

showing the expression of eNOS protein in cerebral microvessels in mouse (Ishii *et al.* 2002), rat (McNeill *et al.* 1999; Yamakawa *et al.* 2003) and pig (Gobeil *et al.* 2002). We have also observed that though the expression level is significantly lower than in BAECs, eNOS protein is certainly expressed in BBECs (Fig. 5). However, no previous studies have directly shown the production of NO in cerebral microvessels. Because the amount of NO generated by eNOS is relatively smaller than that produced by inducible NOS (Stoclet *et al.* 1999), very few methods have been introduced to measure NO production in cultured endothelium, i.e. a porphyrinic-based microsensor (Malinski & Taha, 1992) and the NO-sensitive fluorescent dye DAF-2 (Kojima *et al.* 1998).

Though DAF-2 has been successfully used to measure NO production in cultured endothelium (Kimura *et al.* 2001b; Koyama *et al.* 2002), the specificity of DAF-2 fluorescence to NO has been questioned, because it is influenced by micromolar concentrations of Ca^{2+} (Broillet *et al.* 2001). Therefore, we have developed a novel method in this study for detecting NO production in cultured endothelium (Fig. 4Ba). Endothelium-overlaid, BASMC-embedded gels showed relaxation in response to ACh, when BAECs were overlaid (Fig. 4Bb). ACh-induced relaxation was inhibited by L-NAME and was not observed in the absence of BAECs, thereby indicating that the relaxation of the gel was due to NO generated by the overlying BAECs. Thus we suppose that this

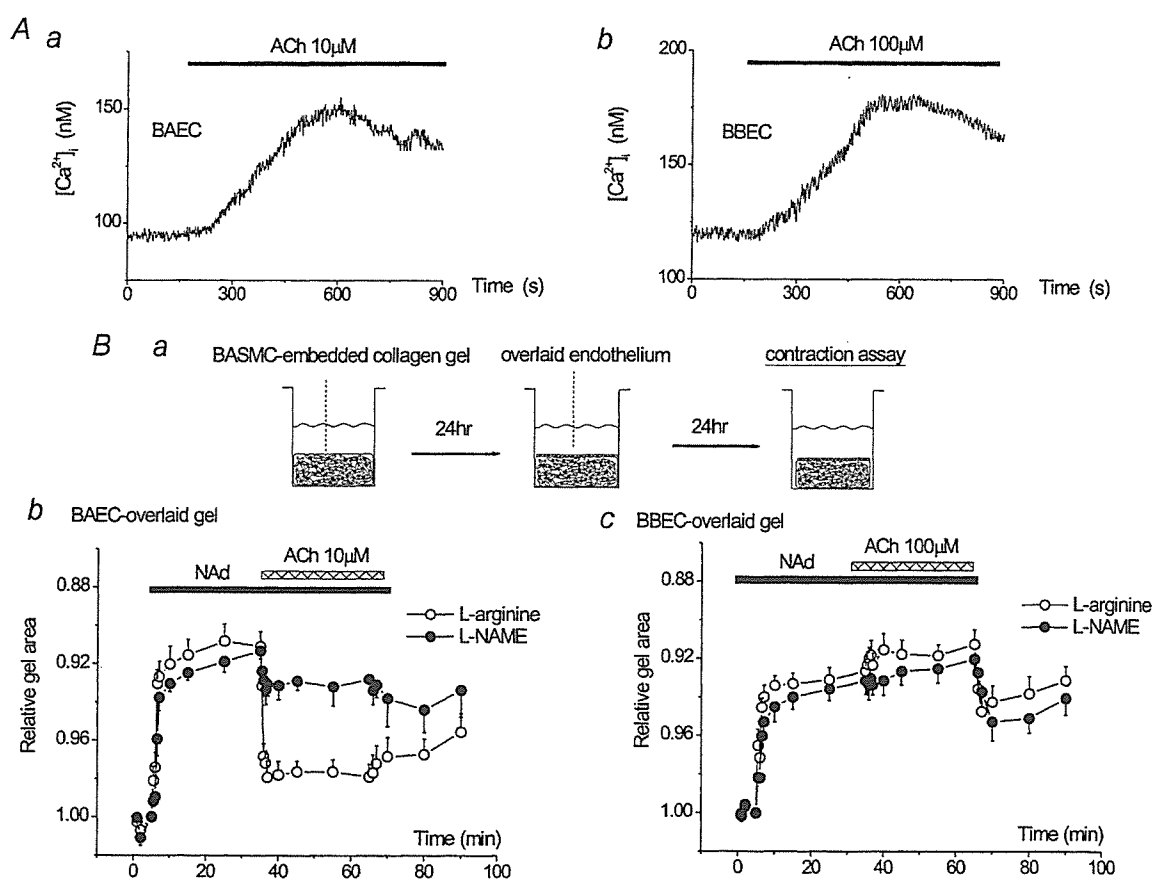


Figure 4. Endothelium-dependent relaxation of smooth muscle-embedded, endothelium-overlaid collagen gels

A, ACh (10 μM) induced Ca^{2+} transients in BAECs (a). A similar degree of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation was obtained with a higher concentration of ACh in BBECs (100 μM , b). Representative traces of 30 (BAEC) or 28 (BBEC) cells are shown. Ba, *in vitro* model vessel consisting of bovine aortic smooth muscle cells (BASMC) embedded in a collagen gel lattice with overlaid endothelium. BASMC were embedded in type I collagen gel, and BAECs or BBECs were overlaid after 24 h. A gel contraction assay was performed after a further 24 h (right). Noradrenaline (NAd, 1 μM) induced a rapid contraction of the gels. Subsequent application of 10 μM ACh induced relaxation of precontracted gels when BAEC was overlaid (b, ○, $n = 20$). Note that L-NAME (0.1 mM) inhibited ACh-induced gel relaxation but did not affect initial gel contraction (b, ●, $n = 6$). BBEC-overlaid gels did not show relaxation in response to 100 μM ACh both in control (○, $n = 22$) and L-NAME-treated gels (c, ●, $n = 6$).

method is applicable for detecting NO production in cultured endothelium. Using this method, we observed that BBECs did not induce vasorelaxation in response to 100 μM ACh (Fig. 4Bc), while this concentration of ACh induced considerable Ca^{2+} transients in BBECs (Fig. 4Ab). Pretreatment with L-NAME did not affect the initial gel contraction induced by NAd, thereby eliminating the possibility that NAd induced NO production and therefore subsequent ACh failed to generate further NO in BBECs.

Therefore, these results strongly suggest that BBECs do not generate significant amounts of NO in response to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation. However, since we have examined NO production only in non-stimulated BBECs, this study does not exclude the possibility that eNOS in cerebral microvascular endothelium may generate NO under some pathophysiological environments, as previously suggested (McNeill *et al.* 1999; Gobeil *et al.* 2002; Yamakawa *et al.* 2003). For instance, McNeill *et al.* (1999) reported that chronic treatment of rat cerebral microvessels with oestrogen increased the expression of eNOS and discussed the possibility that this might be involved in the neuroprotective effect of oestrogen and sex-related differences in cerebrovascular events. Furthermore, it is well known that shear stress generates NO in a Ca^{2+} -independent manner in endothelium (Fleming *et al.* 1998), and we have only observed the absence of ATP-mediated, Ca^{2+} -dependent mechanosensitive NO production in BBECs (Fig. 3). Therefore it should be noted that the present study does not rule out the presence and importance of shear stress-induced, Ca^{2+} -independent eNOS activation in BBECs.

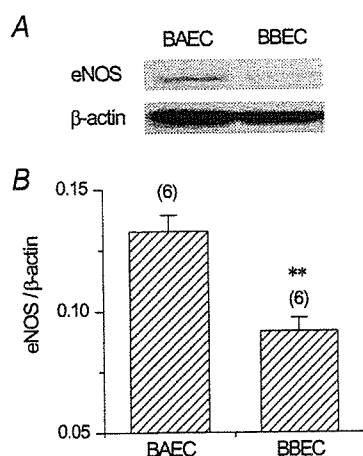


Figure 5. Expression of eNOS protein in BAECs and BBECs, assessed by Western blotting

A, expression of eNOS and β -actin proteins in BAECs and BBECs. Same amount of total cellular protein (5 μg) was applied to each lane. Note that eNOS protein expression was lower in BBECs than in BAECs. B, densitometric analysis of the eNOS protein bands. Values are normalized to β -actin band density. ** $P < 0.01$ vs. BAECs.

Expression of eNOS alone is not enough to induce Ca^{2+} -dependent NO production but its substrate L-arginine and cofactors such as calmodulin, tetrahydrobiopterin and NADPH are also essential (Moncada *et al.* 1991). In this study we propose two possible mechanisms for the absence of detectable NO production in spite of a sufficient $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in BBECs, namely lower expression of eNOS protein (Fig. 5) and lower cellular L-arginine uptake (Fig. 6). Cellular uptake of L-arginine in vascular endothelium is achieved by cationic amino acid transport systems such as y^+ and y^+L , and it is known that the efficiency of endothelial amino acid transport is markedly site specific (for a review see Mann *et al.* 2003). However, we cannot conclude from the present results that these mechanisms are solely responsible for the absence of detectable NO production in BBECs. Another possibility would be that eNOS protein is not coupled properly with other cofactors in BBECs. Therefore, it remains to be elucidated whether significant NO production could be obtained if the expression of eNOS protein is increased in pathological conditions.

It has been suggested that EDHF rather than NO plays a significant role in endothelial control of vascular tone in smaller vessels (Garland *et al.* 1995). The results of the present study have further clarified that $[\text{Ca}^{2+}]_i$ elevation in brain microvascular endothelium does not lead to considerable NO production, and may support a recent report showing that cerebral microcirculation is controlled by neurone-to-astrocyte signals (Zonta *et al.* 2003). In conclusion, the present study has revealed that constitutive Ca^{2+} -dependent and HTS-induced NO production is not detectable in BBECs, and suggests that there may be a marked site specificity in the generation of NO in endothelium.

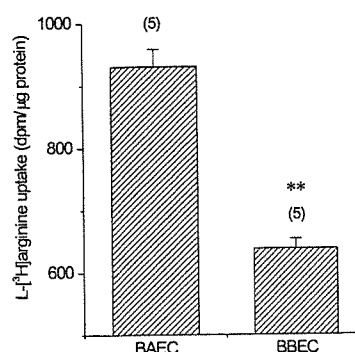


Figure 6. Uptake of L-[^3H]arginine in BAECs and BBECs

Cells were incubated with L-[^3H]arginine for 15 min at 37°C, and the incorporated L-[^3H]arginine was measured as described in Methods. Results are shown as radioactive disintegrations per minute (d.p.m.) per μg cell protein (mean \pm S.E.M., $n = 5$). ** $P < 0.01$ vs. BAECs.

References

- Bodin P & Burnstock G (2001). Evidence that release of adenosine triphosphate from endothelial cells during increased shear stress is vesicular. *J Cardiovasc Pharmacol* **38**, 900–908.
- Broillet M, Randin O & Chatton J (2001). Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Lett* **491**, 227–232.
- Chen Y, McCarron RM, Golech S, Bemby J, Ford B, Lenz FA, Azzam N & Spatz M (2003). ET-1- and NO-mediated signal transduction pathway in human brain capillary endothelial cells. *Am J Physiol* **284**, C243–C249.
- Fleming I, Bauersachs J, Fisslthaler B & Busse R (1998). Ca²⁺-independent activation of the endothelial nitric oxide synthase in response to tyrosine phosphatase inhibitors and fluid shear stress. *Circ Res* **82**, 686–695.
- Furchgott RF & Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373–376.
- Garland CJ, Plane F, Kemp BK & Cocks TM (1995). Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 23–30.
- Gobeil F Jr, Dumont I, Marrache AM, Vazquez-Tello A, Bernier SG, Abran D, Hou X, Beauchamp MH, Quiniou C, Bouayad A, Choufani S, Bhattacharya M, Molotchnikoff S, Ribeiro-Da-Silva A, Varma DR, Bkaily G & Chemtob S (2002). Regulation of eNOS expression in brain endothelial cells by perinuclear EP3 receptors. *Circ Res* **90**, 682–689.
- Hisadome K, Koyama T, Kimura C, Droogmans G, Ito Y & Oike M (2002). Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. *J General Physiol* **119**, 511–520.
- Ishii M, Shimizu S, Shiota K, Yamamoto S, Kiuchi Y & Yamamoto T (2002). Stimulation of tetrahydrobiopterin synthesis by cyclosporin A in mouse brain microvascular endothelial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 1134–1141.
- Kashiwagi S, Kajimura M, Yoshimura Y & Suematsu M (2002). Nonendothelial source of nitric oxide in arterioles but not in venules: alternative source revealed in vivo by diaminofluorescein microfluorography. *Circ Res* **91**, e55–64.
- Kimura C, Cheng W, Hisadome K, Wang YP, Koyama T, Karashima Y, Oike M & Ito Y (2002). Superoxide anion impairs contractility in cultured aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol* **283**, H382–H390.
- Kimura C, Koyama T, Oike M & Ito Y (2000a). Hypotonic stress-induced NO production in endothelium depends on endogenous ATP. *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 736–740.
- Kimura C, Oike M & Ito Y (1998a). Acute glucose overload abolishes Ca²⁺ oscillation in cultured endothelial cells from bovine aorta: a possible role of superoxide anion. *Circ Res* **82**, 677–685.
- Kimura C, Oike M & Ito Y (2000b). Hypoxia-induced alterations in Ca²⁺ mobilization in brain microvascular endothelial cells. *Am J Physiol* **279**, H2310–H2318.
- Kimura C, Oike M, Kashiwagi S & Ito Y (1998b). Effects of acute glucose overload on histamine H2 receptor-mediated Ca²⁺ mobilization in bovine cerebral endothelial cells. *Diabetes* **47**, 104–112.
- Kimura C, Oike M, Koyama T & Ito Y (2001a). Alterations of Ca²⁺ mobilizing properties in migrating endothelial cells. *Am J Physiol* **281**, H745–H754.
- Kimura C, Oike M, Koyama T & Ito Y (2001b). Impairment of endothelial nitric oxide production by acute glucose overload. *Am J Physiol* **280**, E171–E178.
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y & Nagano T (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* **70**, 2446–2453.
- Koyama T, Kimura C, Park SJ, Oike M & Ito Y (2002). Functional implications of Ca²⁺ mobilizing properties for nitric oxide production in aortic endothelium. *Life Sci* **72**, 511–520.
- Koyama T, Oike M & Ito Y (2001). Involvement of Rho-kinase and tyrosine kinase in hypotonic stress-induced ATP release in bovine aortic endothelial cells. *J Physiol* **532**, 759–769.
- Lopez-Jaramillo P, Gonzalez MC, Palmer RM & Moncada S (1990). The crucial role of physiological Ca²⁺ concentrations in the production of endothelial nitric oxide and the control of vascular tone. *Br J Pharmacol* **101**, 489–493.
- McNeill AM, Kim N, Duckles SP, Krause DN & Kontos HA (1999). Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels. *Stroke* **30**, 2186–2190.
- Malinski T & Taha Z (1992). Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. *Nature* **358**, 676–678.
- Mann GE, Yudilevich DL & Sobrevia L (2003). Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev* **83**, 183–252.
- Moncada S, Palmer RM & Higgs EA (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* **43**, 109–142.
- Nelin LD, Nash HE & Chicoine LG (2001). Cytokine treatment increases arginine metabolism and uptake in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am J Physiol* **281**, L1232–L1239.
- Oike M, Kimura C, Koyama T, Yoshikawa M & Ito Y (2000). Hypotonic stress-induced dual Ca²⁺ responses in bovine aortic endothelial cells. *Am J Physiol* **279**, H630–H638.
- Sabirov RZ, Dutta AK & Okada Y (2001). Volume-dependent ATP-conductive large-conductance anion channel as a pathway for swelling-induced ATP release. *J General Physiol* **118**, 251–266.

Stoclet JC, Muller B, Gyorgy K, Andriantsiohaina R & Kleschyov AL (1999). The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiac tissue. *Eur J Pharmacol* **375**, 139–155.

Xia Y, Tsai AL, Berka V & Zweier JL (1998). Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca^{2+} /calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process. *J Biol Chem* **273**, 25804–25808.

Yamakawa H, Jezova M, Ando H & Saavedra JM (2003). Normalization of endothelial and inducible nitric oxide synthase expression in brain microvessels of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II AT1 receptor inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 371–380.

Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T & Carmignoto G (2003). Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* **6**, 43–50.

Acknowledgements

The authors thank Dr M. Hirakawa for his initial support with Western blotting experiments. This study was carried out as a part of 'Ground Research Announcement for the Space Utilization' promoted by National Space Development Agency of Japan and Japan Space Forum. This study was also supported in part by a grant-in-aid from the Japan Society for the promotion of Science (No. 14570081).

骨粗鬆症

高柳涼一

■概 念

- ◎骨粗鬆症は「低骨量と骨組織の微細構造の劣化が特徴的で、その結果、骨の脆弱性が増し、骨折が生じやすくなった全身性の骨疾患」と定義されている。
- ◎閉経後骨粗鬆症や老人性骨粗鬆症などの原発性と骨量低下をきたす疾患に伴ってみられる続発性のものに分けられる(表1)。
- ◎骨粗鬆症の治療の目的は、骨折の防止とそれによる生命予後の改善、QOLの維持であり、ビスフォスフォネート、SERM(selective estrogen receptor modulator)などの強力な骨粗鬆症治療薬が登場している。

表1 骨粗鬆症の分類

1. 原発性骨粗鬆症
1) 退行期骨粗鬆症
・閉経後骨粗鬆症
・老人性骨粗鬆症
2) 特発性骨粗鬆症(若年性, 妊娠後など)
2. 続発性骨粗鬆症
1) 薬剤性(ステロイド, メソトレキセートなど)
2) 不動性(長期臥床, 麻痺)
3) 内分泌性(Cushing 症候群, 性腺機能低下症, 甲状腺機能亢進症, 副甲状腺機能亢進症)
4) 代謝性(糖尿病, 肝疾患など)
5) 先天性(骨形成不全症)
6) その他(多発性骨髄腫, 関節リウマチ, 胃切除)

■診断基準, 診察・診断検査法

1. 症 候

- ◎臨床症状は比較的乏しく、骨折をきたさない限り自覚症状を認めないが、椎体骨折の進行したときの身長短縮、背中が丸くなる円背は特徴的である。椎体変形による周囲組織へのストレスにより慢性の腰背部痛を生じる。特に体を動かすときの初動作時痛が多い。
- ◎海綿骨が脆くなるので脆弱性骨折は海綿骨の豊富な部位(脊椎骨, 肋骨, 大腿骨頸部, 踵骨)や転倒時に衝撃を受けやすい部位(橈骨遠位端, 上腕骨近位端, 大腿骨頸部)に起きやすい。

- ◎椎体骨折は急激な腰背部痛に加えて、X線上、骨折が確認できる臨床骨折と自覚症状がほとんどなく、X線上の椎体変形により診断される形態骨折に分類される。骨粗鬆症における椎体骨折の2/3は形態骨折である。椎体骨折は胸腰椎移行部に多い。

2. 診 断

- ◎円背, 腰背部痛, 身長短縮, 過去の脆弱性骨折に加えて, 危険因子(高齢, 女性, 低体重, 骨折・骨粗鬆症の家族歴, 運動不足, ステロイド使用, 日光曝露不足, 飲酒, 喫煙, 低Ca摂取, 早期閉経や閉経前卵巣摘出, 胃切除)の有無をチェックする。

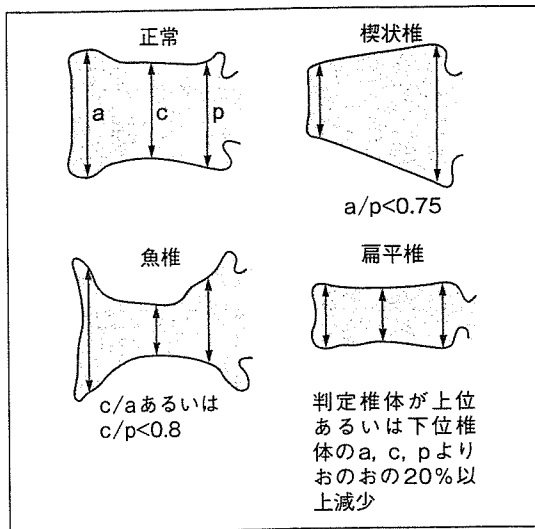


図1 椎体変形の種類

- 胸腰椎 X 線により椎体骨折の有無，骨粗鬆症以外の脊椎疾患の有無を判定する。椎体の不規則な透過像や破壊所見がある場合は MRI 検査などにより転移性骨腫瘍，多発性骨髄腫などの鑑別が必要となる。
- わが国では図1に示すように椎体骨折は楔状椎，魚椎，扁平椎に大別しているが，正確な椎体の変形率の判定には椎体側面から正中(椎体の傾き，回転を考慮した)撮影することが肝要である。
- 骨密度測定を行い日本骨代謝学会より提唱されている2000年度版診断基準(表2)，診断マニュアル(図2)を利用して診断する。腰椎の骨密度測定が原則であるが，変

表2 原発性骨粗鬆症診断基準(2000年度版)

I. 脆弱性骨折あり ^a		
II. 脆弱性骨折なし		
	骨密度値 ^b	脊椎 X 線像での骨粗鬆症化 ^c
正常	YAM の 80% 以上	なし
骨量減少	YAM の 70 以上 80% 未満	疑いあり
骨粗鬆症	YAM の 70% 未満	あり
<p>YAM：若年成人平均値(20~44歳)</p> <p>^a 脆弱性骨折：低骨量(骨密度がYAMの80%未満，あるいは脊椎 X 線像で骨粗鬆症化がある場合)が原因で，軽微な外力によって発生した非外傷性骨折。骨折部位は脊椎，大腿骨頸部，橈骨遠位端，その他</p> <p>^b 骨密度は原則として腰椎骨密度とする。ただし，高齢者において，脊椎変形などのために腰椎骨密度の測定が適当でないと判断される場合には大腿骨頸部骨密度とする。これらの測定が困難な場合は橈骨，第二中手骨，踵骨の骨密度を用いる</p> <p>^c 脊椎 X 線像での骨粗鬆症化の評価は，従来の骨萎縮度判定基準を参考にして行う</p>		
脊椎 X 線像での骨粗鬆症化		従来の骨萎縮度判定基準
なし		骨萎縮なし
疑いあり		骨萎縮度 I 度
あり		骨萎縮度 II 度以上

低骨量をきたす骨粗鬆症以外の疾患または続発性骨粗鬆症を認めず，骨評価の結果が上記の条件を満たす場合，原発性骨粗鬆症と診断する。(折茂 肇ほか：日骨代謝誌 18：76-82, 2001より)

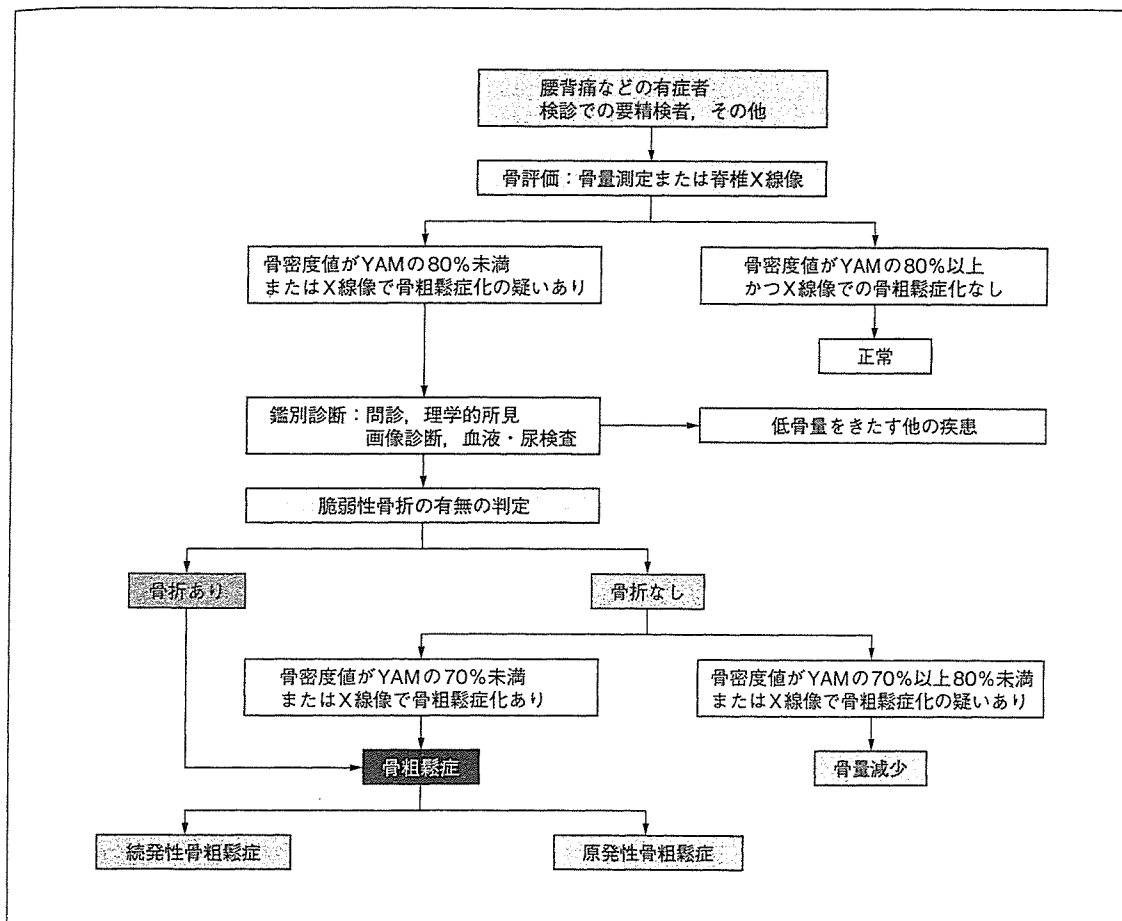


図2 原発性骨粗鬆症の診断マニュアル
(折茂 肇ほか: 日骨代謝誌 18:76-82, 2001 より)

形性脊椎症の合併などにより骨硬化が存在すると見かけ上、骨密度が高値となるので、X線像とともに評価する。脊椎X線写真による骨粗鬆症化の判定は骨密度の測定・評価が困難な場合に用いる。

- 骨代謝マーカーを測定する。骨代謝マーカーは破骨細胞による骨吸収とその後の骨芽細胞による骨形成(骨リモデリング)時に出る代謝物である。骨吸収マーカーとしての尿中あるいは血中I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTx), 尿中I型コラーゲン架橋C-テロペプチド(CTX), 尿中デオキシピリジノリン(DPD), 骨形成マーカー

ーとしての骨型アルカリフォスファターゼ(BAP)のいずれか一つの測定が保険適応となっている。骨代謝マーカーの高値(高回転型)は重度の骨粗鬆症を示す一方、異常高値の場合は転移性骨腫瘍などの骨疾患の可能性がある。

- Ca, Pを含めた一般生化学検査を行う。原発性骨粗鬆症ではCa, Pは正常であり、血沈, CRPも正常である。
- 続発性骨粗鬆症が疑われる場合は基礎疾患の鑑別を行う。男性の骨粗鬆症では肝硬変が基礎疾患となることが多い。

■ 基本的治療法(図3)

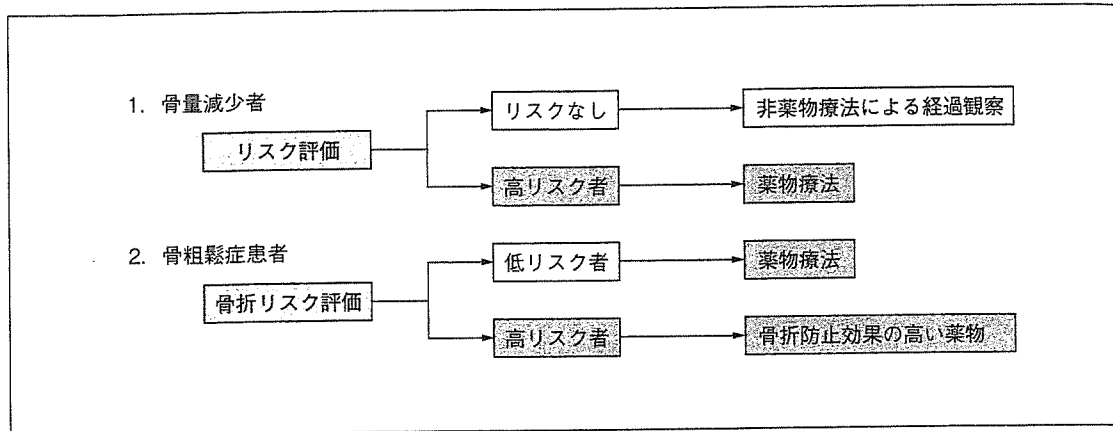


図3 骨粗鬆症に対する薬物療法の適応基準
(折茂 肇ほか：Osteoporosis Japan 6：205-253, 1998 より改変)

- 骨量減少者(骨密度がYAMの70%以上80%未満)はリスクを評価し、リスクのない場合は運動を含めた生活習慣の改善を行う。運動は有酸素運動を行う。高齢者に最も良い運動は徒歩である。骨量減少者でもステロイド使用例、閉経前卵巣摘出例を含めて早期閉経例は薬物療法を行う。
- 骨粗鬆症患者(骨密度がYAMの70%未

満)は骨折危険度を考慮して薬物療法を行う。骨粗鬆症における新規椎体骨折発生の危険因子には低骨密度(YAMの60%以下)、既存椎体骨折の存在、高齢(65歳以上)、骨代謝亢進の4つがある。これが一つ以上存在する場合は骨折防止効果の高い第3世代ビスフォスフォネートあるいはSERMを用いる。

■ 治療薬一覧

● 表3に示す。

表3 骨粗鬆症治療薬の用法

種類	骨折抑制作用	骨密度増進作用	一般名	商品名	用量	用法
カルシウム製剤	-	+	L-アスパラギン酸カルシウム	アスパラ-CA	200mg (Ca 22.3mg/1錠)	3~6錠 分2~3
			リン酸水素カルシウム	リン酸水素カルシウム	(Ca 330mg/散剤 1g)	1~3g 分1~3
			乳酸カルシウム	乳酸カルシウム	(Ca 130mg/散剤 1g, 骨粗鬆症には保険適応なし)	2~5g 分2~3

種 類	骨折抑制作用	骨密度増加作用	一般名	商品名	用 量	用 法
活性型ビタミンD ₃	+	+	アルファカルシドール	ワンアルファアルファロール	1.25, 0.5, 1.0 μg	0.25~1.0 μg 分1
			カルシトリオール	ロカルトロール	1.25, 0.5 μg	0.25~0.5 μg 分1~2
ビタミンK ₂ 製剤	-	+	メナテトレノン	グラケー	15 mg	3錠 分3(食後) (ワーファリン服用者は禁忌)
ビスフォスフォネート製剤	++	++	エチドロネート	ダイドロネル	200 mg	1錠 分1, 早朝空腹時に水とともに服用, 服用後60分は食物を摂取しない, 2週間投与/10~12週休薬の繰り返し
			アレンドロネート	ボナロン フォサマック	5 mg	1錠 分1, 早朝空腹時食前30分に水とともに服用, 服用後30分は食事, 臥床しない
			リセドロネート	ベネット アクトネル	2.5 mg	1錠 分1, 同上
カルシトニン製剤	+	+	サケカルシトニン	カルシトラン	10 単位/アンブル	骨粗鬆症における疼痛に対して1回10単位週2回筋注 同上 骨粗鬆症に対して1回20単位週1回筋注
			エルカトニン	サーモトニン	10 単位/アンブル	
				エルシトニン	20 単位/アンブル	
エストロゲン製剤	++	++	17β-エストラジオール	エストラダー ΔM エストラーナ	0.72 mg/1 枚	2日ごとに1枚
			酢酸メドロキシプロゲステロン	プロベラ	2.5 mg/1 錠	1錠 分1, 上記に併せて同時併用投与 (骨粗鬆症には保険適応なし)
SERM製剤	++	+	塩酸ラロキシフェン	エビスタ	60 mg/1 錠	1錠 分1

■個別治療

1. 各治療薬の使用上の注意

- ③骨折リスクを低下させるエビデンスを持つものはエストロゲン, カルシトニン(椎体骨折のみ), 活性型ビタミンD₃, ビスフォスフォネート, SERM(ラロキシフェン)である。
- ④エストロゲン, プロゲステロン製剤による

ホルモン補充療法は骨折予防効果は認めるものの, 虚血性心疾患リスク抑制効果がないことや, 乳癌リスクの上昇が最近の大規模臨床試験で明らかになっており, 更年期障害を伴う女性に限定した慎重な使用が望まれる。乳房も含めて定期的婦人科検診が必須である。

- 第3世代ビスフォスフォネート(アレンドロネート, リセドロネート)は強力な骨吸収抑制作用により骨密度上昇作用が最も高いが, 副作用として食道, 胃刺激作用(消化性潰瘍)があり, 副作用が強い場合, 他剤に変更する。エチドロネートでは血中無機リンの上昇をみることがある。
- カルシトニン中枢神経を介した強い鎮痛効果があり, 腰背部痛の強い例に選択される。鎮痛効果の発現に2~3週間かかる。ビスフォスフォネートも投与後1ヵ月以内に発現する強い鎮痛効果を持つことが最近明らかになっている。
- 活性型ビタミンD₃には骨粗鬆症治療薬として以外に筋力増強と認知機能の改善による高齢者の転倒頻度の減少効果が示されている。ただし, 尿中Caのモニターが必要であり, 随時尿で尿中Ca排泄量300 mg/gクレアチニンを越えるときは腎結石, 高カルシウム血症の出現の危険性が高いので中止する。
- ラロキシフェンは静脈血栓症のリスクはエストロゲンと同等であり, 肺塞栓症, 静脈血栓塞栓症の患者またはその既往のある患者には禁忌である。また, 長期不動状態に入る場合は3日前に中止する。
- 併用療法については, 骨折リスク低下のエビデンスは得られていないが, ビスフォスフォネートと活性型ビタミンD₃の併用は骨密度の上昇が単剤に比べて高い。ビタミンD₃とビタミンK₂の併用については一貫した効果を認めていない。
- ヒッププロテクターは介護単位で(施設として)装着すると大腿骨頸部骨折の発生を低下させると期待されている。個人の意思に任せたものでは有効性は明らかではない。

い。

2. 治療効果の判定

- 治療開始6ヵ月, 12ヵ月後に骨密度測定, 胸腰椎X線撮影, 3ヵ月後に骨代謝マーカーを測定し効果判定を行う。骨密度の低下, 骨折の発生, 骨代謝マーカーの高値があれば治療法を変更する。効果があれば治療を継続する。第3世代ビスフォスフォネートでは10年間の投与による治療効果の持続が報告されている。ビスフォスフォネート, ラロキシフェン, エストロゲンでは3ヵ月以内に骨代謝マーカーの低下を認める。
- 治療による骨密度の変化は腰椎の骨密度が最も鋭敏なので, 腰椎骨密度で判定することが望ましく, 3%以上の変化があれば有意である。

3. ステロイド骨粗鬆症

- ステロイド骨粗鬆症は続発性骨粗鬆症で最も頻度の高いものであり, その予防は重要である。骨量減少者のみならず, 正常骨密度でも既存あるいはステロイド治療中に新規骨折がある場合はさらに新規骨折が発生するリスクが高いので薬物療法を行う。また, 正常骨密度でもプレドニゾロン換算で7.5 mg/日以上を3ヵ月以上投与する場合は薬物療法が望ましい。薬物はステロイド骨粗鬆症の骨折の防止効果が証明されているビスフォスフォネートを用いる。活性型ビタミンD₃の併用は骨密度減少防止の点では有効である。

4. 専門機関への転送

- 経過中, 不眠をきたすほどの腰背部痛や下肢の麻痺, 排尿障害が出現したときは破裂骨折による脊髄麻痺の合併が疑われるので整形外科への移送が必要である。

トピックス

II. 高齢者総合医療

3. 予防医学

高柳 涼一

要 旨

ヒトの限界寿命は現在約 120 歳である。高齢者のQOL (quality of life) を著しく損なう老年病は成人期から持ち込まれる生活習慣病と高齢期に発症する変性疾患とが複合したものが多くを占め、両者の存在は相乗的にQOLを悪化させる。従って、老年病の予防には成人期から高齢期にかけてのライフスタイルの改善が重要となる。また、骨粗鬆症のように老年病は新しい医療の開発とその早期の応用により予防の概念と方法が変化して行くものと考えられる。〔日内会誌 93: 2514~2517, 2004〕

Key words: 予防医学, 老年病, 生活習慣病, QOL, 老化

1. 老化機構

老化には生理的老化と病的老化がある。精神的、肉体的にも疾病に罹患せず、天寿をまっとうする過程で現れる表現型が生理的老化であり、普遍性（すべての生命体に出現する）、内在性（誕生、発育、成熟、老衰の過程がプログラムされている）、進行性（不可逆的現象）、有害性の原則を有する。この生理的老化の機序として、老化が遺伝子レベルで制御されているとするプログラム説、生命現象の過程で出現する様々の障害によりDNAやタンパク質に障害が蓄積することにより老化が進行するとするエラー蓄積説の2つの説が提唱されており（図1）、それぞれの説を支持するエビデンスも数多く報告されている。現在は両者によってagingが進むものと解釈されている。プログラム説はヒトが何歳まで生きられるかという限界寿命に深く関与すると推定されるが、その寿命については120~140

歳まで諸説がある。呼吸機能の1秒量は加齢によって低下し120歳でほぼ0となり生存不能となると推察されることが報告されている。我が国では1963年から1993年までの30年間に100歳老人の数は153人から4,802人にまで増加したが、最高年齢は112~114歳の間にあって延長していない。ヒトの生存率曲線（図2）は20世紀初頭から1940年代までは年齢に対して直線的減少関係にあったが20世紀末には生存率曲線が上方に偏位して、高齢になって急激に低下する四角形に変化している。これは無菌的に飼育した実験動物の生存曲線に類似する。即ち、生命現象の進行過程において寿命プログラム（と一部エラー蓄積）で天寿をまっとうすればこのような四角形の生存率曲線をとるが、病的老化の要素が加わると直線的な生存率曲線へ近づくことになる。

2. 老年病の特徴

老年病は高齢者に比較的多い疾患と高齢者に特有の疾患に分けられる（図3）。前者は成人期

たかやなぎ りょういち：九州大学大学院医学研究院
老年医学

1. プログラム説—老化関連遺伝子の発見—

細胞分裂におけるテロメアDNA短縮 細胞周期調節因子 (p16 ^{INK4A} , p19 ^{ARF}) Klotho遺伝子, WRNヘリカーゼ	
---	--
2. エラー蓄積説—酸化ストレス(フリーラジカル)—

酸化ストレス(フリーラジカル) 脂質過酸化 クロスリンキング	C. elegans, SODノックアウトハエ での証明
--------------------------------------	------------------------------------

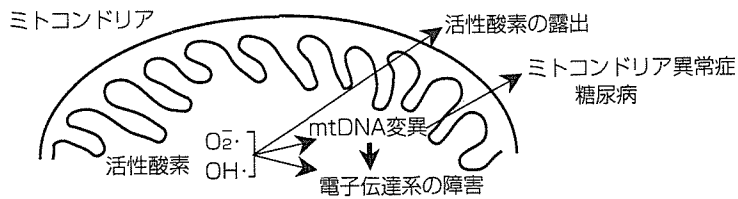


図1. 老化の機序

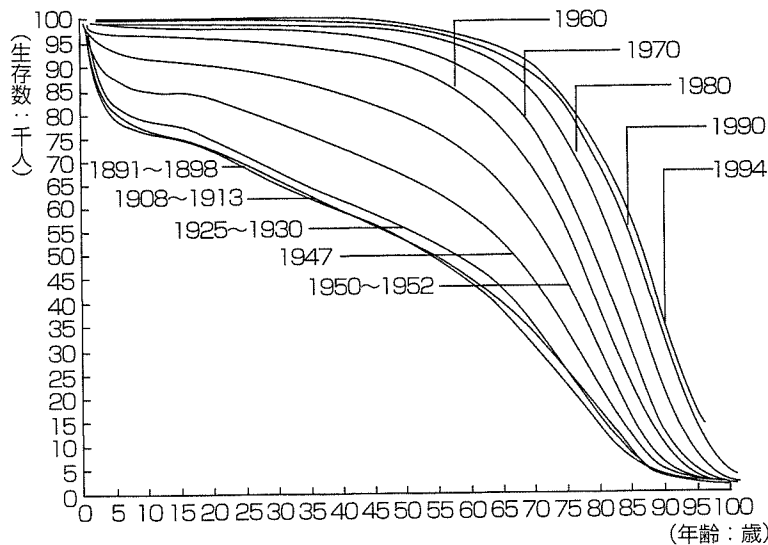


図2. 日本人女性の生存率曲線の推移 (厚生労働省調査)

に発症したものをそのまま老年期に持ち込んだ慢性疾患で、いわゆる生活習慣病とほぼ同一である。「ヒトは血管とともに老いる」と言われているように糖尿病、高脂血症、高血圧、肥満等の生活習慣病を基盤要因とした動脈硬化の進展による脳血管障害、心血管障害は高齢者でもQOL (quality of life) を損なう疾患の大部分を占めている。一方、老年期痴呆、骨粗鬆症、パーキンソン病、前立腺疾患、老人性白内障、老人性難聴などの変性疾患は高齢になって出現するもの

が多く、これらは直接の死因になるよりもむしろ日常生活活動度(ADL)を損ない高齢者のQOLを低下させるものである。高齢になって出現するが実際には骨粗鬆症のように若年から成人期にかけての生活習慣が老年期の発症に大きく影響する。生活習慣病と高齢者特有の変性疾患の両者の存在は相乗的にADLを低下させ、寝たきり発生の確率が高くなり介護老人数を増加させることになる。

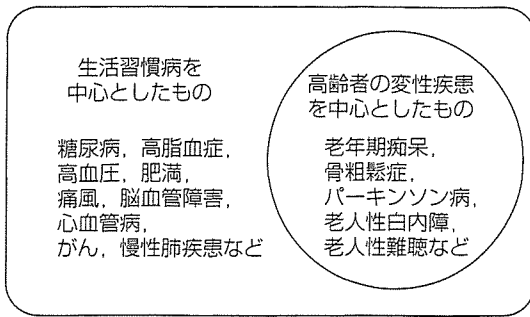


図3. 老年病の構成

表1. 我が国の寝たきりの原因
(65歳以上の寝たきり者28万4千人)

脳卒中	32.7%
老衰	26.7%
骨折・転倒	9.2%
リウマチ・関節炎	6.1%
心臓病	4.9%
その他	20.5%

高齢者をとりまく世帯の状況「国民生活基礎調査報告」96-99, 1998.

表2. 生活習慣の改善項目

<p><食事></p> <ul style="list-style-type: none"> ・カロリー制限：80%が目安。 ・コレステロール摂取の制限：高コレステロール血症では1日300mg以内に糖分の過剰摂取を避ける。 ・魚類を積極的に摂取する。 ・繊維分を積極的に摂取する。 ・塩分摂取の制限：1日10gが目標（高血圧の人は7～8gを目標に）。 ・カルシウム：高齢者では900～1,000mg/日の摂取を勧める。 ・マグネシウム：300mg/日が目安。 <p><運動></p> <ul style="list-style-type: none"> ・中等度以下の運動を長期間続ける：60～70歳代では心拍数が110くらいになるよう運動を1日20～40分、週3回以上行う。 <p><嗜好品></p> <ul style="list-style-type: none"> ・禁煙。 ・適度なアルコール摂取：アルコールとして1日20～30ml。
--

3. 老年病の予防

上述したように我が国の大部分の老年病の構成と進展には生活習慣病の発症・進展に加えて高齢者特有の変性疾患が加わったものとなっている。寝たきりへの移行は老年病の1つの終着点と考えられる。我が国の寝たきりの原因の第1位は脳卒中、第2位は老衰、第3位は骨折・転倒であり(表1)、老年病の構成を反映している。従って、老年病の予防は第1に生活習慣病の予防、第2に変性疾患による機能障害に引き続く生活機能障害への移行の予防が重要と考えられる。当然のことながら、成人期から老年期の生活習慣(ライフスタイル)の改善はこの両者に

大きく影響する。

1) ライフスタイルの改善

高脂血症、高血圧、糖尿病、肥満、痛風等の動脈硬化の危険因子となる疾患、虚血性心疾患や脳梗塞などの動脈硬化性疾患、骨粗鬆症、大腸がんなどは発症、増悪に生活習慣が大きく影響する生活習慣病である。その予防のため成人期には表2に示すような生活習慣の改善が重要である。高齢者においても生活習慣は重要であるが、高齢者ではライフスタイルが確立しており、成人期と同じ方法を適用することが必ずしも良い結果を生じない。栄養過多を極端に避けることは老人特有の低栄養につながり、また、食事の楽しみを奪うなどQOLを障害することにもなりかねない。高齢者においては平均余命、

意欲、生活活動度、QOLに注意しながら、慎重に行うことが重要となる。生活習慣と遺伝素因の相互作用がどのように生活習慣病を発症、進展させるのかを解明することは老年病の発症予防の点からも重要であり、著者らは数万人からなる九州コホート構築を中心としたゲノム疫学研究「大規模コホートに基づく生活習慣病研究教育」を推進している。

熊谷らは、1993年から2年間、シルバーマンションの居住者に対する介入研究を行った。居住者(平均年齢75歳)に対して食生活、身体活動、社会参加などの生活習慣の改善を目的とする教育活動を行い、対照群として小金井市民のデータから、性別・年齢を合わせて比較した。最も特徴的な変化は血清アルブミンの変化で、対照群では有意に低下したが、介入群では有意に上昇した。BMIは介入群で上昇、対照群で低下の正常範囲内の変化を示した。血清アルブミンは死亡に対して有意の規定要因であることが示されており、生活習慣への介入により、高齢者でも老年病発症のリスクを低減させ得ることを示している。

2) 医療の進展による予防内容の概念の変化

老年病の予防にはライフスタイルの改善ばかりでなく、トランスレーショナルリサーチに代表される新しい医療の開発によって、その概念は変化している。閉経後女性の骨粗鬆症は10代の運動と栄養による最大骨量の増加、20代か

ら40代の定期的運動による骨量の維持といった1次予防に加えて、保険診療の問題を除けば、50代以降、ビスフォスフォネートやエストロゲン受容体モジュレーター(SERM)などの新しい治療薬による骨量と骨質の低下の予防が可能となっている。また、しみ、しわなどの皮膚の老化、白内障や加齢黄斑変性による視覚の老化、老人性難聴、加齢に伴う筋肉の萎縮に対して、その発症機構に応じた予防・治療(抗酸化療法、副腎アンドロゲンDHEA補充)から再生医療開発までの広範な試みがなされている。このようなアンチエイジング療法は生命予後には大きく関係しないと考えられるが、高齢者のQOLを著しく改善し、「生きて行く元気」を生じさせることは明らかであり、このようなことも老年病の予防法の一つとなって行くものと推察される。

参考文献

- 1) 葛谷文男：老年病—特徴と疫学，老年の診療，最新内科学体系79. 井村裕夫，他編. 中山書店，東京，1995, 25-33.
- 2) 熊谷 修，他：自立高齢者の老化を遅らせるための介入研究—有料老人ホームにおける栄養状態改善によるこころみ. 日本公衛誌 46:1003-1012, 1999.
- 3) 柴田 博：予防医学，老年医学. 荻原俊男編. 朝倉書店，東京，2003, 326-331.
- 4) 大内尉義：老年病と生活習慣病，老年医学テキスト. 日本老年医学会編. メジカルビュー社，2002, 東京，160-161.
- 5) Ohnaka K, Takayanagi R: DHEA and Elderly. Encyclopedia of Endocrine Diseases. 1, Academic Press, San Diego, California, USA 2004, 647-650.

転写因子と内分泌疾患Ⅱ：ステロイドホルモン

高柳涼一¹⁾/河手久弥²⁾

KEYWORDS 核内受容体, ステロイドホルモン不応症, 共役因子病, FRAP

はじめに

ステロイドホルモン過剰状態が存在するにもかかわらず、そのホルモンの作用不足を呈する状態、あるいは、ホルモン過剰症状を示さない病態はステロイドホルモン不応症という疾患概念で理解されている。これらの大部分はステロイドホルモン受容体をコードする遺伝子の変異により引き起こされる。ステロイドホルモン受容体は類似の構造をもつ核内ホルモン受容体(核内受容体)ファミリーの一員であり、リガンド依存性の転写調節因子である。近年の急速な核内受容体による転写調節制御の研究の進展に伴い、ステロイドホルモン不応症という概念はステロイド受容体分子の異常という概念から、広く核内受容体の異常、さらに、受容体から基本転写装置に至るシグナル伝達系の異常として考えられるようになり、これらは核内受容体異常症という概念でとらえられる。本稿では、ステロイドホルモン受容体を中心とした核内受容体異常症の成因論と、その実例としての共役因子病(coregulator-related disease)について筆者らの成績を含めて概説する。

核内ホルモン受容体による転写調節

1. 共役因子複合体と転写調節

アンドロゲン受容体(AR), グルココルチコイド受容体(GR), エストロゲン受容体(ER)などのステロイドホルモン受容体はC末端にホルモン結合部位, 中央部に各受容体間で相同性の高いDNA結合部位, N末端に遺伝子活性化部位の3つのドメインからなる共通構造をもつ(図1)。C端側にはリガンド依存性転写活性化領域(AF-2)が存在する。N端側にはAF-1と

呼ばれる転写活性化領域が存在する。C端のホルモン結合部位は受容体間で比較的保存されているが、AF-1は多様であり、受容体の組織, 細胞特異性に関与する。ステロイドホルモン受容体はリガンドが結合することにより構造変化をきたし、細胞質より核内へ移行し、標的遺伝子のプロモーター上に結合、さらに共役因子(cofactor/coregulator)という一群の蛋白質を介して基本転写装置へその転写活性化シグナルが伝達される(図2)。核内受容体の生物作用の特異性はこれらの共役因子群によって規定されると考えられており、ほかの細胞内シグナルもこれらの共役因子を介してクロストークが行われている。この共役因子は現在、個々に作用するのではなく、巨大な複合体を形成して作用することが明らかになっている。これらの複合体の重要な役割はまず、DNAがヒストンに巻き付けられた構造(クロマチン構造)を修飾して変化させることであると考えられている。クロマチン構造が緩むことにより、核内受容体などのDNA塩基配列特異的な転写因子がプロモーター上に結合し、polymerase IIを含む基本転写装置に作用し、転写を活性化する。このようなクロマチン構造を修飾する複合体として、DNAを巻き付けて固定しているヒストン蛋白の塩基性アミノ酸をアセチル化するヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)活性や逆にアセチル基を取り除くヒストンデアセチラーゼ活性(HDAC)をもつものと、ATP依存性のヌクレオソームの再編成(rearrangement)により、クロマチン構造を緩めるSWI2/SNF2, ISW1, Mi2などがある。

1) CBP/p300, SRC(steroid receptor coactivator)-1/TIF(transcriptional intermediary factor)2を中心とする複合体

転写共役因子には転写を活性化するコアクチベーターと転写を抑制するコリプレッサーがある。リガ

1) TAKAYANAGI Ryoichi 九州大学 大学院医学研究院老年医学・教授

2) KAWATE Hisaya 同

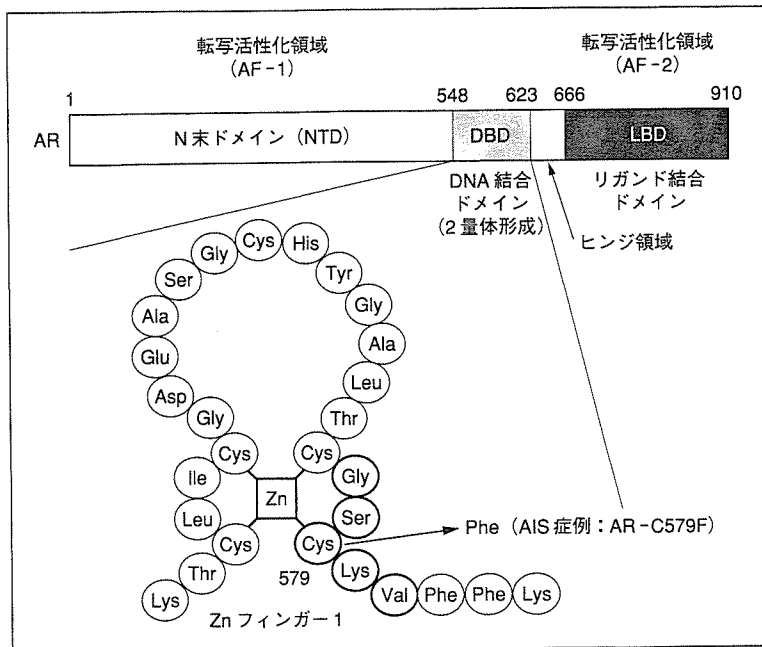


図1 アンドロゲン受容体の構造と機能, DNA 結合領域に変異をもつ AR-C 579 F

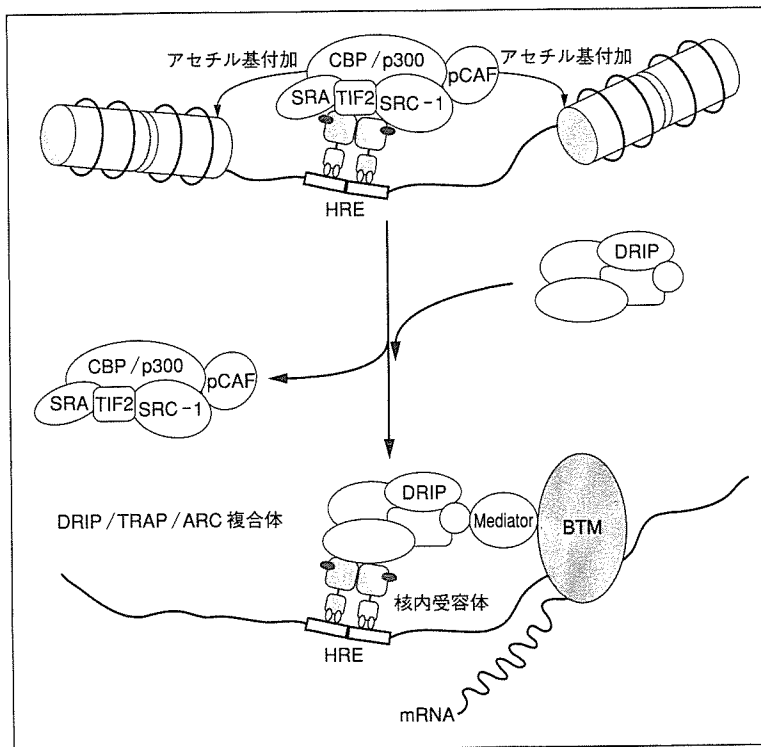


図2 CBP/p 300 複合体とほかの複合体の two step による転写活性化モデル
BTM : basal transcription machinery, HRE : hormone responsive element

ドがない状態ではコリプレッサーが核内受容体に結合して転写を抑制し、リガンド結合により解離して、コアクチベーターが結合する機構が明らかになっている。これらのコアクチベーターは単独で核内受容体に結合するのではなく、数十のコアクチベーターが複合体を形成して結合する。現在、p160ファミリー(SRC-1/NCoA1, TIF2/GRIP, pCIP/AIB1/ACTR), CBP/p300, pCAFなどのコアクチベーター、NCoR(nuclear receptor corepressor)/SMRT(silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor)などのコリプレッサーがクローニングされている。CBP/p300はcAMP応答配列に結合するCREBのコアクチベーターとして見いだされたが、転写制御のインテグレーターとして核内受容体ばかりでなく、STAT, NF- κ Bなどのシグナルを受容して転写制御を行うことが明らかとなった。

SRC-1/TIF2ファミリー, pCAFはCBP/p300と複合体を形成する。これらのコアクチベーターの機能として重要なのは、HAT活性をもつことである。DNAはヒストンに巻き付けられた状態では転写因子の結合やmRNAを合成するRNAポリメラーゼIIを結合することはできない。転写開始とともに伸長反応を行うためHAT活性により十分な範囲のクロマチン構造を解き、RNAポリメラーゼIIを含む基本転写装置複合体をDNAに接近させることがコアクチベーターの転写活性化機構の重要なメカニズムの1つと考えられている。

2) DRIP/TRAP/ARC 複合体¹⁾

ビタミンD受容体にリガンド依存性に結合する共役因子群として単離されたDRIP(vitamin D receptor-interacting proteins)複合体はSRC-1/TIF2ファミリーに代表されるp160 kDa蛋白やCBP/p300を含まず、また、HAT活性ももたないが、*in vitro*の転写系でコアクチベーター作用が示された。このDRIP複合体の構成蛋白は甲状腺ホルモン受容体とリガンド依存性結合を示す共役因子複合体として同定されたTRAP(thyroid hormone receptor-associated protein)と同一であった。さらに、SREBP-1a, VP16, NF- κ Bのコアクチベーター複合体であるARC(activator-recruited cofactor)と同一であることも明らかになった。また、p53による転写活性化を促進するSMCC(SRB/MED-containing cofactor complex)やE1A-interacting complex(human mediator)の構成因子と共通のものがかなり含まれる

ことも判明した。この複合体は約25個の12~240 kDaのsubunitから構成されている。これらの事実はDRIP/TRAP/ARC/SMCC複合体がCBP/p300を中心とした複合体に匹敵する重要な転写共役因子複合体であり、核内受容体ばかりでなく、p53, VP16, Sp1, SREBP, NF- κ B, E1Aなどのメディエーターとして作用することを示している。TRAP複合体のうち、TRAP220/230(DRIP205)がLXXLLモチーフを介して核内受容体に結合するインターフェイスの役割を果たすと推定されている。

3) TF2C-type TRRAP/GCN5 複合体²⁾

TF2C-type TRRAP/GCN5複合体はエストロゲン受容体 α (ER α)のC末ドメインにリガンド依存性に結合する共役因子複合体として単離されたもので、VP16やc-Mycによる転写活性化のコアクチベーターとして報告されたGCN5(HAT活性をもつ)やTRRAP, さらに、TAFなどの転写因子も含まれている。

核内レセプターとの結合をCBPを中心とした複合体とDRIP複合体が競合することから、multistep modelが提唱されている¹⁾。すなわち、CBPを中心とした複合体がまず、核内受容体に結合し、HAT活性により、クロマチン構造をゆるめた後、DRIP複合体が結合し、あるいは両者が交互に結合し、基本転写装置へシグナルを伝えるというものである(図2)。

4) WINAC(WSTF including nucleosome assembly complex)複合体³⁾

最近、ATP依存性のクロマチンリモデリング活性をもつ複合体として、WINACが同定された。ビタミンD受容体(VDR)に結合する複合体として単離されたWINAC複合体はWilliams症候群の原因遺伝子であるWSTF(Williams syndrome transcription factor)を中心にSW1/SNF型のATPase(Brg1, hBrm)やDNA複製に関係する因子など少なくとも13の蛋白質から構成されている。WINACはリガンド非依存性にVDRをプロモーター上のVDR結合部位(VDRE)にリクルートし、その後、リガンドが結合すると、HAT活性をもつ共役因子群がリクルートされると考えられている。

Williams症候群は常染色体優性遺伝の疾患で、大動脈弁上狭窄、妖精様顔貌、知的障害を示す疾患で特発性高カルシウム血症などを伴うが、以上のような知見から、KitagawaらはWilliams症候群をChromatin-remodeling diseaseと位置付けている³⁾。

核内ホルモン受容体異常症の成因論

核内ホルモン受容体異常症はリガンド結合から転写開始に至る様々の段階の障害で起こり得るわけで、受容体の構造異常による受容体そのものの機能不全あるいは機能亢進、異常受容体が正常受容体の機能を阻害するドミナントネガティブ(dominant negative)効果、あるいはほかの核内蛋白の機能を阻害する可能性、リガンド結合により活性化された受容体に結合する共役因子に異常があるもの、さらに、核内構造を規定する因子の異常など高次機能の障害によるものなどが考えられる。

1. 受容体の構造異常に起因するもの

1) 異常受容体自身の機能不全および機能亢進

核内受容体の構造異常に起因する核内受容体異常症の代表はステロイドホルモン不応症であり、アンドロゲン受容体(AR)異常によるアンドロゲン不応症(睾丸女性化症)、グルココルチコイド受容体(GR)異常による原発性グルココルチコイド抵抗症、エストロゲン α 受容体(ER α)異常による骨量減少症、ミネラルコルチコイド受容体異常による常染色体優性遺伝型の偽性低アルドステロン症 I 型、ビタミン D 受容体異常による II 型ビタミン D 抵抗症が報告されている。一方、リガンドが特定されていないオーファン受容体による異常症も見いだされている。Dosage sensitive sex reversal(DSS)の原因遺伝子であり、X 染色体上にある DAX-1 の異常により伴性劣性遺伝形式の低ゴナドトロピン性性腺機能低下症を伴う先天性副腎低形成を発症する。副腎・性腺の発生、分化に必須の転写因子である Ad 4 BP/SF-1(steroidogenic factor-1)はノックアウトマウスの成績ではヘテロ接合体は正常であり、ヘテロでの何らかの異常の発症は予測されていなかった。しかしながら、SF-1 のヘテロの遺伝子変異により、46 XY の核型で表現型は女性(XY sex reversal)、原発性副腎不全、非常に未熟な精巣をもった症例が報告された⁹⁾。そのほか、核内受容体異常症ではないが、副腎、性腺異常と関係するものとして、SRY 様 HMG(high mobility group; DNA 結合領域)ボックス遺伝子の SOX 9 の変異はヒトの XY sex reversal と骨格奇形(campomelic dysplasia)をきたす。粘膜皮膚カンジダ症、副甲状腺機能低下症、副腎不全を三主徴とし常染色体劣性遺伝を示す多腺性自己免疫症候群 1 型の原因遺伝子として、AIRE

(autoimmune regulator)が同定された。早期卵巣不全(premature ovarian failure)の原因としてフォークヘッド型転写因子である FOXL 2 の変異が見いだされた。

2) 異常受容体による dominant negative 作用

甲状腺ホルモン受容体(TR)には TR α 、TR β の 2 種が存在し、現在のところ、TR β の異常による甲状腺ホルモン不応症が報告されている。この不応症の多くは常染色体優性遺伝形式を示し、変異遺伝子のヘテロ接合体で発症し、異常 TR β が正常 TR β の機能を障害する dominant negative 作用によるものと考えられている。NCoR や SMRT などの corepressor の異常 TR β からの解離や異常 TR β への SRC-1 のリクルートが障害されることも報告された⁹⁾。成人発症で進行性の球筋、四肢近位筋の萎縮を主徴とする運動ニューロン疾患である伴性劣性球脊髄性筋萎縮症では AR の N 末のグルタミン酸をコードする CAG の反復数が正常の 2 倍以上に増加しており、この変異 AR がほかの核内蛋白の機能障害を起こしていることが推定されている。GR 遺伝子変異(Ile 559 \rightarrow Asn)のヘテロ接合体でグルココルチコイド抵抗症を発症した例では変異 GR が正常 GR の細胞質から核内への移行を dominant negative 効果で抑制することが示された¹⁰⁾。転写因子のなかでも形態形成と分化に関与するものはその量が精微に調節されている。また、1 つの転写因子が複数の局面で利用されている。したがって、ヒトの 2 つの染色体上の遺伝子のうち片方が機能不全になっても絶対量が不足して症状が出現してしまう(haplo-insufficiency)。CBP などはこのような表現型を示す。また、dominant negative 効果や haplo-insufficiency を示すものは優性遺伝形式をとることになる。

2. 共役因子異常に起因するもの

1) コアクチベーター病(coregulator-related diseases)としてのアンドロゲン不応症

アンドロゲン不応症 AIS(androgen insensitivity syndrome)は遺伝的性は男性(46 XY)であるが、アンドロゲン作用機構の障害により男性化障害を呈する疾患で、ステロイドホルモン不応症では最も多い疾患である。男性化障害の強い順に完全型、不完全型、Reifenstein 症候群、男性不妊症などに分類される。しかしながら、臨床的かつ内分泌学的検査成績から AIS と診断されるにもかかわらず AR に全く異常を認めない症例が存在し、このような症例の病因とし

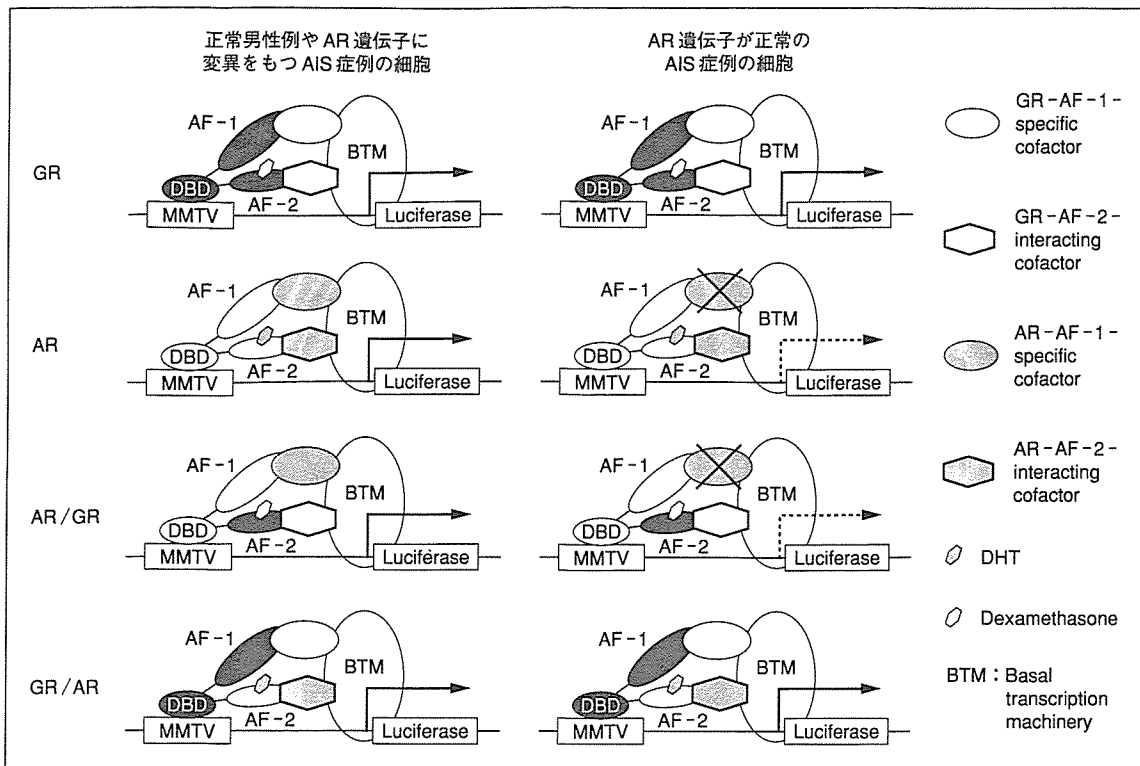


図3 正常男性、ARに異常のないAIS患者、ARに異常をもつAIS患者の培養皮膚線維芽細胞に導入した正常AR、GR、ARとGRのキメラによるリガンド依存性転写活性化能の比較

て、受容体から基本転写装置へのシグナル伝達系の異常が推定される。われわれはこのようなAISの1例を解析した結果、ARのAF-1領域、すなわち、細胞特異的発現を担う領域と相互作用するcofactorの異常が示唆された症例を経験した⁷⁾。本患者のアンドロゲンの結合活性は正常で、リガンド依存性核内移行も正常であった。そこで、培養皮膚線維芽細胞にルシフェラーゼレポーターベクターとともに正常のARあるいはGRの発現ベクターを導入すると、GRのリガンド依存性転写活性化能は患者と正常対照の細胞間で差がなかったが、ARのリガンド依存性転写活性化能は患者の細胞において有意に低下していた(図3)。また、AR遺伝子の異常によるAIS患者の細胞ではARのリガンド依存性転写活性化能は正常対照と同程度であった。ARとGRのAF-1、AF-2をお互いに入れ替えたキメラ蛋白の転写活性化能を測定すると、N端がAR、リガンド結合領域がGRであるキメラ、AR/GRキメラ受容体のデキサメサゾンによるリガンド依存性転写活性化能は正常と比較して患者の細胞で有意に低下していた。すなわち、本患者ではARの

AF-1に由来する転写活性化に障害が存在することが強く示唆された。また、SRAを含めて、既知の共役因子では転写活性の回復は認められなかった。また、GST pull-down assayによりARのAF-1に特異的に結合する蛋白が本症例では欠損していた。本患者は以上のようにARのAF-1と特異的に直接的あるいは間接的に相互作用する共役因子の機能異常が推定され、本症例はステロイド不応症の中でコアクチベーター病という新しい概念を提唱するものである⁷⁾。

2) Rubinstein-Taybi (RTS) 症候群

共役因子病としては、種々の奇形(低身長、頭蓋・顔面奇形、心奇形)と精神発達遅滞を呈するRubinstein-Taybi症候群でCBP遺伝子の異常が報告されたものが最初であり、CBPを含む領域の消失例やCBP遺伝子の点突然変異例のヘテロ接合体で発症しているが、dominant negative作用ではなく、正常CBP遺伝子の量的な不足が原因であると推定されている⁸⁾。CBPのヘテロ欠損マウスは手指骨、頭蓋骨、肋骨の形成異常を認め、RTSに類似の骨異常を示した。しかしながら、ホモのノックアウトマウスは

RTS にみられる心奇形を示さなかったことから⁹⁾、心奇形に関しては変異 CBP による dominant negative 効果が推定されている。また、RTS 患者の約 20% にしか CBP 遺伝子異常が認められないことも報告されており、RTS の原因として CBP 以外の遺伝子異常の存在が推測されている¹⁰⁾。

3) 複合ホルモン不応症 (multiple hormone resistance)

グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、アンドロゲンに抵抗性だが、ビタミン D、甲状腺ホルモンに対する不応は認められない姉妹例が報告された¹¹⁾。血中のコルチゾールは高値だが、Cushing 徴候を示さず、また、血中のアンドロゲンレベルは男性のレベルであるが、男性化徴候を認めず、これらの複数の受容体に共通のコアクチベーターの異常が強く推定され、既知の共役因子の異常の有無が検索されたが、現時点まで異常は同定されていない。

4) Reftoff 症候群

現在常染色体遺伝形式を示しながら TR α や TR β に異常を認めない家族発症の甲状腺ホルモン不応症例も報告されており¹²⁾、これらの症例では共役因子群を含めたポスト受容体障害の存在が推定されているが、その実体は明らかでない。SRC-1 のノックアウトマウスは部分的なホルモン抵抗性を示し、特に下垂体・甲状腺系の negative feedback 調節機構を阻害し、甲状腺ホルモン抵抗性を示すことが示されたが¹³⁾、臨床例での SRC-1 の変異は報告されていない。

5) X 連鎖性の痴呆を伴う甲状腺機能低下症 (X-linked male dementia and hypothyroidism)

TRAP 230 のホモのノックアウトマウスは胎生致死であるが、ヘテロのノックアウトマウスは成長障害や下垂体性の甲状腺機能低下症を呈することが示された¹⁴⁾。TRAP 230 の CAG repeat 内の変異が X-linked male dementia and hypothyroidism に関連することが遺伝子疫学的に示され¹⁵⁾、本症の原因として、TRAP 230 遺伝子異常が推定されている。

核内構造と転写調節

1. ステロイドホルモン受容体の核内コンパートメント

主として、生化学的解析により、共役因子や基本転写因子の構造決定、作用が明らかにされてきたが、遺伝子転写は核内の複雑な機能と相関した構造変化によ

っても制御されていることが近年の画像研究法の進歩によって明らかにされつつある。以前より転写が不活性化されている領域は DNA の凝集した heterochromatin、転写が活発に行われている領域は euchromatin という比較的 DNA 凝集の少ない領域であることが知られている。最近の研究では活性の遺伝子を heterochromatin 領域に組み込むと転写が不活性化されることが明らかとなり、核内の部位に依存した転写の制御機構の存在が確認されている。よく知られている核内構造は核小体であり、リボゾーム RNA 合成部位である。また、遺伝子転写によって合成された pre-mRNA の splicing は特定の領域 (compartment) で行われており splicing factor compartment (SFC) と呼ばれ核内容積の 20% を占めている。蛍光蛋白が広く生物学の研究に応用されるに至って、共役因子群と結合し、転写的に活性化されたステロイドホルモン受容体は speckles あるいは foci と呼称される compartment を形成することがここ数年の間に明らかにされた。高精細三次元画像法による解析 (図 4 A) ではこれらは euchromatin 領域で SFC とは異なった compartment を占めること、さらに、AR, GR, ER α はコアクチベーターとともに同一の foci に集積されることが明らかになった^{16,17)}。このような核内の compartment は細胞質のオルガネラのように形質膜で境界されているわけではないのにいかにして特定の領域を維持できるのかは不明であったが、最近の FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) 法により興味深い事実が明らかになった。すなわち、蛍光蛋白標識した核内蛋白を細胞に導入し、強いレーザー光により蛍光を消滅させた後の、その部位への蛍光蛋白の回復を測定した結果、秒の単位で回復することが明らかになった^{18,19)}。また、この回復現象はグルココルチコイド受容体やエストロゲン受容体でも観察された²⁰⁾。すなわち、核内の compartment を構成する分子は静止しているのではなく、非常に早い速度で拡散と集合を繰り返しており、特定の分子群が一定の steady-state の状態を現出している結果、compartment を形成していることになる。

2. リアルタイムイメージングによる AIS 病態の解析

上述のような解析を応用することにより、以前、AR の DNA 結合領域に変異をもつ AIS においてその病態は核内の標的遺伝子への結合障害と推定されていたものが、実は細胞質の特定の部位への滞留による