

200921003A

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者の性ホルモン低下に伴う各種合併症に対する臨床研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 並木 幹夫

平成22(2010)年 4月

目次

I. 総括研究報告

高齢者の性ホルモン低下に伴う各種合併症に関する臨床研究

並木 幹夫

1

II. 分担研究報告

1. LOH 症候群に対するバイオ診断チップの開発に関する研究

民谷 栄一

10

2. LOH 症候群における遺伝子多型と ART の治療感受性遺伝子同定に関する研究

小中 弘之

14

3. LOH 症候群に対する ART の有用性に関する研究

高 榮哲

20

(資料) 研究会/学会抄録

4. LOH 症候群におけるアンドロゲン補充療法の臨床試験—中間での統計解析結果—

折笠 秀樹

37

(資料) 統計解析結果

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

149

IV. 研究成果の刊行物・別刷

150

厚生労働科学研究費補助金(長寿研究事業)

総括 研究報告書

高齢者の性ホルモン低下に伴う各種合併症に関する研究

主任研究者 並木幹夫 金沢大学大学院医学系研究科集学的治療学 教授

研究要旨

従来から顕在するホルモン補充療法における“性差”を是正すべく、加齢に起因するアンドロゲン低下に伴う高齢男性性腺機能低下(Late-Onset Hypogonadism: LOH)症候群に着目し、その推奨治療であるアンドロゲン補充療法(ART)の有効性を前向きランダム化比較試験(RCT)によって検証する。今年度は3年の研究期間の最終年にあたり、一部はまだ解析中であるが、1) LOH症候群に対するARTの有用性に関する臨床研究(主研究)、2) LOH症候群に対するバイオ診断チップの開発(副研究)、3) LOH症候群における治療感受性を規定する遺伝子多型の解析(副研究)の進捗状況は劇的に好転した。さらに、今年度からは統計解析の専門家を分担研究者として迎え、本研究の目玉である主研究(RCT)の解析が加速度的に進み、中間解析ではあるが興味深い結果が散見され始めた。本研究によってEBMに基づいた適正なARTを確立・普及させることは、高齢男性のQOLを高めるとともに健康寿命の延伸に寄与し、超高齢社会における大きな福音になりうると考えられた。

A. 研究目的

人口の高齢化に伴い、高齢男性のQOLの質が問われており、近年は学際的な視点から各種取り組みがすすめられている。その一環としてアンチエイジング医療が脚光を浴びるなか、高齢男性の性ホルモン低下に起因する合併症に対する医療の必要性が認識されつつある。従来から、ホルモン補充療法に対する取り組みには大きな性差が存在し、更年期女性に対するエストロゲン補充療法が広く普及してきた一方で、男性に対するARTは未だ発展途上にある。これまで高齢男性のアンドロゲン低下は“加齢に伴う一般現象”と単に理解され、医療行政からも顧みられることなく、あまり医療の対象にならなかった。また、一部の医療機関ではART

の有用性に関するエビデンスが欠落したまま、男性更年期障害という経験的な診断に基づいて ART が施行されていたのが現状である。

そこで本研究では、まず高齢男性の性ホルモン低下に起因する諸症候を呈する病態である LOH 症候群という新しい概念を世に浸透させるべく、「LOH 症候群診療の手引き」を作成した。次に、その治療方針で推奨する ART の LOH 症候群に対する有効性を検証する目的で、国内の大学病院を中心とした多施設共同大規模 RCT を計画した。この臨床試験は、低テストステロン値を呈する中高年男性を対象とし、テストステロン投与群と非投与(コントロール)群の 2 群に無作為化し、ART の治療効果を比較検討するものである。治療効果については、自覚症状の改善を各種質問紙にて、他覚徴候の改善度を脂質代謝、糖代謝、骨代謝に関連した各種マーカーによって評価する。また、軽度の糖尿病、高血圧症、高脂血症、あるいは虚血性心疾患を有する内科加療中の低テストステロン値を呈する症例において、各疾患に対する標準治療に ART を併用することの有用性を検証する。本研究によって、LOH 症候群に対する関心が高まり、その治療法としての ART が確立・普及すれば、高齢男性における QOL の改善や ADL の高い維持が可能となり、男性の健康寿命を延伸させると共に、長寿社会における医療費の削減にも寄与できると考えられる。

さらに副研究として、1) ナノテクノロジーを利用した、LOH 症候群の早期発見、早期治療を目指したバイオ診断チップの開発と 2) テーラーメイド医療を念頭に置いた、ART の有効性を規定しうる遺伝子の同定とその遺伝子多型の解析を本研究課題に追加した。

B. 研究方法

主研究:

1. 中高年男性における前立腺特異抗原 (PSA) と遊離型テストステロン (Free-T) との相関および運動習慣の有無に関する臨床試験 (スクリーニング試験)
2. 高齢男性性腺機能低下 (LOH) 症候群におけるアンドロゲン補充療法 (ART) の有用性に関する臨床試験 (本試験)

【試験計画】 国内の大学病院を中心とした多施設共同の大規模 RCT で、3 年計画で最初半年間の準備期間を経てその後 1 年間で症例の組み入れ期間とし、最後半年はデータ解析に充てる。LOH 症候群に対する ART の有効性を検証する大規模 RCT (テストステロン単独投与試験) を実施するにあたり、適格患者のスクリーニングと PSA と Free-T 関連を検討する目的でスクリーニング試験を計画する。

【試験目的】 LOH 症候群に対する ART の有効性を評価する。

【試験対象】スクリーニング試験として、40歳以上の90歳未満男性を対象に、PSAとFree-Tを採血する。運動習慣の有無に関する質問紙 PSA < 2.0 ng/ml かつ Free-T < 11.8 pg/ml 症例に対し、本試験参加の同意を取得する。目標症例数を400に下方修正した。

【薬剤投与】エナント酸テストステロンのデポ剤を、1回250mg、4週毎に合計12回筋注し、治療期間は原則約1年間とする。

【試験方法】封筒法を用いた無作為化によって組み入れ対象を2群に割付する。プラセボによるrun-in期間は設けず、テストステロン投与群と非投与(コントロール)群間で治療効果を比較検討する。また、軽度の糖尿病、高血圧症、高脂血症、あるいは虚血性心疾患に対して内科加療中で、テストステロンの低下を呈する症例においても、各疾患に対する標準的治療にARTを追加する併用効果の有無を検証する。治療開始後の血液検査は3カ月後、6カ月後、12カ月後とし、検査値に基づいて治療の中止または適宜投与量の増減を行う。さらに、ARTの有効性が認められた症例に関しては、治療終了後における効果の持続性も検証するため、6カ月間の追跡期間を加える。得られたデータに対して統計学的解析を加え、治療効果を評価した。

【評価方法】自覚症状については、健康QOL調査の包括的尺度として普及しているMOS Short-Form 36-Item Health Survey (SF-36)、HeinemannらによるAging Males' Symptoms (AMS) rating scale、自己評価うつ尺度Self-rating Depression Scale (SDS)、排尿機能スコアであるInternational Prostate Symptom Score (IPSS)、性機能スコアであるInternational Index of Erectile Function (IIEF5)等の質問紙を用いて治療前後で比較評価する。また、骨密度の減少、筋力の低下、体脂肪の増加、貧血の進行等の改善に対する客観的評価には、脂質代謝、糖代謝、骨代謝に関する各種マーカーに加えて、下垂体性腺系ホルモン、副腎性ホルモン、血算、一般生化学検査に依る。有害事象については、腫瘍マーカーPSAを含めた一般生化学的血液検査に加えて、National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI-CTCAE)を用いて評価した。

副研究1: LOH症候群に対するバイオ診断チップの開発

患者及び健常人から血液および唾液を採取し、遊離型テストステロンのみならず、心身ストレスとの関連が指摘されているコルチゾール(cortisol)や老化度との関連が指摘されているデヒドロエピアンドロステロンサルフェート(DHEA-S)を測定し、適切なcut off値を設定し、3者を同時に測定検出できるシステムを構築する。また、副腎性ホルモンであるDHEAは血中濃度が極めて低いために一般に検出は困難とされているが、ナノテクノロジーを応用した高感度法を用いて、DHEAの唾液中検出を試みた。

副研究2: LOH症候群における治療感受性を規定しうる遺伝子多型の解析

ARTが施行された対象症例からの血液を採取し、治療感受性遺伝子に照準を絞って、主とし

て一塩基多型 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) を検索し、ART 有効群の予測が可能か検討した。また、DNA チップなどの遺伝子研究の革新的技術とコンピューターの情報処理能力を駆使して、網羅的な SNP の解析も展開する。具体的には ART の有効症例と 1) androgen receptor (AR)における CAG および GGN repeat 数、2) 標的遺伝子における SNP との関連について検討した。また、標的遺伝子としてチトクローム p-450 の酵素である CYP17、CYP3A4、インシュリン関連の insulin-like growth factor-1 (IGF-1)、IGF binding protein-3 (IGFBP-3)、テストステロンを DHT に変換する酵素である 5 α -reductase type 2 (SRD5A2)、について、今年度はサイトカイン関連として IL-6、TNF- α も追加して、さらなる解析を加えた。

(倫理面への配慮)

LOH 症候群に対する診断の必要性和 ART の有用性に対するランダム化試験に対するインフォームドコンセントを十分に行い、対象者からの同意を得ることを前提としている。また本研究終了後、対象者に対するアンケート調査を施行し、研究対象者の視点から倫理的の問題の有無についても吟味し、今後の臨床研究にフィードバックさせていく予定である。さらに、患者及び健常人から提供された検体を用いたバイオ診断チップの開発および遺伝子多型の解析に関する研究においては、各施設におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会で承認を得たうえで、研究に使用する検体は、匿名化のうえ個人情報管理者により厳格に管理され、使用済み試料は産業廃棄物として廃棄する。得られた結果データについても、同様に管理され、倫理的に懸念される「個人及びその家族等の関係者に対する不利益」は全く生じないように配慮される。

C. 研究結果

多施設大規模臨床試験: 加齢男性性腺機能低下 (LOH) 症候群におけるアンドロゲン補充療法 (ART) の有用性に関する臨床試験 (以下、本試験) については、平成 20 年 8 月初旬に東京 (田町) で開催された第 1 回の班会議を皮切りに、その計画、内容、問題点等について十分に各施設間で意見交換がなされた。適格症例のスクリーニングも兼ねる目的で、中高年男性における前立腺特異抗原 (PSA) と遊離型テストステロン (Free-T) との相関および運動習慣の有無に関する臨床試験 (以下、スクリーニング試験) が新たに追加された。臨床検体、試験薬を使用する性格上、本試験、スクリーニング試験ともにその執行には各施設における臨床試験審査委員会 (IRB) の承認が必要不可欠で、その準備がかなりの律速段階となり、大部分の施設で承認が得られるまでに同年 12 月末まで費やされた。

この予想外の状況において、まず金沢大学関連施設で、いち早く同年11月下旬ぐらいから、本格的にスクリーニング試験が動きだした。しかしながら、プラセボ群を置かない、テストステロン投与群と非投与群間でARTの有用性を比較検討する臨床試験であるため、本試験のエントリーに際し、その同意取得を頂くことは容易ではなかった。結局のところ、本研究に関する進捗状況に関しては、半年という準備期間の設定から大規模臨床試験に関する計画上の執行遅延は約2ヵ月で、昨年未ぐらいより本研究が加速度的に進んで進捗状況は極めて良好となった。平成22年4月末日現在のエントリー数は、スクリーニング試験約1,680例、本試験335例(うち中止69例)に達した。遺伝子多型の解析は、倫理委員会の承認が律速段階となって約3ヵ月の執行遅延が認められた。バイオ診断チップの開発はほぼ計画通りであった。

スクリーニング症例の一部で解析をすすめ、LOH症候群と2型糖尿病との関連、脂質代謝との関連、性機能との関連等について、昨年度に引き続き今年度においても、いくつかの研究會、学会等で中間報告として発表した。

D. 考察

本研究では、アンドロゲンの欠乏に伴う諸症候からなる病態として、LOH症候群という新しい概念を採択し、その啓発に努めるとともに、ARTの有効性を検証する大規模なRCTを計画した。また、軽度の糖尿病、高血圧症、高脂血症、あるいは虚血性心疾患を有する内科加療中で、低テストステロン値を呈した症例も積極的にRCTに組み入れ、それらの各疾患に対する標準治療に加えてARTを併用することの臨床効果も検討した。期待される成果としては、EBMに基づいたARTの積極的な推進によって、高齢男性のADLとQOLの著しい向上と健康寿命の延伸、ひいては医療費の削減につながる事が予想された。究極的には、本研究が高齢者に特有の医学的諸問題の解決に対するブレークスルーの一つとなり、現行の介護中心の医療からWHOが提唱する“healthy and active aging for men”への転換を促進させる新たな長寿医療が萌芽すると考えられた。また、副研究として“LOH症候群に対するバイオ診断チップの開発”と、“ARTの治療効果に関与しうる遺伝子の同定とその遺伝子多型の解析”を加えたことによって、それぞれよりLOH症候群の早期発見・早期治療・予防を目指したスクリーニングシステムの確立とテーラーメイド医療の構築の可能性がもたらされたと共に、本研究が単なるRCTを主体とした臨床研究に止まることなく、示唆に富んだ奥行きのある多角的な研究に発展し得たと考えられた。

E. 結論

本研究の特筆すべきことは、国外に先駆けて施行する、LOH症候群に対するARTの有効性を検証する多施設共同の大規模 RCT の計画であった。さらに副研究として展開される、“LOH症候群に対する非侵襲的な診断法の確立としてのバイオチップを用いた診断法の開発”と“LOH症候群に関する遺伝子多型の解析とARTの治療感受性遺伝子の同定”によって、個人の発病リスクや予後推察、ARTの治療効果や副作用予測、新しい診断法、治療法や予防法の開発へと発展させる潜在性を有する点に本研究の独創性が十分に発揮された。今年度で本研究は形式的には終了となるが、今後は自主研究として継続的に本研究を進め、さらなるエビデンスの確立を目指す次第である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

並木幹夫, 高榮哲, 小中弘之, 杉本和宏, 重原一慶
加齢男性性腺機能低下症候群 (LOH症候群) 診療の手引
泌尿器外科 23(1): 51-54, 2010

並木幹夫, 高榮哲, 小中弘之, 杉本和宏
ホルモン補充療法の実際
治療 91(9): 2206-2211, 2009

Iwamoto T, Yanase T, Horie H, Namiki M, Okuyama A.

Late-onset hypogonadism (LOH) and androgens: validity of the measurement of free testosterone levels in the diagnostic criteria in Japan.

Int J Urol. 16(2): 168-74, 2009

Kobori Y, Koh E, Sugimoto K, Izumi K, Narimoto K, Maeda Y, Konaka H, Mizokami A,
Matsushita T, Iwamoto T, Namiki M.

The relationship of serum and salivary cortisol levels to male sexual dysfunction as measured
by the International Index of Erectile Function.

Int J Impot Res. 21(4): 207-12, 2009

2. 学会発表

加齢男性性腺機能低下 (LOH) 症候群におけるアンドロゲン補充療法 (ART) の有用性に関する臨床試験-第一報-

小中弘之, 杉本和宏, 高 栄哲, 並木幹夫, 金沢大学大学院医学系研究科集学的治療学

今本 敬, 市川智彦, 千葉大学大学院医学研究院泌尿器科学

辻村 晃, 奥山明彦, 大阪大学大学院医学系研究科泌尿器科学

邵 仁哲, 三木恒治, 京都府立医科大学大学院医学研究科泌尿器外科学

岩本晃明, 国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター

松下知彦, 大船中央病院泌尿器科

第 9 回日本メンズヘルス医学会 (大阪) 2009 年 10 月 17 日

LOH 症候群における高分子量アディポネクチン測定の意義

金沢大学大学院医学系研究科集学的治療学 (泌尿器科)

小中弘之, 重原一慶, 杉本和宏, 高 栄哲, 並木幹夫

第 98 日本泌尿器科学会総会 (盛岡) 2010.4.30

今後の発表予定

LOH 症候群において free-T は総アディポネクチン・高分子量アディポネクチンに影響を与えているか?

石川県立中央病院 泌尿器科: 杉本和宏, 中嶋一史, 中嶋孝夫, 島村正喜

金沢大学大学院 医学系研究科 医薬保険学域医学類・集学的治療学 (泌尿器科): 飯島将

司, 重原一慶, 小中弘之, 高栄哲, 並木幹夫

同 恒常性制御学 (第一内科): 篁 俊成, 安藤 仁

同 臓器機能制御学 (第二内科): 武田仁勇, 米田 隆, 八木邦公

金沢社会保険病院 泌尿器科:高島三洋

国際医療福祉大学病院 泌尿器科:岩本晃明

2010年 日本アンドロロジー学会(東京)2010年7月

EDとアディポネクチンとの相関関係について;LOH(late-onset hypogonadism)症候群を対象とした研究

石川県立中央病院 泌尿器科:杉本和宏, 中嶋一史, 中嶋孝夫, 島村正喜

金沢大学大学院 医学系研究科 医薬保険学域医学類・集学的治療学(泌尿器科):飯島将司, 重原一慶, 小中弘之, 高栄哲, 並木幹夫

同 恒常性制御学(第一内科):篁 俊成, 安藤 仁

同 臓器機能制御学(第二内科):武田仁勇, 米田 隆, 八木邦公

金沢社会保険病院 泌尿器科:高島三洋

国際医療福祉大学病院 泌尿器科:岩本晃明

2010性機能中部性機能学会(名古屋)2010年7月

Androgen Replacement Therapy Contributes to Improving Urinary Function in Patients with Hypogonadism and Benign Prostate Hypertrophy; A Randomized, Controlled Study.

Atsushi Mizokami, Kazuyoshi Shigehara, Kazuhiro Sugimoto, Yuji Maeda,

Hiroyuki Konaka, Eitetsu Koh and Mikio Namiki

5th Japan-Asean Conference on Men's Health & Aging July 9-11, Kota Kinabalu, Borneo, Malaysia

Effects of Androgen Replacement Therapy on Erectile Function in Hypogonadal Patients with erectile dysfunction: Assessment of predictors for the Improving of Sexual Function

Kazuyoshi Shigehara, Eitetsu Koh, Kazuhiro Sugimoto, Yuji Maeda, Hiroyuki Konaka,

Eitetsu Koh and Mikio Namiki

14th World Meeting of the International Society for Sexual Medicine (ISSM)

September 26-30, Seoul, Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得 該当なし

2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

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

ナノテクノロジーを利用した、LOH 症候群の早期発見、早期治療を目指した唾液でわかるバイオ診断チップの開発に関する研究

分担研究者 民谷 栄一 大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻 教授

概要

本分担研究は、LOH 症候群の早期発見を目指して、LOH 症候群のマーカーと考えられる遊離型テストステロン濃度及び心身ストレスと関連しているとされるコルチゾール及び老化度との関連が指摘されているデヒドロエピアンドロステロンサルフェートについて、簡便に測定できるバイオ診断チップの開発を目的に実施した。本年度は昨年度に引き続き、コルチゾールを測定対象に酵素や蛍光分子などを標識剤を用いずに簡便に行える方法について検討した。コルチゾールの分子量から局在プラズモンチップにコルチゾールの抗体を固定する方法よりも、コルチゾールをチップ上に固定し、抗体を添加する方法を採用したところ、感度上昇を確認できた。さらにラベルフリーの2次抗体を使った場合にも、同様に感度上昇の傾向を確認できた。

A. 研究目的

加齢男性性腺機能低下症候群(LOH 症候群)と呼ばれる高齢男性の性ホルモン低下に起因するとされている症例に関して、男性における更年期障害の症例として注目を集めている。LOH症候群の治療は高齢男性の生活の質的向上改善(QOL 改善)や日常生活活動(ADL)の高レベルでの維持可能に繋がり、男性の健康寿命延伸はもちろんのこと、早晚迎えることになる長寿社会において、健康保険医療費の削減に効果的であると考えられる。LOH 症候群の早期発見、早期治療は症例に対する情報獲得、LOH 症候群の重篤化の軽減、治療期間の短縮化が見込まれ、非常に重要となっている。本研究分担ではLOH 症候群の検査の簡便・迅速化や自宅などでのセルフチェックを指向したバイオ診断チップとして診断マーカーであるコルチゾールを検出するセンシングシステム開発を目的とし、研究を行った。

B. 研究方法

コルチゾールの検出に関しては、プラズモン効果を利用した分子間相互作用の解析を採用した。一般的なプラズモン効果を利用した検出方法としては、表面プラズモン共鳴(SPR)を用いたバイオセンサが知られている。この測定方法の長所として抗原抗体反応を酵素・蛍光物質などの標識の必要のないラベルフリー計測が可能である。しかし、SPRを発生させるためにはプリズム及びそれらの光学系を必要とするため、高価で大型なシステムにならざるを得ない。これに対し局在表面プラズモン共鳴(LSPR)を用いた計測は、ファイバープローブと小型分光器などを用いた比較的低価格な光学系で構成が可

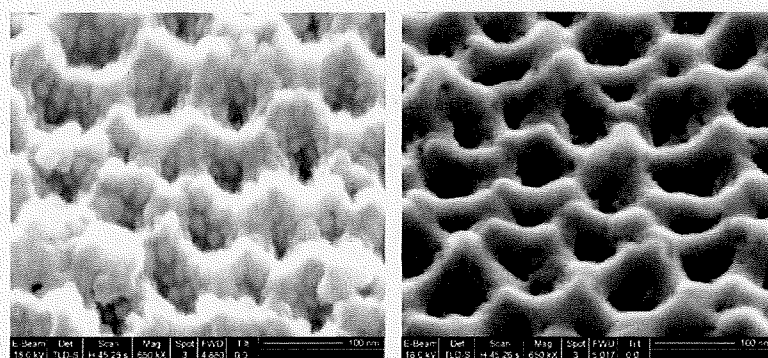
能である。そのため、セルフチェックや簡易的なバイオ診断チップを使ったシステム構築といった目標に対して、ナノバイオセンサチップと光学測定系とのシステム構築と多項目かつ高感度な測定ができるラベルフリーバイオセンシングシステムという目的により現実的なアプローチが可能な方法と考えている。

これまでにポーラスアルミナに金(Au)を蒸着させ、その干渉性と局在表面プラズモン共鳴(LSPR)の性質を有するナノ光学チップを作製し、その光学特性を調べた。さらに、このチップを用いてラベルフリーバイオセンシングへのコルチゾール測定への応用を検討した。この結果を踏まえ、これまでに使用したアルミナポーラスチップと検出方法の改良を行うことで、検出限界の向上を目的にして、引き続きコルチゾールの検出を試みた。

C. 研究結果

ナノ光学チップの測定表面を均一化することで測定再現性の向上や抗体・抗原の固定量などの安定化を検討した。

アルミアポーラスの作製手順は、①アルミニウム基板の陽極酸化処理、②作製した酸化アルミナをエッチングによって一旦除去、③再度陽極酸化処理、の3段階で行った。これによりナノ微細孔構造を有するアルミナポーラス構造が形成される。このアルミナポーラス表面にAu薄層を堆積させ、ナノ光学チップとした。ここで、従来は熱抵抗型真空蒸着法を用いて金属を堆積させていたが、表面の平滑性向上が期待できるスパッタ法を新たに検討した。その結果、図1に示すように、蒸着法では粒子状の表面が観察されていたのに対し、スパッタ法により形成された基板表面において、より平滑な金表面を形成していることが観察された。



(蒸着法)

(スパッタ法)

図1. 改良前後のナノ光学チップのSEM画像

作製したチップ上に抗体あるいは抗原を化学的に固定化させるにあたり、カルボキシル基などの官能基を有するチオール化合物を用いて自己組織化単分子膜(SAM膜)を形

成させる必要がある。従来は、4, 4'-Dithiodibutyric acid (DDA)を用いてSAM膜層を形成させてきた。しかし、DDAではナノ光学チップ上に固定される抗体量が十分でないと考えられたため、より高密度且つ安定なSAM膜形成のために試薬検討を行った。その結果、アルキル鎖の長い15-carboxy-1-pentadecanethiolを用いることで安定なSAM膜層を形成させることができた。

また、測定方法として、従来はナノ光学チップ上に抗体を固定し、さらに抗原を結合させ、その反応に伴う吸収波長変化を測定していた。しかしながら、コルチゾールは比較的low分子であることから、コルチゾールの捕捉に伴う吸収波長変化を安定的に計測することが容易でなかった。そこで、コルチゾールをナノ工学チップ上に固定し、これに抗コルチゾール抗体を反応させる方法での計測を検討した。

ナノ光学チップ表面にBSAコンジュゲートされたコルチゾールを固定化後、光学測定を行った。その結果、10 ng/mLのコルチゾールに対する吸収波長変化を検出することができ(図2)、従来の抗体固定されたナノ光学チップに抗原を添加する測定方法よりも良い結果が得られた。また、さらなる検出感度を上げるために、2次抗体を反応させたところ、図3に示すとおり、より大きな波長変化を計測することができた。加えて、2次抗体の反応時間も10分程度で十分であったため、2次抗体を用いた増感法も有用と考えられた。以上の結果により、今後は競合法やサンドイッチ法などへの応用展開も可能と考えられる。

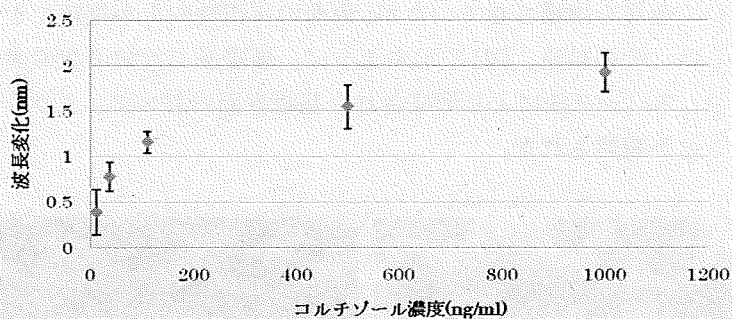


図2. コルチゾール測定

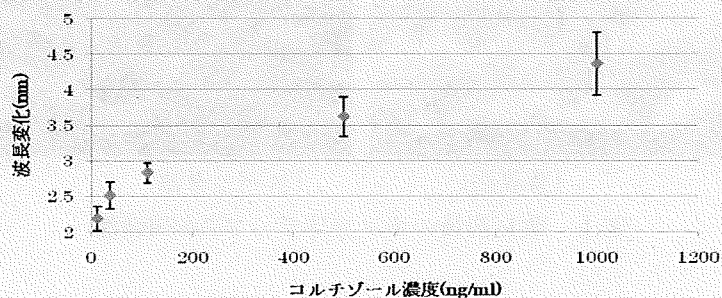


図3. ラベルフリーの2次抗体を使用したコルチゾール測定

研究業績：

著書

1. 局在表面プラズモンチップを用いたバイオセンサ、吉川裕之、斎藤真人、近藤兼司、民谷栄一、OPTRONICS, 341(5), 90-94, 2010

招待講演

(海外)

1. Eiichi Tamiya, "Localized Surface Plasmon Resonance-based Label-free High-throughput Biochip for Multiple Analysis of Biomolecular Interactions" PITTCON2010 (Orland, Florida, U.S.A) 2010/3/3-7
2. Eiichi Tamiya "Nanotechnology based biosensors and biochips" WACBE, World Congress on Bioengineering 2009, The Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, 2009/7/26-29
3. Eiichi Tamiya "Nanotechnology and Biosensor" KAIST Seminar, KAIST, Daejeon, Korea 2009/8/28

(国内)

1. 民谷、「ナノ構造制御デバイスとバイオセンサ」第75回化学センサ研究会、新コスモス電機(株)、大阪、2010/1/21
2. 民谷、「バイオセンサー開発の現状と展望」第4回産研テクノサロン「バイオセンシングの最前線」(大阪大学中之島センター) 2010/1/29
3. 民谷、「ナノバイオテクノロジーの応用展開」第45回化学工学コロキウム(岡山理科大学25号館、岡山市) 2009/12/10

国内学会

1. ナノ光学チップを用いたラベルフリーバイオセンシング、谷山峻一、金道均、Ha Minh Hiep、斎藤真人、民谷栄一、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム、東京工業大学、2008年9月18日-20日
2. ナノ光学チップを用いたラベルフリーバイオセンシング、谷山峻一、金道均、Ha Minh Hiep、斎藤真人、民谷栄一、第56回応用物理学関連連合後援会、筑波大学、2009年3月30日-4月2日
3. ナノ光学チップを用いたラベルフリーバイオセンシング、谷山峻一、金道均、Ha Minh Hiep、斎藤真人、民谷栄一、第24回生体関連化学シンポジウム、九州大学、2009年9月13日-15日

特許

なし

厚生労働科学研究費補助金(長寿研究事業)

分担 研究報告書

LOH症候群における遺伝子多型とARTの治療感受性遺伝子同定に関する研究

分担研究者 小中弘之 金沢大学大学院医学系研究科集学的治療学 講師

【研究要旨】

近年の劇的な遺伝子工学の進歩と相俟って、遺伝子多型の解析はテーラーメイド医療の確立に必須となりつつある。LOH症候群における遺伝子多型(特に一塩基多型)の解析は、個々における疾病罹患リスクの推定につながり、ARTにおける治療感受性遺伝子の同定・解析は、ARTの治療効果や副作用の予測に応用可能である。本研究は、倫理委員会の通過が律速段階となって開始時期が遅延したという事情があつて、現在もサンプルを採取中で研究自体は完結していないが、今回は本研究の最終年度ということで、集積したサンプル数、候補遺伝子と解析に必要なプライマーの作製等につき、現在の進捗状況を中間報告する。今後も引き続き症例を蓄積し、LOH症候群とARTに関する新たな一塩基多型(SNP)の知見を継続的に検証していく必要があると考えられた。

【研究目的】

平均寿命の延長に伴う急激な高齢化という社会的背景のもと、高齢者の健康増進や予防医学への積極的な取り組みが国策の一つとなり、健康寿命の延伸を目指した長寿科学研究が待望される時代となった。近年、アンチエイジング医学の登場とともに、その治療法として、サプリメント摂取、抗酸化療法、ホルモン補充療法の必要性が過度にクローズアップされている。特にホルモン補充療法については、更年期女性に対してはエストロゲン補充療法が広く普及してきた一方で、中高年男性に対するそれは未だ発展

途上にある。中高年男性のアンドロゲン低下は、本邦ではこれまでも“加齢に伴う一現象”とみなされる程度で、医療の対象として軽視されていた経緯があつたが、アンドロゲンは男性における重要な生理的機能を有するため、その低下はED、認知症、筋力低下、骨粗鬆症、貧血、内臓脂肪増加(あるいはメタボリックシンドロームへの進展)等の各種合併症を引き起こし、高齢男性のADL、QOLに多大な影響を及ぼす。そこで、LOH症候群に伴うこれらの症候の改善を目指した、アンドロゲンの補充による骨、筋肉、血管、脂質代謝等に対する臨床効果に関する強力なエビデンスを創出する必要がある。その際、

あらかじめLOH症候群に対するARTの有用性を予測, 予見できれば, テーラーメイド医療の構築によって, 医療費削減につながる事が期待される. 以上のように, 治療の有効性に関する遺伝的背景の解析として, 治療感受性と副作用を規定する遺伝子多型, 特に一塩基多型 single nucleotide polymorphism (SNP)の同定を試み, 個人化治療への進展を促進させることを本研究の目的とした.

【研究方法】

LOH症候群と診断されARTが施行された対象症例より, 血液7 ml採取し, 血清を使用してDNAを抽出する. ゲノムDNA増幅キットを用いて抽出したDNAを増幅し, 後々の追加解析のためにストックサンプルを作成しておく. ARTにおける治療感受性遺伝子に照準を絞って, 主として一塩基多型SNPを検索し, ART有効群を予測する. ターゲット遺伝子の同定に際し, 以下の2つのアプローチを用いた.

1) 候補遺伝子アプローチ: 先駆的な知識をベースに遺伝子を狙い打ちする方法で, 遺伝子の選択方法は多種多様にわたる. 今回我々はARTの有効例に絞って遺伝子多型を検索するため, テストステロン代謝に関わることが予想される以下の遺伝子を解析する. すなわち, チトクローム p450酵素系である CYP17やCYP3A4, 細胞増殖因子とその受容体である insulin-like growth factor-1

(IGF-1)とIGF binding protein-3 (IGFBP-3), 前立腺組織内でテストステロンを dihydrotestosterone (DHT)に変換する酵素である steroid 5 α -reductase type II enzyme (SRD5A2), における遺伝子多型を候補とした. さらに, アンドロゲン受容体 (AR)におけるCAG repeat数が前立腺癌の発ガンリスクや予後因子に関連すると報告されているため, SNP以外に同反復多型も解析対象とする. さらに, 今年度はサイトカインのカテゴリーから, IL-6とTNF- α を解析対象に追加した.

2) ゲノムワイドアプローチ: SNPをゲノム全域に渡って絨毯爆撃的に解析する方法で, 症例対照群においてゲノム上のSNPをマーカーと考えて網羅的に調べていき, その近傍にあるSNPがマーカーとして検出されることによって疾患との関連性を見出す. さらに, DNAチップなどの遺伝子研究の革新的技術とコンピューターの情報処理能力を駆使して, 網羅的なSNPの解析を展開する予定である. なお, 標的遺伝子の既知SNPの検出には, 制限酵素断片長多型性 (RELP)法, アレル特異的プライマーPCR (ASP-PCR)法やダイレクトシーケンス法が用いられるが, 今回我々はTetra-primer amplification refractory mutation system (ARMS)-PCR法を用いた.

(倫理面への配慮)

LOH症候群に対する診断の必要性和ARTの有効性に対するランダム化試験に対するインフォームドコンセントを十分に行い, 対象者からの同意を得ることを前提としてい

る。また本研究終了後、対象者に対するアンケート調査を施行し、研究対象者の視点から倫理的の問題の有無についても吟味し、今後の臨床研究にフィードバックさせていく予定である。さらに、患者及び健常人から提供された検体を用いたバイオ診断チップの開発および遺伝子多型の解析に関する研究においては、各施設におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会で承認を得たうえで、研究に使用する検体は、匿名化のうえ個人情報管理者により厳格に管理され、使用済み試料は産業廃棄物として廃棄する。得られた結果データについても、同様に管理され、倫理的に懸念される「個人及びその家族等の関係者に対する不利益」は全く生じないように配慮される。

【研究結果】

「加齢男性性腺機能低下症候群における遺伝子多型の解析」が、ようやく平成20年6月に金沢大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会より承認された。倫理委員会での承認の遅延が律速段階となっていた経緯があり、進捗状況は当初の予定より遅延している状況であった。今年度は、昨年からの症例エントリーが順調に進み、LOH症候群と診断され、12回のARTが予定通り施行されたのは266例。そのうち、遺伝子多型の解析に同意をいただいて、集積されたDNA抽出サンプルは、現時点で130例に達した。ただし、DNA用採血の時期をART終

了後あるいは開始後半年という設定をしているため、現時点ではまだ本試験の最終採血が完結していない症例が残っている。従って現在のところ、サンプル集積と抽出されたDNAの増幅に追われており、SNP解析の結果を得るまでには至っていない。また、ARTの有効群と非有効群の2群間においても上記の候補遺伝子について遺伝子多型の解析を行う予定であるが、ART群の効果判定の最終決着がまだついていない。しかしながら、SNP解析のための各種試薬、各種キットは既に購入済で、電気泳動ゲル装置、全自動核酸抽出・精製装置を準備すると共に、Tetra-primer ARMS-PCRに必要なプライマーの一部(下記)は既に作製した。

・ IL-6 (-174 G→C)

Forward inner primer (G allele):

5'-GCACTTTTCCCCCTAGTTGTGTCTTCCG-3'

Reverse inner primer (C allele):

5'-ATTGTGCAATGTGACGTCCTTTAGCTTG-3'

Forward outer primer:

5'-GACTTCAGCTTTACTCTTTGTCAAGACA-3'

Reverse outer primer:

5'-GAATGAGCCTCAGACATCTCCAGTCCTA-3'

・ TNF α (-308 G→A)

Forward inner primer (A allele):

5'-TGGAGGCAATAGGTTTTGAGGGGCAGGA-3'

Reverse inner primer (G allele):

5'-TAGGACCCTGGAGGCTGAACCCCGTACC-3'

Forward outer primer:

5'-ACCCAAACACAGGCCTCAGGACTCAACA-3'

Reverse outer primer:

5'-AGTTGGGGACACGCAAGCATGAAGGATA-3'

【考察】

各個人間におけるゲノムの塩基配列の差異は遺伝子多型といわれ、各個人に生来備わっている個性の多くは、この遺伝子多型によって説明されると考えられている。遺伝子多型は、1) 一塩基多型(SNP)、2) 挿入・欠失多型(insertion/deletion polymorphism)、3) 反復多型(repeat polymorphism)の3種類に大別される。

SNPはある集団内で1%以上の頻度で認められるゲノム上の一塩基多型と定義され、その大多数が2種類の対立遺伝子(アレル)からなり、ゲノム上に平均100~1,000塩基につき1個の割合で均等に存在するため、薬物応答性の個人差を規定する因子として今後の新薬開発に大きな影響を与えるとされ、医療ビジネスの分野においても非常に高い注目を受け、急速に解析が進んでいる。

SNPの生物学的な意義は、ゲノム上における存在部位によって異なり、大まかに4種類に分類される。すなわち、1) プロモーターなどの調節領域にあるもの(regulatory SNP: rSNP)、2) エクソン内の翻訳領域にあるもの(coding SNP: cSNP)、3) イントロンに存在するもの(intronic SNP: iSNP)、4) その他の領域にあるもの(genomic SNP: gSNP)である。さらに、cSNPはアミノ酸置換を引き起こすもの(non-synonymous cSNP)とそれを伴わな

いもの(synonymous cSNP)に分類される。そのほかにも、イントロン内に存在しスプライシングに関与する多型や変異によって本来と異なる部位に終止コドンが形成される多型(missense SNP)などが知られている。また、このような1~数十塩基の多型以外にも、数千~数万塩基以上の大きな欠失や挿入、さらには遺伝子単位での重複(遺伝子のコピーの数的差異)が健常人においても認められることが明らかにされている。

さて、遺伝的な観点からみると、ヒト疾患は、単一遺伝子疾患、多因子疾患、および遺伝子が全く関与しない疾患に大別できる。現在の疾患ゲノム研究における最大のテーマは、多因子疾患であるcommon diseaseに関連する遺伝子を同定し、その機能を探ることにある。多因子疾患の発症には、遺伝要因、環境要因、そしてそれらの相互作用が関与しているが、疾患遺伝子の同定が成因解明に直結し、さらにはテーラーメイド医療とよばれる個人差に応じた医療の実現に向けた基盤となりうることを期待されている。疾患関連SNPの同定研究における初期目標は、強い有意差で関連し、かつ高いオッズ比を有するSNPを見つけ出すことにある。SNPが与える影響は、既述したように遺伝子発現量の変化、スプライシングの違い等が考えられ、実際にイントロンや翻訳領域にあるsynonymous SNPで遺伝子発現変化を伴うものの報告が散見される。

今回我々は、ステロイド合成・代謝に関わるCYP17, CYP3A4, SRD5A2を候補遺伝子とするとともに、細胞増殖因子ならびに受容

体の遺伝子多型であるIGF-1とIGFBP-3も標的とした。特にCYP17はアンドロゲン合成に関わる酵素であるP450c17aをエンコードしている。転写開始部位から34bp上流にT/C多型が存在し、変異アレルであるA2は転写活性を亢進すると推測されている。

また、SRD5A2は前立腺組織内でテストステロンをdihydrotestosterone(DHT)に変換させ、アンドロゲン受容体との結合を可能ならしめる。SRD5A2の3'-UTRにはTA反復多型が、そしてcodon49と89にはSNP(A49TとV89L)が存在し、いずれもSRD5A2の酵素活性に影響を及ぼすことが推測されている。

IGF-1は細胞の増殖や分化そしてアポトーシスに関与している増殖因子の一つであり、前立腺ガンではアンドロゲン非存在下での癌細胞の増殖を促す。プロモーター領域にはCA反復多型が存在しIGF-1の発現を調節していることが示唆されている。一方IGFBP-3はIGF-1と結合することによって、IGF-1受容体への結合を阻害することから、IGF-1に対して抑制的に作用していると考えられる。セリンプロテアーゼであるPSAはIGFBP-3を消化するため、PSAレベルが高い環境下ではIGFBP-3濃度は減少し、相対的にIGF-1濃度が増加することが予想される。

ARに関しては、ARのエクソン1に存在するCAGとGGNの反復多型において、長い反復数を持つARはトランス活性能とアンドロゲン結合性が弱いため、前立腺癌の発症に対して抑制効果をもつものと推測されている。しかし、メタアナリシスではいずれの多型においても反復回数の少ないアレルは前立腺ガ

ン発症のリスクを高める傾向が認められるものの、正常コントロールとの差は極めて小さいと報告されている。

従って、LOH症候群におけるSNPを遺伝マーカーとした患者・対照関連解析(アソシエーション・スタディ)は、遺伝要因に対するアプローチ法の1つとなりうると考えられる。また、ARTの治療感受性遺伝子に照準を絞ったSNP検索することによって、ART有効群を予測できる可能性が示唆された。

【結論】

本研究は、SNP解析を中心としたLOH症候群における疾患関連遺伝子の同定とARTに対する治療感受性遺伝子の同定によって、個人の発病リスクや予後推察、ARTの治療効果や副作用予測、新しい診断法、治療法や予防法の開発を目指したものであった。従って、本研究で得られた成果はテーラーメイド医療の確立・実現を加速する大きな推進力となりうる可能性が示唆された。今後、さらなる症例の蓄積によって、LOH症候群とARTに関する新たなSNPの知見を集積していく必要があると考えられた。

【健康危険情報】

該当なし