

# ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子多型解析

平田哲朗、藤岡幹浩、新井祐志、高橋謙治、浅野武志、  
栗林正明、石田雅史、久保俊一

(京都府立医科大学大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)

田村京子、中島滋郎 (大阪大学大学院医学系研究科 小児科学)

近藤亨子、福島若葉、廣田良夫 (大阪市立大学大学院医学研究科公衆衛生学)

里見佳子、西野輔翼 (京都府立医科大学大学院医学研究科 分子生化学)

秋岡清一、岡本雅彦、吉村了勇

(京都府立医科大学大学院医学研究科 移植・再生制御外科学)

特発性大腿骨頭壊死症(ION)は大腿骨頭が阻血性壊死に陥り、股関節機能が失われる難治性疾患である。病態についてはいまだ明らかではないが、凝固・線溶系、脂質代謝の異常の関与が報告されている。われわれは、凝固線溶系、脂質代謝に深い関わりを持つとされるLipoprotein(a)[Lp(a)]や脂質代謝に深い関わりを持つリポ蛋白質とION発生の関連について検討した。腎移植後の症例を対象に、Lp(a)の濃度に影響を与えているとされる3つのsingle nucleotide polymorphisms(SNPs)、Lp(a) phenotype、そして血中Lp(a)濃度を測定し、ION発生の関連を検討した。リポ蛋白質に関しては、冠動脈疾患との関連が多く報告されているApolipoprotein B (ApoB)、Apolipoprotein A1 (ApoA1)をコードする遺伝子のSNPを解析した。Lp(a) phenotypeとION発生の間に有意な関連を認め、分子量の小さいphenotypeでION発生のriskが上昇することが判明した(adjusted odds ratio=6.03、p=0.0018)。またApoB遺伝子のC7623TでION発生の間に強い関連を認め、T alleleを含む症例でION発生のriskが上昇することが判明した(adjusted odds ratio=6.37、p=0.011)。

遺伝子サブグループでは、現在までに輸送タンパクのATP binding cassette B1 (ABCB1)遺伝子と受容体のcAMP-response element binding protein-binding protein (CBP)遺伝子において、腎移植症例のION発生の関連を報告した。今回報告したApoB遺伝子を併せて3遺伝子の遺伝子多型とIONとの関連が明らかになったため、これら3遺伝子の組合せとIONとの関連を解析した。ABCB1がTC+CCで、CBPがAGの症例では、odds ratio(OR)が22.91となり、有意なORの上昇を認めた。交互作用の指標となるSynergy indexが1.99(>1)であったため、ABCB1遺伝子とCBP遺伝子の間に交互作用が存在することが判明した。

その他にも虚血性心疾患などの血管病変との関連が報告されている10種類のSNPとIONとの関連について解析を行ってきたが、ION発生の間に有意な関連を認めなかった。

IONの発生をステロイド投与前から予測するためには、今後もさらにION発生と関連のある遺伝子多型を明らかにしていく必要がある。

## 1. 研究目的

臨床で使用されるステロイド剤は、高い抗炎症効果と免疫抑制作用を有するため、さまざまな疾患に対して頻用される薬剤である。しかし、その反面、多くの合併症も存在する。骨・関節関係の合併症で大きな問題となるのが、特発性大腿骨頭壊死症 (Idiopathic osteonecrosis of the femoral head: ION)である。IONの

好発年齢は、基礎疾患を反映して青壮年期である。壊死部が圧潰を起こすと、強い痛みを生じ、壊死範囲が大きいと骨頭温存が困難になる。

IONの病態についてはいまだ明らかではないが、凝固線溶系、脂質代謝の異常の関与が報告されている。

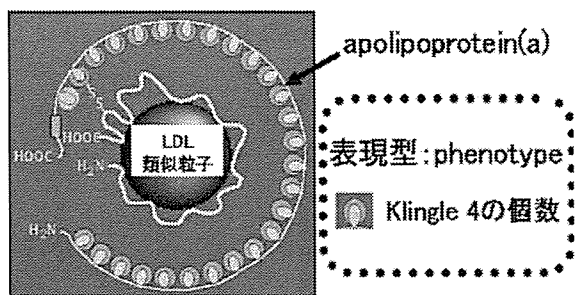


図1 Lipoprotein(a) 粒子

われわれは、凝固線溶系、脂質代謝の両方に深い関わりを持つとされるLipoprotein(a)[Lp(a)]と、ION発生に着目した。血中に存在するLp(a)粒子は、LDL類似粒子に、apolipoprotein(a)[apo(a)]とapolipoproteinB-100[apoB-100]という2つの高分子蛋白質がdisulfide結合した構造を有する脂質粒子であり、動脈硬化惹起性と血栓惹起性とを併せ持つリポ蛋白質として注目されている<sup>1)</sup>(図1)。Kringle4の繰り返し配列の数によって規定されるapo(a)の分子量(以下phenotype)は、動脈硬化進展や血栓惹起性との関連が報告されている<sup>2,3)</sup>。また、plasminogenとapo(a)の構造がよく似ていることから、plasminogen receptorでplasminogenと拮抗し<sup>4)</sup>、線溶系を阻害するとされている<sup>5)</sup>。

リポ蛋白質には、VLDL、LDL、HDLなどがあり、triglyceride(TG)やtotal cholesterol(TC)などの脂質の周囲にApolipoprotein B(ApoB)やApolipoprotein A1(ApoA1)などのタンパク質が取り巻いている構造をしている。low density lipoprotein(LDL)は肝臓から末梢へ脂質を運び、主な構成要素はApoBである。high density lipoprotein(HDL)は末梢から肝臓へ脂質を運び、その主な構成蛋白はApoA1である。そして、血中のLDL、ApoB濃度の上昇やHDL、ApoA1濃度の低下と冠動脈疾患との関連について報告されている<sup>6,7)</sup>。

ApoB蛋白をコードするApoB遺伝子の主なsingle nucleotide polymorphism(SNP)には、代表的なものとしてC7623TとG12619Aがあり、冠動脈疾患<sup>8-10)</sup>や血中LDL、ApoB<sup>11-13)</sup>との関連が多く報告されている。ApoA1蛋白をコードするApoA1遺伝子の主なSNPには、代表的なものとしてG-75AとC83Tがあり、これらも冠動脈疾患<sup>6)</sup>や血中HDL、ApoA1濃度<sup>7,14-17)</sup>との関連が多く報告されている。

今回の研究では、Lp(a)、ApoBそしてApoA1の遺伝的多形性、血中Lp(a)濃度および血中脂質濃度(LDH、HDL、ApoB、ApoA1、TG、TC)を測定し、腎移植後IONの発生群(症例)と非発生群(対照)間で比較することを目

的としている。

また、現在までに遺伝子サブグループで、輸送タンパクのATP binding cassette B1(ABCB1)遺伝子<sup>18)</sup>、ApoB遺伝子<sup>19)</sup>、そして受容体のcAMP-response element binding protein-binding protein(CBP)遺伝子<sup>20)</sup>において、腎移植症例のION発生との関連を報告してきた。IONは複数のrisk factorが関与する多因子疾患であるため、個々の遺伝子のIONに対する影響のみでなく、複数の因子とIONとの関連を解析することが重要である。今回の研究では、IONと関連を認めた複数の遺伝子多型の組合せとIONとの関連についても解析した。

その他に虚血性心疾患などの血管病変と関連が報告されているSNPの解析も行った。

## 2. 研究方法

### (1) 対象

京都府立医科大学では1970年から現在までに600例以上の腎移植が施行されている。これらの患者のうち、移植後にION発生が確認され、定期的に当院に通院している34例のION患者を症例とし、移植後1年以上経過例で定期的に単純X線写真、磁気共鳴画像法(MRI)、骨シンチグラムで全身に骨壊死が発生していないことを確認している患者124例を対照とした。IONの診断には厚生労働省特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会の診断基準を用いた<sup>21)</sup>。

なお以下の患者は除外した。

- 1) 移植腎の機能が廃絶し、透析に至っている患者
- 2) 移植前からION発生が確認された患者
- 3) 白蓋形成不全や変形性股関節症など移植前から股関節疾患を有する患者
- 4) 研究に対する同意が得られなかった患者

### (2) 臨床情報

性別、移植時年齢、移植腎の種別(生体腎あるいは死体腎)、急性拒絶反応の有無、移植後に用いた免疫抑制剤の種類(Cyclosporine、Tacrolimus)、ステロイド投与プロトコールについての情報を収集した。当院ではCyclosporineを1982年から導入し、それによりステロイド投与量を大幅に減量することができた。さらに1996年と2002年を境に、ステロイド投与量を減量するプロトコールを導入した。本検討ではCyclosporine導入後の3つのプロトコール(大量、中等量、少量)別に患者を分類した。

### (3) apo(a) phenotype分類

採血に同意が得られた112例(症例 20例、対照 92例)に対して、apo(a) phenotypeの測定を行った。Utermannら<sup>22)</sup>の方法に準じてapo(a) moleculeをF、B、S1、S2、S3、S4の6つのisoformに分類し、F、B、S1、S2を含む群をLow Molecular Weight (LMW)群、S3、S4のみの群をHigh Molecular Weight (HMW)群とした。apo(a) phenotypeとION発生について統計学的に検討した。採血時期は、腎移植後13から268ヵ月(平均106ヵ月、steady state)で行い、採血時間は朝食前に行った。

### (4) 血中Lp(a)濃度

採血に同意が得られた112例(症例 20例、対照 92例)に対して血中のLp(a)濃度を測定し、ION発生との関連を検討した。

### (5) apo(a)遺伝子のSNP解析

apo(a)遺伝子解析は、保存中のヌクレオチドが解析可能であった150例(症例 33例、対照 117例)に対して行った。同意を得た患者の末梢血より、ゲノムDNAをDNeasy™Tissue Kit (QIAGEN GmbH、Hilden、Germany)を用いて抽出した。PCRに用いたプライマーは5' side-CTTGAATTCCTCCAAAGTGCTGGGATTA CAGAG および3' side- TAAGGATCCGGCATATGT ATTTTACATTGTGGGAGである。ABI PRISM377シーケンサー(Applied Biosystems、PerkinElmer、Inc.、MA)を用い、塩基配列決定をおこなった。シーケンシング反応時のプライマーは、G(-914)A に対しては5'-TCGAGACATTCTTGCTCTGT-3' (f)と5'-GGGATT ATAGGCATGAGC CA-3' (r)で、C(-49)TとG(-21)Aに対しては5'-GCATCTATTGACATTGCACT-3' (f)と5'-AGGAAGTGGTTCTTCTACTT-3' (r)とした。さらに、この3つのSNPの組合せから、過去の報告に準じてhaplotypeをA[G(-914)、C(-49)、G(-21)]、B[A(-914)、C(-49)、G(-21)]、C[A(-914)、C(-49)、A(-21)]、D[A(-914)、T(-49)、G(-21)]に分類し<sup>23,24)</sup>、ION発生との関連を検討した。

### (6) ApoBおよびApoA1遺伝子のSNP解析

ApoBのC7623TとApoAのG-75A、C83Tは、PCR-restriction fragment length polymorphism(PCR-RFLP)法を用いて解析し、制限酵素にC7623TはXbaIを、G-75A、C83TはMspIを用いた。ApoBのG12619Aは、TaqManPCR法を用いて解析した。Primerには

5'GATAACGTGT TTGATGGCTTGGTA-3' (f)と5'-TCAATGAGTGAGT CAATCAGATGCTT-3' (r)を用いた。Probeの配列はTTACTCAAAAATTCCとTTACTCAAGAATTCCとし、蛍光色素にはVICとFAMを用いた。そして、Logistic regression modelを用いてION発生との関連を調査した。

### (7) リポ蛋白質や脂質の血中濃度

採血に同意が得られた112例(症例 20例、対照 92例)に対して、ApoB、ApoA、LDL、HDL、TGおよびTC濃度を測定した。ApoB/A1比やLDL/HDL比も計算し、ION発生との関連を検討した。また、ApoBとApoA1のSNPsと血中脂質濃度との関連についても調査した。

### (8) 3遺伝子の解析

輸送タンパクのABCB1遺伝子、脂質代謝のApoB遺伝子、そして受容体のCBP遺伝子を今までの報告<sup>18-20)</sup>に従って、2カテゴリーに分類した(表1)。

表1 3遺伝子の出現頻度とカテゴリーの分類

	症例 n(%)	対照 n(%)		症例 n(%)	対照 n(%)
ABCB1 gene	(n=30)	(n=121)	ABCB1 gene	(n=30)	(n=121)
TT	2 (7)	28(23)	TT	2 (7)	28(23)
TC	15 (50)	54(45)	TC+CC	28 (93)	93(77)
CC	13(43)	39(32)			
ApoB gene	(n=33)	(n=122)	ApoB gene	(n=33)	(n=122)
CC	27 (82)	115 (94)	CC	27 (81)	115 (94)
CT	6 (18)	6 (5)	CT=TT	6 (18)	7 (6)
TT	0(0)	1(1)			
CBP gene	(n=34)	(n=123)	CBP gene	(n=34)	(n=123)
GG	23 (68)	105(85)	GG	23 (68)	105(85)
AG	11(32)	18(15)	AG	11(32)	18(15)
AA	0(0)	0(0)			

#### <解析1>

3遺伝子とステロイド性大腿骨頭壊死症との関連を明らかにするために、logistic regression modelを用いてodds ratio(OR)と95%信頼区間(95%CI)を計算し、同じモデル内で、互いの影響を調整して解析した。

#### <解析2>

遺伝子の2つずつの組合せとIONとの関連をlogistic regression modelを用いて解析した。

#### <解析3>

交互作用を検討し、additive modelでSynergistic indexを計算した(式)。

$$\text{Synergistic index} = \frac{\text{RR(AB)} - 1}{\text{RR}(\bar{\text{A}}\text{B}) + \text{RR}(\text{A}\bar{\text{B}}) - 2} \dots (\text{式})$$

### (9) その他のSNPの解析

上記のほかにも虚血性心疾患やangioplasty後の再狭窄などの血管病変と関連の深いSNPとして報告されている lipoprotein lipase(LPL、 S447X)<sup>25)</sup>、 fatty acid-binding protein 2(FABP2、 G2445A)<sup>26)</sup>、 cholesteryl ester transfer protein(CETP) (RS708272)<sup>27)</sup>、 thrombomodulin (THBD、 C2136T)<sup>28)</sup>、 NADH/NADPH oxidase p22 phox(p22-PHOX、 C242T)<sup>26)</sup>、 eNOS(G894T)<sup>28)</sup>、 eNOS(T-786C)<sup>29)</sup>、 paraoxonase (PON1、 Arg192Gln、 Leu54Met)<sup>26)</sup>、そしてConnexin-37(GJA4、 C1019T)<sup>30)</sup>について、ION発生との関連をTaqManPCR法を用いて解析した。

### (10)統計解析

統計的有意差の検討には、Chi square test、Fisher's exact test、Wilcoxon's ranks sum test、Student T test、もしくはMantel extension methodを用いた。単変量および多変量解析にはlogistic regression model (SAS software ver 9.0)を用いた。apo(a) phenotypeとION発生との関連をOdds ratio (OR) および、95%信頼区間(CI)を算出することから評価した。多変量解析を、性別、移植時年齢、移植後に用いた免疫抑制剤の種類 (Cyclosporine、Tacrolimus)、ステロイド投与プロトコール (少量、中等量、大量)、そしてapo(a) phenotypeに基づき施行し、ION発生との関連を検討した。

### (11)倫理面への配慮

本研究を開始するにあたり、京都府立医科大学におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。また、患者に対して専用の同意書を作成し、文書による同意を得た。

## 3. 研究結果

### (1) 対象の一般特性

表2に対象の一般特性を示す。性別、移植時年齢、移植腎の種類(生体腎、死体腎)、急性拒絶反応の有無については、症例、対照間で有意差は認められなかった。免疫抑制剤の種類とION発生との比較(p=0.027)、またはステロイド投与プロトコールとION発生との比較(p=0.021)で有意な関連を見いだした。

表2 対象の一般特性

		症例 (n=34)	対照 (n=124)	P value
性別 n(%)	男性	23(67.6)	91(73.4)	0.509*
	女性	11(32.4)	33(26.6)	
移植時年齢 平均	中央値(範囲)	38.5(20-64)	35(9-63)	0.157**
		40.0	36.1	
免疫抑制剤 n(%)	Cyclosporine	28(82.4)	77(62.1)	0.027*
	Tacrolimus	6(17.6)	47(37.9)	
移植腎 n(%)	生体腎	29(82.4)	110(88.7)	0.382**
	死体腎	6(17.6)	14(11.3)	
急性拒絶反応 n(%)	なし	29(85.3)	103(83.1)	0.757*
	あり	5(14.7)	21(16.9)	
ステロイドプロトコール n(%)	大量	20(58.8)	44(35.5)	0.021†
	中等量	12(35.3)	66(53.2)	
	少量	2(5.9)	14(11.3)	

\*Chi square test, \*\*Fisher's exact test, #Wilcoxon Rank Sums test, or †Mantel extension method.

### (2) apo(a) phenotypeとION発生との関連

apo(a) phenotypeとION発生との関連を表3に示す。isoformのF、B、S1、S2を1つでも含むphenotype LMWでは症例 10例(50.0%)、対照 14例(15.2%)に対し、S3、S4のみを含むphenotype HMWでは症例 10例(50.0%)、対照 78例(84.8%)であった。

apo(a) phenotypeとION発生との間に統計学的に有意な強い関連を認めた(p=0.0018)。Logistic regression analysisでは、HMWに対して、LMWでは単変量、多変量ともにORの有意な上昇を認めた(crude OR=5.57、95% CI: 1.96-15.8、p=0.0013、adjusted OR=6.03、95% CI: 1.95-18.6、p=0.0018)。

表3 apo(a) phenotypeとION発生との関連

	Odds Ratio			
	Crude OR(95% CI)	P value	*Adjusted OR(95% CI)	P value
phenotype				
LMW:	5.57 (1.96-15.8)	0.0013	6.03 (1.95-18.6)	0.0018
HMW:	1		1	

\* This model includes Sex, Age, Immunosuppressant, and Steroid Administration and phenotype. LMW(Low Molecular Weight): F, B, S1, S2を1つでも含む群 HMW(High Molecular Weight): S3, S4のみを含む群.

### (3) 血中Lp(a)濃度とION発生との関連

表4に、血中Lp(a)濃度とION発生との関連を示す。血中Lp(a)濃度は、対照で平均12.9mg/dlに対し、症例で

は 18.8 mg/dlと上昇は認められたが、有意ではなかった。  
(p=0.058)。

表4 Lp(a) 血中濃度とION発生との関連

	ION		P value
	症例 (N=20) median (range)	対照 (N=93) median (range)	
Lp(a) (mg/dl)	14.0 (1-66) ( mean = 18.8)	6.0 (1-85) ( mean = 12.9 )	0.058*

Statistical analysis were done by using #Wilcoxon Rank Sums test

(4) apo(a) haplotype と ION発生との関連

本検討でhaplotypeの頻度は、A: 31.3%、B: 0.7%、C: 41.3%、D: 26.7%であり、日本人での過去の報告とほぼ一致した<sup>24)</sup>。図2にapo(a) haplotypeとION発生についての検討結果を示す。各グラフは症例、対照のそれぞれにおけるhaplotypeの出現頻度を示すが、統計学的有意差を認めなかった。

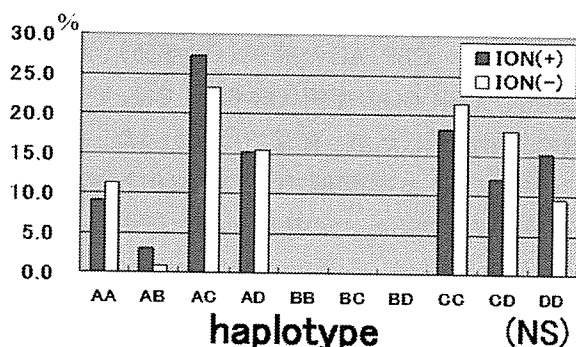


図2 haplotypeとION発生

(5) genotypeとION発生との間の関連

ApoB、ApoA1の各SNPでAlleleの出現頻度を調査した(図3)。以前の報告とほぼ同じ出現頻度であり、今回の腎移植症例は一般的な日本人のAllele頻度を示していた。

ApoB遺伝子のC7623TでAllele Tを有するgenotypeではgenotype CCに比べてOR 6.37と有意な上昇を認めた(表5)。つまり、Tを有する症例でIONが発生するriskが有意に高いことが判明した。ApoBのG12619AやApoAのG-75A、C83Tでは有意な関連を認めなかった。

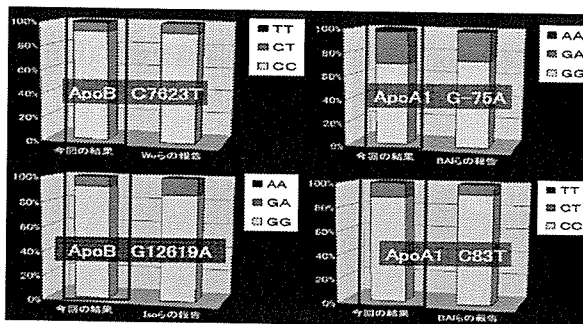


図3 Allele出現頻度

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

表5 SNPsとION発生との関連性

ApoB	症例	対照	#Adjusted OR (95%CI)	P value	
C7623T	CC	27	115	1	0.011
	CT TT	6	7	6.37 (1.53-26.52)	
G12619A	GG	33	112	1	0.602
	GA AA	1	11	0.55 (0.06-5.11)	
ApoA1	症例	対照	#Adjusted OR (95%CI)	P value	
G-75A	GG	22	86	1	0.459
	GA AA	11	34	1.41 (0.57-3.50)	
C83T	CC	29	106	1	0.615
	CT TT	4	14	1.39 (0.38-5.05)	

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

(6) ION発生と血中濃度との関連

図4に血中濃度とION発生との関連の解析の結果を示す。ApoBやApo A1単独では有意差を認めなかったが、ApoB/A1比で有意差を認めた。

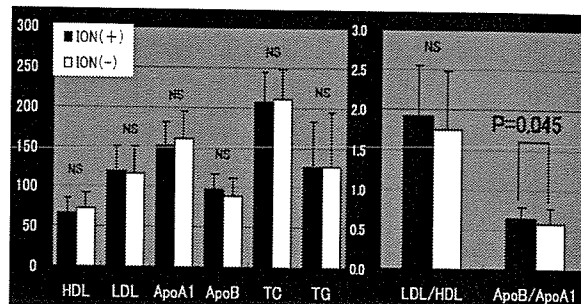


図4 ION発生と血中濃度との関連

また、ION発生との間に有意差を見出したApoBのC7623Tのgenotypeと血中濃度との関連を示す(図5)。すべての血中濃度で有意差を認めなかった。

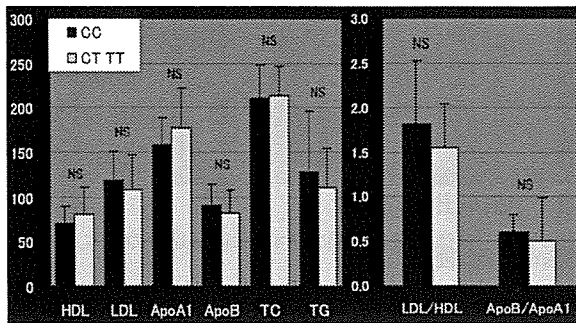


図5 ApoBのC7623Tのgenotypeと血中濃度との関連

(7) 3遺伝子とIONとの関連の解析結果

<結果1>

多変量モデルには、他の遺伝子の影響を調整するためにIONと関連を示した3つのfactor (ABCB1遺伝子、ApoB遺伝子、CBP遺伝子)を同じモデルに含めた。3遺伝子とステロイド性大腿骨頭壊死症との関連を示す(表6)。単変量解析でABCB1遺伝子のTT+CCは、TTに比べて約4倍のORの上昇を認めたが、境界域の有意性であった(univariate OR=4.22、P=0.059)。しかし、他遺伝子で調整後にORの上昇は有意になった(multivariate OR=5.03、P=0.039)。ApoB遺伝子は、CCに比べてCT+TTでは、他遺伝子で調整後も有意なORの上昇を認めた(univariate OR=3.65、P=0.030、multivariate OR=4.59、P=0.025)。CBP遺伝子は、GGに比べてAG+AAでは、他遺伝子で調整後も有意なORの上昇を認めた(univariate OR=2.80、P=0.022、multivariate OR=3.77、P=0.008)。このように、互いの遺伝子多型で調整後も、3遺伝子すべてで有意なORの上昇を認めた。

次に表6の多変量モデルの変数にさらにgender、age、immunosuppressant、kidney、acute rejection、steroid dose and three genesの6つの背景因子を加えたモデルで多変量解析を行った。ORは、ABCB1遺伝子TC+CCで5.03、ApoB遺伝子CT+TTで4.57、そしてCBP遺伝子AG+AAで3.06となり、表6と同じ方向性と同様なパターンを示した。したがって、本研究では表6をfinal modelとした。

表6 3遺伝子とIONとの関連

	症例 n(%)	対照 n(%)	univariate		multivariate <sup>a</sup>	
			*OR (95%CI)	P Value	OR (95%CI)	P Value
ABCB1 gene (n=30)		(n=121)				
TT	2 (7)	28 (23)	1		1	
TC+CC	28 (93)	93 (77)	4.22 (0.95-18.8)	0.059	5.03 (1.08-23.4)	0.039
ApoB gene (n=33)		(n=122)				
CC	27 (82)	115 (94)	1		1	
CT+TT	6 (18)	7 (6)	3.65 (1.14-11.7)	0.030	4.59 (1.21-17.4)	0.025
CBP gene (n=34)		(n=123)				
GG	23 (68)	105 (85)	1		1	
AG+AA	11 (32)	18 (15)	2.80 (1.16-6.70)	0.022	3.77 (1.42-9.99)	0.008

<sup>a</sup>This model includes ABCB1 gene, ApoB gene, and CBP gene.  
\*OR=odds ratio, 95%CI=95% confidence interval

<結果2>

2遺伝子ずつの組合せとIONとの関連を検討した。ABCB1 遺伝子とCBP 遺伝子のSNPの組合せで4つのグループに分け、ABCB1 TT、CBP GGの症例をreferenceとしたときの3グループのORを計算した(表7)。モデルにはApoB 遺伝子も調整因子として含めた。ABCB1 TT、CBP AGの症例(OR=6.55)、ABCB1 TC+CC、CBP GGの症例(OR=6.45)では、いずれもORの上昇を示したが、有意ではなかった。ABCB1 TC+CC、CBP AGの症例では、OR=22.91となり、有意なORの上昇を認めた。この結果を図6に示す。

表7 ABCB1遺伝子とCBP遺伝子の交互作用(interaction)

Interaction variables	<sup>a</sup> Odds ratio (95% CI)	P Value
ABCB1 gene		
TT	1	
TT	6.55 (0.33-130)	0.218
TC+CC	6.45 (0.78-53.3)	0.084
TC+CC	22.9 (2.42-217)	0.006
CBP gene		
GG	1	
AG	6.55 (0.33-130)	0.218
AG	22.9 (2.42-217)	0.006

<sup>a</sup> Pairs of risk factors were analyzed with adjustment for the third risk factor (ApoB gene).

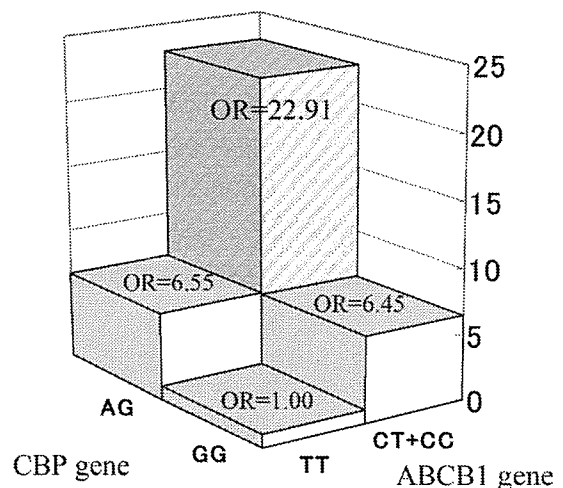


図6 ABCB1遺伝子とCBP遺伝子の組合せ

### <結果3>

次にadditive modelでSynergy index(S)を計算した。(式)にあてはめて計算すると $S=(22.91-1)/(6.55-1+6.45-1)=1.99 (>1)$ となった。Synergy indexが1より大となり、ABCB1 遺伝子とCBP 遺伝子に交互作用が存在すると考えられた。つまり、ABCB1 CT+CC、CBP AGの両方を有する者ではさらにリスクが高くなることが判明した。次に、残りの組合せであるABCB1 遺伝子とApoB 遺伝子、CBP 遺伝子とApoB 遺伝子の交互作用を検討したが、ABCB1 TT、ApoB CT+TT がn=3、CBP AG、ApoB CT+TT がn=1と少数であったためlogistic regression modelにてORの計算ができなかった。

### (8) その他のSNPとIONとの関連

脂質代謝関連のLPL(S447X)<sup>25)</sup>、FABP2(G2445A)<sup>26)</sup>、CETP(RS708272)<sup>27)</sup>、凝固線溶系関連のTHBD(C2136T)<sup>26)</sup>、生体内酸化ストレス関連のp22-PHOX(C242T)<sup>26)</sup>、eNOS(G894T)<sup>28)</sup>、eNOS(T-786C)<sup>29)</sup>、PON1(Arg192Gln)<sup>26)</sup>、PON1(Leu54Met)<sup>26)</sup>、そして血管内皮細胞関連因子であるGJA4(C1019T)<sup>30)</sup>について解析を行ったが、すべてにおいてION発生と有意な関連を認めなかった(表8)。

表8 SNPsとION発生との関連

LPL S447X	症例	対照	P value	eNOS G894T	症例	対照	P value
SS	25	93	0.910	GG	30	108	0.511
SX	8	26		GT	3	13	
XX	0	3		TT	1	1	
FABP2 G2445A				eNOS T-786C			
AA	6	20	0.869	CC	0	0	6.442
GA	13	43		CT	5	22	
GG	15	60		TT	29	101	
CETP RS708272				PON1 Arg192Gln			
TT	6	19	0.987	GG	5	15	0.575
CC	15	52		AA	13	57	
CT	14	52		GA	17	50	
THBD C2136T				PON1 Leu54Met			
TT	0	6	0.053	TT	24	100	0.079
CT	16	36		TA	10	23	
CC	18	81		AA	1	0	
p22-PHOX C242T				GJA4 C1019T			
TT	1	1	0.375	CC	20	76	0.475
CT	26	102		CT	13	36	
CC	7	20		TT	1	8	

Statistical analysis were done by using Fisher's exact test

## 4. 考察

### (1) Lp(a)に関して

現在までに、冠動脈疾患、脳梗塞などの血管病変と、血中Lp(a)濃度やapo(a) phenotypeとの関連が数多く報告されている<sup>2,3,31-34)</sup>。本検討では、apo(a)のisoformの情報をもとにLMWとHMWとにphenotype分類を行い、ION発生との関連を検討した結果、多変量解析でLMWがION発生の独立した危険因子であることが判明した。

Hervioらは、in vitroで分子量540Kdと590Kdと610Kdの3つのapo(a) isoformを用いた実験系で、今回のLMW

に相当する540Kd、590Kdでは、Lp(a)濃度依存的にplasminogenに拮抗するが、HMWに相当する610Kdになると濃度に関係なく、plasminogenに拮抗しなくなると報告している<sup>35)</sup>。本検討ではFからS2までを含む、つまり580kD以下のisoformを含むphenotype(LMW)で有意にION発生リスクが上昇するという事実が判明したが、この結果はHervioらの結果と矛盾しないと考えた。

GlueckらはCaucasianを対象として、血中Lp(a)濃度とION発生との関連について検討を行った。その結果ION発生例で血中Lp(a)濃度が、有意に高値を示した<sup>36)</sup>。血中Lp(a)濃度は主にapo(a) isoformをはじめとする遺伝的因子によって決定される。しかし、炎症、estrogen、およびprogesterinなどの環境因子の影響を受けることが報告されている。本研究ではGlueckらの報告とほぼ一致して血中Lp(a)濃度が症例で高値をとる傾向を示したが、統計学的有意といえるものではなかった(P=0.058)。この理由としてこれらの環境因子が影響を与えた可能性がある。

よって、このような環境因子に左右されずに遺伝的に各個人で規定されているLp(a) phenotypeの方が、血中Lp(a)濃度よりもION発生の予測に有用であると考えた。

### (2) ApoBに関して

ApoB C7623Tでは、遺伝子型CCの症例は冠動脈疾患になりやすいが、TTの症例では血中脂質濃度が高くなるにも関わらず冠動脈疾患になりにくいという報告がある<sup>8-10,37)</sup>。本研究では、CT+TTがIONの危険因子であることが明らかになった。ステロイド性IONの発生過程には、冠動脈疾患とは異なった脂質代謝異常の病態が存在する可能性がある。

日本人を対象とした調査でIONと血漿中ApoB/A1比が関連すると報告されている<sup>38)</sup>。今回の調査では血中ApoB濃度とIONとの間の関連を認めなかったが、血漿中ApoB/ApoA1比とIONとの間に有意な関連を認めた(P=0.045)。脂質の輸送に関する血清学上の有用なマーカーとして、ApoB/A1比は虚血性心疾患の分野で注目されてきた。骨内への脂質の蓄積がIONの発生に影響を与えているという報告もあり<sup>39)</sup>、本研究でみられたApoB/A1比の上昇は、末梢への脂質輸送が増加することでIONの発生に影響を与えている可能性がある。

### (3) 3遺伝子とIONとの関連に関して

ABCB1遺伝子がコードするP-glycoprotein、ApoB遺

伝子がコードするApoBそしてCBP遺伝子がコードするCREB binding proteinの3つの物質の間における関連についての報告はない。今回の結果から、細胞膜レベルでのステロイドの輸送に関連するABCB1遺伝子と、ステロイドの核内受容体へ作用後の遺伝子の転写に影響を与えているCBP遺伝子の2つの交互作用が判明した。ステロイドが細胞内に入り核内へ移行し、mRNAの転写をしてステロイドの作用が発現するまでの過程で、この2つの遺伝子の作用に相乗作用が存在する可能性が考えられる。

ApoB 遺伝子で計算ができなかったのは、今回解析したApoBのSNPの出現頻度が、以前の日本人での報告と同じように、CTとTTで約8%と少なく、2つの遺伝子を組合せた場合に、対象数が小さくなったため、ApoB 遺伝子を含む解析で、計算できなかったと考えた。

今後も、複数の要因の組合せで、交互作用を検討し、ハイリスクグループの調査を行っていく必要がある。

## 5. 結論

- (1) 本検討から、Lp(a) phenotypeがLMWの症例ではステロイド性ION発生のriskが上昇することが明らかになった。ステロイド投与前からLp(a) phenotypeを検査することは、ION発生予測に有用と考えた。
- (2) ApoB遺伝子のC7623TのT alleleはION発生に有意な影響を与えていることが判明した。IONの発生予測に有用と考えた。
- (3) 血中濃度のApoB/A1比と、腎移植後IONとの間に有意な関連を認めた。
- (4) 3遺伝子とステロイド性大腿骨頭壊死症との関連を明らかにするために、logistic regression modelを用いて解析を行い、ABCB1 遺伝子、ApoB 遺伝子そしてCBP 遺伝子の多型でriskの上昇を認めた。このrisk上昇は互いの遺伝子多型で調整後も保たれていた。
- (5) ABCB1とCBPの間に、交互作用を認め、ABCB1 CT+CC、CBP AGの組み合わせでは、特にriskが高いことが判明した(OR=22.91)。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hirata T, Fujioka M, Takahashi KA, Asano T, Ishida M, Akioka K, Okamoto M, Yoshimura N, Satomi Y, Nishino H, Hirota Y, Nakajima S, Kato S,

Kubo T. Low molecular weight phenotype of apolipoprotein(a) is a risk factor of corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplant. J Rheumatol, in press.

- 2) Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Ueshima K, Hirata T, Okamoto M, Satomi Y, Nishino H, Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. Relationship between postrenal transplant osteonecrosis of the femoral head and gene polymorphisms related to the coagulation and fibrinolytic systems in Japanese subjects. Transplantation, 77: 220-225, 2004.

### 2. 学会発表

- 1) 平田哲朗、藤岡幹浩、高橋謙治、上島圭一郎、新井祐志、浅野武志、石田雅史、栗林正明、濱口裕之、久保俊一: Lipoprotein(a)の phenotype 分類による特発性大腿骨頭壊死症の発生予測、第33回日本股関節学会学術集会、東京、2006.10.27-28.
- 2) 平田哲朗、藤岡幹浩、新井祐志、石田雅史、栗林正明、久保俊一. ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子解析-個人化医療の開発を目的として-. 第21回日本整形外科学会基礎学術集会、長崎、2006.10.19-20.
- 3) 平田哲朗、藤岡幹浩、浅野武志、新井祐志、石田雅史、栗林正明、久保俊一: 特発性大腿骨頭壊死症の遺伝子多型解析~ステロイド感受性、凝固線溶系、脂質代謝について~、第11回日本関節症研究会学術集会、東京、2006.5.27.
- 4) Hirata T, Fujioka M, Takahashi KA, Asano T, Ishida M, Akioka K, Okamoto M, Yoshimura N, Satomi Y, Nishino H, Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. Apolipoprotein(a) phenotype predict the risk of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation. The 52nd Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, Chicago, U.S.A., March 19-22, 2006.
- 5) 平田哲朗、藤岡幹浩、高橋謙治、浅野武志、石田雅史、久保俊一: Lipoprotein(a) Phenotype 分類による特発性大腿骨頭壊死症の発生予測、第20回日本整形外科学会基礎学術集会、三重、2005.10.20-21.
- 6) Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Hirata T, Okamoto M, Sugioka N, Nishino H,



Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. MDR1 C3435T, G2677T/A polymorphism and osteonecrosis of the femoral head after kidney transplantation. The 50th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, San Francisco, CA, USA., March 7-10, 2004.

## 7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 8. 参考文献

- 1) McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987;330:132-7.
- 2) Wild SH, Fortmann SP, Marcovina SM. A prospective case-control study of lipoprotein(a) levels and apo(a) size and risk of coronary heart disease in Stanford Five-City Project participants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:239-45.
- 3) Kronenberg F, Neyer U, Lhotta K, Trenkwalder E, Auinger M, Pribasnik A, Meisl T, Konig P, Dieplinger H. The low molecular weight apo(a) phenotype is an independent predictor for coronary artery disease in hemodialysis patients: a prospective follow-up. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:1027-36.
- 4) Gonzalez-Gronow M, Edelberg JM, Pizzo SV. Further characterization of the cellular plasminogen binding site: evidence that plasminogen 2 and lipoprotein a compete for the same site. *Biochemistry* 1989;28:2374-7.
- 5) Miles LA, Fless GM, Levin EG, Scanu AM, Plow EF. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). *Nature* 1989;339:301-3.
- 6) Sharp DS, Burchfiel CM, Rodriguez BL, Sharrett AR, Sorlie PD, Marcovina SM. Apolipoprotein A-1 predicts coronary heart disease only at low concentrations of high-density lipoprotein cholesterol: an epidemiological study of Japanese-Americans. *Int J Clin Lab Res* 2000;30:39-48.
- 7) Pulkkinen A, Viitanen L, Kareinen A, Lehto S, Laakso M. MspI polymorphism at +83 bp in intron 1 of the human apolipoprotein A1 gene is associated with elevated levels of HDL cholesterol and apolipoprotein A1 in nondiabetic subjects but not in type 2 diabetic patients with coronary heart disease. *Diabetes Care* 2000;23:791-5.
- 8) Scartezini M, Zago MA, Chautard-Freire-Maia EA, Pazin-Filho A, Marin-Neto JA, Hotta JK, Nascimento AJ, Dos-Santos JE. The X-X-/E+E+ genotype of the XbaI/EcoRI polymorphisms of the apolipoprotein B gene as a marker of coronary artery disease in a Brazilian sample. *Braz J Med Biol Res* 2003;36:369-75.
- 9) de Padua Mansur A, Annicchino-Bizzacchi J, Favarato D, Avakian SD, Machado Cesar LA, Franchini Ramires JA. Angiotensin-converting enzyme and apolipoprotein B polymorphisms in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 2000;85:1089-93.
- 10) Hansen PS, Klausen IC, Lemming L, Gerdes LU, Gregersen N, Faergeman O. Apolipoprotein B gene polymorphisms in ischemic heart disease and hypercholesterolemia: effects of age and sex. *Clin Genet* 1994;45:78-83.
- 11) Rios DL, Vargas AF, Torres MR, Zago AJ, Callegari-Jacques SM, Hutz MH. Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. *Clin Genet* 2003;63:380-5.
- 12) Verduci E, Agostoni C, Biondi ML, Radaelli G, Giovannini M, Riva E. Apolipoprotein B gene polymorphism and plasma lipid levels in phenylketonuric children. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004;71:117-20.
- 13) Masson LF, McNeill G, Avenell A. Genetic variation and the lipid response to dietary intervention: a systematic review. *Am J Clin Nutr* 2003;77:1098-111.
- 14) Shioji K, Mannami T, Kokubo Y, Goto Y, Nonogi H,

- Iwai N. An association analysis between ApoA1 polymorphisms and the high-density lipoprotein (HDL) cholesterol level and myocardial infarction (MI) in Japanese. *J Hum Genet* 2004;49(8):433-9. Epub 2004;49:433-9.
- 15) Tashiro J, Morisaki N, Kobayashi J, Bujo H, Kanzaki T, Murano S, Saito Y. Significance of a polymorphism (G→A transition) in the -75 position of the apolipoprotein A-I gene promoter on serum high density lipoprotein-cholesterol levels in Japanese hyperlipidemic subjects. *J Atheroscler Thromb* 2001;8:95-100.
- 16) Larson IA, Ordovas JM, Barnard JR, Hoffmann MM, Feussner G, Lamon-Fava S, Schaefer EJ. Effects of apolipoprotein A-I genetic variations on plasma apolipoprotein, serum lipoprotein and glucose levels. *Clin Genet* 2002;61:176-84.
- 17) Kuusi T, Kesaniemi YA, Vuoristo M, Miettinen TA, Koskenvuo M. Inheritance of high density lipoprotein and lipoprotein lipase and hepatic lipase activity. *Arteriosclerosis* 1987;7:421-5.
- 18) Asano T, Takahashi KA, Fujioka M, Inoue S, Okamoto M, Sugioka N, Nishino H, Tanaka T, Hirota Y, Kubo T. ABCB1 C3435T and G2677T/A polymorphism decreased the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after kidney transplantation. *Pharmacogenetics* 2003;13:675-82.
- 19) 平田哲朗、藤岡幹浩、高橋謙治、新井祐志、浅野武志、石田雅史、久保俊一、里見佳子、西野輔翼、秋岡清一、岡本雅彦、吉村了勇、福島若葉、田中隆、廣田良夫:ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子多型解析-リポ蛋白質を対照にして-、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書、91-94, 2006.
- 20) 中島滋郎、田村京子、平田哲朗、藤岡幹浩、久保俊一、福島若葉、廣田良夫:ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生と CBP 遺伝子多型の関連、厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業 特発性大腿骨頭壊死の予防と治療の標準化を目的とした総合研究 平成 17 年度総括・分担研究報告書、80-84, 2006.
- 21) 特発性大腿骨頭壊死症 診断基準・病型分類・病期分類(平成 13 年 6 月改定案). 厚生労働省特定疾患対策研究事業 骨・関節系調査研究班 特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会 平成 13 年度報告書 :131-135.
- 22) Utermann G, Kraft HG, Menzel HJ, Hopferwieser T, Seitz C. Genetics of the quantitative Lp(a) lipoprotein trait. I. Relation of LP(a) glycoprotein phenotypes to Lp(a) lipoprotein concentrations in plasma. *Hum Genet* 1988;78:41-6.
- 23) Suzuki K, Kuriyama M, Saito T, Ichinose A. Plasma lipoprotein(a) levels and expression of the apolipoprotein(a) gene are dependent on the nucleotide polymorphisms in its 5'-flanking region. *J Clin Invest* 1997;99:1361-6.
- 24) Ichinose A, Kuriyama M. Detection of polymorphisms in the 5'-flanking region of the gene for apolipoprotein(a). *Biochem Biophys Res Commun* 1995;209:372-8.
- 25) Sawano M, Watanabe Y, Ohmura H, Shimada K, Daida H, Mokuno H, Yamaguchi H. Potentially protective effects of the Ser447-Ter mutation of the lipoprotein lipase gene against the development of coronary artery disease in Japanese subjects via a beneficial lipid profile. *Jpn Circ J* 2001;65:310-4.
- 26) Horibe H, Yamada Y, Ichihara S, Watarai M, Yanase M, Takemoto K, Shimizu S, Izawa H, Takatsu F, Yokota M. Genetic risk for restenosis after coronary balloon angioplasty. *Atherosclerosis* 2004;174:181-7.
- 27) Kuivenhoven JA, de Knijff P, Boer JM, Smalheer HA, Botma GJ, Seidell JC, Kastelein JJ, Pritchard PH. Heterogeneity at the CETP gene locus. Influence on plasma CETP concentrations and HDL cholesterol levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:560-8.
- 28) Hassan A, Gormley K, O'Sullivan M, Knight J, Sham P, Vallance P, Bamford J, Markus H. Endothelial nitric oxide gene haplotypes and risk of cerebral small-vessel disease. *Stroke* 2004;35:654-9.
- 29) Yoshimura M, Nakayama M, Shimasaki Y, Ogawa H, Kugiyama K, Nakamura S, Ito T, Mizuno Y, Harada E, Yasue H, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K. A T-

- 786-->C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene and coronary arterial vasomotility. *Am J Cardiol* 2000;85:710-4.
- 30) Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H, Sone T, Tanaka M, Yokota M. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002;347:1916-23.
- 31) Geethanjali FS, Jose VJ, Kanagasabapathy AS. Lipoprotein (a) phenotypes in south Indian patients with coronary artery disease. *Indian Heart J* 2002;54:50-3.
- 32) Kalina A, Csaszar A, Fust G, Nagy B, Szalai C, Karadi I, Duba J, Prohaszka Z, Horvath L, Dieplinger H. The association of serum lipoprotein(a) levels, apolipoprotein(a) size and (TTTTA)(n) polymorphism with coronary heart disease. *Clin Chim Acta* 2001;309:45-51.
- 33) Kraft HG, Lingenhel A, Kochl S, Hoppichler F, Kronenberg F, Abe A, Muhlberger V, Schonitzer D, Utermann G. Apolipoprotein(a) kringle IV repeat number predicts risk for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:713-9.
- 34) Chimienti G, Lamanuzzi BL, Nardulli M, Colacicco AM, Capurso A, La Gioia R, Scrutinio D, Pepe G. APO(a) variants and lipoprotein(a) in men with or without myocardial infarction. *Exp Mol Pathol* 2002;73:28-34.
- 35) Hervio L, Chapman MJ, Thillet J, Loyau S, Angles-Cano E. Does apolipoprotein(a) heterogeneity influence lipoprotein(a) effects on fibrinolysis? *Blood* 1993;82:392-7.
- 36) Glueck CJ, Freiberg RA, Fontaine RN, Tracy T, Wang P. Hypofibrinolysis, thrombophilia, osteonecrosis. *Clin Orthop* 2001;19-33.
- 37) Bohn M, Bakken A, Erikssen J, Berg K. XbaI polymorphism in DNA at the apolipoprotein B locus is associated with myocardial infarction (MI). *Clin Genet* 1993;44:241-8.
- 38) Miyanishi K, Yamamoto T, Nakashima Y, Shuto T, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y. Subchondral changes in transient osteoporosis of the hip. *Skeletal Radiol* 2001;30:255-61.
- 39) Boskey AL, Raggio CL, Bullough PG, Kinnett JG.

Changes in the bone tissue lipids in persons with steroid- and alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop Relat Res.* 1983;289-95.

# ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生に關与する遺伝子の検討

## —特に CBP 遺伝子多型との關連について—

中島滋郎、田村京子

(大阪大学大学院医学系研究科 小児科学)

平田哲朗、藤岡幹浩、久保俊一

(京都府立医科大学大学院医学研究科 運動器機能再生外科学)

福島若葉、廣田良夫

(大阪市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学)

我々は従来から、ステロイドホルモン作用発現に關与する遺伝子について、SNP 解析を中心としたゲノム遺伝子解析、および実際の各遺伝子発現量の解析を行っている。今回は、ステロイドホルモンの機能発現に關与する CYP3A4 遺伝子、NCOA2 遺伝子および CBP 遺伝子の SNP について健常日本人での出現頻度解析と、腎移植患者におけるステロイド性大腿骨頭壊死症(ON)の關連について検討した。健常日本人での検討では、CYP3A4 遺伝子プロモーター領域の遺伝子多型は認めなかった。また、NCOA2 遺伝子多型と ON の発生については有意な關係は認めなかった。それに対して、グルココルチコイド受容体の転写共役因子の一つである CBP 遺伝子の G/A 多型についての腎移植患者157名での解析では、ステロイド性大腿骨頭壊死症発生群では G/G 67.6%,A/G 32.4%、非発生群では G/G 85.4% ,A/G 14.6%で、有意の差を認めた(p=0.018)。この結果より、ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生に CBP 遺伝子多型が關与している可能性が示唆された。今後さらに他の因子の多型について検討するとともに、末梢血単核球を用いた CBP 遺伝子や 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 遺伝子の発現量の解析を進める予定である。

### 1. 研究目的

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

グルココルチコイドの生体内での代謝および作用発現には様々な蛋白が關与しており、それらの遺伝子多型がステロイドホルモン薬の反応性を規定していると考えられる(図1)。以前の研究班(高岡班、平成11-15年度)において我々は、健常日本人および

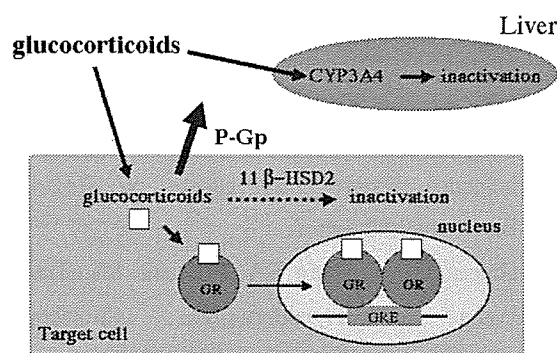


図1:ステロイドホルモンの生体内での主な代謝経路

腎移植後の大腿骨頭壊死症(ON)発生患者においてグルココルチコイド受容体(GR)遺伝子、CYP3A4 遺伝子、p-糖タンパクをコードするMDR-1 遺伝子<sup>(1)</sup>および 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 遺伝子多型について解析してきた。

本研究班(平成16-18年度)ではこれらの研究

をさらに発展させ、ステロイドホルモン代謝に重要な酵素である CYP3A4、GR の重要な転写共役因子である cAMP-response element binding protein-binding protein(CBP) や Nuclear Receptor Coactivator 2 (NCOA2)(図2)の遺伝子多型とステロイド性大腿骨頭壊死症の発生の関連について検討を行った。

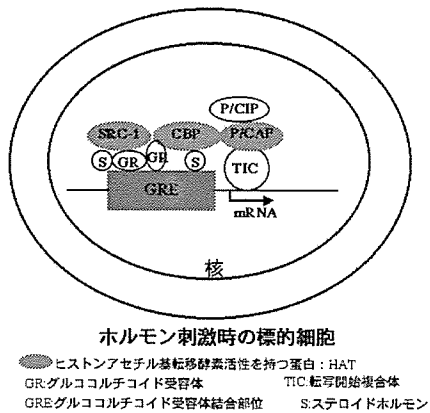


図2: GR を介したステロイドホルモンの作用機序

## 2. 研究方法

(1)CYP3A4 遺伝子プロモーター領域の SNP については、欧米で既報の G/A 多型を健常日本人での出現頻度を検討した。CBP 遺伝子および NCOA2 遺伝子については、日本人における SNP データベース(東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターと科学事業振興事業団の共同プロジェクトである JSNP データベース)上に日本人での多型の分布がほぼ判明している多型を検索した。CBP 遺伝子多型は23個登録されており、そのうち2個が翻訳領域上にあり(JST103922, 008357)、さらにそのうち1個(JST103922、図3)は日本人での多型の分布がほぼ判明している。

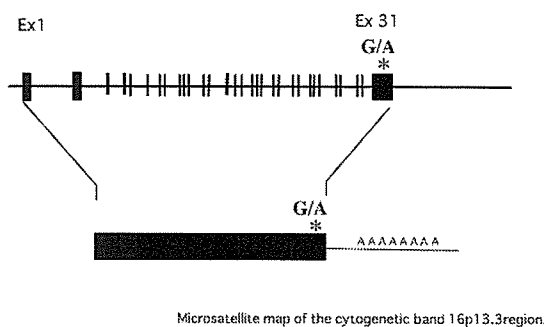


図3: CBP 遺伝子の構造と多型の部位

NCOA2 遺伝子についてはイントロン部分にある多型

(JST067949)を解析した。

以上の多型をふくむ部分に PCR プライマーを設定し、下記の腎移植後患者および健常日本人より得たゲノムDNAを用いてPCR反応を行った。PCR産物を精製の後、ダイレクトシーケンス法により DNA 配列を検討した。

検討対象は京都府立医科大学における腎移植後患者 157 名(男性 112 名 女性 45 名)で、そのうち ON 発生群は 34 名(男性 23,女性 11 名)、ON 非発生群 123 名(男性 89,女性 34 名)であった。また同時に健常日本人76名でも検討した。

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

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

## 3. 研究結果

(1)CYP3A4 遺伝子プロモーター領域の SNP は、健常日本人 39 名での検討では A/A が 39 名、A/G が 0 名、G/G も 0 名であった。従って、日本人ではこの部位の多型は全くないか、非常に少ないものと考えられた。

(2)CBP 遺伝子の JST103922 多型については、健常者62名の検討では G/G 82.3% A/G 17.7% A/A 0%であった。腎移植患者157名では、全体で G/G 81.5% A/G 18.5% A/A 0%で健常者とは差を認めなかった。このうち ON 発生群では G/G 67.6% A/G 32.4% A/A 0%、非発生群では G/G 85.4% A/G 14.6% A/A 0%で、有意差を認めた(p=0.018) (図4)。両群の年齢、性別およびステロイドホルモン投与量を加えた多変量解析でも同様の結果であった(p=0.036)。一方、この結果を各遺伝子型に患者を分けて解析すると、G/G 多型を呈する群での ON 発生

は 18.0%、A/G 多型群では 37.9%であった。

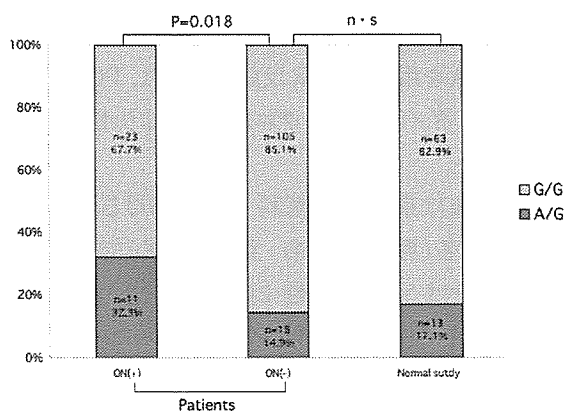


図4:CBP 遺伝子多型と ON 発生の関連

(3)NCOA2 遺伝子の JST067949 多型は、健常日本人 76 名の検討で C/C 63.2%、C/T 35.5%、T/T 1.3%であった。一方、腎移植患者 157 名では、ステロイド性大腿骨頭壊死症発生群では C/C 64.7%、C/T 32.4%、T/T 2.9%、非発生群では C/C 50.4%、C/T 40.7%、T/T 8.9%で、統計学的に有意差は認めなかった(p=0.14)。

(4)現在のところ、A/G および G/G 多型由来の mRNA の各々 1 名ずつについてのみ検討を行った(図 4)。G/G 多型由来の PCR 産物は完全に切断されているのに対し、A/G 由来の PCR 産物の切断では A アレル由来のバンド(594bp)が G アレル由来のバンド(391bp)より濃く、これは分子量で補正しても同様であった。

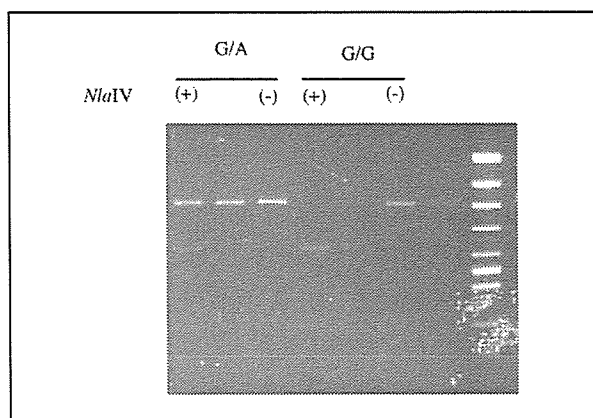


図5:制限酵素 NlaIVによる切断

#### 4. 考察

ステロイドホルモンの作用発現には多くの因子が関

与することが知られている。なかでも、肝臓での CYP3A4 による代謝や標的細胞内での 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 による不活化、GR およびその転写共役因子である CBP や NCOA2 の量や活性が重要であると考えられる。従来ステロイドホルモン感受性の遺伝的因子として GR 遺伝子そのもの<sup>(2,3)</sup>や 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 遺伝子<sup>(4)</sup>についての欧米の検討はあったが、日本人での有意な関係を認めた報告はほとんどない。

CBP は 2,442 アミノ酸よりなる核内蛋白で、HAT(histone acetyltransferase)活性を持つ。GR を始めとする核内受容体や P53、Myo-D などの転写因子および TBP や TFIIIB などの基本転写因子と結合し、前者を介した遺伝子転写を制御する機能を有する。ヒトの遺伝子は 16p13.3 に存在し、ヒトにおける遺伝子変異は Rubinstein-Taybi 症候群を呈することが知られている。本研究班の検討で、我々は腎移植後患者におけるステロイド誘発性大腿骨頭壊死症の発生と CBP 遺伝子多型の関連について検討し、G/A 多型を有する患者で大腿骨頭壊死症の発生が有意に多いことを見出した。この多型は CBP 遺伝子の翻訳領域上にあるがアミノ酸置換は伴わないため、このメカニズムは現在不明である。ただし、多型部位が最も 5'側にあるため、転写された mRNA の安定性に影響している可能性が考えられるため、リンパ球での CBP mRNA 量を検討した。その結果、A アレル由来の mRNA が G アレル由来の mRNA より多い、すなわち安定している可能性が示唆された。我々は既に CBP 蛋白の強制発現により核内受容体を介した遺伝子転写が促進されることを報告している<sup>(5)</sup>。生理的なレベルでの CBP の量的変化がステロイドホルモン感受性にどのような影響を与えるかは不明であるが、CBP の機能や今回の検討結果から考えると重要な役割を演じている可能性が示唆された。

#### 5. 結論

(1)腎移植患者 157 名と健常日本人において CYP3A4、CBP、NCOA2 遺伝子多型を検討した。

(2)CBP 遺伝子の JST103922 多型は ON 非発生群では G/G が 85.3%、G/A が 14.7%であったのに対して、ON 発生群では G/G が 67.6%、G/A が 32.4%であり有意の差を認めた。従って、CBP 遺伝子多型で G/A を有する患者では ON が発生しやすいと考えられ、現

在そのメカニズムについて検討している。

(3) CYP3A4 遺伝子のプロモーター領域の多型は日本人では存在せず、一方 NCOA2 遺伝子の JST067949 多型は ON 発生とは関連を認めなかった。

(4) 今後さらに、他の遺伝子についても検討を進める予定である。

## 6. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 中島滋郎:ステロイドホルモン感受性と遺伝。腎と骨代謝 17:61-66, 2004
- 2) 中島滋郎, 大菌恵一, 小児科領域におけるステロイド骨粗鬆症の現状と治療の実際。ステロイド骨粗鬆症のマネジメント, 医薬ジャーナル社 75-83, 2005
- 3) 里村憲一, 中島滋郎, その他, 小児期ステロイド感受性ネフローゼ症候群における発症・再発の季節性。日本小児科学会雑誌, 109(5), 650-653, 2005
- 4) 中島滋郎, 田村京子, 骨代謝ゲノム解析-ステロイドホルモン感受性の遺伝-。別冊 整形外科骨壊死 最新の診断と治療, 南江堂 No.48, 41-44, 2005
- 5) 堀内博志, 五明広樹, 中島滋郎, その他, 特発性大腿骨壊死症におけるグルココルチコイド受容体の遺伝子多型性解析。別冊 整形外科骨壊死 最新の診断と治療, 南江堂 No.48, 51-53, 2005
- 6) Kubota T, Kotani T, Miyoshi Y, Santo Y, Hirai H, Namba N, Shima M, Shimizu K, Nakajima S, Ozono K. A spectrum of clinical presentations in seven Japanese patients with vitamin D deficiency. Clin Ped Endocrinol 15:23-28, 2006
- 7) Miyoshi Y, Santo Y, Tachikawa K, Namba N, Hirai H, Mushiaki S, Nakajima S, Michigami T, Ozono K. Lack of puberty despite elevated estradiol in a 46,XY phenotypic female with Frasier syndrome. Endocr J 53: 371-376, 2006
- 8) Kubota T, Namba N, Kurotobi S, Kogaki S, Hirai H, Kitaoka T, Nakajima S, Ozono K. Beneficial effect of oral bisphosphonate treatment on bone loss induced by chronic administration of furosemide without alteration of its

administration and urinary calcium loss. Clin Pediatr Endocrinol 15:101-107, 2006

- 9) Hirata T, Fujioka M, Takahashi KA, Asano T, Ishida M, Akioka K, Okamoto M, Yoshimura N, Satomi Y, Nishino H, Hirota Y, Nakajima S, Kato S, Kubo T. Low molecular weight phenotype of apolipoprotein(a) is a risk factor of corticosteroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation. J Rheumatol, in press.
2. 学会発表
  - 1) 中島滋郎, 田村京子, 浅野武志, 藤岡幹浩, 久保俊一, 大菌恵一「ステロイド投与患者におけるステロイドホルモン感受性の検討」第12回日本ステロイドホルモン学会(平成16年11月)大阪
  - 2) 窪田拓生, 道上敏美, 国府力, 中島滋郎, 大菌恵一「ポジショナルクロニングを用いた自然発症変異マウス ringelschwanz における LRP6 遺伝子変異の同定と骨代謝の解析」第22回日本骨代謝学会(平成16年8月)大阪
  - 3) Kubota K, Michigami T, Kokubu C, Suzuki A, Sakai N, Nakajima S, Imai K, Ozono K. Skeletal Defects in Ringelschwanz Mutant Mice Reveal that Lrp6 Is Involved in Bone Resorption and Essential for Proper Bone Mass Acquisition. The 27th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. September 23-27, 2005, Nashville, TN, USA
  - 4) 中島滋郎「幼児のビタミンD欠乏性くる病」第9回京都シンポジウム(平成17年4月)京都
  - 5) 窪田拓生, 道上敏美, 国府力, 鈴木朗, 中島滋郎, 大菌恵一「Lrp6 変異マウス ringelschwanz の骨量低下における骨吸収亢進の関与」第32回日本骨代謝学会(平成17年7月)大阪
  - 6) 窪田拓生, 難波範行, 小垣滋豊, 中島滋郎, 大菌恵一「フロセミド投与中に副甲状腺機能亢進症を伴った骨量減少の2例」第39回日本小児内分泌学会(平成17年10月)東京
  - 7) 田村京子, 中島滋郎, 平田哲郎, 藤岡幹浩, 久保俊一, 大菌恵一「ステロイド性大腿骨頭壊死症の発生と CBP 遺伝子多形の関連の検討」第24回日本骨代謝学会(平成18年7月)東京
  - 8) 窪田拓生, 道上敏美, 阪口奈保子, 国府力, 鈴

木朗、中島滋郎、大藪恵一「骨量低下を示した ringelschwanz マウスに由来する変異型 Lrp6 蛋白の機能解析」第 24 回 日本骨代謝学会（平成 18 年 7 月）東京

- 9) 北岡太一、難波範行、三浦弘司、窪田拓生、平井治彦、中島滋郎、大藪恵一「パミドロネート治療によるカルシウム・リン代謝調節ホルモンの変動」第 40 回 日本小児内分泌学会（平成 18 年 9 月）浜松
- 10) Kubota T, Michigami T, Sakaguchi N, Kokubu C, Suzuki A, Sakai N, Nakajima S, Ozono K. Disrupted Wnt signaling in Lrp6 mutant ringelschwanz caused by impaired interaction with Mesd leads to up-regulation of RANKL and increased bone resorption. Third International Osteoporosis Foundation Asia-Pacific Regional Conference on Osteoporosis October 22-26, 2006, Queensland, Australia

## 7. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 8. 参考文献

- 1) Asano T. et al. ABCB1 C3435T and G2677T/A polymorphism decreased the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after kidney transplantation. Pharmacogenetics. 13:675-82, 2003
- 2) Panarelli M. et al. Glucocorticoid receptor polymorphism, skin vasoconstriction and other metabolic intermedite phenotypes in normal human subjects. J Clin Endocrinol Metab 83:1846-1852, 1998
- 3) Huizenga NAT. et al. A polymorphism in the glucocorticoid receptor gene may be associated with an increased sensitivity to glucocorticoids in vivo. J Clin Endocrinol Metab 83:144-151, 1998
- 4) Smolenicka Z. et al. A new polymorphic

restriction site in the human 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type2 gene. J Clin Endocrine Metab 83:1814-1817, 1998

- 5) Nakajima S. et al. Effect of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase A on ligand-dependent transactivation via the vitamin D receptor. Mol Cell Endocrinol 159:45-51, 2000



# 核内ステロイド受容体の骨組織における機能解明

加藤茂明、今井祐記、高田伊知郎(東京大学分子細胞生物学研究所 核内情報研究分野)  
松本高広、中村 貴 (科学技術振興機構 (ERATO))

グルココルチコイドをはじめとした、ステロイドホルモン受容体機能には、共通の転写共役活性化因子、SRC-1/TIF-2/AIB-1 p160 ファミリータンパクが必須である。SRC-1 遺伝子欠損マウスを用い、骨変異およびグルココルチコイドの応答性について検討した結果、性ホルモン投与と異なり、明確な効果は見出されなかった。そこで、GR 恒常的発現細胞を樹立し、生化学的手法による転写共役因子複合体の単離を試みた。その結果、骨芽細胞促進転写因子 AP1 と GR がデキサメサゾン(Dex)依存的に複合体を形成し、その中にヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 が含まれる可能性が示唆された。また Dex による AP1 標的遺伝子 mRNA の発現抑制について培養細胞を用いて検討した結果、HDAC 活性を要する遺伝子群と要さない遺伝子群が存在する事を見出した。

一方で ION における骨頭の圧潰には破骨細胞の関与が予想される。従って、破骨細胞にて発現する各種因子の高次機能を評価することは極めて重要な課題である。そこで、Cre-loxP 系を用いて Cathepsin K-Cre ノックインマウスを作出し floxed ER $\alpha$  マウスと交配する事で、新たに破骨細胞特異的 ER 遺伝子欠損マウス(Oc-ERKO マウス)を作出し、骨密度を測定した結果、雌 Oc-ERKO マウスにのみ顕著な骨密度の低下が見られた。骨形態計測では破骨細胞機能の亢進に伴う高回転型の骨代謝を認めた。以上よりステロイドホルモンであるエストロゲンの骨量維持作用は、ER を介した破骨細胞機能の抑制である事を強く示唆するものである。

## 1. 研究目的

ION の原因の一つである核内ステロイド受容体型転写因子グルココルチコイド受容体(GR)の転写制御はリガンド結合依存的に相互作用する転写共役因子複合体が鍵になる。そこで転写共役因子の機能解析として、代表的な転写共役因子である SRC-1 ノックアウトマウスの作出を行った。更に GR はリガンド依存的に骨芽細胞促進転写因子 AP1 の機能を抑制するため、リガンド依存的な転写抑制に寄与する新たな転写共役因子複合体の取得を試みた。

一方で大腿骨頭壊死は骨破壊が伴うが、その過程において破骨細胞を介した骨吸収が伴うと予想される。従って、破骨細胞において発現される各種骨代謝制御因子の高次機能を評価することは極めて重要な課題である。アンドロゲン・エストロゲン等の性ステロイドホルモンは、骨代謝制御因子の中でも特に主要なものである。これらのホルモンは、リガンド依存性転写制御因子である核内受容体を介した標的遺伝

子の転写制御を介してその生理作用を発揮する。近年種々の核内受容体 KO マウスが作出され、その骨組織における重要性が認識されつつある一方で、細胞種ごとの特異的機能については未解明な部分が多い。そこで我々は破骨細胞種特異的遺伝子破壊システムを用い、細胞種特異的な核内受容体高次機能について解析を行う。

## 2. 研究方法

ノックアウトマウスを行う転写共役因子として SRC-1 に着目した。この分子は GR や他のステロイド受容体と結合する転写共役因子として初めてクローニングされたものである。骨代謝調節に関する SRC-1 KO マウスの報告は無いため、特定遺伝子の欠損を時期・細胞種特異的に誘導出来る Cre/loxPsystem を用いて、その遺伝子座を loxP 配列で挟んだマウス(SRC-1<sup>fllox</sup> マウス)を作出し、これに全身性に Cre を発現する CMV-Cre マウスと交配させて SRC-1 欠損マウス

(SRC-1KO)の作成に成功した。これら雌雄 KO マウスの骨組織の解析を行った。同時に SRC-1 によって共役される GR や性ステロイドホルモン受容体群の機能活性を評価する目的に受容体リガンドを投与し、骨組織でのホルモン応答について調べた。また新規 GR 転写共役因子複合体取得の方法として、タンパク精製の手法を用いた。方法としてまず Flag タグを付加したグルココルチコイド受容体(GR)を恒常的に発現する浮遊 HeLa 細胞の樹立を試みた。その後大量培養を行い、核抽出液を調製し Flag 抗体カラムと接触、溶出する事で GR と相互作用する因子群の取得を試みた。更にグリセロール密度勾配遠心法を用いて分子量で分画し、AP1 と GR 複合体を形成する因子について同定を行った。更にその因子が GR による AP1 活性抑制に機能する可能性を検討した。

また、我々は性ステロイドホルモンの一種であるアンドロゲンに関し、全身性アンドロゲン受容体(AR)遺伝子破壊マウスの解析を通じて、ARが雄性骨組織において骨量増加作用を持つ事を見出した。しかしながらARによる骨量増加作用が、骨形成細胞である骨芽細胞と骨吸収細胞である破骨細胞の一体どちらを介しているのかが不明であった。一方で、同様に全身性エストロゲン受容体(ER)遺伝子破壊マウスでは、種々のホルモン調節を受け、著明な骨組織への影響を認めない。そこで破骨細胞特異的 AR 及び ERKO マウスの作製を行う事で、破骨細胞内での AR および ER 高次機能について解析を行った。具体的には破骨細胞特異的発現遺伝子である Cathepsin K 遺伝子座に Cre リコンビナーゼを挿入することで、破骨細胞特異的 Cre 発現マウスの作製を試みた。続いて、既に樹立済みの AR 及び ER flox マウスと交配を行う事で破骨細胞特異的 AR 及び ERKO マウスを作製し、骨組織の解析を行った。

### 3. 研究結果

SRC-1KO は、雌雄共に発生・成長に異常なく生殖も可能であったが、DEXA を用いて骨量について解析した結果、大腿骨の骨密度が同胞野生型マウス(WT)と比較して約 20%低下していた。更に 3D-CT により検討したところ、骨量減少は皮質骨・海綿骨ともに認められた。また WT と比較して雌の血中 estradiol 濃度が約 40%、雄の血中 testosterone 濃度が約 30% 上昇していた。更に性腺除去(OVX 及び ORX)マウス

にそれぞれ estradiol 及び DHT の徐放ペレットを投与すると、WT は無処置群と同定とまで骨量が回復したのに対し、SRC-1KO では雌雄とも低下分の約半分の回復しか示さなかった。一方 prednisolone 投与による骨量低下は WT と SRC-1KO で同程度に見られた。

タンパク精製を用いた新規 GR 転写共役因子の取得に関しては、FlagGR の強制発現細胞の樹立に成功し、上記精製法によってヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 が GR と AP1 と複合体を形成する事を見出した。更に HeLa 細胞において Dex 処理 12 時間後に脱アセチル化酵素阻害剤 TSA を加え、AP1 標的遺伝子の mRNA 発現変化を検討した。標的遺伝子として c-fos、IL6、IL11、TNF  $\alpha$  を用いた。その結果、Dex 依存的な抑制に TNF  $\alpha$  は HDAC 活性を要したが、IL11 は HDAC 活性を要さない事が観察された。

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

Oc-ERKO マウスでは全身性 ERKO マウスで観察される血中テストステロン値上昇等の内分泌系異常を示さない事から、間接的な骨組織への作用を排除した系統であると考えられた。12 週齢マウスの骨密度を測定した結果、メス Oc-ERKO マウスで顕著な骨密度の低下が見られた。さらに骨形態計測の結果、破骨細胞機能の亢進に伴う高回転型の骨代謝が行われている事が明らかとなった。また、このマウスではエストロゲン過剰投与による海綿骨量の増加が著しく阻害されている事が分かった。一方、オス Oc-ERKO マウスにおいてこれらの異常は観察されないことから、生理的条件下において ER はメス特異的な骨吸収制御因子として機能すると考えられた。我々はさらに、高感度免疫組織化学法を用いることで、破骨細胞核内での ER の存在を、組織レベルで確認する事にも成功した。さらに、骨吸収機能亢進の要因を検索するため、エストロゲンを投与した後に得られた骨組織から抽出した RNA を用いて GeneChip 解析を施行したところ、Apoptosis 関連遺伝子の上昇を認めた。

#### 4. 考察

SRC-1KO は雌雄共に性ホルモンの骨量維持作用の低下に基づく高代謝回転型の骨粗鬆化を呈する事が明らかになり、生体内における SRC-1 の骨量維持機構における重要性が示された。またアンドロゲン、エストロゲン負荷実験により SRC1 の欠損はエストロゲン及びアンドロゲンによる骨量維持作用を抑制している事が明らかになった。一方 prednisolone 投与による骨量低下は WT と SRC-1KO で同程度に見られた事により、骨におけるグルココルチコイドシグナルには SRC-1 は関与していない事が示された。

タンパク精製を用いた手法から、GR と AP1 の複合体にヒストン脱アセチル化酵素である HDAC2 が含まれる事が明らかとなった。しかしながら GR と HDAC による AP1 抑制には標的遺伝子選択性が存在する可能性もある。また今回用いた細胞は HeLa 細胞のみであったため、今後骨関連細胞株を用いる事で細胞種特異性についても検討する必要がある。更に GR/AP1 複合体に含まれる因子の同定を行う事で、骨代謝における GR 機能の解明が可能であると考えられる。

世界に先駆けて破骨細胞特異的遺伝子破壊システムの構築に成功した。これまで多くの骨吸収制御因子が報告されているが、生体レベルにおいてそれら因子が成熟破骨細胞に対してどのように機能しているのかを証明する手段が存在しなかった。Ca<sup>2+</sup>psin K-Cre マウスを用いた、成熟破骨細胞特異的遺伝子破壊が可能となった事で、今後、これら因子の詳細な作用メカニズムの解析が可能となった。また、現在まで、破骨細胞での明確な AR および ER 発現報告がないにも関わらず、破骨細胞特異的 ARKO マウスを作製したところ、骨量の減少が観察された。この結果は破骨細胞内 AR および ER が破骨細胞機能を直接制御している事を示している。以上の結果から、これまでアンドロゲンの骨組織に対する同化作用は骨芽細胞を介した骨形成促進作用によるものと考えられてきたが、破骨細胞内 AR を介した骨吸収抑制経路が存在する事が新たに判明した。一方で破骨細胞特異的 ER 欠損マウスの解析結果からエストロゲンの骨組織における機能は、破骨細胞の Apoptosis 誘導により、骨吸収を抑制し結果、骨形成を促進することに

より骨量を維持することであることが分かった。

以上より、骨組織、特に破骨細胞における核内ステロイド受容体の機能を明らかにすることが出来つつあり、今後、ION の一病因であるグルココルチコイドの骨組織特異的な機能・転写共役因子を同定することで、SERM の如き選択的 GR 作動薬の開発および ION 予防・治療につながると期待できる。

#### 5. 結論

Cre-loxP system を用いて雌雄の SRC-1KO マウスのラインを確立した。

SRC-1KO 雌雄マウスは高回転型の骨量減少を呈し、エストロゲン及びアンドロゲンによる骨量維持に必須の因子である事が示唆された。

GR 強制発現細胞を用いた大量培養実験から、GR と AP1 が複合体を形成することを明らかにした。

GR/AP1 複合体に HDAC2 が含まれる事を見出した。

骨細胞腫特異的遺伝子破壊システムとして、成熟破骨細胞特異的 Cre 発現マウスを作出した。

破骨細胞特異的 AR および ERKO マウスの作出に成功し、破骨細胞における AR および ER の機能を新たに見出す事が出来た。今後 GR も含め成熟破骨細胞における大腿骨頭壊死関連因子の機能を解析出来ると考えられる。

#### 6. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Murayama, A., Kim, M., Yanagisawa, J., Takeyama, K., Kato, S.: Transrepression by a liganded nuclear receptor via a bHLH activator through co-regulator switching. *EMBO J.*, **23**, 1598-1608, 2004.
- 2) Sato, T., Matsumoto, T., Kawano, H., Watanabe, T., Uematsu, Y., Sekine, K., Fukuda, T., Aihara, K., Krust, A., Yamada, T., Nakamichi, Y., Yamamoto, Y., Nakamura, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Metzger, D., Chambon, P., Kato, S.: Brain masculinization requires androgen receptor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1673-1678, 2004.
- 3) Kouzmenko, A. P., Takeyama, K., Ito, S., Furutani, T., Sawatsubashi, S., Maki, A., Suzuki,

- E., Kawasaki, Y., Akiyama, T., Tabata, T., Kato, S.: Wnt/ $\beta$ -catenin and estrogen signaling converge *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 40255–40258, 2004.
- 4) Sawatsubashi, S., Maki, A., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Ecdysone receptor-dependent gene regulation mediates histone poly (ADP-ribosylation). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 268–272, 2004.
  - 5) Maki, A., Sawatsubashi, S., Ito, S., Shirode, Y., Suzuki, E., Zhao, Y., Yamagata, K., Kouzmenko, A., Takeyama, K., Kato, S.: Juvenile hormones antagonize ecdysone actions through co-repressor recruitment to EcR/USP heterodimers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **320**, 262–267, 2004.
  - 6) Wada, O., Oishi, H., Takada, I., Yanagisawa, J., Yano, T., Kato, S.: BRCA1 function mediates a TRAP/DRIP complex through direct interaction with TRAP220. *Oncogene*, **23**, 6000–6005, 2004.
  - 7) Ito, S., Takeyama, K., Yamamoto, A., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., Kato, S.: *In vivo* potentiation of human oestrogen receptor  $\alpha$  by Cdk7-mediated phosphorylation. *Genes to Cells*, **9**, 983–992, 2004.
  - 8) Takeyama, K., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shirode, Y., Yamamoto, A., Suzuki, E., Maki, A., Yamagata, K., Zhao, Y., Kouzmenko, A., Tabata, T., Kato, S.: A novel genetic system for analysis of co-activators for the N-terminal transactivation function domain of the human androgen receptor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1209–1215, 2004.
  - 9) Kato, S., Matsumoto, T., Kawano, H., Sato, T., Takeyama, K.: Function of androgen receptor in gene regulations. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, **89–90**, 627–633, 2004.
  - 10) Kato, S., Fujiki, R., Kitagawa, H.: Vitamin D receptor (VDR) promoter targeting through a novel chromatin remodeling complex. *J. Steroid Biochem. & Mol. Biol.*, **89–90**, 173–178, 2004.
  - 11) Masuhiro, Y., Mezaki, Y., Sakari, M., Takeyama, K., Yoshida, T., Inoue, K., Yanagisawa, J., Hanazawa, S., O'Malley, B. W., Kato, S.: Splicing potentiation by growth factor signals via estrogen receptor phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8126–8131, 2005.
  - 12) Fujiki, R., Kim, M., Sasaki, Y., Yoshimura, K., Kitagawa, H., Kato, S.: Ligand-induced transrepression by VDR through association of WSTF with acetylated histones. *EMBO J.*, **24**, 3881–3894, 2005.
  - 13) Unno, A., Takada, I., Takezawa, S., Oishi, H., Baba, A., Shimizu, T., Tokita, A., Yanagisawa, J., Kato, S.: TRRAP as a hepatic coactivator of LXR and FXR function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **327**, 933–938, 2005.
  - 14) Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: A role of androgen receptor protein in cell growth of an androgen-independent prostate cancer cell line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**, 2236–2239, 2005.
  - 15) Takada, I., Suzawa M., Kato, S.: Nuclear receptors as targets for drug development: crosstalk between peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  and cytokines in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Pharmacol. Sci.*, **97**, 184–189, 2005.
  - 16) Furutani, T., Takeyama, K., Koutoku, H., Ito, S., Taniguchi, N., Suzuki, E., Kudoh, M., Shibasaki, M., Shikama, H., Kato, S.: Human expanded polyQ androgen receptor mutants in neurodegeneration as a novel ligand target. *J. Pharm. Experim. Therapeutics*, **315**, 545–552, 2005.
  - 17) Ogawa, S., Oishi, H., Mezaki, Y., Kouzu-Fujita, M., Matsuyama, R., Nakagomi, M., Mori, E., Murayama, E., Nagasawa, H., Kitagawa, H., Yanagisawa, J., Kato, S.: Repressive domain of unliganded human estrogen receptor  $\alpha$  associates with Hsc70. *Genes to Cells*, **10**, 1095–1102, 2005.
  - 18) Matsumoto, T., Takeyama, K., Sato, T., Kato,