

かにした。動物実験においても、プロテアソーム阻害剤(epoxomicin または proteasome inhibitor 1)をマウスの皮下あるいは腹腔に5日間投与したところ、2週間後にはコントロールと比較して骨形成率が70%増加していた。骨芽細胞においてGli3という転写因子がプロテアソームによる分解を受け、その分解産物がBMP-2の転写を抑制した。そして、プロテアソーム阻害剤によるGli3の分解抑制が、BMP-2の発現と骨形成の促進に重要であることが示された⁹⁾。

また、ヘパリンやヘパラン硫酸などの硫酸化多糖が、BMPと結合してその生理活性を促進

することも報告されている¹⁰⁾。

おわりに

近年、BMP-2の発現を増加させて骨形成を促進する薬剤が次々に報告されているが、臨床応用にはまだ至っていない。スタチンの骨折抑制効果に関しても、大規模臨床試験の解析で明確な結論は出ていない。これらの骨形成を促進する薬剤は、骨形成が低下しているステロイド性骨粗鬆症や高齢者の骨粗鬆症において、現在の骨吸収抑制薬の限界を越えて骨折予防効果を上昇させる可能性がある。

参考文献

- 1) Mundy G, et al: Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. *Science* **286**: 1946-1949, 1999.
- 2) Bauer DC: HMG CoA reductase inhibitors and the skeleton: a comprehensive review. *Osteoporos Int* **14**: 273-282, 2003.
- 3) Sugiyama M, 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.
- 4) Ohnaka K, 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.
- 5) 高柳涼一: スタチンは骨形成薬となり得るか? *Medical Science Digest* **30**: 95-98, 2004.
- 6) LaCroix AZ, et al: Statin use, clinical fracture, and bone density in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Observational Study. *Ann Intern Med* **139**: 97-104, 2003.
- 7) Schoofs MW, et al: HMG-CoA reductase inhibitors and the risk of vertebral fracture. *J Bone Miner Res* **19**: 1525-1530, 2004.
- 8) 吉川秀樹: BMPの応答制御機構の解析. *The Bone* **16**: 287-291, 2002.
- 9) Garrett IR, et al: Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *J Clin Invest* **111**: 1771-1782, 2003.
- 10) Takada T, et al: Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J Biol Chem* **278**: 43229-43235, 2003.

副腎性高血圧のわが国における疫学調査

足立雅広 高柳涼一

九州大学大学院老年医学

副腎ホルモン産生異常による副腎性高血圧は二次性高血圧のなかでも、外科的に副腎腫瘍が摘出されれば治癒が期待できるため、早期診断が重要である。わが国において以前より厚生省特定疾患調査研究班による副腎ホルモン産生異常症の全国的な疫学調査がおこなわれてきた。最近では1997年に名和田班により、全国的な疫学調査がなされた。本調査の結果は従来の調査とほぼ同様であったが、初めて統計的に信頼できる全国推定患者数を算出したことが注目すべき成果である。最近の話題として、正カリウム性の原発性アルドステロン症の患者は予想以上に多く、高血圧患者の約6%に達するという報告がなされた。副腎ホルモン産生異常は比較的予後が良好で、腫瘍が摘出されれば完治も期待できるため、迅速かつ的確な診断が重要である。

はじめに

副腎で合成、分泌される各種ステロイドホルモン、カテコールアミンなどの副腎ホルモンは、種々の作用機序により、循環血行動態のホメオスタシスに関与している。副腎腫瘍、過形成などによる副腎ホルモン産生異常症は種々の臨床症状を呈するが、高血圧症など心血管障害をきたす病態が多い。副腎性高血圧の二次性高血圧症に占める割合は約1%といわれているが、診断されれば、外科的治療または薬物治療にて完治が期待できるものであり、迅速かつ的確な診断が必要である。その病態、診断、治療を検討するためにも正確な疫学調査による実態の把

握が必要である。本稿では、1997年の厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班（名和田班）¹⁾をもとに、副腎性高血圧をきたす各疾患の疫学および臨床統計を概説する。

1. 副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査

わが国における厚生省特定疾患としての副腎ホルモン産生異常症の全国疫学調査は、1975年に厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班としてスタートし、わが国における実態調査と臨床病態の解明に向けて研究がおこなわれてきた。井林（1972～1976年）²⁾、（1972～1976年）³⁾、竹田（1982～1986年）⁴⁾、名和田（1997年）¹⁾らを班長にする調査研究班による全国疫学調査が報告されている。1997年の名和田班によるアンケート調査では、全国の4,060の診療科に対して、1997年1～12月までの患者数を調査し（一次調査）、各疾患患者の存在が示された診療科に対して各患者の詳しい情報を依頼し

KEY WORD

二次性高血圧、副腎ホルモン産生異常症、原発性アルドステロン症、クッシング症候群、プレクリニカルクッシング症候群、褐色細胞腫

表 1. 主要な副腎ホルモン産生異常症の全国推定患者

疾患	患者数		計	全国推定患者数 [95%信頼区間]	二次調査での 悪性症例数
	男	女			
原発性アルドステロン症	331 (1:1.5)	494	825	1,450 [1,250-1,650]	1/435 (0.2%)
クッシング症候群	151 (1:3.9)	586	737	1,250 [1,100-1,400]	5/417 (1.2%)
副腎性プレクリニカル クッシング症候群	61 (1:1.7)	102	163	290 [230-350]	0/78 (0%)
褐色細胞腫	270 (1:0.93)	252	522	1,030 [860-1,200]	30/279 (10.8%)

(名和田新, 1999¹⁾より引用)

情報を得た(二次調査)。一次調査によるアンケートの回収率は63.7%で、二次調査による回収率は53.0%であった。従来の「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班においては、対象病院を特定したため真の疫学調査と言い難い面もあったが、当調査においては、一定規模以上の病院はすべてを、小規模の病院は無作為に抽出することで、精度の高い疫学調査となった。また当調査において、初めて統計的に信頼できる全国推定患者が算出された。各疾患の疫学調査では、アジソン(Addison)病で結核性が減少し、特異性が増加した点以外は、従来とほぼ変わらなかった。

2. 原発性アルドステロン症

原発性アルドステロン症は、副腎腺腫、あるいはまれではあるが副腎過形成により、副腎皮質からのアルドステロンの分泌が増加し、腎臓でのナトリウム再吸収の促進により循環血液量の増加をきたし、高血圧症と低レニン血症をきたす疾患である。副腎性高血圧症をきたす疾患では最も頻度の多い疾患で、全高血圧症例の約0.05%を占めるといわれている。1997年の厚生省特定疾患調査研究班(名和田班)¹⁾における全国推定患者数は、1,450人(95%信頼区間:1,250-1,650人)(表1)で副腎ホルモン産生異常症のなかで最も多く、男女比1:1.5であった。年齢分布は1峰性の分布を示し、ピークは男女とも50歳前後にあった。患者の平均年齢は男53.4歳、女52.2歳、推定発症平均年齢は男43.6歳、女42.1歳であった。

病型分類とその頻度は、(1)アルドステロン産生腺腫(aldoosterone-producing adenoma: APA) 84.4%(367/435)、(2)両側性副腎過形成[特異性アルドステロ

ン症(idiopathic hyperaldosteronism: IHA)] 8.3%(36/435)、(3)片側性副腎過形成[原発性副腎過形成(primary adrenal hyperplasia: PAH)] 1.6%(7/435)、(4)グルココルチコイド奏効性アルドステロン症(glucocorticoid-remediable aldosteronism: GRA) 0.2%(1/435)、(5)その他: 5.5%(24/435)であった。

主要検査の陽性率は、(1)低カリウム(K)血症: 87.3%(365症例中)、(2)高アルドステロン血症: 94.4%(387症例中)、(3)低レニン血症: 86.1%(348症例中)、(4)レニン刺激試験に低反応: 77.9%(176症例中)であった。後述するが、最近正K性のアルドステロン症の割合が全体の50%近くあるという報告もあり検討を要する。

局在診断は、エコー、CT、MRI、I²⁵¹-アドステロールシンチグラフィによってなされるが、APAの微小腺腫例や、IHAの診断においては、局在診断が困難な場合が多い。全体の57.8%で選択性副腎静脈サンプリングが施行されており、診断の有用性は腺腫例で64.4~71.4%と集計され、局在診断における有用性が示された。副腎静脈、とくに右副腎静脈が細く、サンプリングが放射線科医の技量に依存してしまうため、その差を失くすことや、副腎静脈の選択制を評価するために用いる副腎静脈コルチゾール値/下大静脈コルチゾール値の、値の統一化などが今後の課題である。

APAでは、腫瘍の摘出が第一選択であるが、手術不能例においては、スピロラクトンによる薬物療法をおこなう。IHAでは外科的治療の有用性は確立しておらず、スピロラクトンによる薬物療法が第一選択となる。名和田らの調査によるとAPAの85.2%が腫瘍摘出を受け、IHAの88.9%が薬物療法の適用となった(表2)。

表 2. 原発性アルドステロン症における腫瘍摘出術と薬物療法の効果

	高血圧症			低K血症			
	改善	不変	不明 (%)	改善	不変	不明 (%)	
原発性アルドステロン症全例							
腫瘍摘出	76.1% (331/435)	88.5	8.8	2.7	87.6	6.3	6.1
薬物療法	19.5% (85/435)	74.1	18.8	7.1	76.5	18.8	4.7
片側性副腎腺腫							
腫瘍摘出	85.2% (305/358)	88.9	8.1	3.0	87.5	6.6	5.9
薬物療法	12.3% (44/358)	65.9	27.3	6.8	75.0	15.9	9.1
特発性アルドステロン症							
腫瘍摘出	8.3% (3/36)	100	0	0	100	0	0
薬物療法	88.9% (32/36)	81.3	9.4	9.4	81.3	18.7	0

腫瘍摘出例は薬物療法併用を含む
(名和田新, 1999¹⁾より引用)

表 3. 原発性アルドステロン症, クッシング症候群, プレクリニカルクッシング症候群, 褐色細胞腫の転帰

	症例数 (人)	治癒 (%)	改善 (%)	不変 (%)	悪化 (%)	死亡 (%)	不明 (%)
原発性アルドステロン症	435	37.5	50.8	8.8	0.5	0	3.4
クッシング症候群	417	37.9	49.2	7.9	0.2	2.6	2.2
プレクリニカルクッシング症候群	78	28.2	23.1	44.9	1.3	0	2.6
褐色細胞腫	279	55.6	25.8	10.8	2.9	1.8	3.1

(名和田新, 1999¹⁾より引用)

表 4. 高血圧患者における原発性アルドステロン症 (PA) の割合

報告者, 報告年	スクリーニング数	PAの患者数 と頻度 (%)	スクリーニングテスト	確定診断のための検査
Hiramatsu, 1981	348	9 (2.6%)	血中アルドステロン/レニン活性比	施行せず
Gordon, 1994	199	17 (8.5%)	血中アルドステロン/レニン活性比	フルドロコルチゾン抑制試験
Abdelhamid, 1996	3,900	257 (6.6%)	尿中アルドステロンと代謝産物	立位負荷試験と生食負荷試験
Rosi, 1998	320	19 (5.9%)	記号論理学多変量判別分析	施行せず
Lim, 1999	125	18 (14.4%)	血中アルドステロン/レニン活性比	血中アルドステロン/レニン活性比 > 750
Loh, 2000	350	16 (4.6%)	血中アルドステロン/レニン活性比	生食負荷試験
Mosso, 2003	609	37 (6.1%)	血中アルドステロン/レニン活性比	フルドロコルチゾン抑制試験
Total (%)	5,851	364 (6.6%)		

(Plouin PF et al. 2004⁶⁾より改変引用)

全アルドステロン症患者の高血圧症は、手術療法にて 88.5% (293/331)、薬物療法にて 74.1% (63/85) の頻度で改善を認めた (表 2)。転帰では、死亡例は認めず (表 3)、比較的予後は良好で、適切な治療がおこなわれれば治療効果は高いことが示されたが、近年アルドステロンが血管炎を基盤とした直接的臓器障害作用をもつことが明らかとなっており、迅速で的確な診断が必要である。最近の話題として、1994年に Gordon ら⁵⁾によって、199人の高血圧患者に対して、立位での血漿アルドステロン濃度/血漿レニン活性比 40 をカットオフ値としてスクリーニングし、フルドロコルチゾン抑制試験をおこなった結果、8.5%が原発性アルドステロン症 (PA) 患者であり、その半数において血清 K 濃度が正常であり、その 1/3 以上

の症例で血漿アルドステロン濃度が正常であったと報告している。Plouin ら⁶⁾が、7つの報告をまとめた結果、5,851例の高血圧患者のうち 364例 (6.6%) が PA と診断された (表 4)。わが国においても、Nishikawa ら⁷⁾が 1,020例の外来の高血圧患者の 5.4%を PA と診断したと報告した。これらの報告は、厚生省特定疾患調査研究班の調査結果と比較して血清 K 濃度が正常である症例の割合が高いことが一つの特徴である⁸⁾。今後、血漿アルドステロン濃度/血漿レニン活性比のカットオフ値の統一化や、検査時に降圧薬を中止するかどうかなどの条件の画一化をおこなったうえでの大規模な疫学調査がなされることが期待される。

表 5. クッシング症候群の症候

症候	全症例	年齢		病因	
		64歳以下	65歳以上	下垂体性	副腎性
満月様顔貌	84.3	84.2	70.7	86.0	81.6
高血圧	83.9	83.3	88.4	81.8	88.3
中心性肥満	81.2	82.3	71.8	81.4	80.7
buffalo hump	63.2	64.7	50.0	64.7	63.3
月経異常	59.8	—	—	57.7	60.0
伸展性皮膚線状	52.7	56.3	21.1	51.8	50.8
皮下溢血	45.6	45.1	48.6	45.9	43.8
筋力低下	48.6	46.3	66.7	48.1	51.5
ざ瘡 (にきび)	45.2	48.2	18.9	45.2	42.5
多毛	41.8	45.2	13.9	38.6	43.4
浮腫	50.4	48.7	62.5	49.6	48.9
糖尿病	46.7	43.4	70.5	50.7	45.2
骨粗鬆症	48.4	45.1	74.2	48.7	36.2
精神障害	17.6	17.3	21.1	18.7	15.2
色素沈着	19.9	19.5	23.5	27.3	14.4

(名和田新, 1999⁹⁾より引用)

3. 副腎性クッシング症候群

クッシング (Cushing) 症候群はコルチゾールの慢性的な過剰分泌により特徴的な身体、臨床検査を呈する症候群である。満月様顔貌、中心性肥満などの特徴的な身体所見を呈する。約 80% で高血圧症を認めるが、夜間も高血圧が持続し血圧の日内変動が欠如していることが特徴であり、コルチゾールの分泌と関連していると考えられている。1997 年の厚生省特定疾患調査研究班 (名和田班)⁹⁾における全国推定患者数は、1,250 人 (95%信頼区間: 1,100-1,400 人) (表 1) で、男女比 1: 3.9 と女性患者が多かった。年齢分布は、PA と同じく幅広い年齢にわたるほぼ 1 峰性の分布を示し、患者の平均年齢は男 45.9 歳、女 46.4 歳、推定発症平均年齢は男 33.0 歳、女 37.8 歳であった。

病型分類とその頻度は、(1) 副腎腺腫: 47.2% (197/417)、(2) 両側結節性過形成: 5.8% (24/417)、(3) 副腎癌: 1.7% (7/417)、(4) 下垂体腺腫: 35.7% (149/417)、(5) 異所性 ACTH 症候群: 3.6% (15/417)、(6) 下垂体癌: 0.2% (1/417)、(7) 不明、病因不明: 5.8% (24/417) であった。24 例の原発性結節性過形成のうち、ACTH 非依存性大結節性副腎過形成 (ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia: AIMAH) が 3.1% (13/417)、原発性色素性結節性副腎異型性 (primary pigmented nodular adrenal disease: PPNAD) が 0.7% (3/417) であった。

副腎性クッシング症候群の 88.3% (182/206) に高血圧症の合併を認め、クッシング病の 81.8% (121/148) と差を認めなかった。年齢別では、65 歳以上が 65 歳以下と比較して、中心性肥満などの典型的な Cushingoid 徴候を呈する頻度が少ないが、高血圧症は 65 歳以下 83.3%、65 歳以上 88.4% と年齢差は認めず、糖尿病や骨粗鬆症の合併は 65 歳以上の患者に有意に高かった (表 5)。

治療は、片側性、両側性においても腺腫摘出術が第一選択である。副腎性クッシング症候群の 98.5% (192/195) が腺腫摘出術を受け、腺腫摘出術による改善率は 95.7% (179/187) であった。

転帰では 2.6% に死亡例を認めた (表 3)。未治療の場合、高血圧症などの心血管障害や感染症が予後と規定すると言われており、PA 同様に、迅速な診断治療が必要である。

4. 副腎性プレクリニカル (サブクリニカル) クッシング症候群

本症例は、血中コルチゾールの基礎値 (早朝時) が正常範囲内で、満月様顔貌、中心性肥満や野牛肩 (buffalo hump) などの典型的な Cushingoid 徴候を欠くものの、副腎からのコルチゾールの自律性分泌を認める疾患で、1996 年の厚生省特定疾患調査研究班 (名和田班)⁹⁾において診断基準が示された。1997 年の厚生省特定疾患調査研究班¹¹⁾における全国推定患者数は、290 人 (95%信頼区間: 230-350 人) (表 1) で、男女比 1: 1.7 であった。プ

レクリニカルクッシング症候群 (PCS) のなかでクッシング症候群 (CS) に移行する例はなく、発症 (初診時) 年齢の平均は 57.5 歳、最頻値は 68 歳であり、CS, PA, 各々の最頻値 49 歳に比べて高齢であり、CS との病態の違いが指摘されている。PCS には、高血圧症、耐糖能異常や高脂血症をきたす症例があり、副腎腺腫摘出後に正常化する例が多く報告されている¹⁰⁾。海外の報告であるが、PCS 28 例について検討した結果、正常対照群との比較において、収縮期・拡張期血圧の上昇、高脂血症などの心血管危険因子の増悪を認めている¹¹⁾。随伴する高血圧症が、PCS の症状なのか本態性高血圧症の合併なのか各々の症例によってその関与は異なるが、1996 年の厚生省特定疾患調査研究班⁹⁾によると、高血圧症、全身性肥満、耐糖能異常のいずれかを合併する症例の場合は手術適用も考慮すべきと示されている。

5. 褐色細胞腫

褐色細胞腫は、アドレナリン、ノルアドレナリンなどのカテコールアミンの過剰分泌により、高血圧をはじめとする種々の臨床症状を呈する疾患である。1997 年¹⁾の厚生省特定疾患調査研究班における全国推定患者数は、1,030 人 (95%信頼区間: 860-1,200 人) (表 1) で、男女比 1:0.93 であった。年齢分布は幅広い年齢にわたるほぼ 1 峰性の分布を示し、患者の平均年齢は男 53.6 歳、女 51.6 歳、推定発症平均年齢は男 46.3 歳、女 41.2 歳であった。

病型として、臨床的には発作性と持続性に分けられ、腫瘍の発生形式からは、副腎原発性と副腎外例、片側性と両側性、良性と悪性、散発性と家族性に分けられる。大部分が散発性片側副腎発生の良性腫瘍である。本調査においては、279 症例中 (1) 副腎内: 90.1%, 副腎外: 9.9%, (2) 片側性: 84.4%, 両側性: 8.2%, 不明: 7.4%, (3) 良性: 77.7%, 悪性: 11.3%, 不明: 11.0%, (4) 散発性: 86.9%, 家族内発症: 5.0%, 不明: 8.1% であった。

局在診断として腹部 CT, MRI, ¹³¹I-MIBG シンチグラフィ、PET などが用いられる。¹³¹I-MIBG シンチグラフィは、¹³¹I-MIBG の分子構造がノルアドレナリンと

類似していることを利用しており、副腎皮質腫瘍との鑑別、異所性や転移巣の検索に有用である。調査症例の 75.5% (213/282) において試行され、陽性: 86.9% (185/213), 陰性: 11.3% (24/213), 不明: 1.8% (4/213) であった。

治療の第一選択は腫瘍摘出術であるが、血中へのカテコールアミンの流出や腫瘍への機械的刺激などによりショックをきたす危険性があるため、従来は開腹術が主であったが、近年は腹腔鏡下にておこなわれることが多くなっている。本調査において、91.8% (259/282) が手術適用となったが、開腹術: 85.0% (220/259), 腹腔鏡下: 15.0% (39/259) であり、ショックの出現率は、開腹術: 8.6% (19/220), 腹腔鏡下: 5.1% (2/39) と差を認めず、今後腫瘍の大きさや周囲組織への癒着、合併症の有無などを考慮したうえで、腹腔鏡下腺腫摘出術の頻度が増えてくるものと思われる。

6. 副腎酵素欠損症

先天性副腎過形成は、先天性のステロイド合成障害による副腎ステロイド産生異常により種々の臨床症状を呈する疾患で、常染色体劣性遺伝形式をとり、ステロイド合成酵素の障害部位により 6 つの病型に分類される。1997 年の厚生省特定疾患調査研究班において、副腎酵素欠損症の全国推定患者数は 1,462 人で、各々の病型でみると (1) 21-水酸化酵素欠損症 87.2%, (2) 11 β -水酸化酵素欠損症 1.7%, (3) 17 α -水酸化酵素欠損症 1.9%, (4) 3 β -水酸化ステロイド脱水素酵素欠損症: 1.8%, (5) リポイド過形成症 (Prader 病): 5.5%, (6) 18-水酸化酵素欠損症: 0.1%, (7) その他: 1.7% である。このなかで、高血圧症を認める疾患は、17 α -水酸化酵素欠損症と 11 β -水酸化酵素欠損症のみである。過去 5 年間における推定患者数は、17 α -水酸化酵素欠損症が 25 人、11 β -水酸化酵素欠損症が 28 人である。17 α -水酸化酵素欠損症は、低レニン性高血圧と種々の程度の性腺機能不全を呈するが、P 450 c 17 遺伝子変異による P 450 c 17 活性が臨床症状、とくに性腺機能低下の程度と比較的相関している¹²⁾。高血圧症は、二次性徴の障害が明らかとなる思春期~20 歳代にかけて診断されることが多い

が、幼児期やあるいは40～50歳代になるまで診断されない場合もある。17 α -水酸化酵素欠損症は、男性化と高血圧症をきたす。欧米での報告は多いが、わが国では副腎酵素欠損症の1～2%である。血圧の上昇はデオキシコルチコステロン（DOC）の過剰分泌による。

おわりに

副腎性高血圧は、従来の全国的な疫学調査からも、高血圧症全体のなかでは比較的まれであると考えられてきた。最近、各種ホルモンのアッセイ系や画像診断の進歩により、本態性高血圧症と診断されていた外来高血圧患者のなかから、PAやPCSなどの副腎性高血圧の患者を見つける可能性が高くなっている。副腎ホルモン産生異常症は適切な治療がなされれば予後は良好であり、それによる副腎性高血圧は、診断確定後、腫瘍を摘出すれば完治するケースが多いため、迅速かつ確実に診断をつけることが重要である。また、高血圧症以外の特異的症状が乏しい副腎性疾患を見落とさないために、各疾患に対するスクリーニングの基準の統一化が必要と考えられる。



文 献

- 1) 名和田新：厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班 平成10年度研究報告書，1999，p.11
- 2) 加藤堅一ほか：ステロイドホルモン産生異常症第二次実態調査報告。厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班 昭和54年度研究報告書，1980，p.13
- 3) 加藤堅一ほか：ステロイドホルモン産生異常症第二次実態調査報告。厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班 昭和57年度研究報告書，1980，p.1
- 4) 竹田亮介：厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班昭和62年度総括研究報告書，1998，p.1
- 5) Gordon RD *et al* : *Clin Exp Pharmacol Physiol* **21** : 315, 1994
- 6) Plouin PF *et al* : *Nephrol Dial Transplant* **19** : 774, 2004
- 7) Nishikawa T *et al* : *Biomed Pharmacother* **54**(suppl 1) : 83, 2000
- 8) Mulatero P *et al* : *J Clin Endocrinol Metab* **89** : 1045, 2004
- 9) 名和田新ほか：厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班 平成7年度研究報告書，1996，p.223
- 10) 足立雅広ほか：厚生省特定疾患「副腎ホルモン産生異常症」調査研究班 平成6年度研究報告書，1995，p.168
- 11) Tauchmanova L *et al* : *J Clin Endocrinol Metab* **87** : 4872, 2002
- 12) Yanase T *et al* : *Endocr Rev* **12** : 91, 1991

トピックス

II. 骨粗鬆症の病型と病態

3. ステロイド性骨粗鬆症

後藤 公宣 大中 佳三 高柳 涼一 名和田 新

要 旨

ステロイド骨粗鬆症は、続発性骨粗鬆症の代表的な病態である。発症要因としてはグルココルチコイド(GC)の骨に対する直接的な骨形成抑制作用が最も重要と考えられているが、性ステロイドの分泌を抑制することも発症に関与する。ステロイド骨粗鬆症においては、原発性骨粗鬆症と比較して、骨折閾値が高い。YAM値 80%においても、ステロイド骨粗鬆症では新規の椎体骨折発生率が高くなることが知られている。〔日内会誌 94：637～642, 2005〕

Key words：グルココルチコイド，Cushing症候群，骨折閾値，海綿骨

はじめに

グルココルチコイド(GC)製剤の使用、もしくは内因性GC過剰状態であるCushing症候群に伴って発症するステロイド(誘発)骨粗鬆症は、続発性骨粗鬆症の代表的な病態である。長期間のGC投与によって誘発されるステロイド骨粗鬆症は、以前は有効な治療法がなく、また原病の治療が優先され、骨量減少に伴う骨折の発症予防はあまり顧みられなかったが、骨折によるquality of life(QOL)の低下や寝たきりの問題は深刻で、GC投与による骨粗鬆症発症に伴う骨折の予防対策は現在、必須と考えられている。

1. ステロイド性骨粗鬆症の発症機序

現在、ステロイド骨粗鬆症の発症要因として

はGCの骨に対する直接作用が最も重要と考えられている。二次性副甲状腺機能亢進症は比較的大量のGC投与時に認められる。また、GCが下垂体のLH(黄体形成ホルモン)、FSH(卵胞形成ホルモン)分泌を抑制して性ステロイドの分泌を抑制することも骨粗鬆症発症に関与する(図1)。

1) GCの骨に対する直接作用

生理量のGCは骨芽細胞の分化・増殖に必要であり、コラーゲン合成、DNA合成を促進する。一方、過剰量のGCはコラーゲン、DNA、TGF- β 、I型コラーゲン、オステオカルシンの合成を抑制し、未分化間葉系細胞から骨芽細胞への分化・増殖を抑制する。このGCの作用は、I型コラーゲン合成やマトリックス形成を促進し、コラーゲンの分解を抑制するインスリン様成長因子IGFの合成抑制や、コラゲナーゼ、蛋白分解酵素のmRNAの安定性を増加するが、オステオカルシンは転写レベルで抑制される。さらに、GCはIGF-Iの転写を直接抑制、また、IGF結合蛋白を増加させることによりIGF-IIを抑制する。骨表面に接着する骨芽細胞の数がGC過剰投与では減少しているとの観察があり、この原因としてGCが β 1-イン

ごとう きみのぶ、なわた はじめ：九州大学大学院
医学研究院病態制御内科学
おおなか けいぞう、たかやなぎ りょういち：同
老年病学

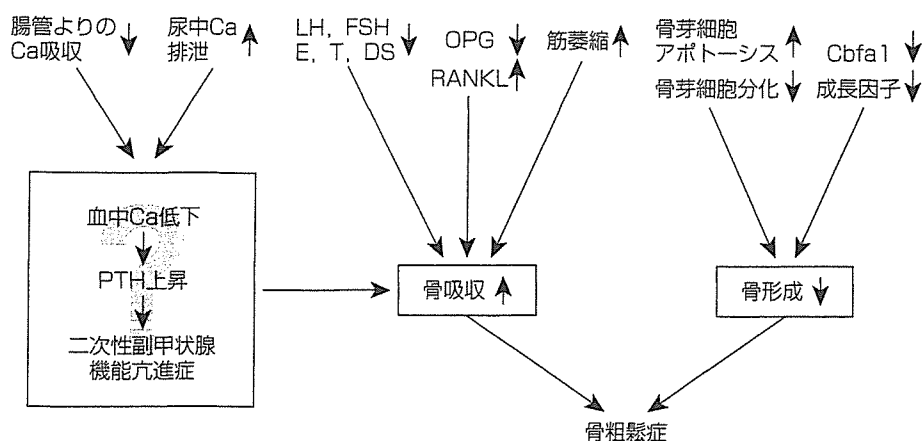


図1. グルコルチコイドの骨代謝におよぼす影響

テグリンなどの接着因子の発現を著しく低下させ、骨芽細胞の骨基質への結合を阻害するとの報告がある。

ステロイド骨粗鬆症の形態学的特徴として海綿骨部位の極端な空洞化と骨壊死が挙げられる。マウスでは、過剰のGCは上記の骨芽細胞への分化抑制に加えて、骨芽細胞、骨細胞のアポトーシスを強く誘導し、骨細胞の絶対数が減少することが示された。骨代謝回転も強く抑制するため、破骨細胞の前駆細胞数も減少した。この絶対的細胞数の減少を主病因とする説はステロイド骨粗鬆症の形態学的特徴によく合致している。近年開発されたビスフォスフォネート製剤はステロイド骨粗鬆症に有効であることが臨床試験で証明されている。ビスフォスフォネートはマウスにおいて、MAPキナーゼの一つであるERKのリン酸化を促進することにより、骨芽細胞のアポトーシスを阻止する。原発性骨粗鬆症におけるビスフォスフォネート製剤の作用機序は骨吸収の抑制、即ち、骨代謝回転を低下させることによるが、ステロイド骨粗鬆症では既に低下している骨代謝をさらに低下させることが当初懸念されたが、実際の臨床例の検討で、既に低下している骨代謝をさらに低下させてリモデリングを阻害することもなく、mineralizationを阻害することもないことが報告されている。

GCは生理量で破骨細胞の分化を促進、大量では抑制するが、成熟した破骨細胞に対しては骨吸収作用を促進する。この機序として、GCは骨芽細胞における破骨細胞分化抑制因子osteoprotegerin (OPG) (osteoclastogenesis inhibitory factor: OCIF) の産生を抑制し、破骨細胞分化因子osteoprotegerin-ligand (OPGL) (osteoclast differentiation factor: ODF/receptor activator of nuclear factor κ B-ligand: RANKL) の発現を増強することによって破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進することが報告された。しかしながら、ステロイド骨粗鬆症の病態に、骨吸収亢進がどの程度関与するのかは議論の余地が多い。

2) 腸管のCa吸収に対するGCの作用

GCは十二指腸および上部空腸でのCa吸収を低下させることが知られている。GCの大量投与時には多くの例で腸管Ca吸収の低下を認める。吸収抑制の機構として、小腸陰窩細胞数の減少などGCの腸管に対する直接作用と、 1α -水酸化酵素最大反応速度の低下など、ビタミンD₃代謝の変化を介した間接的作用が考えられている。

3) 尿中Ca排泄に及ぼす影響

GCは尿中へのCa排泄を増加させる。この機序として、GCによる腎糸球体濾過量 (GFR) 増加に伴う二次的なものであるとする説と、腎尿細

管への直接的な作用によるCa再吸収の抑制によるものであるとする両者の考え方がある。正常人では空腹時の尿中Ca排泄量と、血中PTH分泌量を反映する尿中腎原性cAMPは負の相関を示すのに対し、GC投与時は反対に正の相関を示す。また、腎尿細管でのCa再吸収を促進するサイアザイド投与が、GC投与による尿中Ca排泄量の増加と高PTH血症を改善することが知られている。このことは後者のCa再吸収抑制説を支持するものである。

4) 副甲状腺ホルモン(PTH)分泌に対するGCの影響

GCの過剰投与によりPTHの分泌が増加する。GCによる副甲状腺への直接的な刺激作用よりは、上述した腸管よりのCa吸収の低下と腎におけるCa排泄の増加に伴う二次性副甲状腺機能亢進症であると考えられている。増加したPTHが骨吸収を促進するわけであるが、GC骨粗鬆症患者の血中PTHは必ずしも上昇していないことが最近報告されている。GCによる腎からのCa再吸収の抑制は臨床的にGC骨粗鬆症が発症するよりもかなり大量(プレドニゾロン換算で30から35mg)のGCが必要であること、原発性副甲状腺機能亢進症では皮質骨の吸収が特徴的に認められるが、GC骨粗鬆症では海綿骨の減少がより顕著であることなどから、単純に二次性副甲状腺機能亢進症のみでGCによる骨量減少を説明するのは困難であると考えられる。また、PTHの骨吸収作用はサイトカインのIL(interleukin)-6やIL-11の作用と言われているが、GC骨粗鬆症ではむしろ、IL-6とIL-11は低下している。

5) 性ホルモンへの影響

過剰量のGCは、下垂体よりの黄体化ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の抑制を介してエストロゲン、テストステロン、DHEA、DHEA-Sの分泌を抑制し、骨粗鬆症を進展させる。さらに、慢性疾患によるストレス状態の持続は副腎からのDHEA-S分泌を抑制することになる。DHEA-S

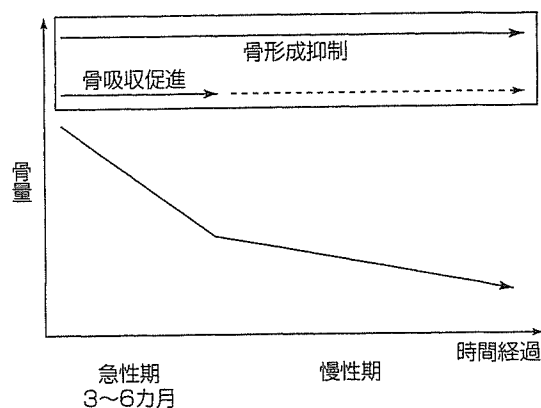


図2. グルココルチコイド過剰に伴う骨量の変化

は末梢組織でエストロゲンに変換されるので、閉経後女性の主要なエストロゲン源と考えられている。

2. ステロイド性骨粗鬆症の臨床

1) 外因性GC製剤使用に伴う骨粗鬆症

米国リウマチ学会による調査(1996年)¹⁾では、骨粗鬆症の推定患者数約2,000万人のうち20%がステロイド骨粗鬆症で、GC長期服用患者の25%が骨折を経験しているという。英国Consensus Groupの調査(1998年)では、25万人以上がGCの持続的経口投与を受けているが、骨量減少に対する予防措置を受けているのは全体の14%のみであった。GC誘発性の骨粗鬆症の発症は投与総量と期間に相関し、プレドニゾロン相当で7.5mg/日以上を慢性的に投与すると発症するとされる。GC投与開始6カ月以内に急速な骨量の減少が起こり、以後、徐々に進行する2相性を示す(図2)。

また、好発部位は胸腰椎骨、肋骨、大腿骨頸部などの海綿骨が豊富な部位であり、椎骨圧迫骨折、肋骨骨折の頻度が高い。形態学的に類骨層の減少と海綿骨の極端な空洞化が起こる。老人、閉経婦人では骨量が減少しているので、ステロイド骨粗鬆症を発症しやすくなる。また、リウマチ性疾患などの原病にともなう不動化は

骨粗鬆症を進展させる可能性があるが、これに関しては、リウマチ性疾患に罹患している患者の年齢が、他の疾患より高いことを反映している可能性も指摘されている。

さらに、注意すべきは、ステロイド骨粗鬆症においては、原発性骨粗鬆症と比較して、骨折閾値が高いという点である。原発性骨粗鬆症の診断に於いては正常と骨量減少の境界であるYAM(young adult mean: 若年正常人平均値)値80%においても、ステロイド骨粗鬆症では新規の椎体骨折発生率が高くなることが知られている。Van Staaらはメタアナリシスの結果、腰椎骨密度とステロイド総投与量(1日使用量×期間)は逆相関すること、1日投与量がプレドニゾン換算の2.5mg未満でも脊椎の骨折リスクは1.55と1以上であり、骨折率は用量依存的に上昇し、7.5mg以上では5.18となる結果を得た³⁾。彼らは5mg以上が骨折リスク増大の閾値と報告している。また、一般にステロイド投与を中止すると若年者では骨密度が上昇し、骨折リスクは速やかに低下するが、高齢者ではステロイドを中止しても元のレベルには戻らないことも示されている。田中らは縦断研究により、年齢、ステロイド投与量、治療前既存骨折、ステロイド投与前骨密度、男性であることが危険因子として抽出されたと報告している。特に既存骨折が最も高い危険因子であることを強調している⁴⁾。

2) Cushing症候群に伴う骨粗鬆症

Cushing症候群が初めて論文に記載されたときから、骨粗鬆症の合併は知られていたが、外因性グルココルチコイド製剤投与により発症するステロイド骨粗鬆症と同様に、長い間、臨床にはあまり注目されていなかった。しかしながら、手術療法による大幅な治療成績の向上が達せられた現在では、Cushing症候群は完治が期待される疾患であり、治癒後のQOL(quality of life)維持のためにも、骨粗鬆症の治療は必須である。適切な治療により、高血圧、糖尿病などの合併症は緩解することはあっても、脊椎圧迫骨折に

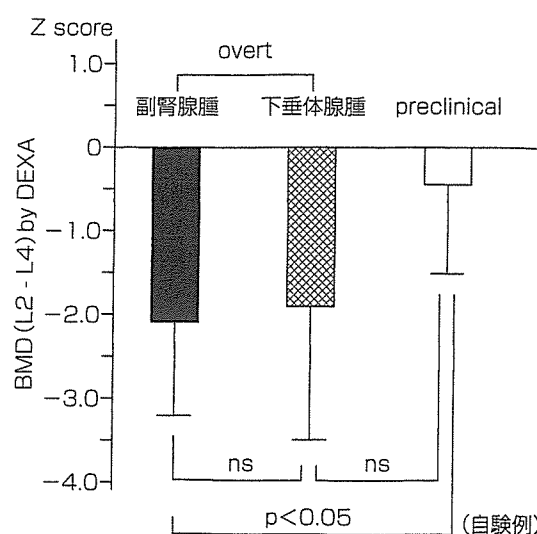


図3. Cushing症候群患者の骨塩量(自験例)

よるQOL低下は、生涯にわたって患者を苦しめることになる。

Cushing症候群患者の骨量に関しては、顕性患者で腰椎骨塩量をDEXA法で測定した場合、Z scoreでおよそ-1.5程度の低下を認めるとする報告が一般的である。当科での測定値はZ scoreでおよそ-2.0程度であり、副腎性、下垂体性の病因による差は認めなかった(図3)。最近、著明な骨粗鬆症の原因精査を目的として、他科より内科に紹介される患者の中にCushing症候群が発見されることが少なからずあり、このような患者を診察する際には十分な注意が必要である。また、最近注目されているプレクリニカルCushing症候群患者が、正常コントロール群と比較して骨量低下を来しているかに関しては、Z scoreでおよそ-0.4程度の低下を認めるとする報告が多いが、有意差を持つかについては意見が分かれている。

主な病変部位としては、外因性グルココルチコイド製剤投与により発症するステロイド骨粗鬆症と同様に、胸腰椎骨、肋骨、大腿骨頸部などの海綿骨が豊富な部位である。骨形成の低下を反映して、術前に測定した血中オステオカルシン値は低下しており、術後は、正常値に戻っ

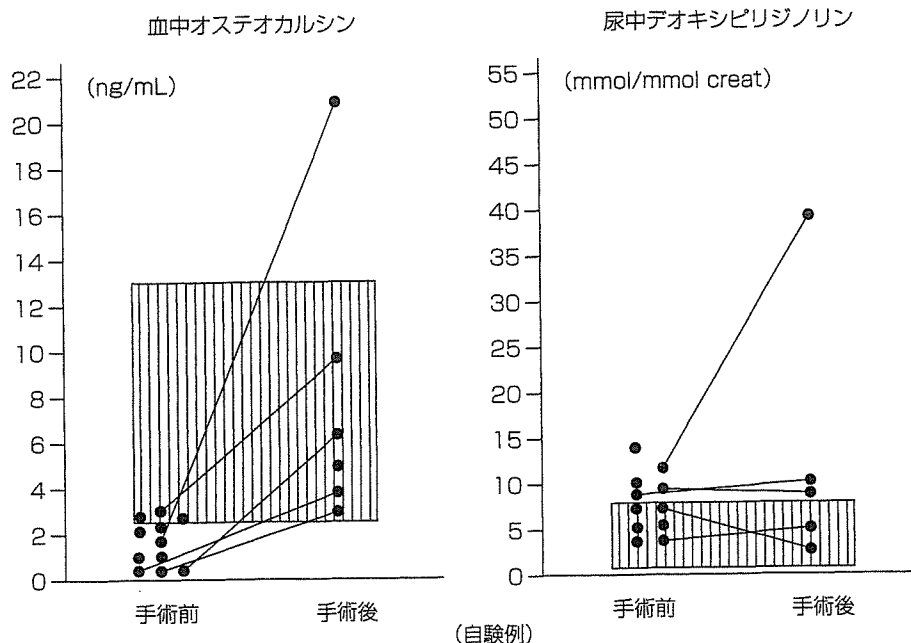


図4. Cushing症候群患者の手術前後における骨代謝マーカの推移（自験例）

ている（図4）。膠原病などの慢性疾患に対する外因性グルココルチコイド製剤投与と異なり、Cushing症候群は、ひとたび手術が成功すると、血中のコルチゾール値は速やかに正常化する。この場合の骨量の推移は、およそ数年を要して正常域にもどるとされているが、その場合でも、Z scoreでおよそ-0.5から-1.0程度の低下を認めるとする報告がある。さらに、術後6カ月間は、骨量は変化がないか、むしろ低下する可能性があることも報告されており、この期間の新たな骨折の発症に十分留意する必要がある。

3. 診断と治療

ステロイド骨粗鬆症に対する種々の治療薬の臨床試験の結果が相次いで報告されている。このうちステロイド骨粗鬆症に対し骨密度の増加とともに骨折率の減少を認めているのはビスフォスフォネート製剤である。これらのエビデンスをもとに、ステロイド骨粗鬆症による骨折を積極的に予防するため、1996年の米国リウマチ学

会（ACR）をはじめとして、各国より治療ガイドラインが発表されている^{1,2,5}。各指針で対象となる患者のGCの投与量や期間、第一選択薬、骨量減少の定義が異なっているが、新しい指針ほど予防治療薬としてのビスフォスフォネートの重要性が強調され、対象患者のGCの投与量や期間が短くなる傾向にある。本邦でも、日本骨代謝学会の骨粗鬆症診断基準検討委員会にてガイドライン作成が進められ、発表された。

現時点ではおおむね以下のように考えられている。プレドニゾン換算で7.5mg/日以上GCを6カ月以上投与される患者においては、GC投与量が15mg/日以上の場合や骨折あるいは危険因子がある場合は治療を開始する。特に閉経後婦人や高齢者ではそれ自体重要な危険因子となる。また、これらの条件に合致しなくても腰椎骨密度のT scoreが-1.5SD以下（若年正常人平均値YAMの約80%で、2000年度の原発性骨粗鬆症診断基準の骨量減少症に相当する）では治療を開始する。この際、性腺機能低下がある場合、欧米ではホルモン補充療法が主であるが、

本邦ではビスフォスフォネート製剤が第一選択薬として考慮されることになると考えられる。治療開始の条件に合致しない場合は一定期間毎に骨密度を測定し、年間3~4%以上の低下がある場合(いわゆるfast looser)は治療を開始する。

文 献

- 1) American College of Rheumatology Task Force on Osteoporosis Guidelines. Recommendations for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Arthritis Rheum* 39 : 1791-1801, 1996.
- 2) 高柳涼一, 他: ステロイド骨粗鬆症の病態と治療指針. *CLINICAL CALCIUM* 13 : 134-140, 2003.
- 3) Van Staa TP, et al : The epidemiology of corticosteroid-induced osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos Int* 13 : 777-787, 2002.
- 4) 田中郁子, 大島久二: ステロイド性骨粗鬆症の診断と治療に関する縦断研究: 診断・治療指針への予備的検討. *Osteoporosis Jpn* 11 : 11-14, 2003.
- 5) Bone and Tooth Society, National Osteoporosis Society, Royal College of Physicians. Glucocorticoid-induced osteoporosis: guidelines for prevention and treatment. London : Royal College of Physicians ; 2002.

大腸癌の一次予防

Primary prevention of colorectal cancer

古野 純典

Suminori Kono

九州大学大学院医学研究院予防医学分野

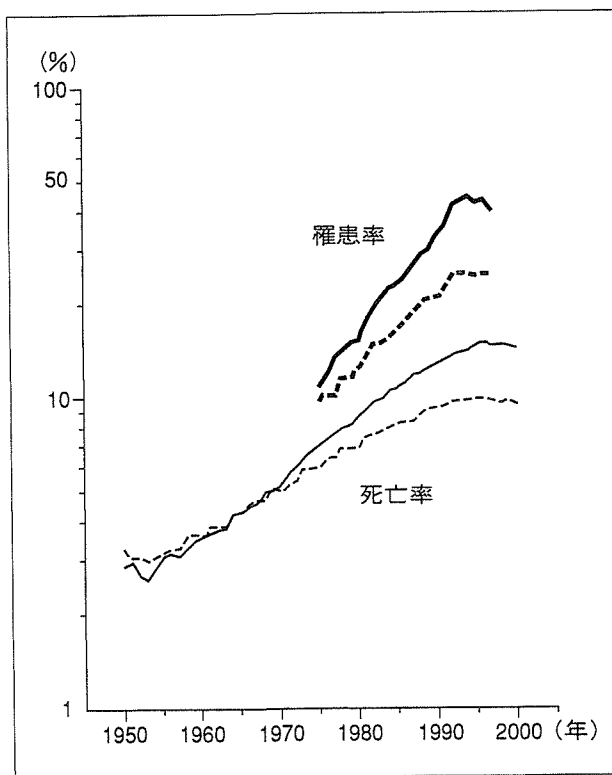
key words : 運動, 肥満, 葉酸, カルシウム

はじめに

大腸癌死亡は、2000年にはわが国癌死亡の12%を占め、男性では4番目に多く、女性では2番目に多い癌である¹⁾。罹患してみると男性では2番目に多く、女性ではもっとも多い癌である。家族性大腸ポリポーシスに発生する大腸癌や遺伝子修復異常を伴う非ポリポーシス遺伝性大腸癌など遺伝的素因の強い大腸癌が知られているが、わが国における大腸癌、とくに結腸癌の顕著な増加(図1)は、大腸発癌における環境要因の重要性を示しており、一次予防が可能であることを強く示唆するものである²⁾。従来から、高脂肪・低繊維の食事が大腸癌の危険因子として重要視されているが、世界各地の疫学研究の結果は脂肪の影響について否定的であり、食物繊維との予防的関連も定かでない。むしろ、運動不足や肥満が危険因子として注目されている。

大腸癌の予防的要因と危険因子

世界癌研究基金(WCRF)と米国癌研究財団(AICR)は、食物・栄養と癌に関する研究を詳細に検討し、癌の予防的要因と危険因子に関する報告書を1997年に出版しているが、大腸癌の確実な予防的要因として運動と野菜が、ほぼ確実な危険因子として赤身肉(牛肉、豚肉および羊肉)と飲酒があげられている(表1)³⁾。この報告書では、葉酸との予防的関連については証拠不十分、カルシウムについてはおそらく関係ないとされているが、最近の疫学研究では、葉酸およびカルシウムが大腸癌に予防的であることを示す結果が相次いで報告されている。



〔文献2〕より引用・改変
図1 わが国の男性(実線)と女性(破線)の結腸癌年齢調整死亡率および罹患率(人口10万対)の動向

1. 運動不足と肥満

予防的であることの機序は定かでないが、運動が結腸癌に対して予防的であることは多くの疫学研究でほとんど例外なく観察されている³⁾。仕事での運動、余暇の運動、1日エネルギー消費量などさまざまな身体活動量の指標との間に予防的な関連性が一致して認め

表1 環境要因と大腸癌

評価	予防的要因	関連のない要因	危険因子
確実	運動（結腸癌）， 野菜 NSAIDs ^{注1)}		
ほぼ確実			赤身肉，飲酒
可能性あり	食物繊維，デンプン， カロテノイド	カルシウム ^{注2)} ， セレン，魚	肥満，高身長， 頻回の食事，砂糖， 総脂肪， 動物性・飽和脂肪， 卵，加工肉， 高熱調理肉料理
証拠不十分	消化抵抗性デンプン ビタミンC，D，E 葉酸 ^{注2)} ，メチオニン， 穀類，コーヒー		

^{注1)}非ステロイド系抗炎症剤

^{注2)}最近の疫学的知見を勘案すれば，葉酸とカルシウムは「ほぼ確実」に予防的であるとえられる

[文献3]より引用・改変]

られており，疫学的にはきわめて強い証拠といえる。直腸癌に予防的であるとする研究はほとんどなく，結腸癌と直腸癌では成因が異なることを示す一例でもある。肥満についてはWCRF/AICRの報告書では「可能性あり」の判断がされているが，その後の研究成果を考慮すれば，肥満が結腸癌リスクを高めることも「ほぼ確実」と考えられる。われわれも自衛官の研究において，肥満が大腸前癌病変である大腸腺腫と強く関連していることを観察した(表2)⁴⁾。

2. 脂肪と赤身肉

世界各地の多くの症例対照研究でも，欧米の大規模コホート研究でも，脂肪摂取と大腸癌については明確な関連は示されていない(表3)¹⁾³⁾。一方，これらの大規模コホート研究では，牛肉や豚肉などの赤身肉ある

表2 肥満と結腸腺腫（前癌病変）：自衛官の研究

BMI (kg/m ²)	調整オッズ
< 22.45	1.0 (基準)
22.45 ~ 24.30	1.6 (0.9 ~ 2.7)
24.31 ~ 26.89	1.2 (0.7 ~ 2.1)
≥ 26.90	2.4 (1.1 ~ 5.1)

()内は95%信頼区間

BMI分布の30，60，90%で分類し，喫煙，飲酒および余暇の運動の影響を調整している

[文献4]より引用]

いは肉加工品の摂取が結腸癌リスクを高めることが示されている¹⁾³⁾。最近のメタ・アナリシスでは，赤身肉の摂取増加120g/dayに相当する相対危険は1.24(95%信頼区間1.08~1.41)，加工肉の摂取増加30g/dayに対応する相対危険は1.36(95%信頼区間1.15~1.61)

表3 脂肪・肉と結腸癌に関する大規模コホート研究の結果

	米国 看護師	米国男性 保健職	アイオワ州 女性住民	オランダ 男女住民
総脂肪	2.00*	1.19	0.86	1.07
飽和脂肪	1.39	0.88	1.21	1.07
肉 ^{注1)}	2.49*	3.57*	1.21	0.84
加工肉	1.21	1.16	1.51	1.72*

* $p < 0.05$

数値は5分類した場合の最低摂取群に対する最高摂取群の相対危険

オランダの加工肉は4分類

^{注1)}米国の研究では主菜としての牛・豚・ラム肉。オランダの研究は鶏肉を含む

[文献1]より引用・改変]

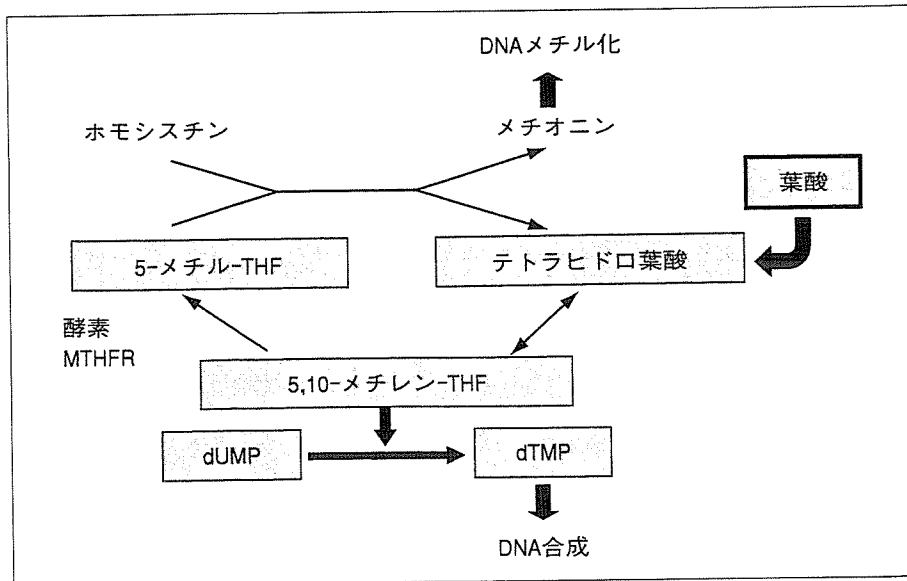


図2 葉酸の代謝経路

DNA 合成にはウリジル酸 (dUMP) がメチル化されてできるチミジル酸 (dTTP) が必須である。5,10-メチレン-THF はメチル基の供給源である

と推定されている⁵⁾。相対危険の高まりは一見小さいが、食物摂取調査での誤差の大きさを考えると実際の相対危険はもっと高いと考えてよい。肉・加工肉の高温調理によって産生されるヘテロサイクリックアミンあるいはヘム鉄の大腸発癌作用が注目されている。

3. 食物繊維と野菜

食物繊維と一般にいわれているものは消化吸収されない植物成分のことで、野菜、穀類および果物が主要な摂取源である。多くの症例対照研究では食物繊維高摂取群での結腸癌、あるいは大腸癌リスクの低下が認められている³⁾。しかし、米国の大規模コホート研究をはじめとして多くのコホート研究では食物繊維と関連した大腸癌リスクの低下はみられておらず、WCRF/AICR の報告書でも「可能性あり」の判断にとどまっている。一方、最近報告された欧州10カ国52万人のコホート研究では、食物繊維との予防的関連が観察されている⁶⁾。平均摂取量が13g/dayの群に対して32g/day (女性) あるいは36g/day (男性) の群の大腸癌の相対危険は0.75 (95%信頼区間1.15~1.61) と推定されている。ただし、摂取量が極端に違う地域のデータをまとめて解析しているので結果の解釈が難しい。

WCRF/AICR の報告書では、野菜が大腸癌に予防的であることは確実であるとされている³⁾。予防的である野菜の成分としては、食物繊維のほかに抗酸化ビタミンに関心がもたれているが、葉酸も重要である。葉酸はDNAメチル化およびDNA合成に重要な役割を果たしており (図2)、葉酸摂取が予防的であるこ

とが最近のいくつかの疫学研究で観察されている⁷⁾。また、葉酸代謝酵素 MTHFR の遺伝子多型と大腸癌の研究でも、葉酸が大腸癌に予防的であることを支持する結果が得られている⁷⁾。われわれの福岡大腸癌研究でも葉酸代謝酵素 MTHFR 遺伝子多型のホモ変異型で大腸癌リスクの低下が観察されている⁸⁾。MTHFR ホモ変異型では酵素活性が低く、葉酸摂取が多い場合にはDNA合成・修復に必要なチミジル酸 (dTTP) の供給が十分確保されるためと考えられる。葉酸が大腸癌に予防的であることについて WCRF/AICR の報告書では「証拠不十分」とされているが、最近の知見を勘案すれば、「ほぼ確実」と考えてよさそうである。

4. 飲酒

コホート研究や症例対照研究の多くで、飲酒による大腸癌リスクの軽度の高まりが認められている。飲酒による大腸癌リスクの高まりはほぼ確実であるとされている³⁾。メタ・アナリシスでは、アルコール1日24g (ウイスキー・シングル2杯相当) あたりの大腸癌の相対危険は1.10 (95%信頼区間1.05~1.14) と推定されている。アルコールの代謝産物アセトアルデヒドは発癌物質であるが、アルコールは葉酸の腸管吸収を低下させ、アセトアルデヒドが葉酸に阻害的であることも知られており、飲酒と関連した大腸癌リスクの高まりは葉酸不足が関与している可能性がある⁷⁾。

5. カルシウム

カルシウム摂取と大腸癌との関連は1980年代から検

表4 カルシウムによる大腸腺腫再発抑制試験

	1日量	追跡期間	投与群	対照群
米国6施設 ⁹⁾	1.2g	4年	127/409 (31%)	159/423 (38%)
欧州10各国21施設 ¹⁰⁾	2g	3年	28/176 (16%)	36/178 (20%)

数値は腺腫再発例数/対象者数。()内は再発率

表5 カルシウム摂取量と大腸癌リスク：世界5カ国10コホートのまとめ

1日摂取量 ²⁾	相対危険	(95%信頼区間)
< 500	1.00	(基準)
500 ~ 599	0.90	(0.73 ~ 1.11)
600 ~ 699	0.83	(0.66 ~ 1.05)
700 ~ 799	0.79	(0.67 ~ 0.94)
800 ~ 899	0.89	(0.74 ~ 1.06)
900 ~ 1099	0.79	(0.67 ~ 0.93)
1100 ~ 1299	0.76	(0.64 ~ 0.91)
1300 ~	0.74	(0.62 ~ 0.88)

²⁾食事とサプリメントの総摂取量

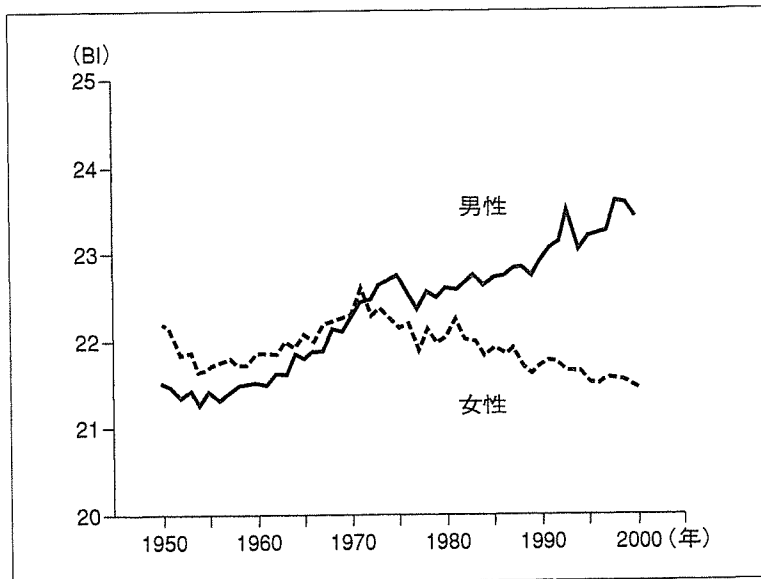
肥満度、運動、肉など多くの関連要因が調整されている

討されているが、カルシウムと大腸癌とはおそらく関係ないであろうと考えられていた³⁾。しかし、カルシウムによる大腸腺腫の再発抑制効果が2つの無作為化比較研究で観察されている(表4)⁹⁾¹⁰⁾。これらの研究では、カルシウム1日1.2gの投与で腺腫再発の相対危険が0.81(95%信頼区間0.67~0.99)⁹⁾、1日2gの投与での腺腫再発の相対危険は0.66(95%信頼区間0.38~1.17)と報告されている¹⁰⁾。これらの研究対象者のベースライン時の1日あたりのカルシウム平均摂取量は900~1,000mgであり、かなりの量が投与されていることになる。米国の研究では、その後、血中ビタミンDレベル別の腺腫再発率が検討され、再発抑制は血中ビタミンD高値群でのみ観察されている¹¹⁾。また、大腸ポリープ患者を対象とした小規模な無作為化比較試験(投与群42名、対照群51名)において、カルシウム(1日1.6g)、抗酸化ビタミンおよびセレンの複合投与が腺腫発生を抑制することが報告されている¹²⁾。さらに、世界5カ国の10コホート研究をまとめた最近の結果ではカルシウムが大腸癌に予防的であることが示されている(表5)¹³⁾。これらの結果から、カルシウムも「ほぼ確実」に大腸癌に予防的であると考えられる。

大腸癌の一次予防

これまでの疫学研究の成果をまとめると、大腸癌の

一次予防に役立つ生活習慣としては、①運動、②肥満防止、③野菜を多く摂ること、④赤身肉を控えること、⑤大量飲酒を控えること、⑥葉酸とカルシウム摂取を高めること、が重要であると思われる。WCRF/AICRの報告書では癌予防15カ条が提唱されているが、大腸癌に関係するのは野菜、赤身肉、飲酒、運動および肥満である。具体的内容は、①野菜・果物の1日摂取を400~800g、②赤身肉は多くても1日80g未満、③アルコールは1日ビール中ビン1本相当量(女性0.5本相当量)まで、④坐位作業職の人は1日1時間歩き、週1時間以上の強度な運動をする、⑤成人での体重増加を5kg未満に抑える、となっている³⁾。日本人の1日あたりの野菜と牛・豚肉の平均摂取量はそれぞれ、約400gと60gで、指針をおおむね満たしている¹⁴⁾。しかし、飲酒と運動については大腸癌を予防するには不十分な状態と思われる。肥満度指数の動向(図3)²⁾から、中高年男性の運動不足は深刻であると推測される。癌予防のための葉酸摂取の指針は定まっていないが、中高年日本人の葉酸摂取量は300~400μg/dayであり、平均値としては比較的高いレベルにあると思われる¹⁴⁾。主要な摂取源は野菜(37%)、緑茶(12%)、穀類(9%)および果物(7%)である。一方、日本人ではカルシウム摂取量が比較的小さく、1日平均600mg弱である。1日1gぐらひは必要であるのかもしれない。



[文献 2]より引用・改変]

図3 わが国中年男女の肥満度指数の年次推移
(平均身長と平均体重から求めた body mass index)

おわりに

現在、日本は世界的にみて大腸癌の高率国になっている¹⁾²⁾。従来から大腸癌の危険因子であると指摘されている高脂肪の食事について疫学研究の結果は否定的である。一方、運動と肥満防止が結腸癌に予防的であることはほとんど間違いないと考えられる。食物繊維が大腸癌に予防的であることについては否定的なコホート研究もあるが³⁾、野菜を中心とした食事は大腸癌に予防的である。葉酸とカルシウムが予防的であることが最近明らかにされているが⁴⁾、望ましい摂取量については今後の研究課題である。

【文 献】

- 1) 古野純典：大腸癌の社会疫学。現代医療，35：170～175，2003。
- 2) Kono, S. : Secular trend of colon cancer incidence and mortality in relation to fat and meat intake in Japan. Eur. J. Cancer Prev., 13 : 127～132, 2004.
- 3) World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research (WCRF/AICR) : Food, nutrition and the prevention of cancer : A global perspective. American Institute for Cancer Research, Washington, D. C., 1997, pp. 216～251.
- 4) Kono, S., Handa, K., Hayabuchi, H., et al. : Obesity, weight gain and risk of colon adenomas in Japanese men. Jpn. J. Cancer Res., 90 : 805～811, 1999.
- 5) Norat, T., Lukanova, A., Ferrari, P., et al. : Meat consumption and colorectal cancer risk : Dose-response meta-analysis of epidemiological studies. Int. J. Cancer, 98 : 241～

- 256, 2002.
- 6) Bingham, S. A., Day, N. E., Luben, R., et al. : Dietary fiber in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) : An observational study. Lancet, 361 : 1496～1501, 2003.
- 7) Bailey, L. B. : Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C→T polymorphism affect cancer risk : Intake recommendations. J. Nutr., 133 : 3748S～3753S, 2003.
- 8) Yin, G., Kono, S., Toyomura, K., et al. : Methylene tetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer : The Fukuoka Colorectal Cancer Study. Cancer Sci., 95 : 908～913, 2004.
- 9) Baron, J. A., Beach, M., Mandel, J. S., et al. : Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. N. Engl. J. Med., 340 : 101～107, 1999.
- 10) Bonithon-Kopp, C., Kronborg, O., Giacosa, A., et al. : Calcium and fiber supplementation in prevention of colorectal adenoma recurrence : A randomized intervention trial. Lancet, 356 : 1300～1306, 2000.
- 11) Grau, M. V., Baron, J. A., Sandler, R. S., et al. : Vitamin D, calcium supplementation, and colorectal adenomas : Results of a randomized trial. J. Natl. Cancer Inst., 95 : 1765～1771, 2003.
- 12) Hofstad, B., Almendingen, K., Vatn, M., et al. : Growth and recurrence of colorectal polyps : A double-blind 3-year intervention with calcium and antioxidants. Digestion, 59 : 148～156, 1998.
- 13) Cho, E., Smith-Warner, S. A., Spiegelman, D., et al. : Dairy foods, calcium, and colorectal cancer : A pooled analysis of 10 cohorts. J. Natl. Cancer Inst., 96 : 1015～1022, 2004.
- 14) 健康・栄養情報研究会・編：国民栄養の現状。平成13年厚生労働省国民栄養調査結果，第一出版，東京，2003。

Testicular zinc finger protein recruits histone deacetylase 2 and suppresses the transactivation function and intranuclear foci formation of agonist-bound androgen receptor competitively with TIF2

Rong-Hua Tao^a, Hisaya Kawate^a, Yin Wu^a, Keizo Ohnaka^a,
Masamichi Ishizuka^b, Atsuto Inoue^b, Hiromi Hagiwara^b, Ryoichi Takayanagi^{a,*}

^a Department of Geriatric Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

^b Faculty of Biomedical Engineering, Toin University of Yokohama, Kurogane-cho 1614, Aoba-ku, Yokohama 225-8502, Japan

Received 10 October 2005; received in revised form 20 December 2005; accepted 23 December 2005

Abstract

We previously reported that testicular zinc finger protein (TZF) is a corepressor for androgen receptor (AR). The present study demonstrated that a central portion (amino acids 512–663) of TZF, TZF(512–663), is responsible for both binding to AR and repressing the transactivation. TZF recruited endogenous histone deacetylase 2 (HDAC2) and formed a complex with agonist-bound AR. Imaging analyses showed that TZF and TZF(512–663) were recruited by AR and simultaneously impaired distinct AR foci formation. Quantification of the foci number using a three-dimensional imaging method revealed that the number of intranuclear AR foci was related to its transactivation activity. Moreover, increased levels of TZF dissociated a coactivator, TIF2, from the AR foci and vice versa. These results indicate that the ligand-dependent transactivation function of AR is quantitatively related to its intranuclear foci formation, and suggest that corepressors, such as TZF, act on these intranuclear events competitively with coactivators.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Androgen receptor; GFP; HDAC; Corepressor

1. Introduction

Androgens regulate a wide range of developmental and physiological processes and play particularly central roles in the expression of the male phenotype. These biological actions of androgens are mediated through androgen receptor (AR), a member of the nuclear receptor superfamily (Mangelsdorf et al., 1995; Roy et al., 1999; Heinlein and Chang, 2002). Dysfunction of AR through mutations predominantly leads to three different pathological situations, namely androgen insensitivity syndrome (AIS), spinal bulbar muscular atrophy (SBMA, Kennedy's disease) and prostate cancer (Gottlieb et al., 1999; Brinkmann, 2001; Yeh et al., 2002; Kawano et al., 2003). Similar to other members of the nuclear receptor superfamily, AR is composed of four functional domains: the N-terminal transcription activation domain, DNA-binding domain (DBD),

hinge region and C-terminal ligand-binding domain (LBD). The N-terminal domain contains the major ligand-independent transactivation function domain (AF-1) and the C-terminal domain contains another ligand-dependent transactivation function domain (AF-2). The DBD consists of two zinc finger clusters, of which the first zinc finger is involved in specific recognition of androgen-responsive elements (AREs) in target genes (Brinkmann, 2001; Heinlein and Chang, 2002). Before ligand binding, AR is located in the cytoplasm where it is sequestered by heat shock proteins, which maintain the receptor in a conformation that is able to bind its ligand. Ligand binding causes a conformational change of AR that releases it from the heat shock proteins and allows its translocation into the nucleus, where it binds to AREs and activates the transcription of its target genes (Gobinet et al., 2002; Gelmann, 2002). We previously reported that AR forms intranuclear fine foci in a ligand-dependent manner and is colocalized with coactivators (Tomura et al., 2001; Saitoh et al., 2002). Since treatment with antagonists and coexpression of a corepressor inhibited the AR foci formation, this foci formation was suggested to be a critical

* Corresponding author. Tel.: +81 92 642 6912; fax: +81 92 642 6911.
E-mail address: takayana@geriat.med.kyushu-u.ac.jp (R. Takayanagi).

step for transactivation by steroid receptors (Fejes-Tóth et al., 1998; Stenoien et al., 2000; Tomura et al., 2001; Saitoh et al., 2002; Kawate et al., 2005).

To date, many coregulators (coactivators and corepressors) that modulate nuclear receptor-mediated transactivation have been identified (Heinlein and Chang, 2002; Gobinet et al., 2002). One mechanism for the regulation by these coactivators and corepressors is chromatin modifications, such as acetylation or deacetylation of chromosomal histone proteins (Ogryzko et al., 1996; Heinzel et al., 1997; Kinyamu and Archer, 2004). Many coactivators carry histone acetylase activity and corepressor complexes often contain histone deacetylase (HDAC). Reversible acetylation of the core histones modulates chromatin structure and regulates transcription (Aranda and Pascual, 2001; Heinlein and Chang, 2002; Gobinet et al., 2002). It has recently been suggested that coregulators may be closely associated with the pathogenesis of several diseases, such as hormone-dependent cancers (breast or prostate cancer) and AIS (Adachi et al., 2000; Yanase et al., 2004).

Testicular zinc finger protein (TZF) has a Zn-finger motif in its C-terminus and is predominantly expressed in the testes (Inoue et al., 2000). We previously showed that TZF is a novel corepressor of AR (Ishizuka et al., 2005). TZF was localized in the nucleus in discrete dots, and recruited into AR foci after addition of the ligand 5 α -dihydrotestosterone (DHT) (Ishizuka et al., 2005).

In the present study, the repression mechanism of AR by TZF was further investigated. We found that HDAC2 was involved in the TZF-mediated repression. The number of AR foci decreased with increasing levels of TZF but recovered in the presence of the coactivator TIF2. TZF and TIF2 were colocalized with agonist-bound AR, and increased levels of TZF dissociated TIF2 from the AR foci, and vice versa. These results suggest that TZF and coactivators compete for AR foci formation and AR-mediated transcriptional activation.

2. Materials and methods

2.1. Plasmid construction

Expression plasmids for AR (pCMV-hAR, pAR-GFP and pAR-CFP) were prepared as previously described (Adachi et al., 2000; Tomura et al., 2001; Saitoh et al., 2002). Firefly reporter plasmids for AR (pGL3-MMTV and pGL3-PSA) were constructed as previously described (Tomura et al., 2001; Kawate et al., 2005). The expression plasmid for TIF2 (pcDNA-TIF2) was also described previously (Saitoh et al., 2002). Expression plasmids for TZF, pEGFP-TZF and pEYFP-TZF, were constructed as follows. The plasmid pLP-EGFP-C1-TZF (Ishizuka et al., 2003) was digested with *SaII* and *XhoI*, resulting in the creation of a *SaII*-*XhoI* fragment encoding the C-terminus of TZF and a *SaII*-*SaII* fragment encoding the rest of TZF. The *SaII*-*XhoI* fragment was initially inserted into the *SaII* sites of pEGFP-C1 and pEYFP-C1 (BD Sciences Clontech, Palo Alto, CA), followed by insertion of the *SaII*-*SaII* fragment into the *SaII* sites of these plasmids. Similarly, another expression plasmid for TZF, pFLAG-CMV2-TZF, was constructed using pFLAG-CMV2 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO). An expression plasmid for TZF(1-275), pEYFP-TZF(1-275), was constructed by removing an *ApaI* fragment from pEYFP-TZF. Subsequently, the removed *ApaI* fragment was inserted into the *ApaI* site of pEYFP-C1 to create an expression plasmid for TZF(275-942), pEYFP-TZF(275-942). A *XhoI*-*SmaI* fragment of pEYFP-TZF encoding TZF(1-663) was inserted into the *XhoI* and *SmaI* sites of pEYFP-C1 to produce pEYFP-TZF(1-663). A

BamHI-fragment encoding TZF(512-942) from pEYFP-TZF was cloned into the *BamHI* site of pEGFP-C3 (BD Biosciences Clontech) to produce an expression plasmid for TZF(512-942), pEGFP-TZF(512-942). An expression plasmid for TZF(512-663), pEGFP-TZF(512-663), was constructed by inserting a *BamHI* fragment of pEYFP-TZF(1-663) into the *BamHI* site of pEGFP-C3. To construct an expression plasmid for an internal deletion mutant, the *BamHI*-fragment encoding TZF(512-942) was first removed from pEYFP-TZF and a PCR-amplified fragment encoding TZF(663-942) was inserted into the *BamHI* site of the residual plasmid to produce pEYFP-TZF(Δ 512-663). The sequences of the PCR primers were 5'-AGGATCCAGGCTCAATTCTGTAAAGCG-3' and 5'-AGGATCCCTACTGGCCACAAGGACG-3'. The expression plasmid pFLAG-CMV2-TZF(512-663) was constructed by inserting a *HindIII*-*XbaI* fragment of pEGFP-TZF(512-663) into the *HindIII* and *XbaI* sites of pFLAG-CMV2.

To construct VP16-fusion proteins for modified mammalian one-hybrid assays, a *KpnI* fragment of pEYFP-TZF was inserted into the *KpnI* site of pACT (Promega Corp., Madison, WI) to construct pVP16-TZF encoding full-length TZF. An expression plasmid for TZF(1-275), pVP16-TZF(1-275), was constructed by inserting a *SmaI* fragment of pEYFP-TZF(1-275) into the *BamHI* site of pACT which was filled with the Klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I to create a blunt end. An expression plasmid for TZF(1-663), pVP16-TZF(1-663), was constructed by inserting a *XhoI*-*ScaI* fragment of pEYFP-TZF into the *SaII* and *EcoRV* sites of pACT. An expression plasmid for TZF(512-663), pVP16-TZF(512-663), was constructed by inserting a *BamHI* fragment of pEGFP-TZF(512-663) into the *BamHI* site of pACT. To construct an internal deletion mutant fused with VP16, the insert of pEYFP-TZF(Δ 512-663) was subcloned into pACT to create pVP16-TZF(Δ 512-663). The validity of all the constructs was confirmed by DNA sequencing.

2.2. Cell culture

A monkey kidney-derived cell line, COS-7, was obtained from the Riken Cell Bank (Tokyo, Japan). A human prostatic cancer cell-line, LNCaP, and a mouse fibroblast cell line, NIH3T3, were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA). COS-7 and NIH3T3 cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), while LNCaP cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 medium (Sigma). Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Sanko Junyaku Co. Ltd., Tokyo, Japan) and 100 U/ml of penicillin-streptomycin (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

2.3. Functional reporter assay

Cells (1×10^5 cells/well) were seeded in 12-well plates and incubated for 24 h before transfection. The cells were transfected with 0.3 μ g/well of pGL3-MMTV or pGL3-PSA as a reporter, 2 ng/well of pRL-CMV (a *Renilla* Luciferase vector; Promega Corp.) as an internal control, 0.1 μ g/well of pCMV-hAR and 0.5 μ g/well of an expression vector for full-length TZF or its truncated mutants, unless otherwise indicated, using 2.7 μ l of Superfect transfection reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). In all cotransfection studies, the total amount of plasmid DNA was fixed by adding empty vector to the transfection mixture. After incubation for 3 h, the cells were rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and re-fed with the appropriate medium containing 10% charcoal-stripped FBS in the presence or absence of 10 nM DHT. After an additional incubation for 24 h (COS-7) or 48 h (LNCaP), the cells were lysed using the lysis buffer supplied with the luciferase kit (Promega) and the luciferase activities were assayed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) and a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). An additional treatment with trichostatin A (TSA; Sigma) was carried out for 12 h before cell harvesting. One-way analysis of variance followed by Scheffé's test was used for multi-group comparisons. $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

2.4. Modified mammalian one-hybrid assay

NIH3T3 cells (1×10^5 cells/well) were seeded in 12-well plates at 24 h before transfection. The cells were transiently transfected with 0.3 μ g of an expression vector for full-length TZF or its truncated mutants fused to VP16,