治療を受けていないもののみを対象としており、症例数を集めるため多施設共同研究のかたちをとって下記の施設で共同研究を開始している。

順天堂大学膠原病内科 (津田裕土、山路 健)

京都府立医科大学大学院運動器機能再生外科学 (藤岡幹浩)

京都府立医科大学大学院生体機能制御学 (川人 豊)

産業医科大学第一内科 (田中良哉、岡田洋右)

京都大学大学院臨床免疫学 (三森経世)

新潟大学第二内科 (黒田 毅)

埼玉医科大学総合医療センターリウマチ膠原病内科
(竹内 勤、天野宏一)

4. 結果

現在までに抗高脂血症薬を投与した SLE 症例 3 例において大腿骨頭壊死症は発生していない。

5. 考察

まだ症例数が少なく解析する段階ではないが、多施設共同研究によって症例数を集める準備は完成した。

抗高脂血症薬単独で有意な壊死抑制効果が認められれば、合併症も少なく入院治療も必要としないため臨床診療において福音となる可能性がある。

ピタバスタチンによるステロイド性骨壊死予防効果

西田顕二郎、山本卓明、本村悟朗、神宮司誠也、岩本幸英
(九州大学整形外科)

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるピタバスタチンは、第3世代のスタチン系製剤で、強力な総コレステロール低下作用および HDL-コレステロール上昇作用を有しており、近年、主に動脈硬化性疾患治療の分野で注目されている。そこで今回我々は、ステロイド性骨壊死モデルを用いて、ピタバスタチンの骨壊死予防効果を検討した。

1. 研究目的

抗高脂血症剤投与によるステロイド性骨壊死予防効果について、ステロイド投与患者にスタチンを投与することで骨壊死発生が減少したという報告¹⁾や、ステロイド骨壊死モデルにプロブコールを投与することで骨壊死発生率が減少したという報告²⁾がされている。

HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるピタバスタチンは、第3世代のスタチン系製剤で、強力な脂質低下作用を有しており、近年、主に動脈硬化性疾患治療の分野で注目されている。

そこで今回我々は、ステロイド性骨壊死モデルを用いて、ピタバスタチンの骨壊死予防効果を検討した。

2. 研究方法

28 週齢以上の日本白色雄家兎 41 羽を対象とした。そのうち、ピタバスタチン投与群が 21 羽、ステロイド単独投与群が 20 羽であった。メチルプレドニゾロン 20mg/dl を右臀筋に一回のみ筋注し、ピタバスタチン 0.7mg/kg/day を、ステロイド投与二週前より、二週後まで計 4 週間、静注投与を行った。その後犠牲死とし、両大腿骨・上腕骨の近位 1/3 及び遠位部の HE 染色標本にて、病理組織学的定義に基づき判定を行った。³⁾

血液学的検査として、脂質系データ（総コレステロール、HDL コレステロール、LDL コレステロール、トリグリセリド、中性脂肪、遊離脂肪酸、カイロミクロン）について週に一回行い比較検討した。

3. 結果

骨壊死発生率は、ステロイド単独投与群で 70%であったのに対し、ピタバスタチン投与群では、43%であった。

血液データについては、T-chol、および LDL-C についてピタバスタチン投与群で、有意に低下を認め、他の脂質系データでは有意差は認められなかった。

4. 考察

抗高脂血症剤であるプロブコール投与における同様の実験の結果、骨壊死発生率は 38%(2)であり、PS 群とほぼ同等の結果であった。血液データを比較すると、T-Chol において、PS 群 PC 群ともに CTR 群に比して有意な低下を認めたが、両群間には有意差は認められなかった。LDL-C については、プロブコール群、ピタバスタチン群ともにコントロール群より有意な低下を認めております。さらにピタバスタチン群では、プロブコール群と比してさらに有意な低下を認めた (table 1)。しかしながら、骨壊死発生率に、両群間の差を認めていないことを考えると、単純に脂質を低下させることが、必ずしも骨壊死発生減少には相関しないのではないかと考えられる。今後、骨壊死との相関が考えられるその他の因子について検討を行っていく必要があると考えられる。

脂質系血液データ <LDL-Cholesterol>

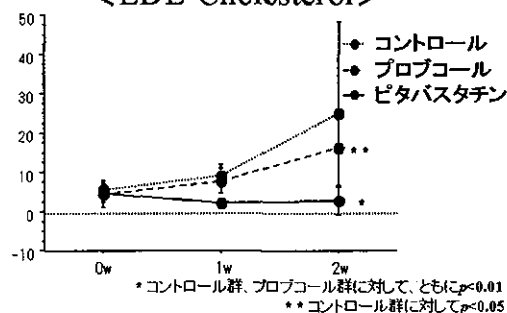


Table 1

ステロイド投与後0w、1w、2wにおけるLDL-Chol値。プロブコール群、ピタバスタチン群ともにコントロール群に比して有意に低下している。ピタバスタチン群は、プロブコール群に比しても有意に低下させていた。

5. 結論

ステロイド投与家兎骨壊死モデルに第三世代のスタチン製剤であるピタバスタチンを投与すると骨壊死発症率は43%であった。

6. 研究発表

A. 論文発表

なし

B. 学会発表

- 1) 西田顕二郎、山本卓明、本村悟朗、首藤敏秀、中島康晴、神宮司誠也、岩本幸英;急速破壊型股関節症における白蓋側の早期MRI所見,第31回日本股関節学会学術集会(2004.10.15-16 長崎)

7. 知的所有権の取得状況

A. 特許取得

なし

B. 実用新案登録

なし

C. その他

なし

8. 参考文献

- 1) Pritchett JW. Related Statin therapy- decreases the risk of osteonecrosis in patients receiving steroids. Clin Orthop. 2001;386:173-8.
- 2) Motomura G, Yamamoto T, Miyanishi K, Jingushi S, Iwamoto Y. Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 2004;50:3387-91.
- 3) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K. Effects of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissues: corticosteroid- induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 1997;40:2055-64.

ステロイド性骨壊死モデルにおける グルタチオン常用量による骨壊死抑制効果の検討

北村憲司、兼氏 歩、市堰 徹、杉森端三、福井清数、松本忠美
(金沢医科大学 整形外科)

ステロイド性骨壊死モデルに還元型グルタチオンを常用量投与しその壊死抑制効果について検討した。骨壊死モデルに対し還元型グルタチオン(5mg/kg)を5日間連続投与し14日目に犠牲死とした家兎をG群、ステロイド単独投与群をS群とした。検討方法は壊死発生の有無を組織学的に検討した。S群で10羽中7羽に骨壊死を認めたのに対し、G群では7羽中骨壊死を認めた家兎は0羽であった。

1. はじめに

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生機序は、いまだ明確にされていない^{1)~4)}。近年種々の疾患に生体内酸化ストレスの関与が報告されている^{5)~7)}。当科でも市堰らはステロイド性骨壊死モデルにおいて、ステロイド投与後3から5日で酸化ストレスが発生していることを確認し、抗酸化剤である還元型グルタチオン(以下GSH)を投与することで骨壊死発生を抑制した事を報告している⁸⁾。この報告では大量のGSHを使用しており、臨床的考慮に入れた場合、その投与量が問題となる。そこで本研究の目的は、通常量のGSHを投与することによるステロイド性骨壊死モデルでの骨壊死抑制効果を検討することである。

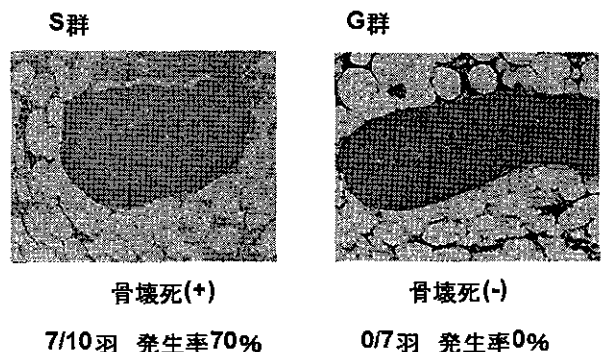
2. 対象と方法

体重約3.5kgの雌性日本白色家兎に対し、酢酸メチルプレドニゾロン4mg/kgを1回のみ殿筋内に筋注し、14日で犠牲死とした10羽をS群とした。また同様の処置を施した家兎にステロイド投与同日からGSH 5mg/kgを5日間連続投与し、14日で犠牲死とした7羽をG群とした。検討項目はH-E染色標本にて大腿骨近位1/3における壊死発生の有無について、山本らの定義に基づき⁹⁾骨壊死を判定し検討した。

3. 結果

S群では10羽中7羽に骨壊死を認め、骨壊死発生率は70%であった。それに対しG群ではS群のよう

な骨壊死像を認めた家兎は全例で認めなかった。またG群で1羽のみ骨髓壊死を認めた。S群とG群間に骨壊死の発生において有意な差を認めた。



4. 考察

近年種々の疾患で生体内酸化ストレスの関与が報告されており、組織傷害や血管内皮障害、細胞死への関与が報告されている。一方ステロイド性骨壊死モデルにおいてステロイド投与後5日目に骨内のDNA酸化障害が発生し、骨壊死発生に関与している可能性があることが示唆されている。今回GSHの投与量を5mg/kgに減量したところ、市堰らと同様に骨壊死発生の抑制を確認することができた。

本結果よりステロイド性骨壊死モデルに常用量の抗酸化剤(GSH)を投与することで骨壊死発生を抑制することが示唆された。

今後、ステロイド投与量を増量しても今回のGSH量で骨壊死発生の抑制について検討することが必要である。

5. 参考文献

- 1) Fisher D E: The role of fat embolism in the etiology of corticosteroid-induced avascular necrosis: Clinical and experimental results. *Clin Orthop* 1978. 130; 68-80
- 2) Wang TY, Wang TY, Avolonitis EG, et al: Systemic necrotizing vasculitis causing bone necrosis. *Am J Med* 1988. 84;1085-1086
- 3) Saito S, Inoue A, Ono K: Intramedullary haemorrhage as a possible cause of avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br* 1987. 69; 346-351
- 4) Jones J P: Intravascular coagulation and osteonecrosis. *Clin Orthop* 1992. 277; 41-53
- 5) Chung SS, Ho EC, Lam KS et al. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14; S233-236
- 6) Uzel N, Sivas A, Uysal M, et al. *Horm Metabol Res* 1987 19(2) 89-90
- 7) Hayashi M, Itoh M, Araki S, et al. Oxidative stress and disturbed glutamate transport in hereditary nucleotide repair disorders. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001 60(4) 350-356
- 8) T. Ichiseki, T. Matsumoto, M. Nishino et al. Oxidative stress and vascular permeability in steroid-induced osteonecrosis model. *J Orthop Sci* 2004 9(5) 509-515
- 9) Yamamoto T, Irita T, Sugioka Y, Sueishi K. Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue. *Arthritis Rheum*. 1997 Nov 40(11) 2055-2064

特発性大腿骨頭壊死症の発生と肝 CYP3A4 活性との相関に関する研究

高岡邦夫、金城養典、大橋弘嗣、岩城啓好、政田俊明、岩切健太郎

(大阪市立大学大学院整形外科学)

小田裕

(大阪市立大学大学院麻酔・集中治療医学)

近藤享子、廣田良夫

(大阪市立大学大学院公衆衛生学)

グルココルチコイド剤は肝臓で主に薬物代謝酵素である CYP3A4 により肝で代謝され、代謝されなかった部分が標的臓器に至り作用する。この肝 CYP3A4 活性は個人差が大きいことが知られている。この酵素活性低下は肝での代謝の低下によってステロイド剤の過度の薬理効果をもたらす可能性があり、ステロイド投与に関連する特発性大腿骨頭壊死症(ION)の発生の素因となっている可能性がある。この仮説の基に ION 発症患者の肝 CYP3A4 活性を midazolam clearance を用いて測定し、解析を行った。その結果、ステロイド性 ION 患者の肝 CYP3A4 活性は健常人の分布を参照にすると、低値に分布していた。また、多変量解析の結果より、この肝 CYP3A4 活性低値はステロイド性 ION 発生のリスクを 5.3 倍高めることが明らかになった。したがってステロイド剤投与に際して肝 CYP3A4 活性が測定できれば、ステロイド剤の投与量の調整によってステロイド性 ION を予防できる可能性があると考えた。その測定を簡便に行うために、midazolam 投与後 1 回採血法によるスクリーニング試験を開発した。この方法によりステロイド性 ION 高リスク患者の同定が可能になり、ステロイド剤投与開始時の用量調節などによってステロイド性 ION の予防が可能になることが期待される。

1. 研究目的

特発性大腿骨頭壊死症(ION)は青壮年期に好発し、その罹患患者の多くは股関節の破壊に至り、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、ステロイド剤投与との強い関連が示唆されている。^{1,2,3,4)}

しかし、ステロイド治療を受けた症例すべてに本症が発生するわけではなく、同一疾患の患者群が同程度のステロイド剤投与を受けた場合でも ION の発生頻度は比較的低い⁵⁾。この事実は ION 発生の個体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剤代謝能の個体差が ION の発生と関連があると仮説した。

生体内でステロイド剤は主に肝臓の薬物代謝酵素である CYP3A4 により代謝を受け、代謝を受けなかった未変化体のみが標的細胞に至り作用する^{7,8,9)}。肝 CYP3A4 は Cytochrome P450 family で、CYP3A subfamily のおもな isoform であり、肝臓に含まれる Cytochrome P450 のおよそ 30%を占める。現在使用

されている全薬物の 50%以上を代謝し、肝臓での mRNA の発現量の個人差は 50 倍以上、生体内機能は 20 倍以上の個人差があるとされ^{10,11)}、薬効の個体差を説明する分子の一つとされている¹²⁾。

我々は、この肝 CYP3A4 活性の低い患者はステロイド剤の代謝が悪く、その過剰な薬理効果のためにステロイド性 ION を発生すると仮説し、検索を行った。

また、ステロイド剤投与に関連した ION 発生防止方法の確立を目標として、ステロイド性 ION 発生高リスク患者の同定のためのスクリーニングテストについても検索を行っている。この方法が可能となれば、ステロイド剤投与開始時の用量調節などによって予防が可能となる。

2. 研究方法

(対象)

対象は、整形外科入院手術を受けたステロイド性 ION 患者 19 例、アルコール性 ION 患者 18 例、整形外科

入院手術を受けた健常人 41 人を normal control とした。ION の診断には厚生労働省大腿骨頭壊死症研究班診断基準を用いた¹³⁾。高度肝機能障害、CYP3A4 機能に影響する薬物投与を受けている場合、極端な肥満を除外基準とした。

(方法)

肝 CYP3A4 活性定量は midazolam clearance を計測することにより定量した¹⁴⁾。

手術時の麻酔導入を midazolam 0.25mg/kg にて導入し、静注後経時的に動脈ラインより採血を行った(5,10,15,20,30,45,60,90,120,180,240,360 分。1 回 2.5cc)。採血後、2 時間以内に遠心分離(12000rpm × 10 分)し、上清液を-80℃にて保存した。後日、その上清液から血中 midazolam 濃度を HPLC にて定量した。得られた値より濃度曲線を作成し血中濃度曲線下面積(AUC; Area under the concentration curve)、clearance (CL=Dose/AUC)を算出し、肝 CYP3A4 活性とした¹⁵⁾。

簡便なスクリーニングテストとして single point 1'-OH MDZ/MDZ ratio について検索した^{16,17)}。midazolam と同様に血清中の 1'-OH midazolam 濃度を HPLC にて定量した。その結果より、5,10,15,20,30,45,60,90,120,180, 240,360 分の single point 1'-OH MDZ/MDZ ratio を算出し、ステロイド性 ION 発生高リスク患者の同定の可能性、肝 CYP3A4 活性との相関性について検索を行った。

(統計学的解析)

肝 CYP3A4 活性と ION 発生の関連性を unconditional logistic regression model (SAS software)を用いて odds ratio (OR)、95%信頼区間(95%CI)を算出することにより評価した。

single point 1'-OH MDZ/MDZ ratio の最適時点を sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value を算出し、ROC 曲線を作成することにより検索した。

(倫理面への配慮)

本研究の実施にあたって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。

3. 研究結果

Table 1.に characteristics を示す。ステロイド性 ION 群と normal control 群の間に、性・年齢・肝機能・腎機能に有意差は認めなかった。アルコール性 ION 群と

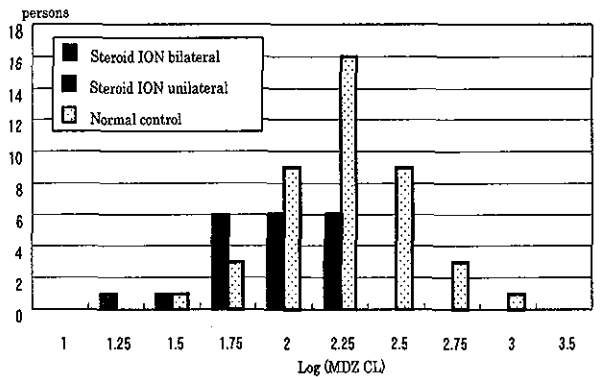


Figure 1-a. Histogram
Steroid-induced ION patients vs. normal control.

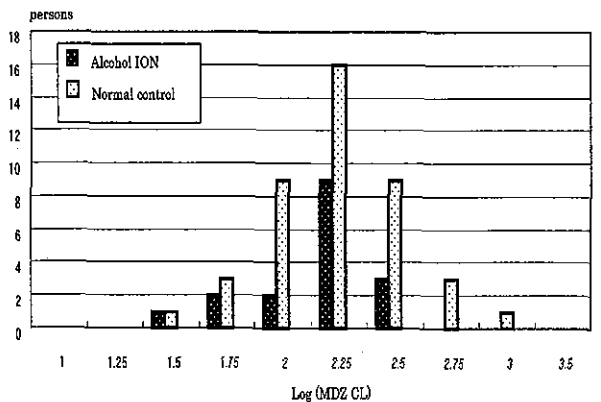


Figure 1-b. Histogram
Alcohol-related ION patients vs. normal control.

normal control 群間では、アルコール性 ION 群に有意に肝トランスアミナーゼの上昇を認めた (p<0.05 in Wilcoxon's rank sum test (vs. controls))。

ステロイド性 ION 群と normal control 群の histogram を Figure 1-a に示す。健常人の肝 CYP3A4 の分布を参照すると、ステロイド性 ION 群は肝 CYP3A4 活性が低値に分布する集団であった。さらにそのステロイド性 ION 群内で、肝 CYP3A4 活性が低値の患者は両側発生例であり、高値の患者は片側発生例である傾向を認めた。

アルコール性 ION 群と normal control 群の histogram を Figure 1-b に示す。ステロイド性 ION 群とは異なり健常人の肝 CYP3A4 活性を参照すると、アルコール性 ION 群は、肝 CYP3A4 活性の高低に特別な傾向を認めなかった。

Table 1. Selected characteristics by disease category

Characteristics		Steroid induced n=19	Alcohol related n=17	Control n=41
Sex	male (%)	9 (47)	14 (82)	15 (37)
Age	yrs	41.0±12.8	44.8±13.4	40.6±15.7
AST	IU/l	23.3±9.6	* 32.0±13.0	24.6±6.9
ALT	IU/l	21.7±9.0	* 36.0±21.2	23.7±11.6
BUN	mg/dl	13.5±5.0	12.7±2.7	13.7±4.1
Cre	mg/dl	0.68±0.16	0.69±0.17	0.63±0.17

Data are mean±SD.

* p<0.05 in Wilcoxon's rank sum test (vs. controls).

Characteristics	Steroid	Control	Crude		Sex and age adjusted		
			OR (95% CI)	P value	OR (95% CI)	P value	
MDZ CL (ml/kg/min)							
a) <9.7	14	14	5.4 (1.6-18.0)	0.006 **	5.3 (1.6-18.0)	0.007 **	
9.7+	5	27	1 (ref)		1 (ref)		
SEX							
M	9	15	1		1		
F	10	26	0.6 (0.2-1.9)	0.429	0.6 (0.2-1.9)	0.383	
AGE (yrs)							
	19	41	1 (0.97-1.04)	0.678	1 (0.97-1.05)	0.700	
AST (IU/l)							
b) ≤40	17	40	1		1		
41+	2	1	4.7 (0.4-55)	0.218	6.1 (0.5-77)	0.161	
ALT (IU/l)							
b) ≤45	19	38					
46+	0	3					
BUN (mg/dl)							
b) <7.0	1	0					
7.0-18.0	15	39					
18.0+	3	2					
Cre (mg/dl)							
b) <0.4	0	2					
0.4-1.1	19	38					
1.1+	0	1					

Cut-off point; a) lowest third in control, and b) normal range.

*p<0.05. **p<0.01

Table 2. Unconditional logistic regression model for risk factors of steroid-induced ION.

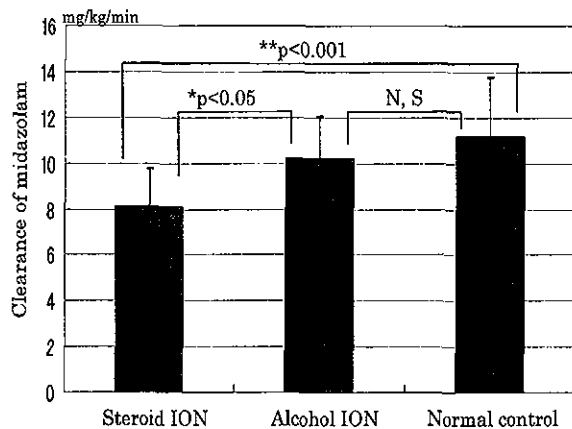


Figure 2. *p<0.05, **p<0.001 in t-test.

平均値で比較すると(Figure 2)、ステロイド性 ION 群は normal control 群と比較して統計学的有意に肝 CYP3A4 活性が低値であった(p<0.001 in t-test)。一方、アルコール性 ION 群は normal control 群と比較して統計学的有意差を認めなかった。さらに、同じ ION 群の中でもステロイド性 ION 群はアルコール性 ION 群と比較して統計学的有意に肝 CYP3A4 活性が低値であった(p<0.05 in t-test)。

次に、CYP3A4 活性低値がステロイド性 ION の発生に関与しているか検索するために unconditional logistic regression model を用いて多変量解析を行った(Table 2)。normal control 群の midazolam clearance の第一 3 分位の 9.7mg /kg/min 以下を肝 CYP3A4 活性低値とした。性・年齢の影響を調整した結果、肝 CYP3A4 活性低値はステロイド性 ION 発生のリスクを 5.3 倍高めていた (OR=5.3 95%CI(1.8-18.0))。性・年齢・肝機能・腎機能はステロイド性 ION 発生に関与してはいなかった。また、Attributable fraction を算出すると 81%であり、ステロイド性 ION 患者の 81%は肝 CYP3A4 活性低値が原因であることが明らかになった。

midazolam 投与後 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 360 分の single point 1-OH' MDZ/MDZ ratio を算出し、ステロイド性 ION 発生高リスク患者の同定の可能性、肝 CYP3A4 活性との相関性について検索を行った。ステロイド性 ION 群の約 95%は midazolam clearance が 10mg/kg/min 以下であるので、midazolam clearance 10mg/kg/min 以下と 10mg/kg/min 以上を判別することを目的とするスクリーニング検査とした。ROC 曲線を作成し検索した

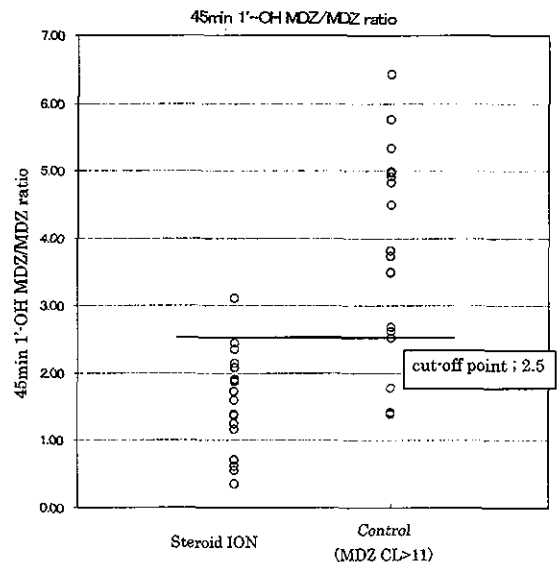


Figure 3.

sensitivity=0.94, specificity=0.84, positive predictive value=0.85, negative predictive value=0.94

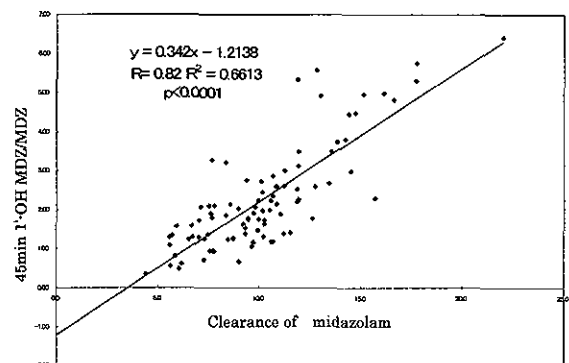


Figure 4.

45min 1'-OH MDZ/MDZ ratio was strongly correlated with clearance of midazolam.

結果 (data not shown)、midazolam 投与後 45 分時の single point 1-OH' MDZ/MDZ ratio は cut-off 値を 2.5 とした場合、感度 94%、特異度 84%、陽性反応的中度 85%、陰性反応的中度 94%でスクリーニングできる簡便法であることが明らかになった(Figure 3)。さらに、midazolam 投与後 45 分時の single point 1-OH' MDZ /MDZ ratio は midazolam clearance と強い相関を示し (R=0.82, R²=0.67, p<0.0001) 肝 CYP3A4 活性をよく反映するスクリーニング法であった(Figure 4)。

4. 考察

midazolam clearance を用いた研究結果より、ステロイド性 ION 患者の肝 CYP3A4 活性は健常人の分

布を参照すると、低値に分布していた。また、ステロイド性 ION 患者群の肝 CYP3A4 活性の平均値は、健常人と比較すると統計学的有意に低値であった。そして、肝 CYP3A4 活性低値はステロイド性 ION 発生のリスクを 5.3 倍高めていた。一方アルコール性 ION 患者はそのような分布は示さず、CYP3A4 活性の平均値も健常人と有意な差を認めなかった。また、多変量解析の結果でも肝 CYP3A4 活性はアルコール性 ION 発生のリスクには関与していなかった (data not shown)。また、同じ ION 群であっても、ステロイド性 ION 患者の肝 CYP3A4 活性の平均値はアルコール性 ION 患者よりも統計学的有意に低値であった。

また症例数がまだ少ないために統計学的解析は行っていないが、ステロイド性 ION 患者の中でも、肝 CYP3A4 活性がより低値である患者は両側発生例であり、高値の患者は片側発生例である傾向を示した。この事実より、肝 CYP3A4 活性はステロイド性 ION の重症度にも関与している可能性があり、現在更に多発性骨壊死など他の重症度についてのパラメーターについても確認し、検索してゆく予定としている。

これらの結果より、ステロイド性 ION 患者は肝 CYP3A4 活性が低い為に (Poor metabolizer)、体内にステロイド剤が蓄積する傾向にあり、ステロイド剤の薬理効果が過剰になった為にステロイド性 ION を発生したと考察した。

肝 CYP3A4 活性の低下がステロイド性 ION の発生の原因であるとすれば、できるだけ簡便かつ低侵襲な方法で個々の患者の肝 CYP3A4 活性を把握し、その活性に基づき投与ステロイド量を調整することでステロイド性 ION 発生の予防が可能になると考えられる。

患者の肝 CYP3A4 活性をステロイド剤投与時に把握する方法としては midazolam clearance 法は実際的ではない。今回 single point 1'-OH MDZ/MDZ ratio をスクリーニング検査として使用できるか検討した結果、midazolam 投与後 45 分値が感度・特異度ともに良いスクリーニング検査であり、かつ肝 CYP3A4 活性ともよい相関性を示した。midazolam はその吸収性の早さゆえ、静脈投与・経口投与とどちらもほぼ同じ体内動態を示すために、実際のスクリーニング検査としては midazolam 経口投与後 45 分での 1 回採血による single point 1'-OH MDZ/MDZ ratio がより望ましい方法であると考察した^{18,19)}。

このような方法でステロイド剤投与前に肝 CYP3A4

活性を把握し、その活性に応じたステロイド剤の投与量調節によって、ステロイド性 ION 発生の予防が可能になると考えられる。

5. まとめ

- 1) ステロイド性 ION 患者は肝 CYP3A4 活性が低く、肝 CYP3A4 活性低値はステロイド性 ION 発生のリスクを 5.3 倍高めていた。この結果より、ステロイド性 ION は肝 CYP3A4 活性低値がその原因の一つと考えられた。
- 2) midazolam 投与後 1 回採血法による single point 1'-OH MDZ/MDZ ratio を求めることにより肝 CYP3A4 活性を簡便に把握する事ができ、この活性に基づいたステロイド剤投与量調節 (テーラード化) によりステロイド性 ION 発生の予防ができる可能性がある。

6. 発表

- 1) 金城養典 政田俊明 高岡邦夫：特発性大腿骨頭壊死症の発生と肝薬物代謝酵素 (CYP3A4) の相関に関する研究. 第 22 回日本骨代謝学会. 2004.8.4
- 2) 金城養典 大橋弘嗣 政田俊明 野村千澄 小田裕 高岡邦夫：特発性大腿骨頭壊死症の発生と肝薬物代謝酵素 (CYP3A4) の相関に関する研究. 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 2004.10.21

7. 参考文献

- 1) Zizic TM, Marcoux C, Hungerford DS, Dansereau JV, Stevens MB. Corticosteroid therapy associated with ischemic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. Am J Med 1985;79(5):596-604.
- 2) Weiner ES, Abeles M. Aseptic necrosis and glucocorticosteroids in systemic lupus erythematosus: a reevaluation. J Rheumatol 1989;16(5):604-8.
- 3) Ono K, Tohjima T, Komazawa T. Risk factors of avascular necrosis of the femoral head in patients with systemic lupus erythematosus under high-dose corticosteroid therapy. Clin Orthop 1992(277):89-97.
- 4) Mont MA, Hungerford DS. Non-traumatic

- avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am* 1995;77(3):459-74.
- 5) Abeles M, Urman JD, Rothfield NF. Aseptic necrosis of bone in systemic lupus erythematosus. Relationship to corticosteroid therapy. *Arch Intern Med* 1978;138(5):750-4.
 - 6) Kalla AA, Learmonth ID, Klemp P. Early treatment of avascular necrosis in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 1986;45(8):649-52.
 - 7) Waxman DJ, Attisano C, Guengerich FP, Lapenson DP. Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1988;263(2):424-36.
 - 8) Frey FJ, Frey BM. Urinary 6 beta-hydroxyprednisolone excretion indicates enhanced prednisolone catabolism. *J Lab Clin Med* 1983;101(4):593-604.
 - 9) Wrighton SA, Stevens JC. The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 1992;22(1):1-21.
 - 10) Ozdemir V, Kalowa W, Tang BK, et al. Evaluation of the genetic component of variability in CYP3A4 activity: a repeated drug administration method. *Pharmacogenetics* 2000;10(5):373-88.
 - 11) Wilkinson GR. Cytochrome P4503A (CYP 3A) metabolism: prediction of in vivo activity in humans. *J Pharmacokinet Biopharm* 1996;24(5):475-90.
 - 12) Eichelbaum M, Burk O. CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 2001;7(3):285-7.
 - 13) Sugano N, Atsumi T, Ohzono K, Kubo T, Hotokebuchi T, Takaoka K. The 2001 revised criteria for diagnosis, classification, and staging of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *J Orthop Sci* 2002;7(5): 601-5.
 - 14) Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: I. In vitro-in vivo correlations in liver transplant patients. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271(1):549-56.
 - 15) Hamaoka N, Oda Y, Hase I, et al. Propofol decreases the clearance of midazolam by inhibiting CYP3A4: an in vivo and in vitro study. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66(2): 110-7.
 - 16) Lin YS, Lockwood GF, Graham MA, et al. In vivo phenotyping for CYP3A by a single-point determination of midazolam plasma concentration. *Pharmacogenetics* 2001;11(9):781-91.
 - 17) Thummel KE, Shen DD, Podoll TD, et al. Use of midazolam as a human cytochrome P450 3A probe: II. Characterization of inter- and intraindividual hepatic CYP3A variability after liver transplantation. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271(1):557-66.
 - 18) McCrea J, Prueksaritanont T, Gertz BJ, et al. Concurrent administration of the erythromycin breath test (EBT) and oral midazolam as in vivo probes for CYP3A activity. *J Clin Pharmacol* 1999;39(1 2):1212-20.
 - 19) Eap CB, Buclin T, Cucchia G, et al. Oral administration of a low dose of midazolam (75 microg) as an in vivo probe for CYP3A activity. *Eur J Clin Pharmacol* 2004;60(4):237-46.

核内ステロイドレセプターGR 転写共役因子群の探索

加藤 茂明 (東京大学分子細胞生物学研究所)

グルココルチコイドをはじめとした、ステロイドホルモン受容体機能には、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。そこで骨代謝におけるグルココルチコイド機能の分子機構を解明する為に、我々は 1) 転写共役因子関連ノックアウトマウスの作出と骨組織の解析、2) 骨組織における GR 転写共役因子群の取得を試みている。本研究では、転写共役因子 SRC1 の KO マウスの作出と骨における表現型の結果、GR のリガンド依存型転写共役抑制因子複合体の取得について報告する。

1. 研究目的

大腿骨頭壊死症の原因の一つである核内ステロイド受容体型転写因子グルココルチコイド受容体(GR)の転写制御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が鍵になる。そこで転写共役因子の機能解析として、ノックアウトマウスの作出を行った。更に GR はリガンド依存的に骨芽細胞促進転写因子 AP1 の機能を抑制するため、リガンド依存的な転写抑制に寄与する新たな転写共役因子複合体の取得を試みた。

2. 研究方法

ノックアウトマウスを行う転写共役因子として SRC-1 に着目した。この分子は GR や他のステロイド受容体と結合する転写共役因子として初めてクローニングされたものである。骨代謝調節に関する SRC-1 KO マウスの報告は無いため、特定遺伝子の欠損を時期・細胞種特異的に誘導出来る Cre/loxPsystem 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、これに全身性に 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。

また新規GR転写共役因子複合体取得の方法として、タンパク精製の手法を用いた。方法としてまず Flag タグを付加したグルココルチコイド受容体(GR)を恒常的に発現する浮遊 HeLa 細胞を樹立を試みた。その後

大量培養を行い、核抽出液を調製し Flag 抗体カラムと接触、溶出する事で GR と相互作用する因子群の取得を試みた。更にグリセロール密度勾配遠心法を用いて分子量で分画し、API と GR 複合体を形成する因子について同定を行った。更にその因子が GR による API 活性抑制に機能する可能性を検討した。

(倫理面への配慮)

全ての実験動物の取り扱いは東京大学実験動物取り扱い規約に則って行った。

3. 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 を用いて骨量について解析した結果、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。更に 3D-CT により検討したところ、骨量減少は皮質骨・海綿骨ともに認められた。また WT と比較して雌の血中 estradiol 濃度が約 40%、雄の血中 testosterone 濃度が約 30%上昇していた。更に性腺除去(OVX 及び ORX)マウスにそれぞれ estradiol 及び DHT の徐放ペレットを投与すると、WT は無処置群と同定と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。

タンパク精製を用いた新規 GR 転写共役因子の取得に関しては、FlagGR の強制発現細胞の樹立に成功し、

上記精製法によってヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 が GR と API と複合体を形成する事を見出した。更に HeLa 細胞において Dex 処理 12 時間後に脱アセチル化酵素阻害剤 TSA を加え、API 標的遺伝子の mRNA 発現変化を検討した。標的遺伝子として c-fos、IL6、IL11、TNF α を用いた。その結果、Dex 依存的な抑制に TNF α は HDAC 活性を要したが、IL11 は HDAC 活性を要さない事が観察された。

4. 考察

SRC-1KO は雌雄共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事が明らかになり、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により SRC1 の欠損はエストロゲン及びアンドロゲンによる骨量維持作用を抑制している事が明らかになった。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事により、骨におけるグルココルチコイドシグナルには SRC-1 は関与していない事が示された。

タンパク精製を用いた手法から、GR と API の複合体にヒストン脱アセチル化酵素である HDAC2 が含まれる事が明らかとなった。しかしながら GR と HDAC による API 抑制には標的遺伝子選択性が存在する可能性もある。また今回用いた細胞は HeLa 細胞のみであったため、今後骨関連細胞株を用いる事で細胞種特異性についても検討する必要がある。更に GR/API 複合体に含まれる因子の同定を行う事で、骨代謝における GR 機能の解明が可能であると考えられる。

5. 結論

Cre-loxP system を用いて雌雄の SRC-1KO マウスのラインを確立した。SRC-1KO 雌雄マウスは高回転型の骨量減少を呈し、エストロゲン及びアンドロゲンによる骨量維持に必須の因子である事が示唆された。GR 強制発現細胞を用いた大量培養実験から、GR と API が複合体を形成することを明らかにした。GR/API 複合体に HDAC2 が含まれる事を見出した。

6. 研究発表

A. 論文発表

1) Murayama, A., Kim, M., Yanagisawa, J.,

Takeyama, K., Kato, S.: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.*, 23, 1598-1608, 2004.

2) 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*, 101, 1673-1678, 2004.

3) Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Ito, S., Furutani, T., Sawatsubashi, S., Maki, A., Suzuki, E., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Tabata, T., Kato, S.: Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J. Biol. Chem.*, 279, 40255-40258, 2004.

4) Maki, A., Sawatsubashi, S., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 262-267, 2004.

5) Sawatsubashi, S., Maki, A., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly (ADP-ribosylation). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 320, 268-272, 2004.

6) Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Yamamoto, A., Suzuki, E., Maki, A., Yamagata, K., Zhao, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., Kato, S.: A novel genetic system for analysis of co-activators for the N-terminal transactivation function domain of the human androgen receptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 1209-1215, 2004.

7) Wada, O., Oishi, H., Takada, I., Yanagisawa, J.,

- Yano, T., Kato, S.: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene*, 23, 6000-6005, 2004.
- 8) Ito, S., Takeyama, K., Yamamoto, A., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., Kato, S.: *In vivo* potentiation of human oestrogen receptor α by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes to Cells*, 9, 983-992, 2004.
- 9) Kato, S., Fujiki, R., Kitagawa, H.: Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 89-90, 173-178, 2004.
- 10) Kato, S., Matsumoto, T., Kawano, H., Sato, T., Takeyama, K.: Function of androgen receptor in gene regulations. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, 89-90, 627-633, 2004.
- 11) Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S.: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004 (in press).
- 12) Tateishi, Y., Kawabe, Y., Chiba, T., Murata, S., Ichikawa, K., Murayama, A., Tanaka, K., Baba, T., Kato, S., Yanagisawa, J.: Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J.*, 23, 4813-4823, 2004.
- 13) Meindl, S., Rot, A., Hoetzenecker, W., Kato, S., Cross, S., Elbe-Burger, A.: Vitamin D receptor ablation alters skin architecture and homeostasis of dendritic epidermal T cells. *British J. Dermatology*, 2004 (in press).
- 14) Ikeda, K., Ogawa, S., Tsukui, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kato, S., Muramatsu, M., Inoue, S.: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.*, 18, 1131-1143, 2004.
- 15) Kahata, K., Hayashi, M., Asaka, M., Hellman, W., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S., Imamura, T., Miyazono, K.: Regulation of transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein signalling by transcriptional coactivator GCN5. *Genes to Cells*, 9, 143-151, 2004.
- 16) Aihara, K. I., Azuma, H., Akaike, M., Ikeda, Y., Yamashita, M., Sudo, T., Hayashi, H., Yamada, Y., Endoh, F., Fujimura, M., Yoshida, T., Yamaguchi, H., Hashizume, S., Kato, M., Yoshimura, K., Yamamoto, Y., Kato, S., Matsumoto, T.: Disruption of nuclear vitamin D receptor gene causes enhanced thrombogenicity in mice. *J. Biol. Chem.*, 279, 35798-35802, 2004.
- 17) Yamada, T., Kawano, H., Sekine, K., Matsumoto, T., Fukuda, T., Azuma, Y., Itaka, K., Chung, U. I., Chambon, P., Nakamura, K., Kato, S., Kawaguchi, H.: SRC-1 is necessary for skeletal responses to sex hormones in both males and females. *J. Bone Miner. Res.*, 19, 1452-1461, 2004.
- 18) Kawasumi, M., Okada, T., Yamada, M., Miyamae-Kaneko, M., Matsuoka, M., Nakahara, J., Tomita, T., Iwatsubo, T., Kato, S., Aiso, S., Nishimoto, I., Kouyama, K.: Targeted introduction of V642I mutation in amyloid precursor protein gene causes functional abnormality resembling early stage of Alzheimer's disease in aged mice. *Eur. J. Neurosci.*, 19, 2826-2838, 2004.
- 19) Segawa, H., Kaneko, I., Yamanaka, S., Ito, M., Kuwahata, M., Inoue, Y., Kato, S., Miyamoto K.: Intestinal Na-Pi cotransporter adaptation to dietary Pi content in vitamin D receptor null mice. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 287, F39-F47, 2004.
- 20) Capuano, P., Wagner, C.A., Radanovic, T., Bacic, D., Kato, S., St-Arnaud, R., Murer, H., Biber, J.: Intestinal and renal adaptation to a low Pi-diet of type II Na-Pi-cotransporters in

- VDR and 1 α -OHase deficient mice. *AJP/Cell*, 2004 (in press).
- 21) Peters, J. M., Kato, S., Gonzalez, F.: The United States-Japan workshop on: the role of nuclear receptors in carcinogenesis. *Mol. Carcinogenesis*, 41, 77-84, 2004.
- 22) Uchida, E., Kagawa, N., Sasaki T., Urushino, N., Sawada, N., Kamakura, M., Ohta, M., Kato, S., Inouye, K.: Purification and characteraization of mouse CYP27B1 overproduced by an Escherichia coli system coexpressing molecular chaperonins GroEL/ES. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 323, 505-511, 2004.
- 23) Fan, W., Yanase, T., Wu, Y., 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.*, 18, 127-141, 2004.

B. 学会発表

国際学会

ASBMR 26th Annual Meeting

- 1) Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts: Generation and characterization of osteoclast-specific androgen Receptor knockout mice
T. Nakamura, T. Watanabe, Y. Nakamichi, T. Fukuda, T. Matsumoto, K. Yoshimura, J. Miyamoto, Y. Yamamoto, H. Shiina, S. Tanaka, M. Sakari, T. Sato, D. Metzger, P. Chambon, S. Kato (2004)
- 2) A genetic evidence of direct VDR function in osteoblasts: generation and analysis of osteoblast-specific VDRKO mice
Y. Yamamoto, T. Yoshizawa, T. Fukuda, H. Kawano, T. Nakamura, T. Yamada, G. Karsenty,

S. Kato (2004)

- 3) Modulation of VDR function by a novel vitamin D analogue, ED-71, is mediated through a novel serum protein
Y. Shirode, K. Takeyama, S. Kato (2004)

Keystone Symposia

- 4) Co-regulator complexes for nuclear receptors and genetic analyses of AR function
S. Kato (2004)
- 5) TRAP240, as a component of the mediator complex, represses transactivation function of androgen receptor
K. Takeyama, S. Ito, S. Sawatsubash, Y. Shirode, E. Suzuki, A. Maki, Y. Zhao, K. Yamagata, A. Kouzmenko, T. Tabata, S. Kato (2004)

ENDO 2004, the 86th Annual Meeting of the Endocrine Society

- 1) Classes of nuclear receptor coregulatory complexes
S. Kato (2004)

UT Forum 2004 in Sweden

- 1) Transcriptional controls by nuclear receptors
S. Kato (2004)
- 2) Azoospermic factor RBMY functions as a cofactor of ER α
M. Sakari, S. Kato (2004)

Vitamin D Workshop Working Group

- 1) The Williams Syndrome and the Vitamin D Receptor
S. Kato (2004)

【国内学会】

2004年度日本農芸化学会

- 1) エストゲンレセプター特異的転写共役因子ノックアウトマウスの解析
福田 亨、渡辺資之、関根圭輔、松本高広、中村 貴、田中佐依子、山本陽子、吉村公宏、椎名博子、宮