

ないものと考えられた。ゆえに骨粗鬆症の治療はきわめて重要であり、このことを通じて、腰痛や骨折の発生を予防することが将来の寝たきり防止にかなりの役割を果たすものと推定された。

E 結論：腰痛は閉経後女性においては骨粗鬆症と関連し、新規骨折リスクを高めた。また腰痛それのみでは観察できなかったが、腰痛も含めた身体のいずれかの部位における痛みの存在は将来の寝たきりに関連していた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1) Tsugawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Tanaka K, Okano T. Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for gamma-carboxylation of osteocalcin. *Am J Clin Nutr* 83: 380-386, 2006.

2) Shiraki M, Kuroda T, Nakamura T, Fukunaga M, Hosoi T, Orimo H, Makino K. The sample size required for intervention studies on fracture prevention can be decreased by using a bone resorption marker in the inclusion criteria: prospective study of a subset of the Nagano Cohort, on behalf of the Adequate Treatment of Osteoporosis (A-TOP) Research Group. *J Bone Miner Metab* 24: 219-225, 2006.

3) Matsumoto T, Shiraki M, Hagino H, Inuma H, Nakamura T. Daily nasal spray of hPTH(1-34) for 3 months increases bone mass in osteoporotic subjects: a pilot study. *Osteoporosis Int* 17: 1532-1538,

2006.

4) Koshizuka Y, Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Seichi A, Takeshita K, Nakamura K, Kawaguchi H. Distinct association of gene polymorphisms of estrogen receptor and vitamin D receptor with lumbar spondylosis in post-menopausal women. *Eur Spine J* 15: 1521-1528, 2006.

5) Kishimoto H, Fukunaga M, Kushida K, Shiraki M, Itabashi A, Nawata H, Nakamura T, Ohta H, Takaoka K, Ohashi Y, for the Risedronate Phase III Research Group. Efficacy and tolerability of once-weekly administration of 17.5 mg risedronate in Japanese patients with involutional osteoporosis: a comparison with 2.5-mg once-daily dosage regimen. *J Bone Miner Metab* 24: 405-413, 2006.

6) Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in the steroid and xenobiotic receptor (SXR) gene (IVS1-579A/G) with bone mineral density. *Geriatrics Gerontol Int* 7:104-109, 2007.

7) Ezura Y, Nakajima T, Urano T, Sudo Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Emi M. Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. *Bone* 40: 997-1005, 2007.

8) Urano T, Shiraki M, Narusawa K, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S. Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis

in postmenopausal Japanese women. *Spine* 32: 25-29, 2007.

9) Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in the WISP1 gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Metab* 25:253-258, 2007.

10) Tsubagawa N, Shiraki M, Suhara Y, Kamao M, Ozaki R, Tanaka K, Okano T. Low plasma phylloquinone concentration is associated with high incidence of vertebral fracture in Japanese women. *J Bone Miner Metab* 26:79-85, 2008.

11) Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Saito M, Fukunaga M, Nakamura T. Nonenzymatic collagen cross-links induced by glycoxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *J Bone Miner Metab* 26: 93-100, 2008.

12) Shiraki M, Urano T, Kuroda T, Saito M, Tanaka S, Miyao-Koshizuka M, Inoue S. The synergistic effect of bone mineral density and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphism (C677T) on fractures. *J Bone Miner*

Metab 26: 595-602. 2008.

13) Urano T, Narusawa K, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in the insulin-like growth factor-1 receptor gene with spinal disc degeneration in postmenopausal Japanese women. *Spine* 33: 1256-1261, 2008.

14) Kuroda T, Shiraki M, Tanaka S, Ohta H. Contributions of 25-hydroxyvitamin D, co-morbidities and bone mass to mortality in Japanese post-menopausal women. *Bone* 44: 168-172, 2009.

15) Matsumoto T, Hagino H, Shiraki M, Fukunaga M, Nakano T, Takaoka K, Morii H, Ohashi Y, Nakamura T. Effect of daily oral minodronate on vertebral fractures in Japanese postmenopausal women with established osteoporosis: a randomized placebo-controlled double-blind study. *Osteoporosis Int* DOI 10.1007/s00198-008-0816-7, 2008

Table 1. Prevalence of lumbago is increasing with advancing of age in postmenopausal women.

Age	<50	50-59	60-69	70-79	80+	p
腰痛 有訴率	26.3%	25.1%	37.1%	44.3%	50.7%	<0.0001

Table 2. Prevalence of osteoporosis in patients with or without lumbago.

Age	<50	50-59	60-69	70-79	80+	p
腰痛例	12.2%	28.3%	50.9%	67.9%	77.9%	<0.0001
非腰痛例	4.4%	21.0%	33.0%	49.8%	69.3%	

Table 3 Prevalence of vertebral fracture in patients with or without lumbago.

Age	<50	50-59	60-69	70-79	80+	p
腰痛例	7.3%	9.7%	31.1%	54.1%	72.7%	<0.0001
非腰痛例	0.0%	3.3%	9.7%	19.3%	11.3%	

Table 4 Association between end plate sclerosis and lumbago

Age	<50	50-59	60-69	70-79	80+	p
腰痛例	0.07±0.16	0.14±0.07	0.13±0.07	0.61±0.08	0.73±0.15	ns
非腰痛例	0.05±0.19	0.14±0.12	0.35±0.09	0.52±0.09	0.84±0.15	

Table 5 Association between osteophyte index and lumbago

Age	<50	50-59	60-69	70-79	80+	p
腰痛例	0.95±1.35	3.18±0.86	8.51±0.61	9.89±0.60	11.35±1.08	ns
非腰痛 例	2.59±1.12	5.42±0.48	8.43±0.52	10.02±0.53	13.39±1.05	

Table 6 Association between disc space narrowing and lumbago

Age	<50	50-59	60-69	70-79	80+
非腰痛例	1.03±0.38	1.36±0.16	2.03±0.70	3.10±0.18	3.55±0.35
腰痛例	1.25±0.45	1.69±0.29	2.46±0.21	2.41±0.20	2.58±0.36

There was no significant difference in the number of inter-vertebral space narrowing between the patients with or without lumbago.

Table 7. Association of common diseases in patients with or without lumbago in post menopausal women

Disease	Age	<50	50-59	60-69	70-79	80+	p
DM	腰痛—	2.6%	5.6%	8.3%	8.8%	10.7%	ns
	有病率	腰痛+	2.4%	4.4%	6.2%	9.6%	
Hyperlipemia	腰痛—	30.7%	41.4%	44.0%	41.4%	22.7%	ns
	有病率	腰痛+	36.6%	43.4%	41.8%	37.3%	
Hypertension	腰痛—	10.5%	27.5%	40.3%	65.8%	76.0%	ns
	有病率	腰痛+	14.7%	20.4%	42.9%	62.2%	

Table 8. Baseline Characteristics by Presence and Absence of Pain (Numerical Data)^a

Item	No Pain ^b	With Pain ^b		P Value ^c
		Back Pain	Other Pain ^d	
Age, y	58.8 ± 9.9 (338)	64.6 ± 10.6 (229)	64.3 ± 9.3 (251)	<.001
Body weight, kg	152.4 ± 5.9 (338)	150.6 ± 6.4 (229)	151.3 ± 5.7 (251)	.003
Body height, cm	52.5 ± 8.0 (338)	51.3 ± 7.8 (229)	53.7 ± 7.9 (251)	.006
BMI, kg/m ²	22.6 ± 3.1 (338)	22.6 ± 3 (229)	23.4 ± 3 (251)	.002
Years since menopause, y	11.3 ± 9.6 (295)	16.2 ± 9.8 (206)	15.2 ± 9.3 (236)	<.001
LBMD, g/cm ²	1.02 ± 0.17 (338)	0.97 ± 0.2 (229)	1.04 ± 0.18 (251)	<.001
FNBM, g/cm ²	0.81 ± 0.13 (230)	0.76 ± 0.13 (135)	0.8 ± 0.15 (149)	.002
Total protein, g/dL	7.3 ± 0.58 (328)	7.3 ± 0.6 (221)	7.3 ± 0.6 (247)	.755
Calcium, mg/dL	9.2 ± 0.4 (326)	9.2 ± 0.4 (222)	9.1 ± 0.4 (246)	.158
Phosphate, mg/dL	3.4 ± 0.5 (326)	3.5 ± 0.5 (222)	3.5 ± 0.4 (246)	.307
Alkaline phosphatase, IU	179.6 ± 66.5 (335)	191.0 ± 70.7 (224)	183.4 ± 57 (249)	.127
Prevalent vertebral fracture number	0.05 ± 0.03 (338)	0.39 ± 0.04 (229)	0.08 ± 0.04 (251)	<.001
Observation period, y	5.8 ± 3.5 (338)	5.4 ± 3.3 (229)	5.7 ± 3.7 (251)	.440

Table 9 Association Between Co-morbidities or Lifestyle Habits and Back Pain

Item	Odds Ratio ^a	95% CI ^a		P Value
Vertebral fracture prevalence	4.60	2.67	8.07	<.001
Osteoporosis ^b	2.14	1.41	3.25	<.001
Osteoarthritis ^c	1.19	0.80	1.76	.395
Rheumatoid arthritis ^d	2.01	0.99	4.03	.049
Diabetes mellitus ^e	0.92	0.48	1.70	.800
Hypertension ^e	0.83	0.59	1.17	.284
Dyslipidemia ^e	1.08	0.78	1.49	.646
Cardio- or cerebro-vascular events	1.59	0.97	2.56	.062
Malignancies	1.28	0.74	2.18	.363
Smoking	0.29	0.05	1.00	.094
Drinking	0.99	0.55	1.72	.980

Table 10 . Details of First Incident Fractures (n=189)

Fracture Site	Number	%	Mean Time at Fracture
Vertebra ^a	148	78.3	5.6±3.2
Femoral neck	8	4.2	6.4±3.9
Colles	19	10.1	5.3±2.9
Other ^b	14	7.4	4.5±3.5

Table 11 . Multivariate Cox Regression Analysis: Risk of Fracture by Back Pain, Adjusted for Age, Prevalence of Osteoporosis and Prevalence of Vertebral Fractures

Item	HR ^a	95% CI ^a		P Value
Age, 5years↑	1.36	1.23	1.50	<.001
Osteoporosis/ Osteoporosis/ Osteopenia+normal ^b	2.23	1.45	3.41	<.001
Prevalence of vertebral fracture, yes/no	1.92	1.20	3.06	0.007
Back pain yes/no ^c	1.62	1.16	2.27	0.005

Table 1 2-1 Baseline characteristics (numerical data)

item	mean \pm SD (n)
Age, y	65.1 \pm 9.2 (1312)
Years since menopause, y	15.9 \pm 9.8 (1259)
Body mass index, kg/m ²	22.5 \pm 3.2 (1312)
Lumbar bone mineral density, g/cm ²	0.91 \pm 0.20 (1311)
Total protein, g/dl	7.3 \pm 0.6 (1292)
Calcium, mg/dl	9.2 \pm 0.4 (1293)
Phosphate, mg/dl	3.5 \pm 0.5 (1293)

Table 1 2-2 Baseline characteristics (categorical data)

item		Prevalence number (%)
Pain category	No pain	484 (36.9)
	Back pain	450 (34.3)
	Other site	378 (28.8)
BMD category* ¹	Normal	427 (32.5)
	Osteopenia	310 (23.6)
	Osteoporosis	575 (43.8)
Pre-existing fracture	No fracture	994 (75.8)
	Vertebral fracture	269 (20.5)
	Colles fracture	29 (2.2)
	Hip fracture	12 (0.9)
	Other site fracture	29 (2.2)
History of co-morbidities	Lumbar osteoarthritis KL grade 3-5* ²	274 (20.9)
	Knee osteoarthritis	327 (24.9)
	Hip osteoarthritis	40 (3.1)
	Rheumatoid Arthritis* ³	58 (4.4)
	Diabetes Mellitus	74 (5.7)
	Dyslipidemia	506 (38.7)
	Hypertension	583 (44.6)
	Cardio- or cerebro-vascular event	133 (10.2)
	Dementia	55 (4.2)
Malignancy	105 (8.0)	

Table 1 3 Type and number of incident fractures

Type of fracture	Number of participants	%
Vertebrae	368	81.6
Distal end of radius	39	8.6
Hip	14	3.1
Other site	29	6.4
Vertebral and other site fracture	1	0.2

Table 1 4 Age adjusted hazard ratio of baseline or incidental parameter vs immobile event (Cox's hazard model)

item	HR	95%CI		p
Age/5	1.71	1.48	1.98	0.000
Age/ BMI	1.00	0.92	1.01	0.896
5+ Lumbago, yes/no	1.56	0.98	2.48	0.062
Pain in all site (Bodily pain), yes/no	2.32	1.30	4.45	0.003
Prevalent all site fracture, yes/no	2.12	1.28	3.54	0.004
Incident all site fracture, yes/no	1.08	0.63	1.89	0.789
Prevalent or incident all site fracture, yes/no	2.12	1.13	4.30	0.018
Prevalent vertebral fracture, yes/no	2.20	1.31	3.69	0.003
BMD-category osteoporosis/normal+osteopenia	1.69	1.02	2.89	0.043
Lumbar OA KL, grade 3-5/1-2	1.05	0.60	1.96	0.857
Knee OA, yes/no	0.89	0.51	1.47	0.651
hip OA, yes/no	2.35	0.71	5.71	0.144
Reumatoid Arthritis, yes/no	1.83	0.55	4.49	0.284
Diabetes, yes/no	0.38	0.11	1.00	0.050
Dyslipidemia, yes/no	0.72	0.42	1.20	0.209
Hypertention, yes/no	0.94	0.57	1.56	0.804
Cardio- cerevo-vascular event	1.51	0.81	2.66	0.184
Dementia, yes/no	2.60	1.31	4.88	0.007
Malignancy event, yes/no	1.05	0.40	2.27	0.911
Treatment for osteoporosis, yes/no	0.94	0.56	1.63	0.815

Table 1 5 Multivariate Cox's regression analysis: risk of immobile event by adjusted for age, prevalence of vertebral fracture and prevalence of dementia

item	HR	95%CI		p
Age, 5y up	1.50	1.27	1.78	0.000
Bodily Pain, yes/no	2.38	1.33	4.61	0.003
Prevalent vertebral fracture, yes/no	1.98	1.20	3.30	0.007
Dementia, yes/no	3.30	1.67	6.18	0.001

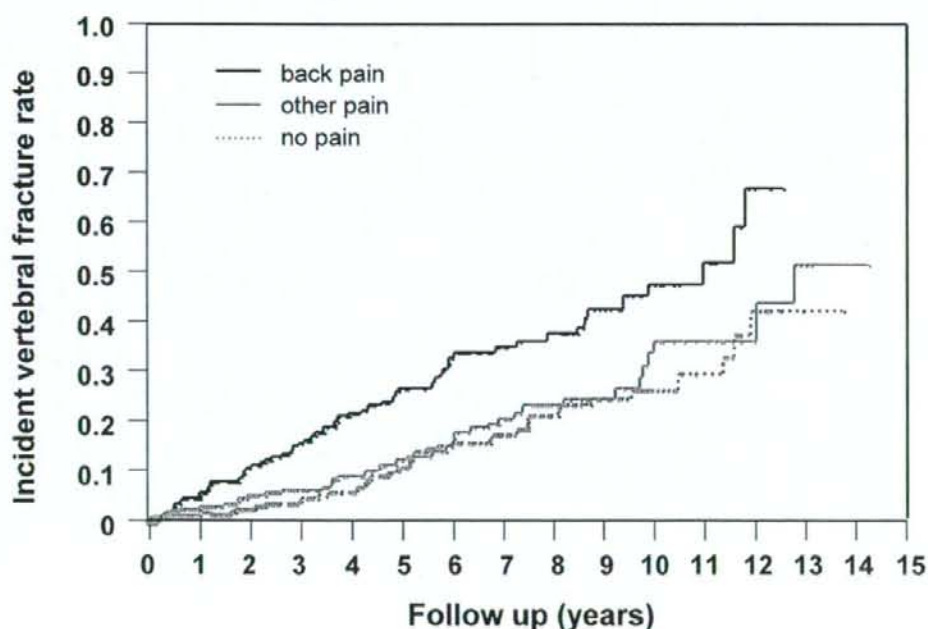


図1 腰背痛あり（黒実線）、他部位の痛み（グレー実線）および痛みなし（グレー破線）の累積脊椎骨折発生率。

平成18-20年度厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担 研究報告書

高齢者の腰痛に及ぼす脊柱変形、生活習慣要因および生活習慣病の影響と
相互作用の解明

脊柱変形に関連する遺伝子多型性に関する研究

研究分担者 細井孝之
国立長寿医療センター先端医療部

脊柱の変形は姿勢の変化や腰背痛を引き起こすことによって罹患者の ADL および QOL を損なうばかりでなく、社会的にも大きな損失をもたらす。脊柱の変形は椎体の圧迫骨折、骨棘形成、椎間板変性、脊柱アラインメントの異常などさまざまな病態を背景としてもたらされる。これらの病態を疾患概念から整理すれば、骨粗鬆症と変形性脊椎症に集約される。骨粗鬆症および変形性脊椎症は、高齢者、特に閉経後女性に多く見られる骨代謝疾患であり、脊柱の変形やこれらの疾患の発症には複数の遺伝的要因と環境要因が関連している。われわれは候補遺伝子の多型性を用いて疾患の遺伝的素因を検討してきたが、その中で γ -glutamylcarboxylase (GGCX) 遺伝子におけるアミノ酸置換を起こす一塩基置換多型 (single nucleotide polymorphism, SNP) である R325Q (CGA > CAA, dbSNP:rs699664) が高齢女性の骨密度と関連があることを見出し報告した (Bone. 2007 Feb;40(2):451-6.)。本研究ではこの遺伝子多型性と骨量との関連を確認するとともに脊柱変形との関連を検討した。さらに GGCX の活性に必要なビタミンであるビタミン K の摂取状況が、骨代謝関連ビタミン K 依存性蛋白質であるオステオカルシンの gla 化に及ぼす影響を検討した。

また、骨粗鬆症と変形性脊椎症の両者に関連する遺伝子多型性を別の観点から探求するために新たな試みを開始した。この研究の背景としては、分担研究者(細井)が世界に先駆けて報告した、口腔外骨症と全身の骨量との関連がある。すなわち、口腔外骨症を有する閉経後女性の腰椎ならびに大腿骨頸部の骨量が、口腔外骨症を有さない対照に比較して有意に高い (J Bone Miner Metab 2002)。また、このころより注目されている遺伝子として LRP5 遺伝子がある。この遺伝子におけるある突然変異は高骨密度を、他の突然変異が低骨密度をもたらすことが報告された。興味深いことに高骨密度に関連する突然変異を有する者はす

べて口腔外骨症を持っていた。このように口腔外骨症と全身骨との関連は注目すべき事象であり、すでに関連する遺伝子の一つが見出されているが、(家族例でなく)一般の集団における分子機序を説明するためには更なる検討が必要であると考え、今研究が立案された。

I. GGCX 遺伝子多型性と骨量ならびに脊椎変形との関連

A. 目的

遺伝子多型性と骨量との関連を確認するとともに脊椎変形との関連を検討する。

B. 方法

検診のために東京都老人医療センターを訪れた70歳以上の健康な閉経後女性113人(年齢 75.07 ± 3.81)を対象とした。骨密度は大腿骨近位部をDXA法で測定した。この測定値をもとに得たZスコアをbody mass index (BMI)で補正した。脊椎変形は胸椎および腰椎(Th4-L4)の正面および側面X線写真を用いて評価した。Genantの方法に修正を加えて椎間腔狭小化、椎体終板硬化および骨棘形成について評価した。評価結果はスコア化され、回帰分析にて年齢とBMIで補正した。

c.8762 G>A GGCX 遺伝子多型タイプは既報のとおり、degenerative HPLC法を用いて行った。

C. 結果

補正大腿骨頸部ZスコアをAA群とAG+GG群で比較検討したところ、それぞれ 1.059 ± 0.604 (AA), 0.548 ± 0.819 (AG+GG)であり、p値は0.0315

と群間に有意な差を認めた。この結果は既報と一致するものである(図1)。

補正椎体終板硬化スコアはc.8762=AAにおいて特に低値であった。補正スコアをAA群とAG+GG群で比較検討したところ、椎間腔狭小化スコアおよび補正骨棘形成スコアについては有意な相関は見られなかったが、補正椎体終板硬化スコアは、それぞれ 0.314 ± 0.678 (AA), 1.682 ± 2.369 (AG+GG)であり群間に有意差を認めた(p=0.0186)。

D. 考察

GGCX c.8762=AAのアレル型は、骨粗鬆症と脊椎変形性関節症の両者に対して予防的効果を持つことが示唆された。またわれわれはc.8762=Aに対応する325Gln-GGCXのカルボキシラーゼ活性が、c.8762=Gに対応する325Argよりも高いことを見出したおり、GGCXアレル型の両疾患に対する影響は、カルボキシラーゼ活性の差異を介したものである可能性が示唆された。これらの結果は骨粗鬆症や脊椎変形性関節症の予防と治療におけるビタミンKの重要性と個人の特性に合わせた栄養指導の有用性を示唆する。

II. GGCX 遺伝子多型性と食生活と

の関連

A. 目的

GGCX 8762 G>A 遺伝子多型がビタミン K (VK) 摂取量と血中 VK 濃度およびオステオカルシン (OC) との関連に及ぼす影響を若年男性を対象として検討する。

B. 方法

男性 60 名 (22.6±1.7 歳) を対象に、3 日間の食事調査、血中 VK 濃度、血中骨代謝マーカー [intact OC、undercarboxylated OC (ucOC)、骨型アルカリホスファターゼ (BAP)] 測定、GGCX 遺伝子多型タイピングを行った。

C. 結果

野菜からの VK 摂取量と血中フィロキノン (PK) は有意な正の相関 ($r=0.337$, $P=0.009$) が認められ、納豆からの VK 摂取量と血中メナキノン (MK)-7 についても、有意な正の相関がみられた ($r=0.663$, $P<0.001$)。また、総 VK 摂取量と ucOC/intact OC 比は、負の相関がみられた ($r=-0.385$, $P=0.003$)。一方、GGCX 遺伝子多型の出現頻度は、GG 型 24 人 (40%)、GA 型 30 人 (50%)、AA 型 6 人 (10%) であった。遺伝子多型別に納豆からの VK 摂取量および血中 MK-7 と ucOC/intact OC 比の相関を検討したところ、GG 型では有意な負の相関が認められたのに対し、GA 型ではやや傾向が認められたが有意ではなく、AA 型では相関が認められなかつ

た。

D. 考察

骨粗鬆症の発症リスクが高いと考えられている GG 型において、納豆からの VK 摂取量および血中 MK-7 濃度と ucOC/intact OC 比の有意な負の相関が明らかとなり、個人に対応した望ましいビタミン K 摂取により、ucOC/intact OC 比を低下させて骨折発症リスクを軽減できる可能性が示された。本研究より、骨粗鬆症予防における SNP タイプ別のテーラーメイド栄養教育の重要性が示唆された。

III. 外骨症発症に関連する遺伝子多型性の検出

A. 研究目的

外骨症発症に関連する SNP ならびに CNV (copy number repeat) を検出する。

B. 研究方法

a. 対象:

症例群は東京都老人医療センター歯科口腔外科に入院中または通院中の外骨症患者で、患部摘出予定の患者のうち文書による同意を得た成人とする。ただし除外基準にあてはまらない者。対照群は骨切手術患者、完全埋伏歯患者、歯槽整形術患者、歯科インプラント術患者のいずれかで、文書による同意を得た健常成人。

b. 解析方法:

① 摘出した組織より骨芽細胞を選択

的に培養し、培養細胞の各種刺激に対する RNA の発現を検討する。

②培養細胞より抽出した DNA:培養細胞から DNA を抽出する。抽出した DNA を用いて、全ゲノム網羅的 CNV 検索をおこなう。

③本研究については研究参加施設での倫理審査を受け承認済みである。

C. D. 結果と考察

現在、症例群 6 例と対照群 3 例についてサンプルが取得され、骨芽細胞の培養が進められ、チップ解析に要する DNA 量を確保された。現在解析が進められている。LRP 5 遺伝子の common polymorphism と一般集団における骨量との間に有意な相関があることは共同研究者らが報告している。LRP 5 遺伝子が重要な入力系の一部を構成している Wnt シグナル系の遺伝子がひろい上げられる可能性もあるが、あらたな骨粗鬆症ならびに変形性脊椎症関連の遺伝子群がみだされることが期待される。CNV は 1 塩基置換である SNP とは異なり、genomic rearrangement による遺伝子多型性であり、遺伝子発現の量的差異に基づく形質の差異をもたらす可能性をもつ

ている。また、CNV の網羅的解析には現在アレイ法 とチップ法があるが、技術面の開発はなお進行している。網羅的解析によって口腔外骨症との有意な関連があるゲノム領域が見出されれば、その部位に候補 CNV 解析を行なっていく。

G. 発表論文

Kinoshita H, Nakagawa K, Narusawa K, Goseki-Sone M, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Yoshida H, Okano T, Nakamura T, Suzuki T, Inoue S, Orimo H, Ouchi Y, Hosoi T. A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin-K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Gln) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women. *Bone*. 2007 Feb;40(2):451-6.

Goseki-Sone M, Maruyama R, Sogabe N, Hosoi T. Effects of dietary lactose on long-term high-fat-diet-induced obesity in rats. *Obesity* 2007 Nov;15(11):2605-13

平成18-20年度厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担 研究報告書

高齢者の腰痛に及ぼす脊柱変形、生活習慣要因および生活習慣病の影響と
相互作用の解明

脊柱変形と遺伝子の関連：長野コホート

研究分担者 井上 聡
東京大学大学院医学系研究科抗加齢医学講座客員教授

高齢者の脊柱変形発症に関与する遺伝的素因に関しては十分な理解がなされていない。そこで本研究では骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において主要な役割を担う Wnt-βカテニンシグナル伝達に関与する遺伝子群と骨量ならびに変形性脊椎症との関連に関して一塩基置換遺伝子多型(SNP)を用いた解析を行った。その結果、Wnt-βカテニンシグナル伝達因子の WNT10b のエクソン5にある SNP は骨量と相関することを見出した。さらに Wnt10b 遺伝子の 5'上流域から 3'下流域までの SNP が連鎖不平衡の関係にあり Wnt10b 遺伝子が一つのハプロタイプブロックを形成している可能性が示唆された。さらに Wnt-βカテニンシグナル応答遺伝子の一つである WISP1 遺伝子の SNP が脊柱変形のパラメーターの一つである終板硬化と有意に相関することを発見した。次に、骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において主要な役割を担う Insulin-like growth factor I (IGF-I)シグナル伝達に関与する遺伝子群と変形性脊椎症との関連に関して SNP を用いた解析を行った。その結果、IGF-Iの受容体の一つである IGF-I受容体(IGF1R)のイントロン1にある SNP が脊柱変形のパラメーターの一つである椎間板狭小化と有意に相関することを発見した。近年、高齢者における失明の原疾患である加齢性黄斑変性症の発症に寄与することが明らかにされ注目されている HTRA1 遺伝子のプロモーター領域に存在する SNP と変形性脊椎症との関連に関して相関解析を行った。その結果、本 SNP が椎間板狭小化と有意に相関することを見出した。また、本研究において骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において重要な役割を担うビタミン D 受容体(VDR)遺伝子と変形性脊椎症との関連についても SNP を用いた解析を行った。その結果、VDR 遺伝子多型の一つである TaqI 多型が脊柱変形のパラメーターの一つである椎間板狭小化と有意に相関することを発見した。今後これら遺伝子をはじめとするシグナル伝達因子を標的とした骨粗鬆症ならびに変形性脊椎症診断法ならびに治療薬が開発されることが期待される。

A. 研究目的

高齢者の脊柱変形とそれに伴う疼痛は高齢者の ADL ならびに QOL を大きく損なう。したがって、本疾患の原因解明を行うことは老人医療において重要な意義を有する。その一方で、これらの遺伝的素因に関しては十分な理解がなされていない。そこで、本研究では近年、骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において主要な役割を果たしていることが明らかにされた細胞内シグナルである、Wnt- β カテニンシグナル伝達において重要な役割を果たす、Wnt10b や WISP1 をはじめとする複数の遺伝子と、変形性脊椎症ならびに骨量との関連に関して一塩基置換遺伝子多型(SNP)を用いた解析を行った。次に、骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において主要な役割を果たしていることが明らかにされた細胞内シグナルである、IGF-I シグナル伝達において重要な役割を果たす、IGF-I 受容体(IGF1R)、あるいは眼の老化関連遺伝子 HTRA1、さらに骨軟骨代謝に深く関わる VDR と変形性脊椎症との関連に関して SNP を用いた解析を行った。

B. 方法

1. Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性脊椎症

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により Wnt-LRP5 シグナル伝達調節因子であるヒト Wnt10b 遺伝子における遺伝子

多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行い、BMD との相関を検討した。

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により Wnt-LRP5 シグナル伝達調節因子である WISP1 における SNP を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症の指標(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を評価した。骨密度ならびに各種臨床データに関する同時測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

2. IGF1R 受容体と変形性脊椎症

日本人非血縁閉経後女性 434 名を対象として末梢血 DNA を抽出し、IGF-I シグナル伝達調節因子であるヒト IGF1 受容体(IGF1R)遺伝子における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行い、SNP を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症のパラメーター(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を評価した。骨密度ならびに各種臨床データに関する同時測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

3. HTRA1 遺伝子多型と変形性脊椎症

本研究では高齢者の眼における変性疾患として知られる加齢性黄斑変性症(AMD)の発症に寄与することが近年明らかにされ注目されている、HTRA1 遺伝子のプロモーター領域に存在する SNP と変形性脊椎症との関連に関する検討を行

った。ヒト膝関節由来初代培養軟骨細胞から mRNA を抽出し、定量的リアルタイム PCR 法により HTRA1 の発現解析を行った。遺伝子多型と脊椎変形との相関解析においては、日本人非血縁閉経女性 513 名(平均年齢 66.6±7.6 歳)を対象とした。末梢血より DNA を抽出し、TaqmanPCR 法により HTRA1 プロモーター遺伝子多型(rs11200638)を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症のパラメーター(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を Genant の方法に基づきスコア化を行い評価した。骨密度ならびに各種臨床データに関しても同時に測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

4. VDR 遺伝子多型と変形性脊椎症

骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において重要な役割を果たしていることが明らかにされた細胞内シグナルであるビタミン D 受容体(VDR)と変形性脊椎症との関連に関して SNP を用いた解析を行った。日本人閉経後女性 606 人(平均年齢±SD: 67.1±7.8 歳)を対象とし、TaqMan PCR 法によりヒト VDR 遺伝子における SNP の中で TaqI 多型と知られる SNP の遺伝子型を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症の各指標(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)をスコア化し、得られたデータに関し統計学的な解析を行なった。胸腰椎 X 線写真を撮影し、脊柱変性のパラメーター(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を Genant の方法に基づきスコア化を行い本遺伝子多型との相関解析を行った。

C. 結果

1. Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性腰椎症

LRP5/6 に対してリガンドとして働く Wnt10b のエクソン 5 に存在するアミノ酸置換を伴わない SNP (1059C/T, His353His, rs7470505)においては、全身骨ならびに腰椎骨密度に関して有意差を呈していた(Fig. 1A, B)。また、Wnt10b の 5'上流域に存在する SNP (rs833840)、3'非翻訳領域における SNP (rs3741627)、さらには 3'下流領域における SNP (rs10875902)も同時に決定し(Fig. 2)、これら遺伝子多型間の連鎖不平衡に関して検討を行った。その結果これら遺伝子多型は連鎖不平衡にあることが示された(Table 1)。

次に WISPI 遺伝子の 3'非翻訳領域に存在する SNP と変形性脊椎症の各パラメーター(骨棘形成、終板硬化、椎間板狭小化)を検討した。その結果、この SNP は終板硬化と有意に相関した(Table 2)。脊椎変形は年齢の影響を受けることからさらに我々は年齢補正後に再解析を行った(Table 3)。WISPI 遺伝子の本 SNP(2364A/G)において G アレルを有する群(AG+GG)と G アレルを有さない群(AA)との 2 群間での比較を行った。終板硬化を複数有する群(n=271)においては複数有さない群(n=33)と比較し、AA 群の頻度が有意に高かった(P=0.0069, オッズ比=2.91)。終板硬化を有する群(n=235)と有さない群(n=69)との比較でも同様に、AA 群の頻度が有意に高かった(P=0.044, オッズ比=1.78)。

2. IGF-I 経路と変形性脊椎症

IGF-I シグナルに対して受容体として働く 1 型 IGF-I 受容体(IGF1R)遺伝子のイントロン 1 に存在する SNP(IVS1+14488C>G, rs11247361)と、変形性脊椎症の各パラメーター(骨棘形成、終板硬化、椎間板狭小化)を検討した。434 名の日本人閉経後女性を対象として遺伝子型を決定したところ、この SNP は CC 型が 144 名、GC 型が 229 名、GG 型が 61 名であった。Table 1 に示したように、バックグラウンドデータ(年齢、身長、体重、BMI)と各群間において有意差はなかった。Kruskal-Wallis 解析の結果、この SNP は変形性脊椎症の各パラメーターの中で椎間板狭小化と有意に相関した(Fig. 3, Table 4, $P=0.0051$)。ANOVA 解析においても同様に椎間板狭小化と有意に相関した(Table 4, $P=0.015$)。

脊椎変形は年齢、身長、体重の影響を受けることが知られているため、次に我々はこれら因子に IGF1R の遺伝子型を加えて、椎間板狭小化に与える影響に関してステップワイズリグレッション解析による検討を行った。その結果これらの因子の中で年齢と IGF1R 遺伝子型が有意に椎間板狭小化スコアと相関した(Table 5)。

さらに、我々は年齢補正を行った後に、IGF1R 遺伝子 SNP(IVS1+14488C>G, rs11247361)の遺伝子型と椎間板狭小化スコアとの相関を解析した。本解析においては、対象者を G アレルを有する群(GG or GC 群)と G アレルを有さない群(CC 群)とに分けた。本解析において G アレルを有

する群(GG or GC)では、椎間板狭小化を 2 椎体間もしくはそれ以上有する人数が有意に多かった(Table 6)($P=0.0042$, オッズ比=1.84)。IGF1R 遺伝子の本 SNP において G アレルを有する群(CG+GG)と G アレルを有さない群(CC)との 2 群間での比較を行った。椎間板狭小化を複数有する群($n=223$)においては複数有さない群($n=211$)と比較し、CC 群の頻度が有意に低かった。椎間板狭小化を 3 個以上の脊椎で有する群($n=140$)と有さない群($n=294$)との比較でも、同様に CC 群の頻度が有意に低かった(Table 6)($P=0.0033$, オッズ比=0.49)。以上より、IGF1R 遺伝子上の SNP が脊椎における椎間板狭小化と相関することが示された。

3. HTRA1 遺伝子多型と変形性脊椎症

定量的リアルタイム PCR 法により、ヒト軟骨細胞において HTRA1 の発現が確認され、その発現は分化マーカーである Col2a1 の上昇に伴って(Fig. 4A)、上昇した(Fig. 4B)。また、その発現は TGF β 添加により増加することが示された(Fig. 4C)。

次に AMD 発症のリスクとなる genotype として知られる、HTRA1 プロモーター遺伝子多型の AA 型 ($n=89$) は、その他の群 (GG + GA 型: $n=424$) と比べ、椎間板狭小化スコアが有意に高値であった ($P=0.0292$) (Fig. 5, Table 7)。HTRA1 プロモーター遺伝子多型の AA 型 ($n=89$) は、その他の群 (GG + GA 型: $n=424$) と比べ、身長が有意に低下していたが ($P=0.0091$)、それ以外のバックグラウンドならびに臨床データにおいて、有意差は存在しなかった(Table 7)。また、胸腰椎に

において椎間板狭小化を4椎体間以上有する群において、AA型が有意に多く存在した(P=0.013; オッズ比 1.97; 95%信頼区間 1.15-3.37) (Table 8)。

4. VDR 遺伝子多型と変形性腰椎症

VDR 遺伝子 TaqI 多型を genotyping したところ、TT 型は 463 名(76.4%)、Tt 型は 134 名(22.1%)、tt 型は 9 名(1.5%)であり、過去の日本人集団における報告と同等であった。t アレルを有する Tt 型+tt 型(143 名)では TT 型(463 名)と比較し、椎間板狭小化スコアが有意に上昇していた(P=0.021)(Fig. 6)。

D. 考察

Wnt- β -catenin シグナル伝達経路は、哺乳動物での細胞増殖や分化の制御において重要な役割を果たす。近年このシグナル伝達系の構成因子のひとつである LDL receptor-related protein 5 (LRP5) 遺伝子は、ヒトでの遺伝子変異やノックアウトマウスの解析から骨芽細胞による骨形成において中心的な役割を果たしていることが明らかにされた。我々は今までに、LRP5 の一塩基置換遺伝子多型性(SNP)と骨量との関連について検討してきた。その結果、LRP5 遺伝子イントロン 17 に存在する SNP は、腰椎骨密度と有意に相関することを発見した(Urano et al, J Bone Miner Metab, 2004)。さらに、アミノ酸変異を伴う SNP に注目し解析を行った結果、エクソン 18 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(A1330V)が、腰椎骨密度と有意に相関することも見出した(Ezura et al, Bone,

2007)。Wnt- β -catenin シグナル伝達因子は多数同定されており、LRP5 のみならず、他の因子に関しても骨量を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。そこで今回、我々は Wnt-LRP シグナル伝達因子である Wnt10b 遺伝子のエクソン 5 における SNP が骨量と有意に相関することを明らかとした(Usui et al, Geriatric Gerontol Int, 2007)。Wnt10b は哺乳動物に多数存在する Wnt シグナルのリガンドとして機能する因子の一つである。近年 Wnt10b 遺伝子のトランスジェニックマウスにおいて骨量増加を示し、ノックアウトマウスでは骨量減少を示すことが報告されている。このマウスのデータと今回の我々の遺伝子多型での解析から、多数存在する Wnt-LRP シグナル制御因子の中で Wnt10b-LRP5 経路が骨形成においては他の Wnt シグナルでは代償できない重要な役割をはたしている可能性が示唆された。また、本 SNP を含む Wnt10b 遺伝子における 5' 上流域、翻訳領域、3' 非翻訳領域ならびに 3' 下流域までの 4 種類の SNP 間での連鎖不平衡を検討したところ、これらはすべて連鎖不平衡にあることを見出した。したがって、Wnt10b 遺伝子全体はハプロタイプブロックを形成している可能性があり、このハプロタイプブロックが Wnt10b 遺伝子の発現や機能を調節し、骨代謝に影響を与えている可能性がある。

前述したように我々は LRP5 が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーである可能性を示してきた。その一方、我々は LRP5 のエクソン 2 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)が、変形性脊椎症

におけるパラメーター(骨棘形成、椎間板狭小、終板硬化)の中で骨棘形成と有意な相関があることを報告した(Urano et al, Spine, 2007)。したがって Wnt-LRP シグナル伝達因子は骨芽細胞の増殖や分化制御ばかりでなく、軟骨の変成にも関与することが示唆された。そこで、我々は Wnt-LRP5 シグナルの下流シグナルである WISP1 と変形性脊椎症におけるパラメーターとの相関を検討したところ、終板硬化との間に有意な相関を見出した。

IGF-I シグナル伝達経路は哺乳動物での細胞増殖や分化の制御において重要な役割を果たす。近年、IGF-I シグナルの受容体として機能する IGFIR の遺伝子変異は胎内ならびに生後の発達障害を引き起こすことが報告されている。また IGFIR 遺伝子上の SNP は寿命や脳血管性認知症の発症との相関も報告されており個体の老化との関連でも注目されている。IGF-I シグナルは関節軟骨細胞の増殖、分化、アポトーシスといった細胞機能に大きな影響を与えることが細胞ならびに *in vivo* モデルで示されており、関節における代謝ならびに関節疾患との関連が注目されてきた。今回、我々は IGFIR の一塩基置換遺伝子多型性(SNP)が変形性脊椎症と有意に相関することを見出した。欧米のグループからは IGFIR のリガンドである IGF-I 遺伝子のプロモーター領域における SNP が変形性関節症と有意に相関することが報告されている。IGF-I/IGFIR シグナル伝達因子は多数同定されており IGF-I や IGFIR のみならず、他の因子に関しても脊椎変形を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。

以上により、我々は IGFIR が変形性脊椎症におけるパラメーターの中で椎間板狭小化と有意な相関があることを報告した(Urano T et al, Spine, 2008)。すなわち、変形性脊椎症の各パラメーターは異なった遺伝子により制御されている可能性が示唆された。

加齢性黄斑変性症(AMD)は高齢者の失明の主たる原因となる疾患である。AMD の発症に関与する SNP を探索した結果 rs11200638 遺伝子多型が同定された。rs11200638 遺伝子多型は HTRA1 のプロモーター領域に存在する SNP である。この SNP の AA 型は HTRA1 が高発現することが示されている。今回、我々は rs11200638 の SNP が変形性脊椎症と有意に相関することを見出した。今回の報告は我々の知るところ、世界で初めての報告である。今回の報告より、rs11200638 は AMD と変形性脊椎症という眼と脊椎といった異なる組織における加齢に伴う変性疾患を同時に制御する SNP である可能性が示された。また、今回我々は HTRA1 の mRNA での発現が TGFβにより発現誘導されることを見出した。HTRA1 はセリンプロテアーゼであり、TGFβはその基質であることから、HTRA1 は TGFβシグナルを遮断することが知られている。今回の発見は、TGFβは HTRA1 を誘導し、誘導された HTRA1 は TGFβシグナルを遮断する negative feed back loop を形成することが示唆された。また、HTRA1 は変形性脊椎症患者由来の滑膜液で高発現していることが示唆されており、今回の HTRA1 の高発現を誘導することが示されている AA 型で変形性脊椎症のリスクが高いデータ

と合わせ考えると、HTRA1の発現を抑制する因子が脊椎変形予防の創薬へとつながる可能性が示唆された。

さらに今回、我々はVDR遺伝子のTaqI多型が脊椎変形のパラメーターの一つである、椎間板狭小と相関することを見出した。過去にMRIによる脊椎変形での検討においてVDR遺伝子におけるTaqI多型との相関が報告されており、その結果は、今回の我々の報告と一致した。このことはVDR遺伝子におけるTaqI多型が再現性を有しており、TaqI多型は脊椎変形を予測する遺伝子マーカーとして有用であることと同時に、我々が行っている単純レントゲン写真を用いたスコア化システムが有用であることが示唆された。

本研究により、Wnt/LRP5シグナル、IGF-I/IGF1Rシグナル、HTRA1/TGFβ1シグナル、VDRシグナル伝達因子は脊椎変形を規定する遺伝子であることが示唆された。今後、これらシグナルが脊柱変形にはたす役割を探求することで、新たな変形性脊椎症をはじめとする脊椎変形を早期に予測する遺伝子マーカー、さらには脊椎変形に対する治療薬の応用や開発が期待される。

本解析によって着目された候補遺伝子については、対象者数を増やし再解析を行うことで、脊椎変形規定遺伝子の候補遺伝子の選定を行う予定としている。今後、これらの解析により新たな高齢者の脊椎変形を規定する遺伝子マーカーや治療薬の応用や開発が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Ichikawa, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Blumberg, B., Inoue, S.: Steroid and xenobiotic receptor SXR mediates vitamin K2-activated transcription of extracellular matrix-related genes and collagen accumulation in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 281, 16927-16934, 2006.
2. Nakasato, N., Ikeda, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Takeda, S., Inoue, S.: A ubiquitin E3 ligase Efp is up-regulated by interferons and conjugated with ISG15. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 540-546, 2006.
3. Takeuchi, T., Inoue, S., Yokosawa, H.: Identification and Herc5-mediated ISGylation of novel target proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 384, 473-477, 2006.
4. Urata, Y., Ihara, Y., Murata, H., Goto, S., Koji, T., Yodoi, J., Inoue, S., Kondo, T.: 17-β-estradiol protects against oxidative stress-induced cell death through the glutathione/glutaredoxin-dependent redox regulation of Akt in myocardial H9c2 cell. *J Biol Chem* 281, 13092-13102, 2006.
5. Urano, T., Shiraki, M., Narusawa, K., Usui, T., Sasaki, N., Hosoi, T., Ouchi, Y., Nakamura, T., Inoue, S.: Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *Spine* 32, 25-29, 2007.
6. Urano, T., Narusawa, K., Shiraki, M., Usui, T., Sasaki, N., Hosoi, T., Ouchi, Y., Nakamura, T., Inoue, S.: Association of a single nucleotide polymorphism in the

- WISPI gene with spinal osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Metab* 25, 253-258, 2007.
7. Ezura, Y., Nakajima, T., Urano, T., Sudo, Y., Kajita, M., Yoshida, H., Suzuki, T., Hosoi, T., Inoue, S., Shiraki, M., Emi, M.: Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. *Bone* 40, 997-1005, 2007.
 8. Ichikawa, T., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Blumberg, B., Inoue, S.: Vitamin K2 induces phosphorylation of protein kinase A and expression of novel target genes in osteoblastic cells. *J Mol Endocrinol* 39, 239-247, 2007.
 9. Usui, T., Urano, T., Shiraki, M., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of a single nucleotide polymorphism in Wnt10b gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 7, 48-53, 2007.
 10. Kinoshita, H., Nakagawa, K., Narusawa, K., Goseki-Sone, M., Fukushi-Irie, M., Mizoi, L., Yoshida, H., Okano, T., Nakamura, T., Suzuki, T., Inoue, S., Orimo, H., Ouchi, Y., Hosoi, T.: A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Glu) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women. *Bone* 40, 451-456, 2007.
 11. Urano, T., Shiraki, M., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of a single nucleotide polymorphism in the steroid and xenobiotic receptor (SXR) gene (IVS1-579A/G) with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 7, 104-109, 2007.
 12. Takayama, K., Kaneshiro, K., Tsutsumi, S., Horie-Inoue, K., Ikeda, K., Urano, T., Ijichi, N., Ouchi, Y., Shirahige, K., Aburatani, H., Inoue, S.: Identification of novel androgen response genes in prostate cancer cells by coupling chromatin immunoprecipitation and genomic microarray analysis. *Oncogene* 26, 4453-4463, 2007.
 13. Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Kumagai, J., Ogushi, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kitamura, T., Muramatsu, M., Inoue, S.: Increased expression of Estrogen-Related Receptor alpha (ERRalpha) is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Int J Cancer* 120, 2325-2330, 2007.
 14. Ijichi, N., Ikeda, K., Horie-Inoue, K., Yagi, K., Okazaki, Y., Inoue, S.: Estrogen-related receptor alpha modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 813-818, 2007.
 15. Kumagai, J., Fujimura, T., Takahashi, S., Urano, T., Ogushi, T., Horie-Inoue, K., Ouchi, Y., Kitamura, T., Muramatsu, M., Blumberg, B., Inoue, S.: Cytochrome P450 2B6 is a growth-inhibitory and prognostic factor for prostate cancer. *Prostate* 67, 1029-1037, 2007.
 16. Ikeda, M., Inoue, S., Muramatsu, M., Minatogawa, Y.: Characterization and identification of a steroid receptor-binding protein, SRB-RGS. *Biol Pharm Bull* 30, 1056-1064, 2007.
 17. Suzuki, T., Urano, T., Miki, Y., Moriya, T., Akahira, J., Ishida, T., Horie, K., Inoue, S., Sasano, H.: Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Sci* 98, 644-51, 2007.