

図4 アンドロゲン受容体(AR)-蛍光蛋白キメラの核内分布の三次元画像解析と変異型 AR-C579 F の細胞内分布

DHT 添加後 30 分以内に野生型 AR は核内に移行し多数の speckle を形成するが(A: 3 次元画像, アンドロゲン受容体分布と核クロマチン構造, AR-GFP は核内に約 300 個の独立した speckle として検出, B: 2 次元画像), DNA 結合領域に変異をもつ AR-C579 F は細胞質に粗大な dot を形成して滞留する(C). 長時間経過すると核内へ移行するが, 形成された dot の数は少ない(D).

核内への移行障害であることが明らかになった。症例は完全型 AIS で, AR の DNA 結合に必須である Zn フィンガーモチーフの Zn を配位する 579 番目のシステインがフェニルアラニンに置換していた(AR-C579 F)(図 1)。レポーターアッセイでは全く転写活性化能を欠いていた。AR と蛍光蛋白 GFP との融合蛋白(AR-GFP)を細胞内で発現させて, 共焦点レーザー顕微鏡下で観察すると, 野生型 AR は, リガンド(DHT)処理後は速やかに核内に移行して, 核内で細かい foci を形成した(図 4 A, 4 B)。一方, AR-C579 F は, DHT を加えると, まず細胞質に大きな dot を形成し(図 4 C), その後長時間観察する

と, 次第に核内にも dot を認めるようになったが(図 4 D), 変異型 AR の核内 dot の数は, 野生型 AR の dot 数と比べて明らかに減少していた。さらに, FRAP 解析では, 核内での mobility も低下していることが示唆された。このような細胞内に dot を形成する理由として, AR の構造変化に基づく misfolding による凝集が原因である可能性がある。転写因子の研究は従来の生化学的研究が進展する一方, このような生細胞のリアルタイムの観察による研究も生理的あるいは病的な意義を解明する研究法として有用である。

## おわりに

核内受容体を例とした転写制御機構の研究の進展により、従来ポスト受容体障害というブラックボックスのなかに分類されていた疾患の実体が明らかにされつつある。また、これらの新知見はさらなる病態の解明とともに新しい治療薬や治療法の開発へと発展することが期待される。

### 文 献

- 1) Ito M, Roeder RG : The TRAP/SMCC/Mediator complex and thyroid hormone receptor function. *Trends Endocrinol Metab* 12 : 127-134, 2001
- 2) Yanagisawa J, Kitagawa H, Yanagida M, et al : Nuclear receptor function requires a TFTC-type histone acetyl transferase complex. *Mol Cell* 9 : 553-562, 2002
- 3) Kitagawa H, Fujiki R, Yoshimura K, et al : The chromatin-remodeling complex WINAC targets a nuclear receptor to promoters and is impaired in Williams syndrome. *Cell* 113 : 905-917, 2003
- 4) Achermann JC, Ito M, Ito M, et al : A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22 : 125-126, 1999
- 5) Safer JD, Cohen RN, Hollenberg AN, et al : Defective release of corepressor by hinge mutants of the thyroid hormone receptor found in patients with resistance to thyroid hormone. *J Biol Chem* 273 : 30175-30182, 1998
- 6) Kino T, Stauber RH, Resau JH, et al : Human GR mutant has a transdominant negative effect on the wild-type GR by inhibiting its translocation into the nucleus ; importance of the ligand-binding domain for intracellular GR trafficking. *J Clin Endocrinol Metab* 86 : 5600-5608, 2001
- 7) Adachi M, Takayanagi R, Tomura A, et al : Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N Engl J Med* 343 : 856-862, 2000
- 8) Petrij F, Giles RH, Dauwerse HG, et al : Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. *Nature* 376 : 348-351, 1995
- 9) Yao TP, Oh SP, Fuchs M, et al : Gene dosage-dependent embryonic development and proliferation defects in mice lacking the transcriptional integrator p300. *Cell* 93 : 361-372, 1998
- 10) Petrij F, Dauwerse HG, Blough RI, et al : Diagnostic analysis of the Rubinstein-Taybi syndrome ; five cosmids should be used for microdeletion detection and low number of protein truncating mutations. *J Med Genet* 37 : 168-176, 2000
- 11) New MI, Nimkarn S, Brandon DD, et al : Resistance to several steroids in two sisters. *J Clin Endocrinol Metab* 84 : 4454-4464, 1999
- 12) Weiss RE, Hayashi Y, Nagaya T, et al : Dominant inheritance of resistance to thyroid hormone not linked to defects in the thyroid hormone receptor alpha or beta genes may be due to a defective cofactor. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 4196-4203, 1996
- 13) Weiss RE, Xu J, Ning G, et al : Mice deficient in the steroid receptor co-activator 1 (SRC-1) are resistant to thyroid hormone. *EMBO J* 18 : 1900-1904, 1997
- 14) Ito M, Yuan CX, Okano HJ, et al : Involvement of the TRAP 220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell* 5 : 683-693, 2000
- 15) Philibert RA, King BH, Winfield S, et al : Association of an X-chromosome dodecamer insertional variant allele with mental retardation. *Mol Psychiatry* 3 : 303-309, 1998 (Erratum in : *Mol Psychiatry* 4 : 197, 1999)
- 16) Tomura A, Goto K, Morinaga H, et al : The subnuclear three-dimensional image analysis of androgen receptor fused to green fluorescence protein. *J Biol Chem* 276 : 28395-28401, 2001
- 17) Saito M, Takayanagi R, Goto K, et al : The presence of both the amino- and carboxyl-terminal domains in the androgen receptor is essential for the completion of a transcriptionally active form with coactivators and intranuclear compartmentalization common to the steroid hormone receptors : A three-dimensional imaging study. *Mol Endocrinol* 16 : 694-706, 2002
- 18) McNally JG, Muller WG, Walker D, et al : The glucocorticoid receptor ; rapid exchange with regulatory sites in living cells. *Science* 287 : 1262-1265, 2000
- 19) Phair RD, Misteli T : High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature* 404 : 604-609, 2000
- 20) Stenoien DL, Patel K, Mancini MG, et al : FRAP reveals that mobility of oestrogen receptor-alpha is ligand- and proteasome-dependent. *Nat Cell Biol* 3 : 15-23, 2000
- 21) 河手久弥, 呉 茜, 大中佳三, 他 : DNA 結合ドメインの変異により, アンドロゲン受容体の核移行障害, 核内局在障害および核内での mobility の低下を認めたアンドロゲン不応症の2例. ホと臨床 52(増刊号), 2004(印刷中)

# スタチンとBMP

大中 佳三\* 高柳 涼一<sup>\*1)</sup>

骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein ; BMP) は未分化な間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させ、骨形成を促進するサイトカインである。HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチンが BMP-2 を増加させ、骨形成を促進することが報告され、骨粗鬆症治療薬の候補として注目されている。スタチンによる BMP-2 発現増加の細胞内メカニズムの1つとして Rho/Rho-kinase 系の抑制の関与が考えられる。

## *Statin and BMP*

*Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyusyu University*

*Keizo Ohnaka, Ryoichi Takayanagi*

Bone morphogenetic proteins (BMP) are cytokines that promote differentiation of mesenchymal stem cells into differentiated osteoblasts and bone formation. Recently, HMG-CoA reductase inhibitors (statins) emerged as a candidate for the treatment of osteoporosis, because they stimulate BMP-2 expression and bone formation. Inhibition of Rho/Rho-kinase pathway may be involved in statin effect on bone formation.

### はじめに

骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein ; BMP) は骨芽細胞の分化を促進し、異所性の骨形成を引き起こすサイトカインである。最近 HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A) 還元酵素阻害剤であるスタチンが BMP-2 を増加させ骨形成を促進することが報告され、骨粗鬆症治療薬の候補として注目されている。本稿では

スタチンと BMP について最近の知見を述べる。

### 骨形成蛋白 (BMP)

1965年、Urist は<sup>1)</sup> 酸脱灰した骨基質を筋肉内へ移植し、異所性の軟骨・骨形成が誘導されることを見いだした。のちに骨基質中に存在し、軟骨・骨誘導能を有する蛋白性因子を骨形成蛋白 (BMP) と命名した。1988年 Wozney らによりヒト BMP-2 と BMP-4 がクローニングされ、現在ま

\* Keizo Ohnaka, Ryoichi Takayanagi 九州大学大学院医学研究院老年医学 <sup>1)</sup> 教授

でに十数種の BMP の存在が報告されている。BMP の主な作用は未分化な間葉系幹細胞の骨芽細胞, 軟骨細胞, 筋肉, 脂肪細胞への分化を調節することである<sup>2)</sup>。BMP は未分化な間葉系幹細胞を骨芽細胞へ分化させ, 骨形成を促進する。また筋肉への分化を抑制する。脂肪細胞への分化は促進, 抑制の両方が報告されており, 使用される細胞により異なる。BMP による骨芽細胞への分化過程では転写因子 Runx2/Cbfa1 が重要で, BMP が受容体に結合した後のシグナル伝達分子である Smad が Runx2/Cbfa1 と結合し, 標的遺伝子の転写を調節すると考えられる。BMP のうち, BMP-2, BMP-4, BMP-6, BMP-7 は骨芽細胞の分化, 骨形成を促進するが, その作用の程度は種や細胞により異なる。BMP-3 は骨芽細胞の分化をむしろ抑制する。

## スタチンと BMP-2

1999 年 Mundy ら<sup>3)</sup> は BMP-2 遺伝子のプロモーターをルシフェラーゼの上流に組み込んだ

アッセイ系を用いて, BMP-2 遺伝子の発現を増加させる物質のスクリーニングを行い, 3 万種以上の天然・合成物質の中から, スタチンの 1 つであるロバスタチンがその作用を有することを見いだした。ほかのスタチン(シンバスタチン, メバスタチン, フルバスタチン)でも同様の活性が認められた。実際にシンバスタチンはヒト骨芽細胞株 MG-63 で BMP-2 mRNA の発現を特異的に促進し(BMP-4 mRNA の発現には影響せず), BMP-2 蛋白産生を増加させた。またスタチンは, マウス頭蓋冠の器官培養系にて新生骨の形成を促進した。さらにラットの骨粗鬆症モデルにおいてシンバスタチンが骨量増加作用のあることを報告した。

スタチンの作用に関して, Sugiyama ら<sup>4)</sup> はヒト骨肉腫由来細胞株 HOS 細胞においてコンパクチンとシンバスタチンは BMP-2 の発現を促進するが, 親水性スタチンであるプラバスタチンにはその作用がないと報告した。Maeda ら<sup>5)</sup> はシンバスタチンがマウスの前骨芽細胞株である MC3T3-

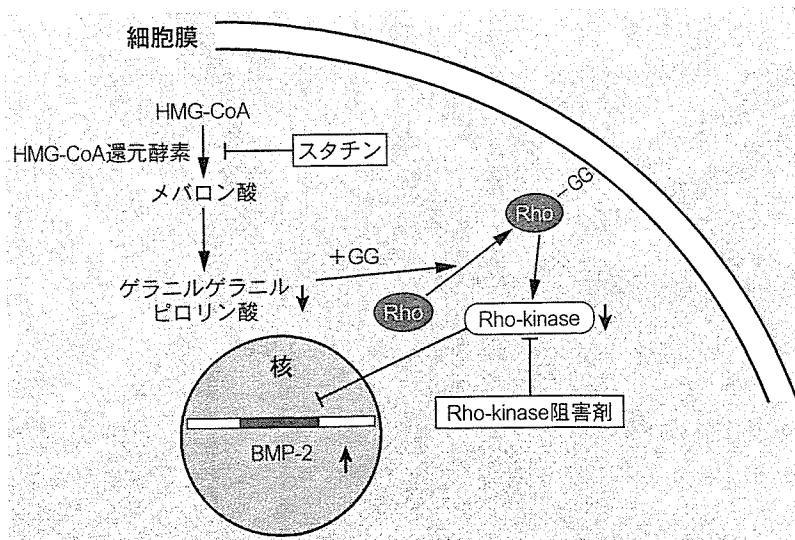


図1 骨芽細胞でのスタチンによる BMP-2 の発現調節 (仮説)

Rho/Rho-kinase 系は BMP-2 の発現を抑制的に調節し, スタチンはこれを阻害して BMP-2 の発現を増加させる。

E1細胞でBMP-2の発現を増加させ、細胞分化とmineralizationを促進することを認めている。またPhillipsら<sup>6)</sup>はコンパクトチンが胚性幹細胞から骨芽細胞への分化を促進し、BMP-2の発現増加を伴うことを報告した。

筆者ら<sup>7)</sup>はヒト骨芽細胞初代培養系を用いて新規スタチンであるピタバスタチンの骨芽細胞に対する作用について検討を行った。1 $\mu$ Mのピタバスタチンにより培養ヒト骨芽細胞のBMP-2 mRNA発現は約2.7倍に増加し、オステオカルシンのmRNA発現は10倍に増加した。オステオカルシンは成熟した骨芽細胞で産生される非コラーゲン性の蛋白で、骨形成のマーカーとして知られる。スタチンがBMP-2の産生を増加して、骨芽細胞の分化を促進することを支持する結果である。ピタバスタチンによるBMP-2やオステオカルシンの発現促進はメバロン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸(geranylgeranylpyrophosphate; GGPP)の添加により抑制されたが、種々の細胞内情報伝達系阻害剤では影響を受けず、この作用はメバロン酸経路の阻害によるものと考えられた。スタチンはメバロン酸経路を阻害してコレステロールの合成を低下させるが、イソプレノイド中間体の合成も阻害する。イソプレノイドはRasやRhoなどの低分子GTP(guanosine 5'-triphosphate)結合蛋白のプレニル化に重要である。ピタバスタチンは培養ヒト骨芽細胞でリゾホスファチジン酸(LPA)によるRho A蛋白の膜への移行を阻害した。さらに、Rhoの下流の標的分子の1つであるRho-kinase活性を抑制した。実際、Rho-kinaseの特異的阻害剤をヒト骨芽細胞初代培養系に添加すると、スタチンと同様にBMP-2やオステオカルシンの発現を促進した。すなわち、Rho/Rho-kinase系はBMP-2発現を抑制的に調節しており、スタチンによる骨形成促進の細胞内

メカニズムの1つとしてRho/Rho-kinase系の抑制の関与が考えられる(図1)。スタチンによる骨形成促進作用に関してほかのメカニズムの関与があるのか、今後さらなる検討が必要であろう。

## ■ おわりに

スタチンとBMPについて、自験成績を含めて概説した。

## 文 献

- 1) Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899, 1965
- 2) Yamaguchi A, Komori T, Suda T: Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev* 21: 393-411, 2000
- 3) Mundy G, Garrett R, Harris S et al: Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins. *Science* 286: 1946-1949, 1999
- 4) Sugiyama M, Kodama T, Konishi K et al: Compactin and simvastatin, but not pravastatin, induce bone morphogenetic protein-2 in human osteosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 271: 688-692, 2000
- 5) Maeda T, Matsunuma A, Kawane T et al: Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 280: 874-877, 2001
- 6) Phillips BW, Belmonte N, Vernochet C et al: Compactin enhances osteogenesis in murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 478-484, 2001
- 7) Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H et al: Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of Rho-associated kinase in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 287: 337-342, 2001

## ホルモン補充による抗加齢療法

河手久弥 高柳涼一

### ● はじめに

急速に高齢化社会が進むなかで、どうすれば老化のスピードを抑え、健康で活動的に生活できる健康寿命を延長できるかということに人々の興味が集まってきている。老化を促進する原因の一つとして、加齢に伴う性ホルモンや成長ホルモンなどの産生量の低下があげられる。これらの低下したホルモンを外から補充すれば、老化を食い止めることができるのではないかという考えのもとに、従来内分泌機能低下症患者に対する治療目的で行われてきたホルモン補充療法 (hormone replacement therapy : HRT) を、抗加齢目的で使用する試みが欧米を中心に盛んに行われてきた。実際にエストロゲンは抗動脈硬化作用や抗高脂血症作用があることが証明されており、生活習慣病の予防効果が期待されていた。ところが、最近の大規模臨床研究の結果から、HRTを受けている群は、受けていない群と比較して、乳癌・脳卒中などの発症率が有意に高いという報告が相次ぎ、また冠動脈疾患の予防に関しても期待されていた効果が得られず、抗加齢療法としてのHRTは、現在岐路に立たされている。

### ● エストロゲン

閉経に伴うエストロゲン欠乏に起因する更年期障害に対して、エストロゲン単独あるいはエストロゲンとプロゲステロンの併用によるHRTは、著明な改善効果を認める。また女性ホルモンの抗動脈硬化作用および抗高脂血症作用が証明され、さらに複数の観察研究の結果から、HRTを受けている人は冠動脈疾患の発症率が低いという報告がなされた。このため閉経後女性のQOL (quality of life) 向上と冠動脈疾患の予防のためにHRTを受ける人は増え続け、1990年代後半は、欧米を中心に約2,000万人がHRTを受けていた<sup>1)</sup>。ところが最近のHRTに関す

る長期にわたる大規模前向き臨床試験の結果から、HRT施行群において乳癌・脳卒中・静脈血栓症の発生頻度が有意に高いことが明らかになった(図1)<sup>1)~3)</sup>。また、期待された冠動脈疾患の予防効果は認められなかった<sup>4,5)</sup>。HRT投与群では、骨量増加と大腸癌の発症率低下というベネフィット(利益)はあるものの、乳癌などのリスク(危険)が上回るために、複数のHRTの臨床試験は予定期間より早く中断された。これらの臨床試験に用いられた薬剤は、ほとんどがエストロゲン0.625mg+酢酸メドロキシプロゲステロン2.5mgの併用であるが、最近ではエストロゲン単独でも脳卒中の発症率が増加していることが報告された<sup>6)</sup>。以上の結果を踏まえて、冠動脈疾患の予防目的でのHRTは行うべきではないという結論に至っている。更年期障害の治療にはHRTが必要なため、今後はHRTのリスクとベネフィットをよく考慮して、患者に対して十分な説明を行い、補充療法を行うかどうかについての慎重な判断が求められる。また日本人に合った投与方法についても十分検討される必要がある。

### ● テストステロン

テストステロンは加齢とともに漸減し、中高年以降の男性では、筋力低下、骨量減少、性欲減退、インポテンツ、記憶力低下、幸福感の低下などの多彩な症状を呈することから、PADAM (partial androgen deficiency in aging male) という概念が提唱され、男性更年期障害の意味で用いられている<sup>7)</sup>。テストステロンの補充は、筋力増強、骨量増加、性欲・性機能の改善をもたらすことが報告され、欧米では補充療法を受ける人の数が急激な伸びをみせている<sup>8,9)</sup>。しかしながらテストステロン補充療法の効果に関しては、大規模臨床研究に基づく評価がされておらず、また前立腺癌などの副作用が懸念されているため、

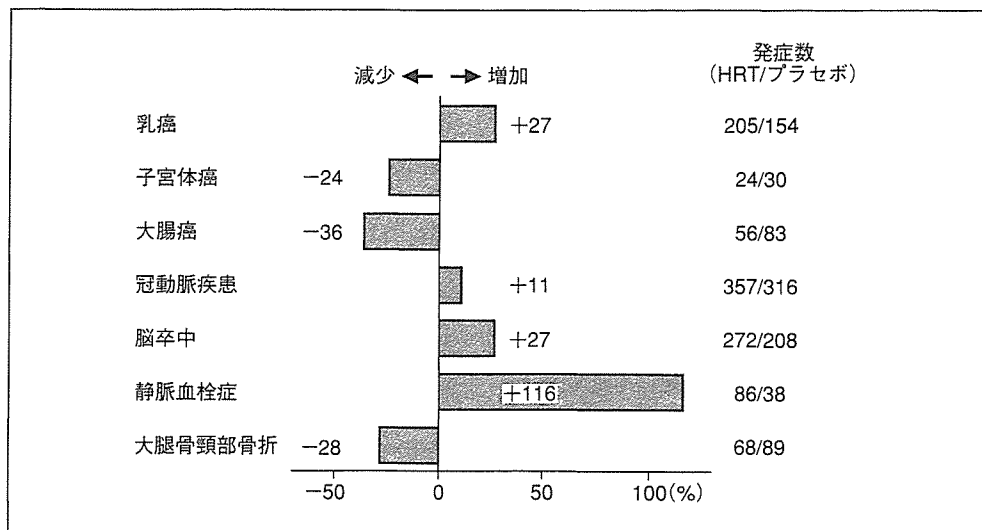


図1 プラセボ群と比較した HRT 群における各疾患の発症頻度 (文献1を改変)  
 対象数: HERS 2,763 人, EVTET 140 人, WEST 664 人, WHI 16,608 人。  
 HERS: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study, EVTET: Estrogen in Venous Thromboembolism Trial, WEST: Women's Estrogen for Stroke Trial, WHI: Women's Health Initiative

その早急な検討が望まれる。

本邦でのテストステロン補充療法はデポ剤の筋肉注射が一般的であるが、欧米では経皮的投与（ゲル製剤、パッチ製剤）も広く用いられている。補充療法を開始する前に、諸症状が血中テストステロン濃度の低下に起因することを確認し、前立腺癌・前立腺肥大症・多血症・心機能低下などの可能性を否定したうえで投与を開始する。また投与中も腫瘍マーカーである PSA (prostate specific antigen) を定期的に測定し、前立腺癌の早期発見に努める必要がある。

### ● DHEA

副腎の網状層から分泌されるデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) およびその硫酸塩 DHEA-sulfate (DHEA-S) は副腎アンドロゲンと呼ばれ、その血中濃度は 20~30 歳代をピークに直線的に低下する。米国における長期縦断追跡研究や動物実験の結果から、長寿と血中 DHEA-S 濃度が相関することが示されて、抗加齢ホルモンとしてますます注目を集めている<sup>10)</sup>。また動物実験においては、抗糖尿病作用、抗動脈硬化作用、抗骨粗鬆症作用、免疫賦活作用などを認め、ヒトにおいても生活習慣病を防止することが期待されている。DHEA 補充の有効性に関しては、Yen ら<sup>11)</sup>が 50 mg/日の DHEA を 6 ヶ

月間連続投与した場合の sense of well being (幸福感) の改善を報告している。しかしながら、DHEA による抗加齢療法の評価は必ずしも一定しておらず、今後の大規模臨床試験による DHEA 補充の抗加齢効果およびリスクの評価が望まれる。

DHEA はサプリメントとして比較的容易に入手することができるが、なかにはその純度の問題のあるものも含まれている。DHEA はホルモンであるため、服用開始時には、血中ホルモン濃度の測定および前立腺癌などの腫瘍の有無の検索が必要である。

### ● 成長ホルモン

成長ホルモン (GH) の分泌も加齢とともに低下する。また成人 GH 分泌不全症では、通常の老化と類似した症状が認められることから、GH も抗加齢ホルモンと考えられている。

1990 年の Rudman の報告<sup>12)</sup>では、GH によって分泌が促進されるインスリン様増殖因子 (IGF-I) の血中濃度が低い高齢者に対して、GH の投与を 6 ヶ月間続けたところ、lean body mass (除脂肪体重) の増加、体脂肪の減少、骨密度の増加などの効果を認めた。しかしながら、その後の多数の GH の臨床試験において、体組成の変化は認めるものの、はっきりした機能改善を示す結果は得られていない<sup>13)</sup>。抗加齢目的の GH 補充療法は、欧米を中心にかなり普

及しているが、GHの抗加齢効果やその副作用（腫瘍の増殖、老人性疣贅の増加など）については臨床的に十分な評価がされているとはいえ、今後さらなる検討が必要である

#### ● ホルモン補充療法施行にあたっての注意点

日本人の死因の上位を占める生活習慣病の予防が、老化を抑えるいちばんの近道であるが、そのためには、まず食生活、運動習慣や禁煙などのライフスタイルを改善することが最も重要である。まずこれらを実践した後に、ホルモン補充療法を考慮すべきである。

米国ではGHやDHEAなどのホルモンが、サプリメントとして供給されているため、個人輸入が可能である。医療機関を受診せずにこれらを安易に服用している場合も多いと考えられる。

ホルモン補充療法の開始にあたっては、医療機関において詳細な内分泌学的検査、腫瘍や前立腺肥大などホルモン投与が不利益になる疾患の有無を評価して、個人に合った抗加齢療法を指導・実践していく必要がある。以下にホルモン補充療法施行にあたっての主な注意点をあげる。

- 1) 投与前の十分な検査（特に血中ホルモン濃度）。
- 2) 悪性腫瘍（乳癌・前立腺癌）などの投与前評価。
- 3) 個人のリスク/ベネフィットの評価。
- 4) 患者に対する十分な説明、最新情報の提供（特にリスクに関して）。
- 5) 投与後の定期的なフォローアップ。
- 6) 大規模臨床試験の結果などに関する最新情報の収集。

#### ● おわりに

ホルモン補充による抗加齢療法に関しては、未だ

にその評価が確立していないものが多い。ホルモン補充療法の評価に関しては、現時点では欧米のデータに頼っているのが実状である。日本と欧米諸国では、遺伝的背景や生活習慣が異なるため、欧米での結果が必ずしもそのまま日本人に当てはまるわけではない。今後はわが国独自の大規模臨床試験において、日本人に適したホルモン補充療法を模索していく必要がある。

#### 文献

- 1) Beral V, Banks E, Reeves G. Lancet 2002 ; 360 : 942-4.
- 2) Chlebowski RT, Hendrix SL, Langer RD, Stefanick ML, Gass M, Lane D, et al. JAMA 2003 ; 289 : 3243-52.
- 3) Li CI, Malone KE, Porter PL, Weiss NS, Tang MT, Cushing-Haugen KL, et al. JAMA 2003 ; 289 : 3254-63.
- 4) Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, et al. N Engl J Med 2003 ; 349 : 523-34.
- 5) Hodis HN, Mack WJ, Azen SP, Lobo RA, Shoupe D, Mahrer PR, et al. N Engl J Med 2003 ; 349 : 535-45.
- 6) Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, et al. JAMA 2004 ; 291 : 1701-12.
- 7) 柳瀬敏彦. 臨床と研究 2003 ; 80 : 1855-8.
- 8) Rhoden EL, Morgentaler A. N Engl J Med 2004 ; 350 : 482-92.
- 9) Kim YC. Asian J Androl 2003 ; 5 : 339-44.
- 10) 高柳涼一, 柳瀬敏彦, 大中佳三, 名和田新. 治療学 2003 ; 37 : 1081-4.
- 11) Morales AJ, Nolan JJ, Nelson JC, Yen SS. J Clin Endocrinol Metab 1994 ; 78 : 1360-7.
- 12) Rudman D, Feller AG, Nagraj HS, Gergans GA, Lalitha PY, Goldberg AF, et al. N Engl J Med 1990 ; 323 : 1-6.
- 13) Vance ML. N Engl J Med 2003 ; 348 : 779-80.



ヒトからヒトへの感染症 — 血液由来感染症

## C 型 肝 炎 ウ イ ル ス

林 純\* 古 庄 憲 浩\*\*

## は じ め に

1989年にC型肝炎ウイルス(HCV)の抗体が測定可能になり、1992年にはこの抗体系が改良され、第二世代HCV抗体として、一般医療機関でも測定されるようになった。その結果、わが国は世界的にみてもHCVの感染率が高いことが判明した。さらに、一般医療機関で実際に診療する慢性肝疾患のうち60%はHCV感染によるもので、内訳としては慢性肝炎の50%、肝硬変の70%、肝癌の80%はHCV感染によるものであった<sup>1)</sup>。衛生教育・環境の整ってきている現在では、新たなHCV感染はほとんど無くなってきているが、すでに感染している者が癌年齢になることから、わが国では肝癌の著明な増加が想像されていた。実際、1970年頃、肝癌による年間死亡者数は約10,000人であったが、この30年間に3倍に増加し、現在では34,000人に達しており、悪性新生物の中では胃癌、肺癌とはほぼ肩を並べている。

本稿では、著者らが長期に継続調査を行っている福岡県H村および長崎県I郡の疫学的研究の成績を中心に、HCVの感染経路、肝炎発症、肝癌発症およびインターフェロン(IFN)療法について述べる。

## I. C型肝炎ウイルスについて

HCVのゲノムは約9.5kbの線状一本鎖RNAであることが判明しているが、HAVおよびHBVと異なりHCVのウイルス粒子は未だ分離されていないため、ウイルス由来の蛋白からおのこの遺伝子をゲノム上に求めることは出来ない。このため、推定アミノ酸配列の解析により、類似ウイルス(フラビウイルス、ペスチウイルス)のそれと比較することにより、構造蛋白・非構造蛋白遺伝子の位置が推定された。その結果、構造蛋白と

してコア蛋白、エンベロープ蛋白(糖蛋白)、非構造蛋白としてはNS1(糖蛋白)、NS2、NS3、NS4、NS5の蛋白が推定された。また、HCVのゲノムRNAの塩基配列をウイルス株間で比較すると、かなりの多様性がみられ、現在、主として1a型、1b型、2a型、2b型に分類されている。本邦では1a型は極めて少なく、HCV感染者の80%以上が1b型である<sup>2)</sup>。HCVのgenotypeはIFNの有効性の指標となり臨床的に重要である。

## II. 感 染 経 路

HCVの家族内感染については、多くの研究がなされている。母児間の感染率は約5%とされ、その際HCV RNA量の高い母親から感染するとされている。また、夫婦感染についても結婚期間に比例して、HCVの感染率が増加しており、その重要性を指摘する報告もあるが、HCVの遺伝子解析から約3%とされている。一方、感染機会の多い特殊浴場女性従業者では6.2%で、従業期間が長いほど陽性率は高くなっており、性行為によるHCVの感染が考えられた<sup>3)</sup>。

以上のことを踏まえて、本邦におけるHCVの主な感染経路を知るために、HCV抗体陽性率が高い福岡県H村(19.7%)<sup>4)</sup>および長崎県I郡(14.1%)<sup>5)</sup>において疫学的検討を行った。福岡県H村ではHCV RNA陽性母親の子供のHCV抗体陽性率は17.8%と高率であったが、彼らの平均年齢は43.8±3.3歳であり、住民の40歳代の15.4%と比較して差はみられなかった。さらに、両地区とも、19歳以下の住民にはHCV抗体陽性例は1例も存在しておらず、母児間感染が主流とは考えられなかった。

夫婦間感染についてみると、福岡県H村ではHCV RNA陽性女性の夫のHCV抗体陽性率は34.8%で、HCV RNA陽性男性の妻のHCV抗体陽性率は22.2%であった。その平均年齢は、それ

九州大学大学院医学研究院・感染環境医学 \*教授 \*\*講師

ぞれ62.7±1.6, 61.4±1.1であり, 住民の60歳代男性の36.2%および女性の26.6%と比較して差はみられなかった。HCV の genotype 1b 型と 2b 型が混在している長崎県 I 郡で, 夫婦とも HCV RNA 陽性の11組について genotype を検討した。このうち6組は同じ genotype であったが, 5組は異なっており, また, たとえ genotype が同一でも, 必ずしも夫婦間感染によるものとは考えられなかった。

福岡県 H 村の HCV 感染者のうち輸血歴が認められたのは11.9%のみであった。当地区における HCV の感染経路を解明するため, 1950~60年代の住民の医療圏, すなわち掛かり付けであった医療機関について, 聞き取り調査を行った。その結果, ある医療機関に通院していた住民に HCV 抗体陽性率が高いことが判明し, さらに, そこでは使用した注射器および針が十分に滅菌されずに, 繰り返し使用されていたことが判明した。台湾でも non-disposable の注射針が C 型急性肝炎の感染経路であったことを報告している。本邦で disposable の注射器および針などが使用され始めたのは1963年頃であり, 地方まで普及したのは最近である。

以上のことから, 本邦における HCV の感染経路は母児間感染および夫婦間感染よりも, 輸血を含む医療行為が主であったと考えられた。

### Ⅲ. 最近の HCV の感染状況

福岡県 H 村において, 1993年の調査で HCV 抗体が陰性であった1,351例について追跡調査を2003年まで行った。新たな HCV 抗体陽性例が70歳および74歳女性に認められ, いずれも HCV RNA も陽性であった。このうち1例は医療機関で下部消化管内視鏡検査(生検を含む)を受けていた。C 型慢性肝炎患者の大腸ポリープ摘出術に用いた内視鏡で検査を受けた一組の夫婦が, HCV に感染し急性肝炎を発症した事例が米国で報告されている。著者らの症例も, 他に感染機会などがないことから, 同様な感染経路が考えられた。いずれにしても, 赤十字血液センターでのスクリーニング体制の改善, disposable 器材の普及などから新たな HCV 感染は著明に減少していると思われる。しかし, 欧米では薬物乱用者での注射器の廻し打ちによる感染が多く報告されているが, わが国でもこのような感染経路による感染が散見されている。

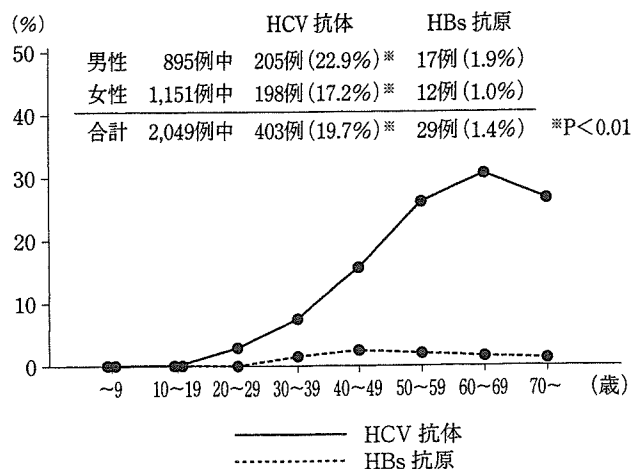


図 1 福岡県 H 村における HCV 抗体および HBs 抗原陽性率 (1993年)

血液透析患者では HCV 感染例が高頻度にみられる事はすでに述べたが, その原因としては HCV 抗体陽性率が透析期間に比例して高率になっていたこと<sup>6)</sup>, HCV 感染者の透析後の透析液には HCV RNA が存在していること<sup>7)</sup>などから, 透析という行為の周辺に感染機会が多く存在していることが考えられた。また, 透析に必要なヘパリン生食を作製する際に, HCV 感染者の血液が誤って混入した事例もあり<sup>8)</sup>, 血液透析施設では, リスクマネジメントも考慮した院内感染対策が必要と考えられた。

### Ⅳ. 肝 炎 発 症 機 序

#### 1. HCV 感染例における肝機能異常

福岡県 H 村での HCV 感染306例について, 年1回行われる肝機能検査の10年間の成績をまとめて検討すると, 39.5%が肝機能持続正常群, 41.5%が間欠異常群, 19.0%が持続異常群であった。また, 持続正常群には女性が多く, 持続異常群には男性が多かった<sup>8)</sup>。

#### 2. 肝炎発症とウイルス側因子

HCV RNA 量は C 型慢性肝疾患では重症になるほど多くなるとの報告もあり, HCV RNA (ウイルス) 量と肝障害の機序との関連が疑われていたが, その後の研究によりウイルス量と肝障害の程度との関連は認められないことが判明した<sup>2)8)</sup>。また, ウイルス量は2~3年では変化しないことも証明された<sup>9)</sup>。

欧米での研究では, C 型の肝硬変患者の genotype は 1a 型および 1b 型が多いとされている。しかし, 本邦での成績は genotype と肝障害の程

度には関連がないとの報告が多く、1b型からも、2a型からも同程度の割合で肝癌の発症がみられている。

著者らは、HCVのコア領域では変異が少ないこと、細胞障害性Tリンパ球(CTL)が認識する領域であることに注目し、福岡県H村における肝機能持続正常群10例と持続異常群10例について、クローニング・シーケンスを行った。前者ではアミノ酸レベルでは変異がみられず、後者では変異が多くみられた<sup>8)</sup>。また、観察中、肝機能が正常から異常になった例では、今までなかったコア領域の変異が、出現するようになった<sup>9)</sup>。すなわち、HCV感染による肝障害と、HCVのコア領域でみたウイルスの多様性との関連性が示唆された。

### 3. 肝炎発症と宿主側因子

#### 1) 免疫 疫

近年、HCV感染による肝炎の発症機序として、CTLを含む細胞性免疫の関与が注目されている。著者らもC型慢性肝炎患者の末梢血単核球ではIL-1 $\beta$ およびTNF- $\alpha$ の産生能が亢進していること<sup>10)</sup>、T細胞の活性化を示すとされる可溶性IL-2レセプターが血清中で高値を示していること<sup>11)</sup>を報告してきた。さらに、彼らの末梢血のリンパ球は、HCV陰性の患者に比較して、CD4+細胞ではIFN- $\gamma$ +細胞が有意に増加しており、CTLの前駆細胞とされるCD28+CD8+IFN- $\gamma$ +細胞が増加していることも判明し<sup>12)</sup>、HCV感染例における肝炎にCTLが強くかかわっていることが考えられた。

#### 2) 生活習慣

福岡県H村におけるHCV慢性感染者で肝機能異常に影響を及ぼす生活習慣因子として、喫煙数、喫煙歴、Brinkmann index、飲酒量、飲酒歴、飲酒指数、重労働を、その他に年齢、性別、輸血歴、HCV genotype、ウイルス量を変数として検討した。HCV慢性感染例では、重労働2時間以上(OR:20.60)、男性(OR:5.98)、飲酒歴(OR:1.04)が肝機能に影響を及ぼす因子として抽出されたが、HCV非感染者では飲酒指数(OR:1.06)のみが抽出された。HCV慢性感染者では、飲酒のみでなく、重労働も肝機能を増悪させる危険因子の一つと考えられた。

### V. 肝 癌 発 症 機 序

福岡県H村でのHCV持続感染411例において、

10年間、肝癌発症について経過観察した。肝癌発症例数は、64例、15.6%であった。肝機能持続正常群144例では、5年目までに0例、10年目までに80歳男性1例、0.7%であったが、肝機能間欠異常群137例では、5年目に7例、5.1%、10年目までに17例、12.4%で、肝機能持続異常群144例では、5年目までに23例、17.7%で、10年目までに46例、35.4%であった。肝機能異常群に有意に多くの肝癌発症がみられたことから、C型慢性肝炎における肝癌発症には、持続する炎症が重要な役割を果たしていると考えられた。

福岡県を含む九州では、成人T細胞白血病ウイルス(HTLV-1)の高浸淫地区である。HTLV-1は白血病を起こすだけでなく、免疫異常を起こすため種々の疾患に関連していることが明らかとなっている(脊髄症、ぶどう膜炎、関節症、皮膚筋炎)。HCVに関しては、HCV感染者にHTLV-1が重複感染すると、HCV単独感染に比較して、肝癌の発症頻度が高く、また、若年で発症する傾向がみられることが、著者らの調査で判明した。

### VI. インターフェロン療法

#### 1. 今までのインターフェロン療法

HCVは自然にウイルス血症が改善することがないため、わが国では1992年にC型慢性肝炎に対してIFNの投与が、保険適応となった。IFNには $\alpha$ と $\beta$ があるが、当初IFN $\alpha$ は24週、 $\beta$ は6~8週投与の単独療法であった。IFN投与終了後、肝機能が正常化する例は約50%で、肝機能が正常化するだけでなく、ウイルスが持続的に陰性化する(著効)例は約30%であった。著者らは311例のC型慢性肝炎あるいは肝硬変に天然型IFN $\alpha$ を投与し、多変量回帰分析を用いて、著効に関与する因子を検討した。その結果、高ウイルス量、genotype 1b型、40歳以上の女性がIFN療法に対する負の因子であった<sup>13)</sup>。その他に、肝硬変も重要な負の因子とされているが、肝硬変でもウイルス量が低い場合、IFNが有効な例もみられ<sup>14)</sup>、IFN療法の有効性の予測因子としては、ウイルス量が最も重要であると考えられる。以上のことから、genotype 1b型で、高ウイルス量の例は難治例と呼称されており、IFN単独療法での著効率は5%以下である<sup>15)</sup>。また、HTLV-1重複感染例では、著効率がHCV単独感染例に比較し有意に低く<sup>16)</sup>、HTLV-1の重複感染は、肝癌発症の促進だけでなく、IFNによるウイルス排除に

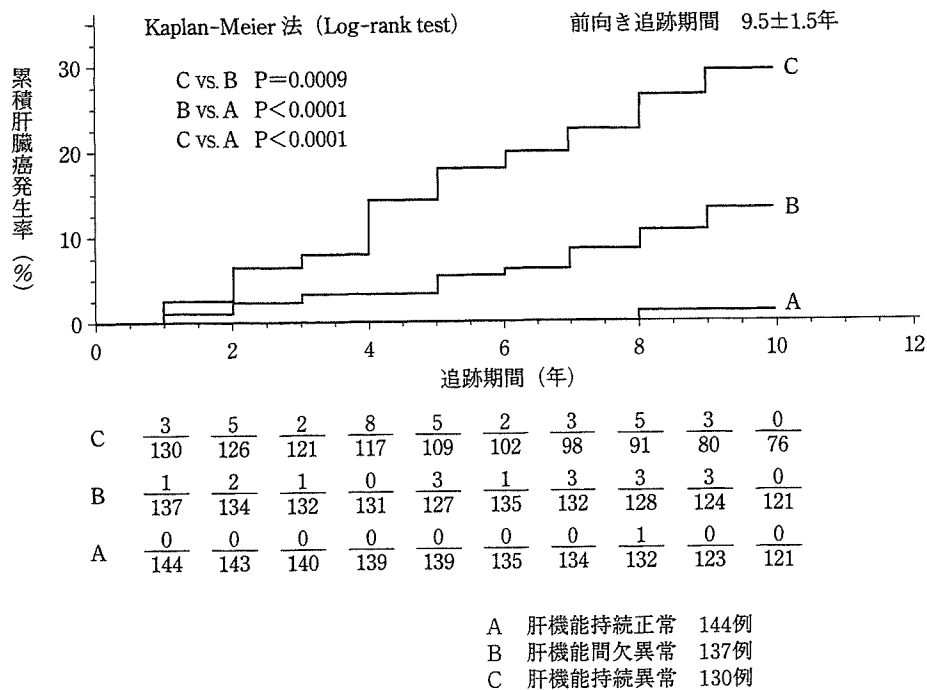


図 2 福岡県 H 村における HCV 感染例の累積肝癌発症率 (1993~2003年, Kaplan-Meier 法, Log-rank test)

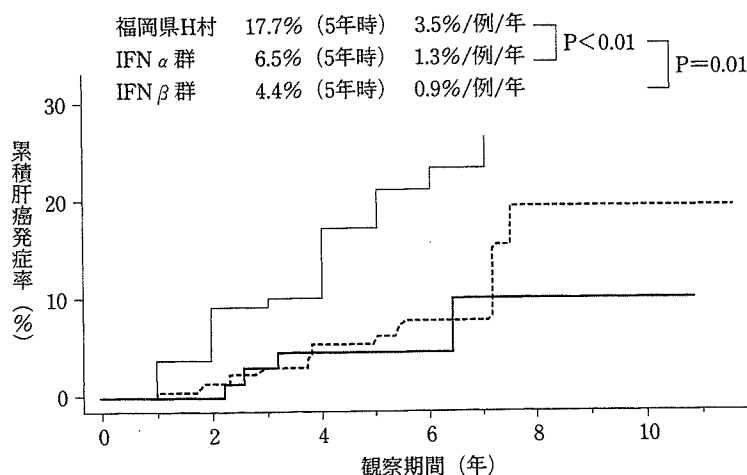


図 3 インターフェロン (IFN)  $\alpha$  および  $\beta$  が投与された C 型慢性肝炎患者の累積肝癌発症率 (Kaplan-Meier 法, Log-rank test) - 福岡県 H 村の肝機能持続異常例との比較 -

対しても負の因子として作用していた。IFN は肝機能の改善だけでなく、ウイルスの排除、さらには肝臓癌発症の防止効果も報告されている。

著者らも IFN 投与患者の経過観察を行い、肝癌の発症について検討した。観察期間平均 5.7 年での肝癌発症は、IFN  $\alpha$  投与群では 260 例中 17 例、6.5%、 $\beta$  投与群では 91 例中 4 例、4.4% で、福岡県 H 村の肝機能持続異常群における 5 年の肝癌発症率 17.7% に比較し低い値であった。特に、ウイルスが持続的に陰性化した著効例や、肝機能が正常化した例に肝癌発症が少ない傾向であった。

IFN  $\beta$  投与群では IFN 無効例でも肝癌発症例が少ない傾向がみられた<sup>17)</sup>。肝癌細胞株 Huh7 および HepG2 を用いた in vitro の著者らの実験では、IFN  $\beta$  で処理した株のほうが、 $\alpha$  処理した株より発育が抑制されており、IFN  $\beta$  は C 型慢性肝炎に対する効果にかかわらず、抗腫瘍効果がみられているのかも知れない。

## 2. 現在と将来の IFN 療法

近年、新たな IFN の開発及び新たな IFN 療法が試みられているが、2001 年 12 月より、難治性 C 型慢性肝炎をターゲットとして、consensus IFN  $\alpha$

単独投与および IFN  $\alpha$  2b+リバビリン併用投与が保険適応となり、合わせて従来から使用されていた IFN の投与期間が 6 ヶ月から無期限となった。さらに、2003年12月には週 1 回の投与で効果が得られるとされる PegIFN  $\alpha$  2a の投与も可能となった。

著者らは、九州大学関連病院肝疾患研究会（36 施設）として、IFN  $\alpha$  2b+リバビリン併用療法の効果を検討した。761例の登録で、治療が完遂し効果判定が可能であった506例における著効率は 209例、41.3%であった。いわゆる難治例は347例中78例、22.5%で、IFN 単独療法の成績よりかなり高率であった。

IFN 療法の副作用としては、発熱、全身倦怠感、うつ状態、甲状腺機能異常などが挙げられるが、リバビリンの併用療法では、これに貧血が加わる。

週 1 回の投与で効果が得られるとされる PegIFN  $\alpha$  2b+リバビリン併用の48週間投与が、2004年末より可能になるものと期待される。米国での研究によれば、いわゆる難治例に対しても、その著効率は約50%と報告されている<sup>18)</sup>。

わが国の HCV 感染者の80%は genotype 1b 型であることから、上述したように IFN 難治例が多く、また、多くの患者が高齢であることから、副作用が軽いとされる PegIFN  $\alpha$  2b に、リバビリンを併用した著効率の高い治療法に期待がかかっている。

## お わ り に

わが国における HCV 感染例の感染経路は、輸血を含む、医療行為によるものが主流と考えられたが、現在新たな感染は激減している。肝炎の発症機序については、未だ不明な点が多いが、CTL を中心とした細胞性免疫とウイルスの変異との関与が考えられる。感染者に対する IFN 療法は肝機能の改善だけでなく、ウイルスの排除、さらには肝臓癌発症の防止効果もみられ有用と考えられる。さらに、著効率の高いとされる PegIFN  $\alpha$  2b+リバビリン併用療法も開始され、特に難治例に対しての効果に期待がもたれている。

わが国の大部分の C 型慢性肝炎患者は高齢化を迎えていることから、さらに肝臓癌の発症の危険性が高まっており、有効な IFN 療法を行うだけでなく、肝臓癌の早期発見に対するスクリーニング検査も重要性を増している。

- 1) Hayashi, J., Hirata, M., Nakashima, K. et al.: Hepatitis C virus is a more likely cause of chronic liver disease in Japanese population than hepatitis B virus. *Fukuoka Acta Med*, 82: 648-654, 1991.
- 2) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yoshimura, E. et al.: Relationship of genotype to level of hepatitis C viraemia determined by competitive polymerase chain reaction. *J Infect*, 30: 235-239, 1995.
- 3) Nakashima, K., Kashiwagi, S., Hayashi, J. et al.: Sexual transmission of hepatitis C virus among female prostitutes and patients with sexually transmitted diseases in Fukuoka, Kyushu, Japan. *Am J Epidemiol*, 136: 1132-1137, 1992.
- 4) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yamaji, K. et al.: Transmission of hepatitis C virus by health care workers in a rural area of Japan. *Am J Gastroenterol*, 89: 794-799, 1995.
- 5) Nakashima, K., Ikematsu, H., Hayashi, J. et al.: Intrafamilial transmission of hepatitis C virus among the population of an endemic area of Japan. *JAMA*, 274: 1459-1461, 1995.
- 6) Hayashi, J., Nakashima, K., Kajiyama, W. et al.: Prevalence of antibody to hepatitis C virus in hemodialysis patients. *Am J Epidemiol*, 134: 651-657, 1991.
- 7) Furusyo, N., Hayashi, J., Kakuda, K. et al.: Acute hepatitis C among Japanese hemodialysis patients: A prospective 9-year study. *Am J Gastroenterol*, 96: 1592-1600, 2001.
- 8) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yamaji, K. et al.: Hepatitis C viral quasispecies and liver damage in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 25: 697-701, 1997.
- 9) Hayashi, J., Furusyo, N., Ariyama, I. et al.: A relationship between the evolution of hepatitis C virus variants, liver damage, and hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C viremia. *J Infect Dis*, 181: 1523-1527, 2000.
- 10) Kishihara, Y., Hayashi, J., Yoshimura, E. et al.: IL- $\beta$  and TNF- $\alpha$  produced by peripheral blood mononuclear cells before and during interferon therapy in patients with chronic hepatitis C. *Dig Dis Sci*, 41: 315-321, 1996.
- 11) Hayashi, J., Kishihara, Y., Yamaji, K. et al.: Serum levels of soluble interleukin-2 receptors and effects of Interferon- $\alpha$  for patients with chronic hepatitis C virus. *Dig Dis Sci*, 40: 1837-1841, 1995.
- 12) Murata, M., Nabeshima, S., Maeda, N. et al.: Increased frequency of IFN-gamma-producing peripheral CD8+ T cells with memory-phenotype in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol*, 67: 162-170, 2002.
- 13) Hayashi, J., Ohmiya, M., Kishihara, Y. et al.: A statistical analysis of predictive factors of response to human lymphoblastoid interferon in patients with chronic hepatitis C. *Am J Gastroenterol*, 89: 2151-2156, 1994.
- 14) Hayashi, J., Kishihara, Y., Ueno, K. et al.: Age-related response to interferon alfa treatment in women vs men with chronic hepatitis C virus infection. *Arch Intern Med*, 158: 177-181, 1998.
- 15) Furusyo, N., Hayashi, J., Ueno, K. et al.: Human lymphoblastoid interferon treatment for patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Clin Ther*, 19: 1352-

1367, 1997.

- 16) Furusyo, N., Hayashi, J., Kashiwagi, K. et al. : Hepatitis C virus (HCV) RNA level determined by second-generation branched-DNA probe assay as predictor of response to interferon treatment in patients with chronic HCV viremia. *Dig Dis Sci*, 47: 535-542, 2002.
- 17) Kishihara, Y., Furusyo, N., Kashiwagi, K. et al. : Human T lymphotropic virus type 1 infection influences hepatitis C virus clearance. *J Infect Dis*, 184: 1114-1119, 2001.
- 18) Kashiwagi, K., Furusyo, N., Kubo, N. et al. : A prospective comparison of the effect of interferon-alpha and interferon-beta treatment in patients with chronic hepatitis C on the incidence of hepatocellular carcinoma development. *J Infect Chemother*, 9: 333-340, 2003.
- 19) Manns, M. P., Mchutchinson, J. G., Gordon, S. C. et al. : Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*, 358: 958-965, 2001.

Hajime Nawata · Satoshi Soen · Ryoichi Takayanagi  
 Ikuko Tanaka · Kunio Takaoka · Masao Fukunaga  
 Toshio Matsumoto · Yasuo Suzuki · Hiroyuki Tanaka  
 Saeko Fujiwara · Takami Miki · Akira Sagawa  
 Yoshiki Nishizawa · Yoshiki Seino  
 The Subcommittee to Study Diagnostic Criteria for  
 Glucocorticoid-Induced Osteoporosis

## Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis of the Japanese Society for Bone and Mineral Research (2004)

Received: November 22, 2004 / Accepted: December 17, 2004

**Key words** Steroid (glucocorticoid) · Osteoporosis · Guideline

osteoporosis diagnostic criteria in 1999 and then the Subcommittee to Study Diagnostic Criteria for Glucocorticoid-Induced Osteoporosis in 2001 to examine diagnostic criteria for glucocorticoid-induced osteoporosis, and the present guidelines were developed for clinical practice (Fig. 1).

### Introduction

Osteoporosis is the most frequent adverse effect of glucocorticoids. Management guidelines were developed [1] in the United States in 1996 when the seriousness of glucocorticoid-induced osteoporosis as a complication of glucocorticoid therapy was recognized, and they have since been revised [2–6]. In Japan, the Japanese Society for Bone and Mineral Research established a study group on

### Guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis

#### Drafting policy

The Subcommittee to Study Diagnostic Criteria for Glucocorticoid-Induced Osteoporosis was initially organized to determine diagnostic criteria. However, guidelines on glucocorticoid-induced osteoporosis in various countries

H. Nawata (✉)  
 Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Science, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan  
 Tel. +81-92-642-5275; Fax +81-92-642-5297  
 e-mail: nawata@intmed3.med.kyushu-u.ac.jp

S. Soen  
 Department of Orthopaedic Surgery and Rheumatology, Nara Hospital, Kinki University School of Medicine, Ikoma, Japan

R. Takayanagi  
 Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan

I. Tanaka  
 Department of Laboratory Medicine, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Japan

K. Takaoka  
 Department of Orthopaedic Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

M. Fukunaga  
 Department of Nuclear Medicine, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan

T. Matsumoto  
 Department of Medicine and Bioregulatory Sciences, University of Tokushima Graduate School of Medicine, Tokushima, Japan

Y. Suzuki  
 Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Tokai University School of Medicine, Isehara, Japan

H. Tanaka  
 Department of Pediatrics Graduate School of Medicine and Dentistry, Okayama University, Okayama, Japan

S. Fujiwara  
 Department of Clinical Studies, Radiation Effects Research Foundation, Chiba, Japan

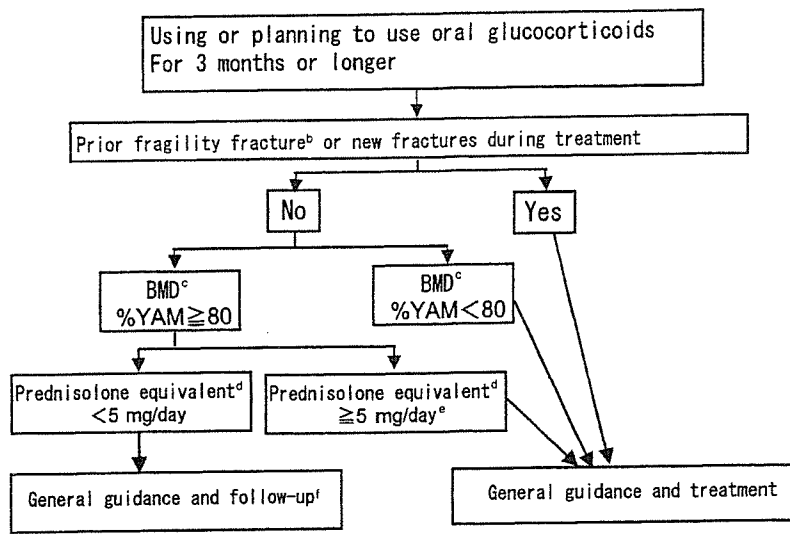
T. Miki  
 Geriatric Medicine, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

A. Sagawa  
 Center for Rheumatic Diseases, Sapporo Yamanoue Hospital, Sapporo, Japan

Y. Nishizawa  
 Department of Metabolism, Endocrinology & Molecular Medicine, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

Y. Seino  
 Japanese Society for Bone and Mineral Research, Osaka, Kosei Nenkin Hospital, Osaka, Japan

Fig. 1. Guidelines on the management and treatment of corticosteroid-induced osteoporosis (2004 edition)<sup>a</sup>



• General guidance

Lifestyle guidance, nutritional guidance, and exercise therapy are based on those for primary osteoporosis

• Follow-up observation

Bone mineral density measurements and thoracic and lumbar vertebra X-rays are performed on a regular basis (every 6 months or 1 year)

• Drug treatment

1. Bisphosphonates are first-line drugs
2. Active vitamin D<sub>2</sub> and vitamin K<sub>2</sub> are second-line drugs

YAM, young adult mean (20–44 years old); BMD, bone mineral density

<sup>a</sup>These Guidelines cover patients 18 years of age and older

<sup>b</sup>Definition of fragility fractures is the same as that for primary osteoporosis

<sup>c</sup>Bone mineral density (BMD) measurements are based on those for primary osteoporosis (2000 revised edition)

<sup>d</sup>Mean daily dose

<sup>e</sup>Patients administered 10 mg or more per day are at risk of fractures even when bone mineral density is high (cut-off value, %YAM90)

<sup>f</sup>Risk of fractures is higher in the elderly

are guidelines for primary and secondary prevention and do not specify diagnostic criteria. The subcommittee discussed this point, and a draft of management and therapeutic guidelines in Japan based on evidence available at present was prepared.

Patients studied by the Subcommittee to Study Diagnostic Criteria for Glucocorticoid-Induced Osteoporosis

The survey items were sex, age, height, body weight, underlying disease, bone mineral density (type of instrument used, region, measured value), glucocorticoid treatment history (dose, mean dose for 6 months until measurement of bone mineral density, maximum dose throughout administration period, total administration period, total dose, pulse therapy within 1 year, use of glucocorticoids for inhalation), osteoporosis treatment history, and fracture history. The facilities connected with the Subcommittee, that is, Osaka

City University, Kawasaki Medicine University, Kyushu University, Kyushu University Hospital at Beppu, Kinki University, Sapporo Yamanoue Hospital, Research Institute and Practice for Involutional Diseases, Tokyo Metropolitan Tama Geriatric Hospital, Tokyo Metropolitan Geriatric Medical Center, Hamamatsu University School of Medicine, Fujita Health University, and Radiation Effects Research Foundation, were requested to conduct the survey. As a result, a total of 692 patients were recruited up to 2002 in addition to the 299 patients recruited in 1999 and 2000, including 627 women and 65 men. The most common underlying disease was rheumatoid arthritis (RA) in 319 patients, and 373 patients had diseases other than RA; these included 162 cases of systemic lupus erythematosus (SLE), 27 of progressive systemic sclerosis (PSS), 26 with mixed connective tissue disease (MCTD), 20 with polymyositis/dermatomyositis (PM/DM), 16 with polymyalgia rheumatica (PMR), 12 with nephrosis, 10 with asthma, 10 with idiopathic thrombocytopenic purpura



(ITP), and 90 with other diseases. The results of an analysis of a 2-year follow-up survey on 220 patients administered glucocorticoids by Tanaka and Oshima [7] were added to these analytical results, and work on establishment of the guidelines proceeded.

#### Evidence for drafting the guidelines

#### Subjects

These guidelines cover men and women 18 years of age or older. Growth disorders caused by glucocorticoids are a serious problem in children, but at present no evidence that can be used has been reported in Japan or overseas, and children were excluded. Because of the same lack of evidence concerning glucocorticoids injected intravenously, only patients using oral glucocorticoids for which evidence is available in Japan and overseas were subjects. There is no evidence concerning the administration period in Japan. The most recent guidelines of the United States, UK, and Canada cover treatment with administration for 3 months or longer [3–6]. In a meta-analysis of the risk of bone fractures after starting treatment with oral glucocorticoids overseas, it was reported that the incidence of new vertebral bone fractures reaches a maximum at 3–6 months after administration and forms a plateau thereafter [8], suggesting that treatment simultaneously with or in the very early stage of glucocorticoid administration is important. Therefore, the subjects were patients with planned administration for 3 months or longer (see Fig. 1).

#### Prior fragility fractures

The results of an analysis in a 2-year longitudinal study by Tanaka and Oshima showed that the risk of new bone fractures in patients with prior fragility fractures showed the highest value compared with other fractures at an odds ratio of 7.92 [7]. Among the patients collected by the Subcommittee to Study Diagnostic Criteria, the 154 cases (103 cases of RA, 51 cases of collagen disease) that could be analyzed longitudinally for 2 years had a high odds ratio of 5.22. Therefore, the first evaluation criterion for starting treatment was patients with prior fragility fractures and patients with new bone fractures during treatment. The definition of a fragility fracture is the same as that for primary osteoporosis [9].

#### Bone mineral density

Table 1 shows the cut-off values of bone mineral density (BMD), which can efficiently separate fracture and non-fracture cases, estimated from the receiver-operating characteristic (ROC) curve based on an analysis of cases collected by the Subcommittee to Study Diagnostic Criteria. The cut-off value for all patients was 0.776 g/cm<sup>2</sup>. When the patients were divided into those with RA, the most common underlying disease, and those with diseases other than RA, the cut-off values were 0.744 g/cm<sup>2</sup> and 0.820 g/cm<sup>2</sup>, respectively. In cases with SLE, the most common underlying disease other than RA, the cut-off value was 0.841 g/cm<sup>2</sup>. Judging from these results, it appeared necessary to set different cut-off values for RA and for other underlying diseases. Table 2 shows the results of an investigation of this point with respect to age. In Table 2, all patients were grouped by age from those less than 40 to those 70 years of age and older. The cut-off values of bone mineral density in fracture and nonfracture cases were obtained by age and expressed as percent (%) young adult mean (YAM). When the level of differences in cut-off values (%YAM) was examined for age differences of 10 years, the values were 6.5% for patients in their forties and in their fifties and 7.1% for patients in their fifties and in their sixties. The mean age of RA patients was 60.4 years and that for diseases other than RA 48.8 years, an age difference of 11.6 years. The cut-off values were 73.6% for RA and 81.1% for diseases other than RA, a difference of 7.5%; i.e., this difference was almost the same as that for age, and the difference in cut-off values of RA and diseases other than RA is not considered as a difference caused by differences in disease but a difference due to age.

**Table 1.** Cut-off values of bone mineral density (BMD) to efficiently separate fracture and nonfracture cases

	BMD (g/cm <sup>2</sup> )	T score	% YAM
Primary osteoporosis	0.708	-2.60	70%
Osteopenia	0.809	-1.70	80%
Glucocorticoid-treated patients	All patients	0.776	76.8%
	RA	0.744	73.6%
	Non-RA	0.820	81.1%
	SLE	0.841	83.2%

YAM, young adult mean; RA, rheumatoid arthritis; SLE, systemic lupus erythematosus

**Table 2.** Cut-off values of bone mineral density by age and underlying disease of patients administered glucocorticoid

Age (all patients)	%YAM	Mean age (years)	Underlying disease
Less than 40 years old	86.9		
Forties	85.9		
Fifties	79.4	48.8	Non-RA
Sixties	72.3	60.4	RA
Seventies and older	69.3		

**Table 3.** Cut-off values of bone mineral density by dose of glucocorticoids

	Daily dose (prednisolone equivalent) (mg)	%YAM (T score)
All patients	≧5	77.7 (-1.90)
	≧7.5	80.3 (-1.67)
	≧10	82.1 (-1.52)
RA	≧7.5	75.1 (-2.12)
Non-RA	≧5	81.8 (-1.55)
	≧7.5	82.6 (-1.48)

Table 3 shows the relationship between glucocorticoid dose and the cut-off values. In all patients, the cut-off value (%YAM) in the group with a prednisolone equivalent dose of 5 mg/day or higher was 77.7%, that in the group with a dose of 7.5 mg/day or higher was 80.3%, and that in the group with a dose of 10 mg/day or higher was 82.1%. These results showed that as the daily dose increased, fractures occurred at higher bone mineral densities. For RA, the cut-off value was 75.1% in the group with a prednisolone equivalent dose of 7.5 mg/day or higher, and for diseases other than RA, it was 81.8% in the group with a dose of 5 mg/day or higher and 82.6% in the group with a dose of 7.5 mg/day or higher. The results of a cross-sectional analysis of all patients collected by the Subcommittee to Study Diagnostic Criteria showed a cut-off value of %YAM 77%, and the cut-off value in the group with a prednisolone equivalent dose of 5 mg/day or higher, at which it was reported based on a meta-analysis that the bone mineral density rapidly decreased and bone fractures increased, was 78%. It was clear that it is not necessary to consider differences in cut-off values due to differences in underlying diseases. In the longitudinal analysis by Tanaka and Oshima, the cut-off value in the group with a prednisolone equivalent dose of 5 mg/day or higher was %YAM 80% [7]. Based on these results, bone mineral density of less than %YAM 80% was taken as the second evaluation criterion for starting treatment.

#### *Dose of glucocorticoids*

The number of patients collected by the Subcommittee was not enough to clarify the relationship between the fracture risk and the total glucocorticoid dose, and the analysis could not be performed. Almost no difference was found in the relationship between the fracture risk and the administration period, but this was because of insufficient data on individual patients, and the relationship will have to be clarified in the future. Sufficient evidence on the relationship between the glucocorticoid dose and fracture risk rate or its cut-off value of bone mineral density has still not been obtained in Japan, and overseas reports had to be used for reference. The results of an overseas meta-analysis showed a reverse correlation between the bone mineral density of the lumbar vertebra and the total dose of glucocorticoid (daily dose × period), and the risk of a spinal fracture even at a daily dose of less than 2.5 mg of prednisolone equivalent

was more than 1.0, i.e., 1.55. The fracture rate increased dose dependently and was 5.18 at 7.5 mg or higher doses [8]. It has been reported that a dose of 5 mg or higher is the threshold value for increased fracture risk. Therefore, the third evaluation criterion for the start of treatment was proposed as a dose of 5 mg/day or higher (mean daily dose) as prednisolone equivalent (see Fig. 1). However, in a longitudinal study, the cut-off value of bone mineral density was %YAM 90% in the group administered a 10 mg/day or higher dose of prednisolone equivalent, and even at a %YAM close to 100%, the risk rate of fractures was clearly higher in the patients given glucocorticoid than in patients not administered glucocorticoids [7].

#### *Old age*

In the study by Tanaka and Oshima [7], the incidence of bone fractures increased significantly with increase in age, and age was identified as a risk factor of new spinal fractures in patients administered glucocorticoids; however, a cut-off value of age to clearly separate fracture and nonfracture cases could not be determined.

#### *Treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis*

**General guidance.** In the same way as with primary osteoporosis, it is necessary to provide guidance on improvements in lifestyle and on nutrition, as well as exercise therapy. This guidance is based on that given for primary osteoporosis [10].

**Follow-up observation.** The risk of bone fractures is higher in patients administered glucocorticoid than in those who were not treated with glucocorticoid. Therefore, in patients evaluated as the follow-up observation group based on the present guidelines, it is essential to conduct follow-up observation by measuring bone mineral density and taking X-rays of the thoracic and lumbar vertebra on a regular basis.

**Drug treatment.** In prospective randomized control trials (RCT) overseas [11–15] and in Japan [16,17], evidence that the bisphosphonate products etidronate, alendronate, and risedronate significantly prevent bone fractures caused by glucocorticoid-induced osteoporosis has been reported. Therefore, these drugs have been recommended as first-line drugs at present. Active vitamin D<sub>3</sub> has been reported to have fracture-preventing effects, although these are inferior to those of the bisphosphonates [18], and vitamin K<sub>2</sub> has also been found to have fracture-preventing effects from a longitudinal study in Japan [7]. These two vitamins have been recommended as second-line drugs. Although the parameter was bone mineral density, it was reported based on a meta-analysis that vitamin D and bisphosphonates administered concomitantly are more effective than bisphosphonates alone in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis [19]. Concomitant administration of active vitamin D<sub>3</sub> and bisphosphonates should be considered in patients with serious or high-risk osteoporosis. When bisphosphonates are difficult to administer to postmeno-

pausal women because of problems such as side effects, selection of raloxifene, a selective estrogen receptor modulator (SERM) [4,20,21] may be considered; however, therapeutic evidence of SERM for glucocorticoid-induced osteoporosis is still insufficient and further study will be necessary.

---

## Conclusion

The 2004 edition of the guidelines on the management and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis has been developed based on the results of a longitudinal study by subcommittee members and the results of an analysis of patients collected by the Subcommittee to Study Diagnostic Criteria for Corticosteroid-Induced Osteoporosis, together with evidence obtained overseas and in Japan at present. It will be necessary to verify and revise the present guidelines based on newly collected evidence in the future.

---

## References

1. American College of Rheumatology Task Force on Osteoporosis Guidelines (1996) Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Rheum* 39:1791-1801
2. Eastell R, Reid DM, Compston J, Cooper C, Fogelman I, Francis RM, Hosking DJ, Purdie DW, Ralston SH, Reeve J, Russell RG, Stevenson JC, Torgerson DJ (1998) A UK Consensus Group on management of glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *J Intern Med* 244:271-292
3. Adachi JD, Olszynski WP, Hanley DA, Hodsman AB, Kendler DL, Siminoski KG, Brown J, Cowden EA, Goltzman D, Ioannidis G, Josse RG, Ste-Marie LG, Tenenhouse AM, Davison KS, Blocka KL, Pollock AP, Sibley J (2000) Management of corticosteroid-induced osteoporosis. *Semin Arthritis Rheum* 29:228-251
4. American College of Rheumatology Ad Hoc Committee on Glucocorticoid-Induced Osteoporosis (2001) Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Update. *Arthritis Rheum* 44:1496-1503
5. Brown JP, Josse RG (2002) Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of osteoporosis in Canada. *Can Med Assoc J* 167:1S-34S
6. Bone and Tooth Society, National Osteoporosis Society, Royal College of Physicians (2002) Glucocorticoid-induced osteoporosis: guidelines for prevention and treatment. Royal College of Physicians, London
7. Tanaka I, Oshima H (2003) A longitudinal study of diagnosis and treatment for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Osteoporosis Jpn* 11:11-14
8. Van Staa TP, Leufkens HG, Cooper C (2002) The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporosis Int* 13:777-787
9. Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga H, et al (2001) Diagnostic criteria of primary osteoporosis (2000 revision). *Jpn J Bone Miner Res* 18:76-82
10. Working Group on Preparation of Guidelines on Treatment of Osteoporosis (Drug Treatment) (representative, Orimo H) (2002) Guidelines on treatment of osteoporosis (drug treatment). 2002 revision. *Osteoporosis Jpn* 10:637-709
11. Adachi JD, Bensen WG, Brown J, Hanley D, Hodsman A, Josse R, Kendler DL, Lentle B, Olszynski W, Ste-Marie LG, Tenenhouse A, Chines AA (1997) Intermittent etidronate therapy to prevent corticosteroid-induced osteoporosis. *N Engl J Med* 337:382-387
12. Saag KG, Emkey R, Schnitzer TJ, Brown JP, Hawkins F, Goemaere S, Thamsborg G, Liberman UA, Delmas PD, Malice MP, Czachur M, Daifotis AG (1998) Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. *N Engl J Med* 339:292-299
13. Cohen S, Levy RM, Keller M, Boling E, Emkey RD, Greenwald M, Zizic TM, Wallach S, Sewell KL, Lukert BP, Axelrod DW, Chines AA (1999) Risedronate therapy prevents corticosteroid-induced bone loss: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Arthritis Rheum* 42:2309-2318
14. Reid DM, Hughes RA, Laan RF, Sacco-Gibson NA, Wenderoth DH, Adami S, Eusebio RA, Devogelaer JP (2000) Efficacy and safety of daily risedronate in the treatment of corticosteroid-induced osteoporosis in men and women: a randomized trial. *European Corticosteroid-Induced Osteoporosis Treatment Study. J Bone Miner Res* 15:1006-1013
15. Adachi JD, Saag KG, Delmas PD, Liberman UA, Emkey RE, et al (2001) Two-year effects of alendronate on bone mineral density and vertebral fracture in patients receiving glucocorticoids: a randomized, double-blind, placebo-controlled extension trial. *Arthritis Rheum* 44:202-211
16. Sato S, Ohosone Y, Suwa A, Yasuoka H, Nojima T, Fujii T, Kuwana M, Nakamura K, Mimori T, Hirakata M (2003) Effect of intermittent cyclical etidronate therapy on corticosteroid induced osteoporosis in Japanese patients with connective tissue disease: 3 year followup. *J Rheumatol* 30:2673-2679
17. Nakayama S, Okada Y, Saito K, Tanaka Y (2004) Etidronate prevents high dose glucocorticoid induced bone loss in premenopausal individuals with systemic autoimmune diseases. *J Rheumatol* 31:163-166
18. De Nijs RN, Jacobs JW, Algra A, Lems WF, Bijlsma JW (2004) Prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis with active vitamin D(3) analogues: a review with meta-analysis of randomized controlled trials including organ transplantation studies. *Osteoporosis Int* 16:625-632
19. Amin S, Lavalley MP, Simms RW, Felson DT (2002) The comparative efficacy of drug therapies used for the management of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-regression. *J Bone Miner Res* 17:1512-1526
20. Sambrook PN, Diamond T, Ferris L, Flatarone-Singh M, Flicker L, MacLennan A, Nowson C, O'Neill S, Greville H (2001) Corticosteroid-induced osteoporosis. Guidelines for treatment. *Aust Fam Physician* 30:793-796
21. Sewell K, Schein JR (2001) Osteoporosis therapies for rheumatoid arthritis patients: minimizing gastrointestinal side effects. *Semin Arthritis Rheum* 30:288-297

## Dehydroepiandrosterone negatively regulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase

Kenji Ashida, Kiminobu Goto, Yue Zhao, Taijiro Okabe, Toshihiko Yanase, Ryoichi Takayanagi, Masatoshi Nomura, Hajime Nawata\*

*Department of Medicine and Bioregulatory Science (3rd Department of Internal Medicine), Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Maidashi 3-1-1, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan*

Received 10 May 2004; received in revised form 10 January 2005; accepted 26 January 2005

### Abstract

Dehydroepiandrosterone-sulfate, the sulfated form of dehydroepiandrosterone, is the most abundant steroid in young adults, but gradually declines with aging. In humans, the clinical application of dehydroepiandrosterone targeting some collagen diseases, such as systemic lupus erythematosus, as an adjunctive treatment has been applied in clinical trial. Here, we report that dehydroepiandrosterone may negatively regulate the mitogen-activated protein kinase pathway in humans via a novel dual specificity protein phosphatase, DDSP (dehydroepiandrosterone-enhanced dual specificity protein phosphatase). DDSP is highly homologous to LCPTP/HePTP, a tissue-specific protein tyrosine phosphatase (PTP) which negatively regulates both ERK and p38-mitogen-activated protein kinase, and is transcribed from the PTPN7 locus by alternative splicing. Although previous reports have shown that the mRNA expression of the LCPTP/HePTP gene was inducible by extracellular signals such as T-cell antigen receptor stimulation, reverse transcribed (RT)-PCR experiments using specific sets of primers suggested that the expression of LCPTP/HePTP was constitutive while the actual inducible sequence was that of DDSP. Furthermore DDSP was widely distributed among different types of human tissues and specifically interacted with p38-mitogen-activated protein kinase. This inducible negative regulation of the p38-mitogen-activated protein kinase-dependent pathway may help to clarify the broad range of dehydroepiandrosterone actions, thereby aiding the development of new preventive or adjunctive applications for human diseases.  
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Dehydroepiandrosterone; Dual specificity protein phosphatase; Protein tyrosine phosphatase; p38-mitogen-activated protein kinase; Mitogen-activated protein kinase; Mitogen-activated protein kinase phosphatase

*Abbreviations:* RT-PCR, reverse transcribed PCR; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PTP, protein tyrosine phosphatase; DSP, protein dual specificity phosphatase; LCPTP, leukocyte-specific protein tyrosine phosphatase; HePTP, hematopoietic tissue-specific protein tyrosine phosphatase; DHEA, dehydroepiandrosterone; DDSP, dehydroepiandrosterone-induced protein dual specificity phosphatase; ERK, extracellular stimulus-regulated kinase; JNK, *c-Jun* N-terminus kinase; TcR, T-cell antigen receptor; GFP, green fluorescence protein; PMA, phorbol-12-myristate-13-acetate; aa, amino acid; SSH, suppression subtraction hybridization

\* Corresponding author. Tel.: +81 92 642 5275; fax: +81 92 642 5297.

E-mail address: [nawata@intmed3.med.kyushu-u.ac.jp](mailto:nawata@intmed3.med.kyushu-u.ac.jp) (H. Nawata).

### 1. Introduction

The mitogen-activated protein kinase (MAPK) family plays a central role in signaling pathways stimulated by extracellular stimuli such as growth factors, cytokines and physical stress. In higher organisms, this kinase family includes the extracellular stimulus-regulated kinases (ERKs) and two stress-stimulated kinase groups, the stress-activated protein kinase/c-JUN N-terminus kinase (SAPK/JNK) and p38-MAPK/p38 High Osmolarity Glycerol response (HOG) 1 [1–5]. The activation of MAPKs requires phosphorylation of conserved tyrosine and threonine residues within the catalytic domain. This phosphorylation is mediated by dual