

全身性エリテマトーデス患者におけるステロイド性 大腿骨頭壊死症に対する抗高脂血症剤の予防効果の検討

関谷文男、山路 健、金井美紀（順天堂大学医学部 膠原病内科）
梁 広石、津田裕士（順天堂東京江東高齢者医療センター 内科）

全身性エリテマトーデス(SLE)患者に対する副腎皮質ステロイド剤投与による特発性大腿骨頭壊死症(ION)発生には、脂質代謝の変化、血液凝固亢進などが関与していると考えられている。副腎皮質ステロイド剤を大量投与するSLE症例において、抗高脂血症剤のION発生に対する予防効果を検討する。プレドニゾロン換算0.5mg/kg/日以上(ステロイドパルス療法を含む)に増量したSLE患者(現在7例)を抗高脂血症剤の投与および非投与群、またステロイドパルス療法施行の有無によりION発生の有無、脂質代謝異常の変化について評価した。抗高脂血症剤投与群は4例、非投与群3例であり、ステロイドパルス療法は3例で施行されている。現在、7例中1例においてIONの発生を認めている。発生例は抗高脂血症剤投与群のCNSループス患者でステロイドパルス療法を3クール受けており、副腎皮質ステロイド剤増量から約15ヶ月で発生を確認している。他の6例においてはION発生を認めていない。

1. 研究目的

SLE患者で副腎皮質ステロイド剤を維持量から中等量以上(プレドニゾロン換算で0.5mg/kg以上)に増量した症例において、特発性大腿骨頭壊死症(Idiopathic osteonecrosis of the femoral head; ION)の発生がみられるか、および高脂血症のコントロールによりIONの発生が予防できるか検討する。

2. 研究方法

①対象患者

プレドニゾロン換算で0.5mg/kg/day以上に増量(ステロイドパルス療法を含む)する20歳以上65歳以下のSLE患者

②除外患者

1. 妊娠を希望する女性患者
2. 重篤な肝障害、腎機能障害(Cr 2.0mg/dl以上)、心疾患を有する患者
3. 担当医が不適当と判断した患者

上記条件を満たすSLE患者において、副腎皮質ステロイド剤増量時にMRI検査を施行しIONが存在しないことを確認し、その後の高脂血症の推移、およびMRIにてIONの発生を観察する。

3. 研究結果

表1 <症例>

	年齢	性別	病態	PSL mg/dl	パルス 過去 今回	抗高脂血症剤
①	21	F	LN	6→60	2回・なし	リビトール10mg →メパロチン10mg
②	21	F	LN	10→50	なし・1回	リビトール 10mg
③	31	F	AIH	10→100	2回・3回	なし
④	43	F	LN	5→50	なし・なし	なし
⑤	32	F	LN	15→50	なし・なし	メパロチン 10mg
⑥	25	F	皮疹	12→30	なし・なし	なし
⑦	42	F	CNS	20→60	なし・3回	リビトール (16週後)
平均	30.7			11.1→57.1	2/7・3/7	

表1に現在までに登録された7症例の概要を示した。平均年齢は30.7歳、全て女性であった。ループス腎炎、自己免疫性肝炎、皮疹やCNSループスなどの病態に対して、それぞれ副腎皮質ステロイド剤を増量され、3例で今回ステロイドパルス療法を施行され、4例で抗高脂血症剤が投与されていた。表2にスタチン投与・非投与別に示したが、そのうち症例⑦において副腎皮質ステロイド剤増量15ヶ月後にION(左右TypeC-1)の発生がみられた。

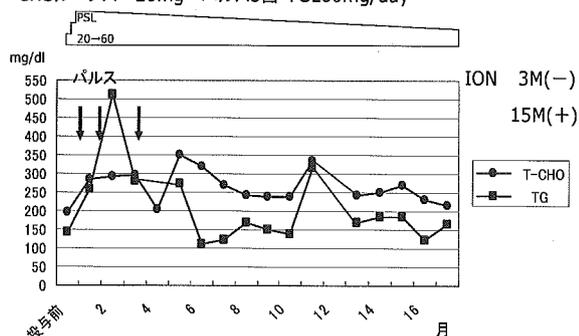
表2 (結果)

		PSL mg/day	パルス 今回	抗高脂血症剤	max TCHO	max TG	ION	観察期間 及び 発生時期
①	スタチン 投与群	60	なし	リピートル10mg →メバロチン10mg	307	273	-	15M
②		50	1回	リピートル10mg	292	218	-	6M
⑤		50	なし	メバロチン10mg	303	196	-	-
⑦	非投与 群	60	3回	リピートル10mg (16週後)	351	511	+	15M
③		100	3回	-	434	183	-	10M
④		50	なし	-	309	213	-	6M
⑥		30	なし	-	201	128	-	-

症例⑦は CNS ループスに対してステロイドパルス療法を3回施行しており、スタチン投与にもかかわらず著しい高脂血症を認めていた。表3に症例⑦の臨床経過を示す。

表3 (症例⑦の臨床経過)

- ・42歳 女性 スタチン投与群(16週後からリピートル10mg)
- ・CNSループス⇒20mg⇒パルス3回 PSL60mg/day



4. 考察

SLE 患者で副腎皮質ステロイド剤を維持量から中等量以上(プレドニゾロン換算で0.5mg/kg以上)に増量した7症例において、1例でIONの発生を認めた。初回治療後にIONを認めなかった症例でも、その後の副腎皮質ステロイド剤の中等量以上の投与により、IONが発生する可能性が示唆された。またスタチン投与下においても脂質のコントロールが不良である場合、ION発生リスクは軽減されない可能性が考えられる。

5. まとめ

SLE 患者において、副腎皮質ステロイド剤を維持

量から増量された症例で、IONへの進展について検討を行っている。

高脂血症をコントロールすることにより、IONの発生を予防することができるか評価していく。特にステロイドパルス療法については、IONの発生リスクも大きいと考えられており、高脂血症の推移を観察していく。

ステロイド誘発特発性大腿骨頭壊死症の発生素因についての検討

—家兎での種々の高脂血症治療薬予防投与とステロイド誘発骨壊死発生との相関—

高岡邦夫、岩切健太郎、金城養典、政田俊明、岩城啓好
(大阪市立大学大学院医学研究科 整形外科)

骨壊死発生と高脂血症、またステロイド代謝の主要酵素である CYP3A6 の活性との関与度を明らかにする為に、CYP3A6 を誘導しない非スタチン系高脂血症治療薬(プロブコール)、CYP3A6 を誘導しないスタチン系高脂血症治療薬(プラバスタチン)、または CYP3A6 誘導作用を有するスタチン系高脂血症治療薬(シンバスタチン)を家兎に予防投与した後、ステロイド剤を大量投与し、その後さらに各薬剤を継続投与し、骨壊死の発生頻度について検索した。その結果、高脂血症治療薬投与 3 群は Control 群に比し骨壊死頻度は低下した。また、CYP3A6 活性誘導作用の無いプラバスタチン群に比し、CYP3A6 誘導作用を有するシンバスタチン群では骨壊死頻度が低下した。これらの結果より、骨壊死の発生と高脂血症に関連性があること、また骨壊死発生とステロイド代謝酵素活性に更なる関連性があることが示唆された。この事実より、ヒトでのステロイド誘発性特発性大腿骨頭壊死症(以下 ION)の発生予防因子として高脂血症の改善及びステロイド代謝能亢進の可能性があることが示唆された。

1. 研究目的

ION に関する従来の研究結果から、ステロイド剤使用により ION が誘発されることは知られている。この ION 発生素因として、様々なメカニズムが推測されており、中でも、ステロイド剤による高脂血症と骨壊死との関連性が指摘されており、スタチン系薬剤(高脂血症治療薬)が骨壊死発生を予防するとの報告¹⁾も見られている。また、我々はこれまで、ウサギ骨壊死モデルを用いてステロイド剤代謝酵素である肝 CYP3A6 活性と骨壊死発生との負の相関について報告してきた。しかし高脂血症、CYP3A 活性それぞれの骨壊死発生への関与度については不明であり、本研究ではこの点について検索し、予防措置を開発することを目的とする。

2. 研究方法

日本白色家兎メス(体重 3.5-4kg)を用いてステロイド剤を投与して骨壊死モデルとした。²⁾このモデル動物を 1. Control 群(ステロイド剤単独投与群)、2. 非スタチン系で CYP3A6 に影響を及ぼさないとされている高脂血症治療薬(プロブコール)投与群、3. スタチン系で CYP3A6 に影響を及ぼさないとされている高脂

血症治療薬(プラバスタチン)投与群、4. スタチン系で CYP3A6 誘導作用を持つとされている高脂血症治療薬(シンバスタチン)の 4 群に分けた。

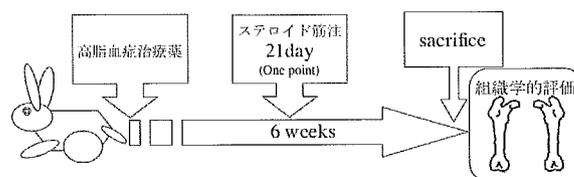


図 1. モデル作製

Control 群にはステロイド剤として Depo-Medrol 20mg/kg を右殿筋内に一回筋注投与した。その他、高脂血症治療薬投与 3 群には、それぞれの薬剤を 3 週間毎日、経口及び静注投与し、3 週目に Depo-Medrol 20mg/kg を右殿筋内に一回筋注投与し、さらにそれぞれの薬剤を 3 週間継続投与した。各群ともステロイド筋注投与後 3 週間経過後、犠牲死させ両大腿骨の H-E 標本を作製し、その病理組織学的観察を行い、骨壊死の発生頻度を評価した。組織評価法は山本らの骨壊死の定義に従い、骨壊死は骨髄の造血細胞壊死および脂肪細胞壊死を伴うもの、骨梁の骨細胞が empty lacunae または pycnotic nuclei of osteocyte を呈するものとした。

また、それぞれの群において、経時的に血液検査(薬剤投与開始後 0.7.14.21.24.28.31.35.42 日目)を行い脂質系因子(HDL, LDL, T-cho, Free Fatty Acid, TG)の測定を行い、高脂血症治療薬投与群 3 群での Control 群に対する脂質系因子の変動を比較した。

また、それぞれの高脂血症治療薬投与前と投与後 3 週目の肝臓 2g を液化窒素にて凍結保存し、ミクロソームを調整して、それぞれの肝臓組織で CYP3A6 活性を測定し³⁾、各薬剤投与前後の CYP3A6 の値を比較し、CYP3A6 の誘導の有無を確認した。

3. 研究結果

脂質系因子の推移:

TG, T-cho, LDL において、いずれもステロイド投与後 3 週目、すなわち 42 日目には control 群に比し、3 群共に有意差を持って低下していた。しかし、ステロイド投与後 1 週目前後ではプロブコール群では、他の 2 剤のプラバスタチン群やシンバスタチン群に比し低下が少ない傾向があった。

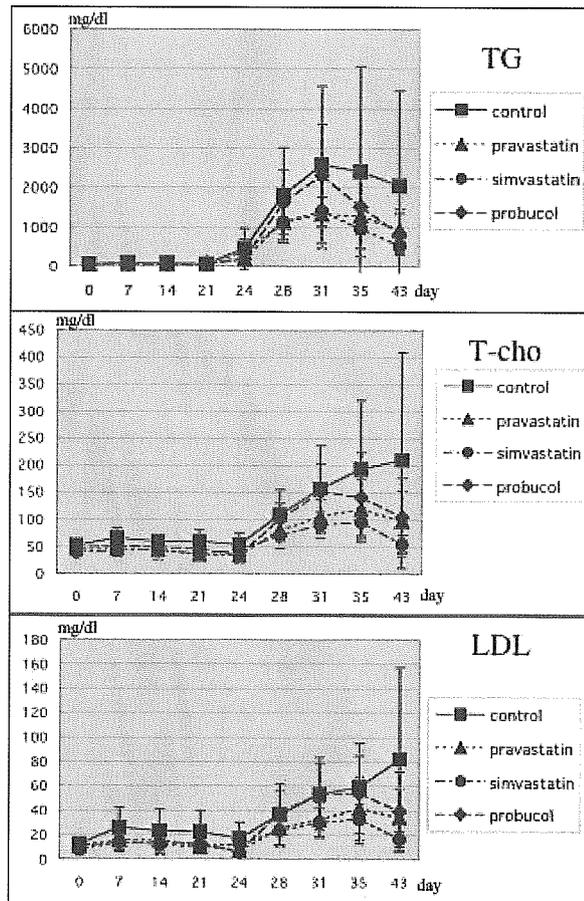


図 2. 脂質系因子の推移

CYP3A 酵素活性:

各薬剤投与前後の CYP3A6 酵素活性の比は、

CYP3A6 を誘導するシンバスタチン群でのみ 1.7 倍と有意に上昇していた。

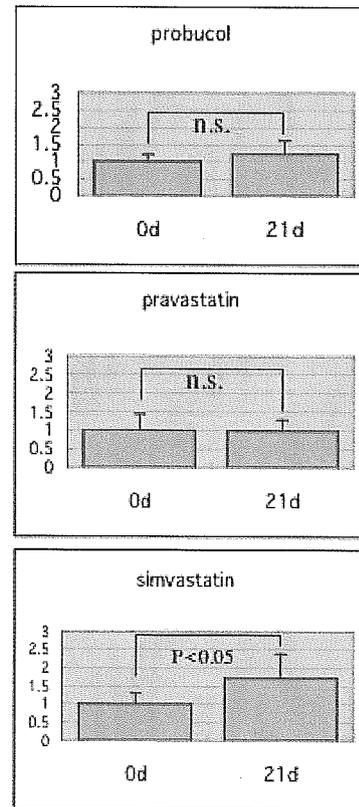


図 3. 高脂血症治療薬による CYP3A6 酵素活性の変化

骨壊死発生率:

Control 群は 90%(9/10)、プロブコール群 66%(4/6)、プラバスタチン群 27%(3/11)、シンバスタチン群 10%(1/10)であった。Control 群とプラバスタチン群との間、またシンバスタチン群との間で有意差(P < 0.05)を認めた。

	ION		計	壊死率
	(+)	(-)		
Control 群	9	1	10	90%
Probuco 投与群	4	2	6	67%
Pravastatin 投与群	3	8	11	27%
Simvastatin 投与群	1	9	10	10%

* < 0.05

表 1. 4 群での壊死発生頻度

4. 考察

ステロイド剤と ION との関連に関する研究は数多くあり、その因果関係が指摘されている。しかし未だ ION の発生機序については明らかではなく、一般的には骨の微小循環に阻血性壊死を起こすことが原因

とされている。しかし、ステロイド剤による微小骨循環に与える障害の発生機序については一定の見解は無く、ステロイド剤による高脂血症が引き起こす脂肪塞栓や血液凝固能亢進、骨髄内脂肪増生による骨髄内圧上昇による微小循環障害、血管内皮細胞障害や内皮依存性血管運動障害などが提唱されてきた。このようなステロイド剤の効果が過剰となることで骨壊死のリスクは高くなることは推察され、逆にこのステロイド剤による高脂血症を予防することで骨壊死発生が減少するとの報告もある。しかし、多量のステロイド投与をしたとしてもそれらの患者すべてにIONが発生するわけではないことも明らかとなっている。これは、ION発生素因にはステロイド剤に対する反応性にかなりの個体差があることが窺われる。従来からステロイド剤に対する反応性の個体差は、薬物代謝酵素、薬物受容体、薬物輸送蛋白などの活性の個人差の関与が考えられてきた。今回我々は、家兎において、高脂血症治療薬を予防的に投与することにより、ステロイド代謝酵素であるCYP3A6活性変動と脂質系因子の変動を調査し、骨壊死発生頻度へのそれぞれの関連性に着目した。

家兎における高脂血症治療薬投与により、脂質系因子であるLDL, TG, T-cho, Free Fatty Acidでは、ステロイド投与後3週目の値はcontrol群に比し有意に抑制されていること、またそれぞれの薬剤による抑制程度に有意差が無いことを確認した。

また、家兎において高脂血症治療薬投与とCYP3A6活性の定量的関係についての報告は少なかったため、実際にそれぞれの高脂血症治療薬投与前後のCYP3A6酵素活性を定量化し、シンバスタチンのみで酵素活性が誘導されていることを確認した。

高脂血症治療薬をステロイド投与前に予防投与することにより骨壊死発生頻度はControl群に比し、減少した。これはCYP3A活性に関わりなく高脂血症予防による効果と考察される。また、非スタチン系高脂血症治療薬のプロブコール投与群に比し、スタチン系高脂血症治療薬投与群で骨壊死発生頻度は減少した。これについては、CYP3A活性に関わりなくスタチンの特異的薬理作用が示唆された。さらに、CYP3A6を誘導しない高脂血症治療薬のプラバスタチン投与群に比し、CYP3A6を誘導する高脂血症治療薬のシンバスタチン投与群で骨壊死発生は減少する傾向があった。よって、CYP3A6活性誘導が壊死発生抑制に関与することも示唆された。

5. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

6. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

7. 参考文献

- 1) Qui Q, Wang GJ, Su CC, Balian G: Lovastatin prevents steroid induced adipogenesis and osteonecrosis. Clin Orthop 334: 8-19, 1997
- 2) Yamamoto T, Irisa T, Sugioka Y, Sueishi K: Effect of pulse methylprednisolone on bone and marrow tissue : corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. Arthritis Rheum. 40(11): 2055-64. 1997 Nov.
- 3) Veronese ME, McManus ME, Laupattarakasem P, Miners JO, Birkett DJ: Tolbutamide hydroxylation by human, rabbit and rat liver microsomes and by purified forms of cytochrome P-450. Drug Metabolism and disposition. 18(3): 356-61. 1990.

ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生と CBP 遺伝子多型の関連

中島滋郎、田村京子

(大阪大学大学院医学系研究科 小児科学)

平田哲朗、藤岡幹浩、久保俊一 (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)

福島若葉、廣田良夫

(大阪市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学)

我々は、グルコルチコイド受容体の転写共役因子の一つである CBP 遺伝子の G/A 多型とステロイド反応性の関連について検討を行った。健常者62名の検討では G/G 82.3%, A/G 17.7%であった。腎移植患者157名では、ステロイド性大腿骨頭壊死症発生群では G/G 67.6%, A/G 32.4%、非発生群では G/G 85.4%, A/G 14.6%で、有意の差を認められた(p=0.018)。ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生に CBP 遺伝子多型が関与している可能性が示唆された。

1. 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、その背景には何らかの遺伝的因子が存在していると考えられる。本サブグループでは、ステロイド誘発性的大腿骨頭壊死症の遺伝的素因と発生のメカニズムを解明する目的で、ステロイドホルモン作用発現に関与する遺伝子(群)と大腿骨頭壊死症そのものの発症に関与する遺伝子(群)について検討を進めている。遺伝的因子の検討としてはゲノム遺伝子を用いた SNP 解析を、また、その因子が実際に疾患に関与しているかの検討は mRNA レベルおよび蛋白レベルでの解析を行っている。このうち我々は、主にステロイドホルモン作用発現に関与する遺伝子(群)について解析している。

グル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と考えられる。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グルコルチコイド受容体(GR)遺伝子、CYP3A4 遺伝子、p-糖タンパクをコードする MDR-1 遺伝子および 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 遺伝子多型について解析してきた。

GR の重要な転写共役因子の一つとして CBP (cAMP-response element binding protein-binding protein)蛋白が知られている。CBP は 2,414 アミノ酸よりなる核内蛋白で、HAT(histone acetyltransferase)活

性を持つ。GR を始めとする核内受容体や p53、Myo-D などの転写因子および TBP や TFIIB などの基本転写因子と結合し、前者を介した遺伝子転写を制御する機能を有する。ヒトの遺伝子は 16p13.3 に存在し、ヒトにおける遺伝子変異は Rubinstein-Tybi 症候群を呈することが知られている。本年度はこの CBP 遺伝子多型と腎移植後患者における大腿骨頭壊死 (ION) の発生との関連について検討したので報告する。

2. 研究方法

(1) 日本人におけるの SNP データベース(東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターと科学事業振興事業団の共同プロジェクトである JSNP データベース)上に 23 個の CBP 遺伝子多型を認めた。そのうち、2 個が翻訳領域上にあり (JST103922, 008357)、そのうち1個(JST103922、図1)は日本人での多型の分布がほぼ判明している。そこで、CBP 遺伝子の JST103922 多型をふくむ部分に PCR プライマーを設定し、下記の腎移植後患者および健常日本人より得たゲノム DNA を用いて PCR 反応を行った。PCR 産物を精製の後、ダイレクトシーケン法により DNA 配列を検討した。

検討対象は京都府立医科大学における腎移植後患者 157 名(男性 112 名 女性 45 名)で、そのうち ION 発生群は 34 名(男性 23,女性 11 名)、ION 非発生群 123 名(男性 89,女性 34 名)であった。また同時

に健常日本人62名でも検討した。

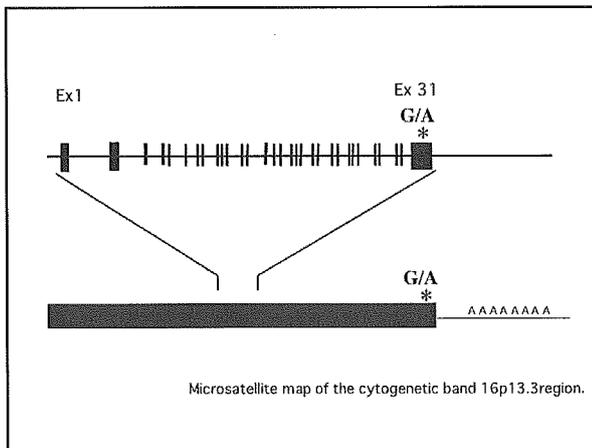


図1:CBP 遺伝子の構造と多型の部位

(2) 遺伝子多型(G/A)によりCBP 遺伝子 mRNA の転写量あるいは転写後の安定性に差がある可能性を検討する目的で、以下の実験を行った。

まず、A/AあるいはG/Aの多型を有する健常人より供与されたヘパリン加血よりFicoll液を用いてリンパ球を分離する。RNeasy Mini kitを用いて総RNAを抽出し、SuperScript IIIによりcDNAを合成する。CBP 遺伝子の多型部位(JST103922)を含むDNA領域をPCR法にて増幅後、制限酵素 *Nla*IV を加えて37度で一晩反応させる。反応物をNusieve 1%/GTG 0.75%ゲルで泳動分離し、写真をNIH imageで解析する。*Nla*IVにてAアレル由来のPCR産物は594bpのまま、Gアレル由来のPCR産物は391bpと203bpに切断されるので、各バンドの濃度を比較することで各々のcDNA量の差を推定できる。

3. 研究結果

(1) 健常者62名の検討ではG/G 82.3% A/G 17.7% A/A 0%であった。腎移植患者157名では、全体でG/G 81.5% A/G 18.5% A/A 0%で健常者とは差を認めなかった。このうちION発生群ではG/G 67.6% A/G 32.4% A/A 0%、非発生群ではG/G 85.4% A/G 14.6% A/A 0%で、有意差を認めた(p=0.018)。両群の年齢、性別およびステロイドホルモン投与量を加えた多変量解析でも同様の結果であった(p=0.036)。一方、G/G多型を呈する群でのION発生は18.0%、A/G多型群では37.9%であった。

(2) 現在のところ、A/GおよびG/G多型由来のmRNAの各々1名ずつについてのみ検討が行った(図2)。G/G多型由来のPCR産物は完全に切断されているのに対し、A/G由来のPCR産物の切断ではAアレル由来のバンド(594bp)がGアレル由来のバンド(391bp)より濃く、これは分子量で補正しても同様であった。

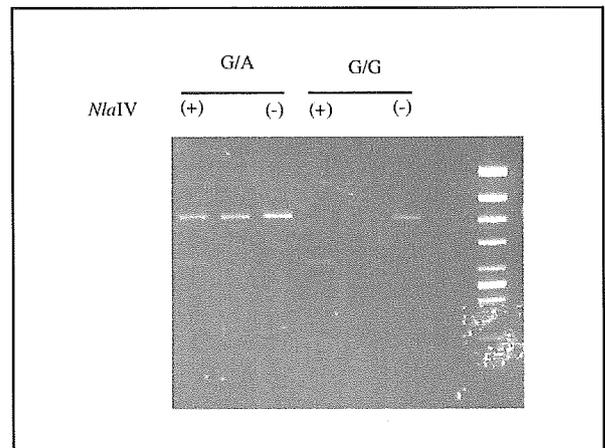


図2:制限酵素 *Nla*IVによる切断

4. 考察

ステロイドホルモンの作用発現には多くの因子が関与することが知られている。そのうち、CBPは直接GR蛋白に結合すること、遺伝子転写に重要なHAT活性を有することから、非常に重要な役割を果たしていると考えられる。従来ステロイドホルモン感受性の遺伝的因子としてGR遺伝子そのもの(1, 2)や11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2遺伝子(3)についての欧米の検討はあったが、CBP遺伝子を検討した研究はなされていなかった。今回我々は腎移植後患者におけるステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の発生とCBP遺伝子多型の関連について検討し、G/A多型を有する患者で大腿骨頭壊死症の発生が有意に多いことを見出した。この多型はCBP遺伝子の翻訳領域上にあるがアミノ酸置換は伴わないため、このメカニズムは現在不明である。ただし、多型部位が最も5'側にあるため、転写されたmRNAの安定性に影響している可能性が考えられるため、リンパ球でのCBP mRNA量を検討した。その結果、Aアレル由来のmRNAがGアレル由来のmRNAより多い、すなわち安定している可能性が示唆された。我々は既にCBP蛋白の強制発現により核内受容体を介した遺伝子転

写が進められることを報告している(4)。生理的なレベルでの CBP の量的変化がステロイドホルモン感受性にどのような影響を与えるかは不明であるが、CBP の機能や今回の検討結果から考えると重要な役割を演じている可能性が示唆された。

5. 結論

- (1) 腎移植患者 157 名と健常日本人 62 名において CBP 遺伝子多型を検討した。
- (2) ION 非発生群では G/G が 85.3%、G/A が 14.7% であったのに対して、ION 発生群では G/G が 67.6%、G/A が 32.4% であり有意の差を認めた。
- (3) CBP 遺伝子多型で G/A を有する患者では ION が発生しやすいと考えられ、現在そのメカニズムについて検討している。
- (4) 今後さらに、他の遺伝子についても検討を進める予定である。

6. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中島滋郎, 大藪恵一, 小児科領域におけるステロイド骨粗鬆症の現状と治療の実際. ステロイド骨粗鬆症のマネジメント, 医薬ジャーナル社 75-83, 2005
- 2) 里村憲一, 中島滋郎, その他, 小児期ステロイド感受性ネフローゼ症候群における発症・再発の季節性. 日本小児科学会雑誌, 109(5), 650-653, 2005
- 3) 中島滋郎, 田村京子, 骨代謝ゲノム解析—ステロイドホルモン感受性の遺伝—. 別冊 整形外科骨壊死 最新の診断と治療, 南江堂 No.48, 41-44, 2005
- 4) 堀内博志, 五明広樹, 中島滋郎, その他, 特発性大腿骨壊死症におけるグルココルチコイド受容体の遺伝子多型性解析. 別冊 整形外科骨壊死 最新の診断と治療, 南江堂 No.48, 51-53, 2005

2. 学会発表

- 1) Kubota K, Michigami T, Kokubu C, Suzuki A, Sakai N, Nakajima S, Imai K, Ozono K. Skeletal Defects in Ringelschwanz Mutant Mice Reveal that Lrp6 is Involved in Bone Resorption and Essential for Proper Bone Mass Acquisition. The

27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. September 23-27, 2005, Nashville, TN, USA

- 2) 中島滋郎 「幼児のビタミン D 欠乏性くる病」第 9 回京都シンポジウム (平成17年4月)京都
- 3) 窪田拓生, 道上敏美, 国府力, 鈴木朗, 中島滋郎, 大藪恵一 「Lrp6 変異マウス ringelschwanz の骨量低下における骨吸収亢進の関与」第 32 回 日本骨代謝学会 (平成17年7月)大阪
- 4) 窪田拓生, 難波範行, 小垣滋豊, 中島滋郎, 大藪恵一 「フロセミド投与中に副甲状腺機能亢進症を伴った骨量減少の 2 例」第 39 回 日本小児内分泌学会(平成17年10月)東京

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) Panarelli M. et al. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction and other metabolic intermediate phenotypes in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1846-1852, 1998
- 2) Huizenga NAT. et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 83:144-151, 1998
- 3) Smolenicka Z. et al. A new polymorphic restriction site in the human 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 gene. *J Clin Endocrine Metab* 83:1814-1817, 1998
- 4) Nakajima S. et al. Effect of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase A on ligand-dependent transactivation via the vitamin D receptor. *Mol Cell Endocrinol* 159:45-51, 2000

マウスにおける破骨細胞特異的遺伝子破壊系の確立

加藤茂明^{1,2}、高田伊知郎¹ (¹東京大学分子細胞生物学研究所、²科学技術振興機構 (ERATO))

大腿骨頭壊死は、骨破壊が伴うが、その過程において破骨細胞を介した骨吸収が伴うと予想される。従って、破骨細胞にて発現する各種因子の高次機能を評価することは極めて重要な課題である。そこで、Cre-loxP 系を用いた時期・部位特異的遺伝子破壊法を用いた。まず、成熟破骨細胞にのみ発現するカタレプシン K 遺伝子座に Cre 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスラインを樹立した。このマウスとテスターマウスや、floxed androgen receptor マウスを掛け合わせることで、破骨細胞特異的な遺伝子破壊が可能であることを確認した。

1. 研究目的

大腿骨頭壊死は骨破壊が伴うが、その過程において破骨細胞を介した骨吸収が伴うと予想される。従って、破骨細胞にて発現する各種骨代謝制御因子の高次機能を評価することは極めて重要な課題である。アンドロゲン・エストロゲン等の性ステロイドホルモンは、骨代謝制御因子の中でも特に主要なものである。これらのホルモンは、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の転写制御を介してその生理作用を発揮する。近年種々の核内受容体 KO マウスが作出され、その骨組織における重要性が認識されつつある一方で、細胞種ごとの特異的機能については未解明な部分が多い。そこで我々は骨細胞種特異的遺伝子破壊システムを用い、細胞種特異的な核内受容体高次機能について解析を行う。

2. 研究方法

我々は全身性アンドロゲン受容体(AR)遺伝子破壊マウスの解析を通じて、AR が雄性骨組織において骨量増加作用を持つ事を見出した。しかしながら AR による骨量増加作用が、骨形成細胞である骨芽細胞と骨吸収細胞である破骨細胞の一体どちらを介しているのかが不明であった。そこで破骨細胞特異的 ARKO マウスの作製を行う事で、破骨細胞内での AR 高次機能について解析を行った。具体的には破骨細胞特異的発現遺伝子である Cathepsin K 遺伝子座に Cre リコンビナーゼを挿入することで、破骨細胞特異的 Cre 発現マウスの作製を試みた。続いて、既に樹立済みの AR flox マウス

と交配を行う事で破骨細胞特異的 ARKO マウスを作製し、骨組織の解析を行った。

3. 研究結果

ジーンターゲティング法を用いて Cathepsin K-Cre マウスを作製した。次に、CAG-CAT-Z テスターマウスを用いた解析により、本マウスを用いた破骨細胞特異的遺伝子欠損システムが機能している事を確認した。続いて、破骨細胞特異的 ARKO マウスを作出し、骨組織の解析を行ったところ、破骨細胞数の増加と、それに伴う骨吸収の亢進によって、大幅な骨量低下が起きている事が解った。

4. 考察

先ず、破骨細胞特異的遺伝子破壊システムの構築に成功した。これまで多くの骨吸収制御因子が報告されているが、生体レベルにおいてそれら因子が破骨細胞に対してどのように機能しているのがを証明する手段が存在しなかった。Cahtpsin K-Cre マウスを用いた、破骨細胞特異的遺伝子破壊が可能となった事で、今後、これら因子の詳細な作用メカニズムの解析が可能となった。また、現在まで、破骨細胞での明確な AR 発現報告がないにも関わらず、破骨細胞特異的 ARKO マウスを作製したところ、骨量の減少が観察された。この結果は破骨細胞内 AR が破骨細胞機能を直接制御している事を示している。以上の結果から、これまでアンドロゲンの骨組織に対する同化作用は骨芽細胞を介した骨形成促進作用によるものと考えられてきたが、破骨細胞

内 AR を介した骨吸収抑制経路が存在する事が新たに判明した。

5. 結論

骨細胞腫特異的遺伝子破壊システムとして、破骨細胞特異的なアンドロゲン受容体 KO マウスの作出に成功し、破骨細胞における AR の機能を新たに見出す事が出来た。今後 GR も含めた骨細胞における大腿骨頭壊死関連因子の機能を解析出来ると考えられる。

6. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 中村 貴、中道裕子、東 由明、福田 亨、落合鋭士、加藤茂明: アンドロゲンの骨増強作用は破骨細胞内 AR を介して発揮される、第 23 回日本骨代謝学会、大阪、2005.7.22.
- 2) T. Nakamura, T. Watanabe, Y. Nakamichi, Y. Azuma, K. Yoshimura, T. Matsumoto, T. Fukuda, E. Ochiai, D. Metzger, P. Chambon, T. Sato, S. Kato: Genetic evidence of androgen receptor function in osteoclasts, ASBMR 27th Annual Meeting, ナッシユビル(USA), 2005.9.23.

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

8. 参考文献

- 1) 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.
- 2) 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.

- 3) 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.

特発性大腿骨頭壊死症の発生と肝 CYP3A 活性の相関に関する研究

高岡邦夫、金城養典、岩切健太郎、岩城啓好 (大阪市立大学大学院医学研究科 整形外科学)
小田 裕 (大阪市立大学大学院医学研究科 麻酔・集中治療医学)
廣田良夫、近藤享子 (大阪市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学)

ステロイド剤は肝薬物代謝酵素である CYP3A により不活化され、代謝されなかった部分が標的細胞に至り薬理作用する。この酵素活性は個体差が大きいことが知られており、その活性低下はステロイド剤の過度の薬理効果をもたらし、ステロイド性大腿骨頭壊死症(ION)発生の素因となっている可能性がある。そこで我々は、ステロイド性 ION 患者 24 例、アルコール性 ION 患者 28 例、健常人 72 例を対象として、CYP3A 活性を測定し、解析を行った。その結果、ステロイド性 ION 患者の肝 CYP3A 活性は健常人の CYP3A 活性の分布の中で低値域に集積していた。また、肝 CYP3A 活性低値はステロイド性 ION 発生のリスクを約 10.1 倍高め、attributable fraction は 90%であった。midazolam 投与後 60 分の 1'-OH midazolam/midazolam ratio は CYP3A 活性と良い相関を示し($R=0.72$, $p<0.0001$)、簡便なリスク予知検査の可能性が示された。これらの結果より、ステロイド性 ION 患者は肝 CYP3A 活性低値のために、ステロイド剤の薬理効果が過剰になり、中毒効果としてステロイド性 ION を発生したと考察した。これらのハイリスク患者を同定するために、低侵襲的な 1 回採血による single point 1'-OH midazolam/midazolam ratio は有用であると考えられる。

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、その罹患によって股関節が破壊され起立歩行障害により QOL が著しく侵される疾患である。病理組織学的には大腿骨頭の無反応性壊死像を特徴とし、従来から骨微小循環障害による阻血性壊死とされてきた。しかし、いまだに正確な病態が不明である。

これまでの多くの疫学的研究によって、ステロイド剤使用やアルコール愛飲が ION 発生に関わっていることが明らかにされている(1,2)。最近の報告の結果によれば、ION 患者の約半数にステロイド使用歴があり、特に女性患者の約 70%にステロイド剤投与歴があるとされている。このような事情を考慮すれば、ステロイド剤に関連した ION の発生機序の解明は、ION 発生を予防する観点からも最も重要な課題であろう。

一方臨床的観察結果によれば、高容量のステロイド剤を投与された患者の全てにステロイド誘発 ION が発生するわけではないことが明らかであり(15-45%)、ステロイド剤に対する感受性、または骨壊死発生傾向に個体差(素因)が存在していることが伺われる(3-5)。

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 CYP3A 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(6,7)。

CYP3A は Cytochrome P450 family 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 の発現量は 50 倍以上、その生体内機能は 5-20 倍の個体差があるとされ、薬物反応性の個体差を説明する酵素の一つとされている(8,9)。

これらの事実より、我々は、この CYP3A 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 を発生したと仮説し、検索を行った。

また、ステロイド剤によって誘発される ION 発生の予防を考慮するとき、ION 発生のリスクが高い患者のスクリーニングが重要な問題となる。我々は、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 24 例、アルコール性 ION 患者 28 例、整形外科入院手術を受けた健常人 72 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(10,11)。高度の肝・腎機能障害、CYP3A 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)

CYP3A 活性定量は midazolam clearance を計測することにより定量した(12)。

整形外科手術麻酔導入を midazolam 0.25 mg/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(15000rpm×2分)し、上清液を-80℃にて保存。後日、その上清液から血中 midazolam 濃度、および 1'-OH 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)を測定し、midazolam clearance 値 (CL=Dose/AUC) を算出し、CYP3A 活性とした。

低侵襲なスクリーニングテストとして single point 1-OH' MDZ/MDZ ratio を候補とした。

5,10,15,20,30,45,60,90,120,180,240,360 分の 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、CYP3A 活性との相関性について検索を行った。

(統計学的解析)

CYP3A 活性と ION 発生との関連を unconditional logistic regression model 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(SAS software)。

(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 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 control 群間では、アルコール性 ION 群に有意に男性が多く

(** $p < 0.01$ in Wilcoxon's rank sum test (vs. controls))、また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 の histogram を figure. 1-a に示す。健常人の CYP3A の分布のなかで、ステロイド性 ION 群は CYP3A 活性が低い部分に分布していた。

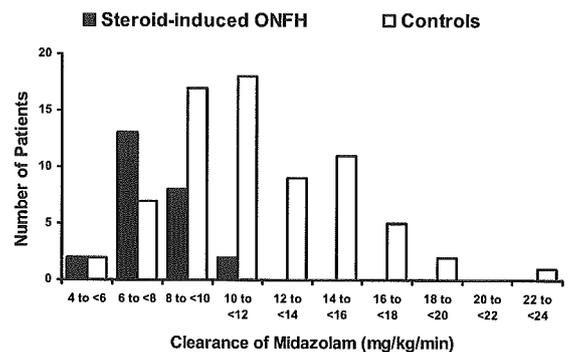


fig. 1-a

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、アルコール性 ION 群は、健常人の CYP3A の分布のなかで CYP3A 活性に特別な傾向を認めなかった。

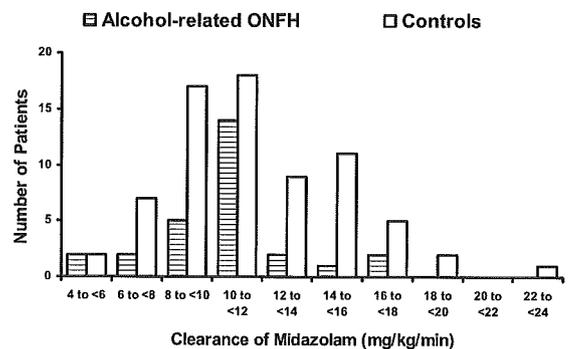


fig. 1-b

平均値で比較すると(fig.2)、ステロイド性 ION 群は normal control と比較して統計学的有意に CYP3A 活性が低く($p < 0.001$)、一方アルコール性 ION 群は normal control 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 CYP3A 活性が低かった($p < 0.05$)。

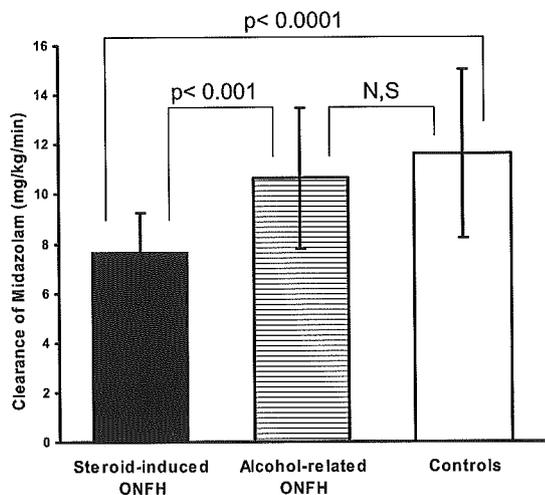


fig. 2

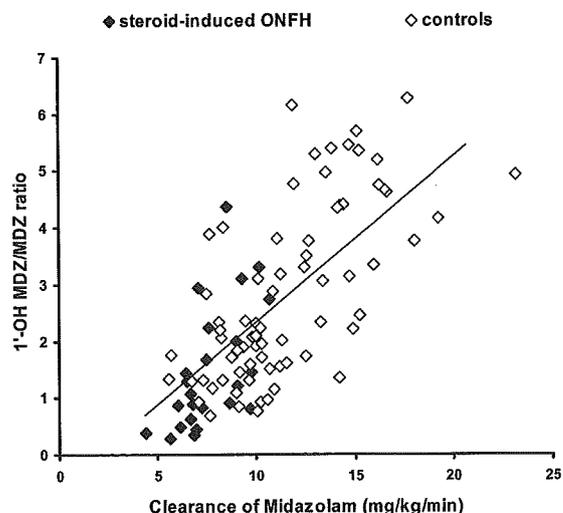


fig. 3

次に、CYP3A 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 の下位 4 分位である 9.1 mg/kg/min 以下を肝 CYP3A 活性低値とした。単変量解析では CYP3A 活性のみがステロイド性 ION 発生のリスクを高めており (Crude OR 11.4 [95 % CI 3.72-34.9], $p < 0.0001$)、性・年齢・肝機能・腎機能はステロイド性 ION 発生に関与してはなかった。性・年齢・肝機能・腎機能の影響を調整下結果、最終的に CYP3A 活性低値はステロイド性 ION 発生のリスクを 10.1 倍上昇させていた (adjusted OR 10.1 [95 % CI 3.21-32.0], $p < 0.0001$)。また、Attributable fraction を算出すると 90% であり、肝 CYP3A4 活性低値はステロイド性 ION の主要な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 分それぞれの 1-OH' MDZ/MDZ ratio を算出し、肝 CYP3A 活性との相関性について検索を行った。その結果、midazolam 投与後 60 分時の single point 1-OH' MDZ/MDZ ratio は midazolam clearance 値 (CYP3A 活性) と強い相関を示し ($R=0.72$, $p < 0.0001$) 肝 CYP3A 活性をよく反映するスクリーニング法であった (fig. 3)。

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 CYP3A 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 CYP3A 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 CYP3A 活性低値はステロイド性 ION 発生のリスクを 10.1 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、CYP3A 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 CYP3A 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 CYP3A 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。

これらの結果より、ステロイド性 ION 患者は肝 CYP3A 活性が低い為に (Poor metabolizer)、体内にステロイド剤が長時間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 CYP3A 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 CYP3A 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、肝 CYP3A 活性とよい相関性を示した。よって、実際のスクリーニング検査としては midazolam 経口投与後 60 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

(13)。

このような方法でステロイド剤投与前に肝 CYP3A 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。

Table 1
Comparison of selected characteristics.

Characteristics	steroid-induced ONFH (n=24)	alcohol-related ONFH (n=28)	controls (n=72)
Sex; male-no. (%)	14 (58)	21 (75) **	30 (42)
Age (yr)	45 ± 14	45 ± 13	44 ± 15
AST † (IU/l)-no. (%)			
≤ 40	21 (88)	23 (82)	66 (92)
40 +	3 (12)	5 (18)	6 (8)
ALT † (IU/l)-no. (%)			
≤ 45 a)	22 (92)	20 (71)	66 (92)
45 +	2 (8)	8 (29) *	6 (8)
BUN † (mg/dl)-no. (%)			
≤ 18	19 (79)	27 (96)	67 (93)
18 +	5 (20)	1 (4)	5 (7)
Cre † (mg/dl)-no. (%)			
≤ 1.2	24 (100)	28 (100)	72 (100)
1.2 +	0 (0)	0 (0)	0 (0)

The continuous variables expressed as mean ± SD.

† normal range.

* p < 0.05 compared to controls. ** p < 0.01 compared to controls.

Table 2
Crude and multivariate odds ratios for steroid-induced ONFH.

Characteristics	Distribution of subjects (%)		Crude		Multivariate *	
	Steroid-induced ONFH	Controls	OR (95% CI)	p value	OR (95% CI)	p value
MDZ CL † (mg/kg/min)						
9.1 +	5 (21)	54 (75)	1		1	
≤ 9.1	19 (79)	18 (25)	11.4 (3.72-34.9)	<0.0001	10.1 (3.21-32.0)	<0.0001
SEX						
Male	14 (58)	30 (42)	1		1	
Female	10 (42)	42 (58)	0.51 (0.20-1.30)	0.159	0.63 (0.20-1.97)	0.428
AGE (yrs)						
per one year	24	72	1.00 (0.97-1.03)	0.980	1.00 (0.96-1.04)	0.855
AST ‡ (IU/l)						
≤ 40	21 (88)	66 (92)	1		1	
40 +	3 (12)	6 (8)	1.57 (0.36-6.83)	0.547	1.76 (0.29-10.8)	0.540
ALT ‡ (IU/l)						
≤ 45	22 (92)	66 (92)	1		1	
45 +	2 (8)	6 (8)	1.00 (0.18-5.32)	1.000	0.55 (0.07-4.13)	0.565
BUN ‡ (mg/dl)						
≤ 18	19 (79)	67 (93)	1		1	
18 +	5 (21)	5 (7)	3.53 (0.92-13.5)	0.065	1.92 (0.39-9.52)	0.420
Cre ‡ (mg/dl)						
≤ 1.2	24	72				
1.2 +	0	0				

Cut-off point; † lowest quartile in the controls, ‡ normal range.

* The model includes MDZ CL, sex, age, AST, ALT, and BUN.

5. 結論

1. ステロイド性 ION 患者は肝 CYP3A 活性が低く、肝 CYP3A 活性低値はステロイド性 ION 発生のリスクを 10.1 倍高めていた。この結果より、ステロイド性 ION は肝 CYP3A 活性低値がその主要な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 CYP3A 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(テーラーメイド化)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. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 金城養典、小田裕、近藤享子、廣田良夫、岩切健太朗、高岡邦夫: 肝薬物代謝酵素(CYP3A4)活性低下はステロイド性大腿骨頭壊死症発生の原因である。第 23 回 日本骨代謝学会 2005.7.19
 - 2) Yasunori Kaneshiro, Yutaka Oda, Kentaro Iwakiri, Toshiaki Masada, Hiroyoshi Iwaki, Yoshio Hirota, Kunio Takaoka: Low functional level of a hepatic cytochrome P450 (CYP3A4) is a potential major risk factor for corticosteroid-induced Osteonecrosis of the femoral head (ONFH), ARCO 2005 13th International Symposium on Bone Circulation combined with Workshop of the ISFR, 15 - 17 September 2005

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Y Hirota, T Hirohata, K Fukuda, M Mori, H

Yanagawa, Y Ohno, Y Sugioka: Association of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status with the risk of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Am J Epidemiol* 137 (1993) 530-8.

- 2) Y Hirota, T Hotokebuchi, Y Sugioka: Idiopathic Osteonecrosis of the femoral head : Nationwide Epidemiologic Studies in Japan. *Osteonecrosis-Etiology, Diagnosis, and treatment* (1997) 51-58.
- 3) K Nagasawa, Y Tada, S Koarada, T Horiuchi, H Tsukamoto, K Murai, A Ueda, S Yoshizawa, A Ohta: Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus: prospective study by MRI. *Lupus* 14 (2005) 385-90.
- 4) K Oinuma, Y Harada, Y Nawata, K Takabayashi, I Abe, K Kamikawa, H Moriya: Osteonecrosis in patients with systemic lupus erythematosus develops very early after starting high dose corticosteroid treatment. *Ann Rheum Dis* 60 (2001) 1145-8.
- 5) K Ono, T Tohjima, T Komazawa: Risk factors of avascular necrosis of the femoral head in patients with systemic lupus erythematosus under high-dose corticosteroid therapy. *Clin Orthop* (1992) 89-97.
- 6) SM Abel, JL Maggs, DJ Back, BK Park: Cortisol metabolism by human liver in vitro—I. Metabolite identification and inter-individual variability. *J Steroid Biochem Mol Biol* 43 (1992) 713-9.
- 7) DJ Waxman, C Attisano, FP Guengerich, DP Lapenson: Human liver microsomal steroid metabolism: identification of the major microsomal steroid hormone 6 beta-hydroxylase cytochrome P-450 enzyme. *Arch Biochem Biophys* 263 (1988) 424-36.
- 8) GR Wilkinson: Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med* 352 (2005) 2211-21.
- 9) M Eichelbaum, O Burk: CYP3A genetics in drug metabolism. *Nat Med* 7 (2001) 285-7.
- 10) N Sugano, T Kubo, K Takaoka, K Ohzono, T

- Hotokebuchi, T Matsumoto, H Igarashi, S
Ninomiya: Diagnostic criteria for non-traumatic
osteonecrosis of the femoral head. A multicentre
study. *J Bone Joint Surg Br* 81 (1999) 590-5.
- 11) N Sugano, T Atsumi, K Ohzono, T Kubo, T
Hotokebuchi, K Takaoka: The 2001 revised
criteria for diagnosis, classification, and staging
of idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *J
Orthop Sci* 7 (2002) 601-5.
- 12) KE Thummel, DD Shen, TD Podoll, KL Kunze,
WF Trager, PS Hartwell, VA Raisys, CL Marsh,
JP McVicar, DM Barr, 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* 271 (1994)
549-56.
- 13) KE Thummel, DD Shen, TD Podoll, KL Kunze,
WF Trager, CE Bacchi, CL Marsh, JP McVicar,
DM Barr, JD Perkins, 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* 271
(1994) 557-66.

ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子多型解析

—リポ蛋白質を対象にして—

平田哲朗、藤岡幹浩、高橋謙治、新井祐志、浅野武志、石田雅史、久保俊一

(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)

秋岡清一、岡本雅彦、吉村了勇

(京都府立医科大学大学院医学研究科 移植・再生制御外科学)

福島若葉、田中 隆、廣田良夫 (大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学)

特発性大腿骨頭壊死症 (ION) は大腿骨頭が阻血性壊死に陥り、股関節機能が失われる難治性疾患である。病態についてはいまだ明らかではないが、凝固・線溶系、脂質代謝の異常の関与が報告されている。われわれは、脂質代謝に深い関わりを持つリポ蛋白質と、ION発生について検討した。腎移植後の症例を対象に、冠動脈疾患との関連が多く報告されているApolipoproteinB (ApoB)、ApolipoproteinA1 (ApoA1)をコードする遺伝子のsingle nucleotide polymorphism (SNP)を解析し、また、血中のlow density lipoprotein (LDL)、high density lipoprotein (HDL)、triglyceride (TG)、total cholesterol (TC)の濃度を測定した。そして、SNPや血中濃度とION発生の関連性、SNPと血中濃度の関連性を調査した。ApoB遺伝子のC7623TでION発生との間に強い関連を認め、T alleleを含む症例でION発生のriskが上昇することが判明した (adjusted odds ratio=6.37, p=0.011)。ステロイド投与前にC7623Tを解析することは、ION発生の予測に有用である。

1. 研究目的

臨床で使用されるステロイド剤は、高い抗炎症効果と免疫抑制作用を有するため、さまざまな疾患に対して頻用される薬剤である。しかし、その反面、多くの合併症も存在する。骨・関節関係の合併症で大きな問題となるのが、特発性大腿骨頭壊死症 (Idiopathic osteonecrosis of the femoral head: ION) である。IONの好発年齢は、基礎疾患を反映して青壮年期である。壊死部が圧潰を起こすと疼痛を生じ、壊死範囲が大きいと骨頭温存が困難になる。

当科では、前回までにIONとステロイドの輸送蛋白質であるP-glycoproteinのABCB1遺伝子多型や、脂質粒子Lipoprotein (a)の分子量とION発生との関連性を報告してきた。今回は脂質代謝と関連の深いリポ蛋白質について調査した。

リポタンパク質にはVLDL、LDL、HDLなどがあり、粒子の周囲にApolipoprotein B (ApoB)やApolipoprotein A1 (ApoA1)などのタンパク質がある。中心には

triglyceride (TG) やtotal cholesterol (TC)などの脂質を蓄え、生体内で脂質の輸送を担っている。脂質代謝の上で、low density lipoprotein (LDL)は肝臓から末梢へ脂質を運ぶ。主な構成要素はApoBである。また、high density lipoprotein (HDL)は末梢から肝臓へ脂質を運び、その主な構成蛋白はApoA1である。そして、血中のLDL、ApoB濃度の上昇やHDL、ApoA1濃度の低下と冠動脈疾患との関連が多く報告されている¹⁾²⁾。

ApoB蛋白をコードするApoB geneの主なsingle nucleotide polymorphism (SNP)には、代表的なものとしてC7623TとG12619Aがあり、冠動脈疾患³⁾⁴⁾⁵⁾や血中LDL、ApoB⁶⁾⁷⁾⁸⁾との関連が多く報告されている。ApoA1蛋白をコードするApo A1 geneの主なSNPには、代表的なものとしてG-75AとC83Tがあり、これらも冠動脈疾患¹⁾や血中HDL、ApoA1濃度^{2), 9)–12)}との関連が多く報告されている。

今回の研究では、ステロイド性IONの危険予測因子を明らかにして予防に役立てていくことを目的として、

冠動脈疾患と関連性を認め脂質血中濃度に影響を与えているとされている4つのSNPsとリポ蛋白質の血中濃度を腎移植後IONの発生群(症例)と非発生群(対照)間で比較検討した。

2. 研究方法

対象は、当院移植内分泌外科の腎移植症例で、ION発生群 34 例および非発生群 123 例であった。男性が 112 例、女性が 45 例で、移植時年齢は 9~64 歳(平均 37 歳)であった。

まず、ApoB と ApoA1 の SNP を解析した。ApoB の C7623T と ApoA の G-75A、C83T は、PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法を用いて解析し、制限酵素に C7623T は XbaI を、G-75A、C83T は MspI を用いた。ApoB の G12619A は、TaqManPCR 法を用いて解析した。Primer には 5'GATAACGTGT TTGATGGCTTGGTA-3' (f) と 5'-TCAATGAGTGAGT CAATCAGATGCTT-3' (r) を用いた。Probe の配列は TTACTCAAAAATTCC と TTACTCAAGAATTCC とし、蛍光色素には VIC と FAM を用いた。そして、Logistic regression model を用いて ION 発生との関連性を調査した。

また、リポ蛋白質や脂質の血中濃度を測定した。採血時期は、腎移植後1年以上経過した定常状態での早期採血から、ApoB、ApoA、LDL、HDL、TG、TC を測定した。この後 ApoB/A1 比や LDL/HDL 比も計算し、ION 発生との関連性を検討した。

また、SNP と脂質血中濃度との関連性についても調査した。

3. 研究結果

まず、Allele の出現頻度を確認した(図1)。各SNPで、以前の報告とほぼ同じ出現頻度であり、今回の腎移植

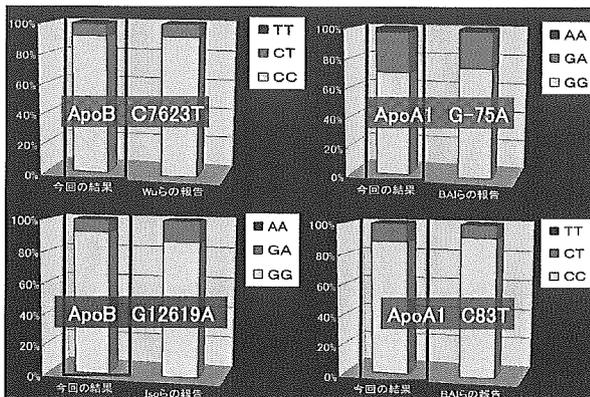


図1 Allele 出現頻度

それぞれ赤棒は今回の結果を示す。右側は以前の日本人での報告の出現頻度を示す。

症例は一般的な日本人のAllele頻度を示していると言える。

次に genotype と ION 発生との間の関連において、ApoB 遺伝子の C7623T で Allele T を有する genotype では genotype CC に比べて OR 6.37 と有意な上昇を認めた(表1)。つまり、T を有する症例で ION が発生する risk が有意に高いことが判明した。ApoB の G12619A や ApoA の G-75A、C83T では有意な関連を認めなかった(表1)。

ApoB	壊死あり	壊死なし	#Adjusted OR (95%CI)	P値
C7623T	CC	27	1	0.011
	CT TT	6	7	6.37(1.53-26.52)
G12619A	GG	33	1	0.602
	GA AA	1	11	0.55(0.06-5.11)
ApoA1	壊死あり	壊死なし	#Adjusted OR (95%CI)	P値
G-75A	GG	22	1	0.459
	GA AA	11	34	1.41(0.57-3.50)
C83T	CC	29	1	0.615
	CT TT	4	14	1.39(0.38-5.05)

表1 SNPs と ION 発生との関連性

This model includes Sex, Age, kidney, Acute rejection, Immunosuppressant, and Steroid Administration

次に、ION発生との間に有意差を見出したApoBの C7623Tの genotype と血中濃度との関連を示す(図2)。すべての血中濃度で有意差を認めなかった。

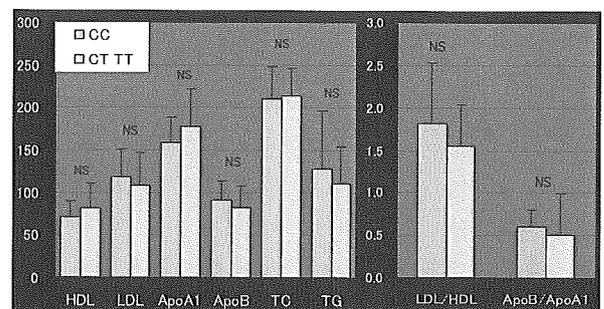


図2 ApoB の C7623T の genotype と血中濃度との関連

図3に血中濃度とION発生との関連の解析の結果を示す。ApoBやApo A1単独では有意差を認めなかったが、ApoB/A1比で有意差を認めた。

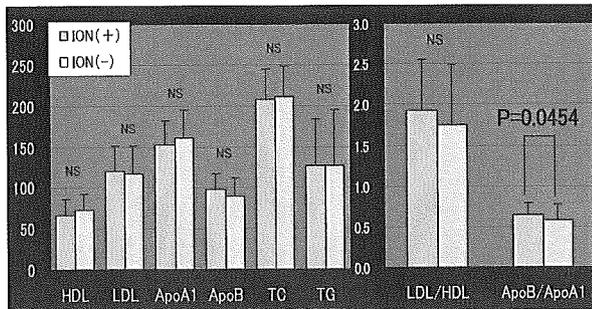


図3 ION 発生と血中濃度との関連

4. 考察

今回、有意差の確認できたC7623Tに関して、Demantらはgenotype TTでLDL receptorの活動性が低下し、LDLの代謝が低下することで、LDLが血中から排除されにくくなると報告した¹³⁾。また、Packardらは、LDL receptorの活動性とLDL血中濃度は、逆相関の関係にあると報告した¹⁴⁾。よって、CT TT genotypeの今回の腎移植症例ではLDLの代謝の低下によるLDLやApoBの血中濃度の上昇がION発生の一つの要因になった可能性がある。

ApoB geneのC7623T多型はION発生との間に、OR 6.31と有意な上昇を認め、ION発生予測に有用であると考える。今回の症例で、C7623T多型とLDLやApoB血中濃度との関連を見い出すことができなかったが、LDLreceptorの活動性を調査すれば、ION発生との間に関連性を見いだせる可能性がある。

また、ION発生と脂質代謝の関連についてはmiyanishiらはnon-traumatic ONの発生とApoB/A1比の関連性について報告している¹⁵⁾。今回の結果から腎移植後症例においてもApoB/A1比はION発生と関連性があることが判明した。

5. 結論

- ・ApoB遺伝子のC7623TのT alleleはION発生に有意な影響を与えていることが判明した。IONの発生予測に有用と考える。
- ・血中濃度のApoB/A1比は、腎移植後IONとの間に有意な関連性を認めた。

6. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

8. 参考文献

- 1) Sharp DS, Burchfiel CM, Rodriguez BL, Sharrett AR, Sorlie PD, Marcovina SM. Apolipoprotein A-1 predicts coronary heart disease only at low concentrations of high-density lipoprotein cholesterol: an epidemiological study of Japanese-Americans. *Int J Clin Lab Res* 2000;30:39-48.
- 2) Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Laakso M. MspI polymorphism at +83 bp in intron 1 of the human apolipoprotein A1 gene is associated with elevated levels of HDL cholesterol and apolipoprotein A1 in nondiabetic subjects but not in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *Diabetes Care* 2000;23:791-5.
- 3) Scartezini M, Zago MA, Chautard-Freire-Maia EA, Pazin-Filho A, Marin-Neto JA, Hotta JK, Nascimento AJ, Dos-Santos JE. The X-X-/E+E+ genotype of the XbaI/EcoRI polymorphisms of the apolipoprotein B gene as a marker of coronary artery disease in a Brazilian sample. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:369-75.
- 4) de Padua Mansur A, Annicchino-Bizzacchi J, Favarato D, Avakian SD, Machado Cesar LA, Franchini Ramires JA. Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein B polymorphisms in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2000;85:1089-93.
- 5) Hansen PS, Klausen IC, Lemming L, Gerdes LU, Gregersen N, Faergeman O. Apolipoprotein B gene polymorphisms in ischemic heart disease and hypercholesterolemia: effects of age and sex. *Clin*

- Genet 1994;45:78–83.
- 6) Rios DL, Vargas AF, Torres MR, Zago AJ, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. *Clin Genet* 2003;63:380–5.
 - 7) Verduci E, Agostoni C, Biondi ML, Radaelli G, Giovannini M, Riva E. Apolipoprotein B gene polymorphism and plasma lipid levels in phenylketonuric children. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;71:117–20.
 - 8) Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1098–111.
 - 9) Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, Goto Y, Nonogi H, Iwai N. An association analysis between ApoA1 polymorphisms and the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level and myocardial infarction (MI) in Japanese. *J Hum Genet Epub* 2004 Jul 17. 2004;49:433–9.
 - 10) Tashiro J, Morisaki N, Kobayashi J, Bujo H, Kanzaki T, Murano S, Saito Y. Significance of a polymorphism (G→A transition) in the -75 position of the apolipoprotein A-I gene promoter on serum high density lipoprotein-cholesterol levels in Japanese hyperlipidemic subjects. *J Atheroscler Thromb* 2001;8:95–100.
 - 11) Larson IA, Ordovas JM, Barnard JR, Hoffmann MM, Feussner G, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. Effects of apolipoprotein A-I genetic variations on plasma apolipoprotein, serum lipoprotein and glucose levels. *Clin Genet* 2002;61:176–84.
 - 12) Kuusi T, Kesaniemi YA, Vuoristo M, Miettinen TA, Koskenvuo M. Inheritance of high density lipoprotein and lipoprotein lipase and hepatic lipase activity. *Arteriosclerosis* 1987;7:421–5.
 - 13) Demant T, Houlston RS, Caslake MJ, Series JJ, Shepherd J, Packard CJ, Humphries SE. Catabolic rate of low density lipoprotein is influenced by variation in the apolipoprotein B gene. *J Clin Invest* 1988;82:797–802.
 - 14) Packard CJ, Shepherd J, Joerns S, Gotto AM, Taunton OD. Apolipoprotein B metabolism in normal, type IV and type V hyperlipoproteinemic subjects. *Metabolism* 1980;29:213–22.
 - 15) Miyanishi K, Yamamoto T, Nakashima Y, Shuto T, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. Subchondral changes in transient osteoporosis of the hip. *Skeletal Radiol* 2001;30:255–61.