

2. 身長低下を指標とした骨粗鬆症スクリーニング

研究分担者 田中 清 (京都女子大学・教授)

高齢者施設入所者を対象に、身長低下の有用性を検討し、一定の意義を有することを示したが、骨折の有無も自己申告であり、骨折を確実に判定したものではないという問題点があった。そこで、骨粗鬆症外来受診患者を対象に検討を行った。整形外科骨粗鬆症外来受診の閉経後女性 151 名を対象に、現在身長・若い時の最大身長・膝高・X 線検査による椎体圧迫骨折の判定を行った。椎体圧迫骨折は、41.1%に存在し、重回帰分析の結果、骨折数は身長低下・身長膝高比の有意な予測因子であった。身長低下の骨折予測能に関する ROC 解析の結果、曲線下面積(AUC)は、1 個以上・2 個以上・3 個以上の骨折に対してそれぞれ、0.84 (0.77, 0.90), 0.88 (0.83, 0.94), 0.91 (0.86, 0.96) であった(カッコ内 95%信頼区間)。骨折の存在に関するカットオフ値は 4.0 cm (特異度 79%、感度 79%)であった。現在身長膝高比については ROC 解析の結果、曲線下面積(AUC)は、1 個以上・2 個以上・3 個以上の骨折に対してそれぞれ、0.73 (0.65, 0.82), 0.85 (0.78, 0.93), 0.91 (0.86, 0.96)であった(カッコ内 95%信頼区間)。骨折の存在に関するカットオフ値は 3.3 (特異度 47%、感度 91%)であった。以上、身長低下・現在身長膝高比は、いずれも椎体圧迫骨折に対する優れた予測能を示し、安価なスクリーニング法としての有用性が示唆された。

A. 研究目的

昨年度、介護付き有料老人ホーム入居者を対象に、若年時からの身長低下の椎体圧迫骨折予測能を検討したところ、身長低下は骨折の有無をよく予測でき、身長低下 3 cm 以上では骨折の存在が強く示唆されたが、3 cm 以上の身長低下を示す例の半数が、骨折なしと答えており、椎体圧迫骨折は本人にも自覚されていないものと思われた。

すなわち若年時からの身長低下は、高齢者において、一定の椎体圧迫骨折予測能を持つものと考えられたが、対象が介護付き有料老人ホーム入居者であるため、

骨密度測定・X 線写真による骨折の判定などができておらず、身長低下・骨折の有無のいずれもが自己申告である点が問題点であった。そこでこれらの検査をきちんと行えている整形外科骨粗鬆症外来受診患者でも検討することが必要と考えられた。昨年度報告書でも予備的に結果の一部を示したが、本報告書では、多変量解析を用いた本テーマに関する最終報告を示す。

B. 研究対象

整形外科骨粗鬆症外来受診患者 167 名に対して、身長(立位)・体重・膝高・

脊椎圧迫骨折数（胸腰椎 X 線写真にて判定）・身長低下値（若年時身長の自己申告値を用いて算出）・QOL 調査(SF-8)を調査した。

C. 研究結果

1) あり群となし群の比較

骨折なし・ありの対象者は、それぞれ 89 名(58.9%)・62 名(41.1%)であった。骨折あり群は有意に高齢であり、有意に現在身長が低かった。骨折あり群における身長低下は中央値 7.0 cm(Q1, Q3 4.0, 11.9)であり、骨折なし群(2.0 cm; Q1, Q3 0.8, 3.6)に比して、有意に大きかった。身長膝高比は、骨折あり群では 3.2 ± 0.1 と、骨折なし群に比して(3.4 ± 0.1)、有意に低かった。

2) 身長低下と既存椎体圧迫骨折の関連

重回帰分析の結果、身長低下と既存椎体圧迫骨折数の関係として、身長低下(cm) = $0.17 \times \text{年齢} + 1.30 \times \text{骨折数} - 8.31$ という式が得られた($r^2=0.54$, $p<0.001$)。1 椎体圧迫骨折あたりの身長低下は、1.30 cm (95%信頼区間(CI); 1.04~1.55)であった。

次に ROC 解析により、椎体圧迫骨折に対する身長低下の予測能・カットオフ値を求めた。

1 個以上の骨折に対しては、ROC 解析における曲線下面積は(AUC)は 0.84 (95% CI; 0.77~0.90)、カットオフ値は 4.0 cm であり、この時の感度・特異度はいずれも 79%であった。本研究の対象集団における椎体圧迫骨折の有病率は 41.1%であったが、この場合における陽性的中率

(PPV)、陰性的中率(NPV)はそれぞれ 71% (95% CI; 64~78)、85% (95% CI; 78~90)であり、身長低下 4.0 cm における likelihood ratio は 3.61 (95% CI; 2.54~4.99)であった。

次に身長低下 4.0 cm をカットオフ値とした場合につき、椎体圧迫骨折有病率に関して、広い範囲でシミュレーションを行ったところ、いずれの有病率でも PPV は低かったが、NPV については、有病率が 50%を越える場合を除き 80%以上の高い値を示した。

1 つ以上、2 つ以上、3 つ以上の椎体圧迫骨折に対する、身長低下のカットオフ値はそれぞれ 4.0 cm, 4.4 cm, 6.0 cm であった。

3) 身長膝高比と既存椎体圧迫骨折の関連

重回帰分析の結果、身長膝高比と既存椎体圧迫骨折数の関係として、身長膝高比 = $-0.01 \times \text{年齢} - 0.03 \times \text{骨折数} + 3.74$ という式が得られた($r^2=0.38$, $p<0.001$)。1 椎体圧迫骨折あたりの身長膝高比変化は、 -0.03 (95% CI; $-0.04 \sim -0.02$)であった。

1 個以上の骨折に対しては、ROC 解析における曲線下面積は(AUC)は 0.73 (95% CI; 0.65~0.82)、カットオフ値は 3.3 であり、この時の特異度・感度はそれぞれ 47%、91%であった。

本研究の対象集団における椎体圧迫骨折の有病率 41.1%における陽性的中率(PPV)、陰性的中率(NPV)はそれぞれ 54% (95% CI; 48~57)、88% (95% CI; 75~95)であり、身長膝高比 3.3 における

likelihood ratio は 1.70 (95% CI ; 1.35 ~1.95)であった。

次に椎体圧迫骨折有病率に関して、広い範囲でシミュレーションを行ったところ、いずれの有病率でも PPV は低かったが、NPV は高い値を示した。

1つ以上、2つ以上、3つ以上の椎体圧迫骨折に対する、身長膝高比のカットオフ値は ≤ 3.2 であった。

D. 考察

骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011 (以下ガイドライン) において、骨粗鬆症のスクリーニングにおいて身長測定は有用であると述べられてはいるものの、それを裏付ける論文には乏しかった。

身長低下評価の方法には2種類ある。一つは本研究で用いた、最大身長と現在身長との差を求めるものであり、これは既存椎体骨折を予測するものである。もう一つは経過を追って、反復して身長を測定するものであり、これは新規骨折を反映する。骨折有病者スクリーニングという目的のためには、明らかに前者を用いるのが妥当であるが、ガイドラインでは両者の区別がなされていない。今回の研究で、思い出し法による身長低下の有用性を示すことができた。

しかし思い出し身長による、身長低下の評価には問題点もあり、身長低下の過小申告や、高齢者においては若い頃の最大身長を覚えていない例のあることなどである。そこで膝高が最大身長の代替指標として使えないのか検討した。本研究で示した、現在身長/膝高比による椎体圧迫骨折予測能の検討は、従来報告がない。

昨年度及び今年度の報告をあわせると、若年時の最大身長を聞き取り、身長低下を算出するのが、簡便であるにも関わらず、すぐれた椎体圧迫骨折予測能を持っており、既存椎体圧迫骨折を有する対象者のスクリーニング法としてふさわしいものと考えられた。

骨粗鬆症においては、既存の椎体圧迫骨折を持つ例を見出すことには大きな意義がある。骨粗鬆症性骨折の中で、最も患者数の多い椎体圧迫骨折は、最も重篤な大腿骨近位部骨折を含む、その後の骨折のリスクを何倍にも上昇させる。このため近年、再骨折予防の重要性が国際的に広く認識されつつある。イギリスでは、コメディカルと共同して、このような対象者に対する活動が行われ (fracture liaison service ; FLS)、再骨折の予防に有効であることが示されている。日本でも最近同様の取り組みが始まり、osteoporosis liaison service (OLS) と呼ばれている。したがって本報告書に示した、身長低下によるスクリーニングは、既存椎体骨折を有する例を見出し、その後のより重篤な骨折を予防する目的には非常に相応しいものである。

しかし当然のことではあるが、初回骨折を防ぐためのスクリーニングには適してはいない。次年度 γ -GTPを含む、別の指標の有用性について検討の予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

田中伸哉, 森脇佐和子, 上西一弘, 田中
漑, 池田義孝, 新飯田俊平: 骨粗鬆症患者
のスクリーニングにおける骨折リスク
質問票の検出能. 第 14 回日本骨粗鬆症学
会 2012 年 9 月 28 日, 新潟

Kuwabara A, Tanaka K, Yoh K: Predictive
Value of Historical Height Loss and Current
Height/knee Height Ratio for prevalent
Vertebral Fracture. American Society for
Bone and Mineral Research 2012 Annual
Meeting. October 2012, Minneapolis

Tanaka S, Moriwaki S, Uenishi K, Tanaka K,
Niida S: "Osteoporosis Questionnaire"
constituted of Age and 6 Clinical Risk
Factors of FRAX is Useful as a Screening
Item for Osteoporosis Patients. 3rd
Asia-Pacific Osteoporosis Meeting. 13-16
December, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. γ -GTP 分泌に対するプロテインキナーゼ A 阻害剤の効果について

研究分担者 池田義孝 (佐賀大学医学部・教授)

腎尿細管上皮細胞あるいは肝癌細胞など γ -GTP 高発現している細胞は培地中にも γ -GTP を分泌しているが、この自発的な分泌がフォルスコリンによる刺激下における分泌亢進と同様な機構を介するのかどうかを検討するため、様々な作用様式をもつプロテインキナーゼ A 特異的阻害剤を培養中に添加し、 γ -GTP の分泌に対する効果を検討した。その結果、これらのタンパク質キナーゼ阻害剤による分泌の阻害が観察されなかったことから、フォルスコリン (ひいては PTH) によって誘導される γ -GTP 分泌と非刺激下における自発的な分泌は異なるしくみによるのではないかと考えられた。

キーワード: タンパク質キナーゼ阻害剤、フォルスコリン、尿細管上皮細胞、 γ -GTP、分泌

A. 研究目的

生体における骨代謝の状態と尿中への γ -GTP 分泌との関連性を探ることを目的に、腎臓の近位尿細管上皮由来の細胞をモデルとして、 γ -GTP の培地中への遊離における細胞内 cAMP の関与について検討を行っている。 γ -GTP を発現している細胞は、程度の差があってもほとんどの細胞が培地中へ γ -GTP を分泌している。 γ -GTP を分泌しているにもかかわらず、一部の細胞株で見られるフォルスコリンに対する非応答性が、たとえば何らかのオートクライン的なしくみに基づく cAMP 経路の飽和によるものかどうかを検討した。

B. 研究方法

ヒト腎近位尿細管細胞株 HK-2 細胞およびブタ腎近位尿細管上皮細胞 LLC-PK を用

いて、培地中にプロテインキナーゼ A (A キナーゼ) 阻害剤を添加し、対照群とともに細胞ホモジネートおよび培地中の γ -GTP 活性を測定し、分泌レベルの比較をした。

C. 研究結果

使用した A キナーゼ阻害剤は、H-89, KT5720, 4-cyano-3-methylquinoline, Protein kinase A inhibitor 14-22 であり、 K_i はいずれも 30 nM ~ 60 nM の値をもつ強力な阻害剤である。阻害様式は多様である。また、cAMP の経路が関与するので、アデニル酸シクラーゼ阻害剤である SQ22536 も併せて検討した。使用濃度は A キナーゼ阻害剤が 1 μ M、アデニル酸シクラーゼ阻害剤が 400 μ M である。これらを添加し経時的に細胞および培地を回収し γ -GTP の酵素活性を測定した。

その結果、いずれの細胞株、いずれの阻害剤についても分泌の明らかな抑制効果は観察されなかった。このことから、昨年度までの解析で得られていた、フォルスコリンによって誘導される分泌の亢進とは異なり、 γ -GTP の基礎分泌（誘導によらない非刺激下の自発的は遊離）は cAMP に依存しないしくみによって細胞膜から遊離することが示唆された。

D. 考 察

これまで γ -GTP の分泌を解析するための細胞株モデルとして、多くの腎尿細管由来細胞株を検討してきたが、うまくマウスの PTH 投与を再現する細胞株が得られていなかった。PTH によるシグナル伝達系は cAMP を介することが分かっていたので、その経路を活性化するフォルスコリンへの応答という点から検討した結果、ブタ LLC-PK1 細胞が我々の研究目的に使用できることを明らかにしている。

ただし、LLC-PK1 細胞は PTH 受容体を欠損しているため、PTH を用いた直接的な検討が出来ないことが問題点であった。そこで、ヒトの腎近尿細管上皮細胞由来でウイルス抗原によって不死化されている HK-2 細胞を用いた系を検討していたのだが、この細胞は PTH 受容体を発現しているにも関わらず、PTH およびフォルスコリンの刺激によって γ -GTP の分泌が亢進しなかった。PTH 受容体を発現すると同時に PTHrP という PTH と同様の作用をもつペプチドを発現しているとの報告があり、いわゆるオートクラインによって経路が飽和している可能性が考えられた。この可能性を検証するために本報告のような

検討を行った。

結果的にはオートクライン的な活性化は実証出来なかったものの、無視できないいわゆる basal な分泌は、フォルスコリンで検討していた分泌とは異なり、おそらく cAMP の経路を介していない現象であることがわかった。以前、活性型ビタミン D3 によって、細胞内の γ -GTP 発現量が増加し、それにもなって分泌も亢進することを明らかにしているが、このビタミン D3 による亢進は、フォルスコリンによる分泌増加とは明らかに異なっており、おそらく非刺激化の basal な分泌な機構と同様であると考えている。一方、フォルスコリンの場合は、細胞における γ -GTP 発現量が全く増加することなく、分泌の亢進が観察されるので、分泌の効率そのものが増加していると考えられ、基礎分泌やビタミン D3 刺激による分泌亢進とは別の機構があらたに活性化されることによって、基礎分泌量に上乗せされるのではないかと解釈している。

E. 結 論

今後これらの研究結果を総合して、複数ある分泌機構、いわゆるデフォルトの分泌機構と cAMP 依存性に誘導される機構の両者がどのようなものであって、どのように違うのかを明らかにする必要がある。これによって、骨代謝の変動・変化にともなうにおける尿中への γ -GTP 分泌だけでなく、肝障害やその他の疾患と関連した血清や他の体液における γ -GTP レベルの増加の生化学的基盤を解明できればと考えている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito R, Takahashi M, Ihara H, Tsukamoto H, Fujii J, Ikeda Y: Measurement of peroxiredoxin-4 in rat tissues and implication of its serum level as a potential marker for hepatic disease. Mol Med Report. 6: 379-384, 2012.

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ihara H, Ikeda Y, Kimoto M: Multiple potential regulatory sites of TLR4 activation induced by LPS as revealed by novel inhibitory human TLR4 mAbs. Int Immunol. 24: 495-506, 2012.

2. 学会発表

田中伸哉, 森脇佐和子, 上西一弘, 田中清, 池田義孝, 新飯田俊平: 骨粗鬆症患者のスクリーニングにおける骨折リスク質問票の検出能. 第14回日本骨粗鬆症学会 2012年9月28日, 新潟

井原秀之, 花島慎弥, 塚本宏樹, 山口芳樹, 谷口直之, 池田義孝: ヒト及び根瘤菌 α 1,6-fucosyltransferaseを用いたジフコシル化キトオリゴ糖の合成. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月14-16日, 福岡.

Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ohta S, Nagai Y, Ihara H, Miyake K, Ikeda Y, Kimoto M: Reduced surface expression of TLR4 by a V254I point mutation may account for the low LPS responder phenotype of BALB/c B cells. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月14-16日, 福岡.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

3. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Ito R, Takahashi M, Ihara H, Tsukamoto H, Fujii J, Ikeda Y	Measurement of peroxiredoxin-4 in rat tissues and implication of its serum level as a potential marker for hepatic disease.	Mol Med Report.	6	379-384	2012
田中伸哉	がんの医療費痛みの強弱と痛みの発生状況をもとにした疼痛評価とQOLおよび心理状態との関連に関する研究.	Osteoporosis Japan	20(1)	62-65	2012
Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ihara H, Ikeda Y, Kimoto M	Multiple potential regulatory sites of TLR4 activation induced by LPS as revealed by novel inhibitory human TLR4 mAbs.	Int Immunol.	24	495-506	2012
新飯田俊平	加齢性疾患へのmicroRNA標的薬の可能性.	日本臨床	70(増刊号8)	383-887	2012
新飯田俊平	尿マーカーによる骨粗鬆症検診の課題と展望.	公衆衛生	76(11)	866-870	2012
田中伸哉、田中清、宮島剛、織田弘美	骨折および身長低下と生命予後の関連.	治療	94(12)	2046-2051	2012
Izuka H, Takahashi K, Tanaka S, Kawamura K, Okano Y, Oda H	Predictive factors of cervical spondylotic myelopathy in patients with lumbar spinal stenosis.	Arch Orthop Trauma Surg.	Published online		2012

4. 別刷り

尿マーカーによる骨粗鬆症検診の課題と展望

新飯田 俊平

はじめに

「この10年、毎年検診を受けて問題ないと言われてきましたが、尿マーカーの検査で要精査となり、病院で骨粗鬆症を見つけてもらい、治療を開始することになりました」。

尿マーカーによる骨粗鬆症のスクリーニング調査を実施してから、しばしばこういう手紙や電話がくる。通常骨粗鬆症の行政検診では、前腕の骨か踵の骨密度を測定する。その感度は非常によいということになっている¹⁾。この場合の感度とは、骨粗鬆症の診断基準となる腰椎または大腿骨の骨密度を反映するという意味である。ところが今回の調査から、骨密度測定はかなりの有病者を見逃していることがわかった。だから冒頭のような手紙や電話がくる。感度のよい検査法は見逃し

が少ないということになっている。骨密度測定法の感度がよいというのがそもそも間違いなのか、使用した測定機器に問題があったのか、それはわからない。

骨代謝マーカーはスクリーニングには不向きである²⁾。そういう意見がある。通常骨代謝マーカーは治療のモニターなど、臨床上的の使用が主で³⁾、行政検診ではほとんど利用されていない。ところが、実際に検診で使ってみたら、骨密度測定のときより二次検診後の有病者スクリーニング数が多かった。この傾向は3年の調査期間を通して変わらなかった。一次スクリーニングが有病者を見逃しては検診の意味がない。それなら尿マーカーを検診で使ってみてもいいのではないか。個人的にはそう思っている。尿マーカーの検診への適応性の議論は専門家に任せるとして、本稿では、今回の調査で見えてきた課題について考えてみた。

増える骨折件数

骨粗鬆症が勝因となった大腿骨近位部骨折件数は、調査を開始して以来増加し続けている⁴⁾(図1)。大腿骨近位部骨折が深刻なのは、寝たきりになることが多いからだ。高齢者が増えているのだから仕方がない。今の時代それで話が済む状況ではない。そのことは、関係者ならよく知っている。骨折～寝たきりとなると、患者本人はもとよ

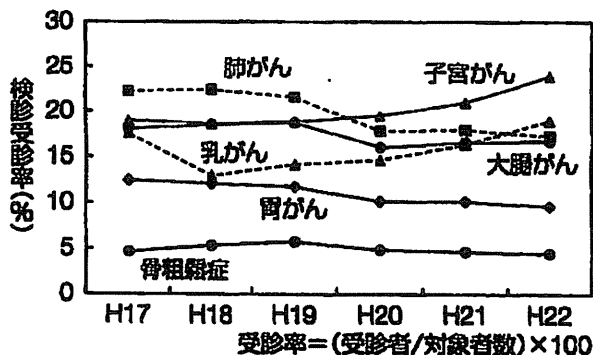


図1 各種がん検診と骨粗鬆症検診の受診率の比較
「地域保健・健康増進事業報告」を基に改変

にいだ しゅんべい：(独)国立長寿医療研究センター遺伝子蛋白質解析室
連絡先：☎ 474-8511 愛知県大府市森岡町源吾 35

り、家族にとっても精神的、経済的負担が大きい。骨粗鬆症関連骨折に掛かる医療費も積み重ねられて財政を圧迫している。介護費用も含めると9,000億円を超えるという試算もある⁹⁾。検診は予防の最前線である。骨粗鬆症検診を受けて病気が発見された場合、かなりの確率で骨折予防効果が期待できる。疫学調査ではそういう結論を出している。

たとえば、欧米の調査では、ビスフォスフォネート系の骨吸収抑制剤による骨折予防は費用対効果に優れているという¹⁷⁾。カナダ¹⁸⁾、フィンランド¹⁹⁾、アメリカ¹⁰⁾からは、大腿骨・橈骨の骨折発症率が減少したという報告が相次いだ。その背景には骨吸収抑制剤の認可とともに、骨検診の普及があると推察している。保険制度の違いや、大腿骨近位部骨折より椎体骨折の方が多い日本人の特性に、欧米の結果が当てはまるかどうかは別として、検診後の早期医療介入ができれば、日本でも骨折リスクの軽減は十分期待出来るはずである。骨代謝研究も治療も日本は先進国である。それでも骨折が減らないのは、介入率が20%程度と言われるところに問題がありそうだ。

低い骨粗鬆症検診受検率

医療介入率を上げるには骨検診の受検率を上げる必要がある。本邦では平成7(1995)年から、自治体による骨折予防を目的とした骨粗鬆症検診(骨検診)が実施されている。当初は40歳と50歳の女性を対象とした節目検診であったが、平成17(2005)年からは40歳から70歳までを5歳刻みで検診している。平成17年以降の検診受検者数の推移を見てみると、毎年30万人前後が受検している¹¹⁾。この数字は受検対象者数のわずか5%程度である(図2)⁹⁾。実際には、人間ドックで骨密度を測定する人もいるので、数字はもう少し大きくなるだろうが、がん検診と比べるとかなり低い数字であることがわかる(図2)。そのがん検診の受検率(男性で約30%、女性で約20%)は、実はOECDの加盟国中、最低ランクに位置する¹²⁾。欧米先進国は軒並み70%を超えている。こうし

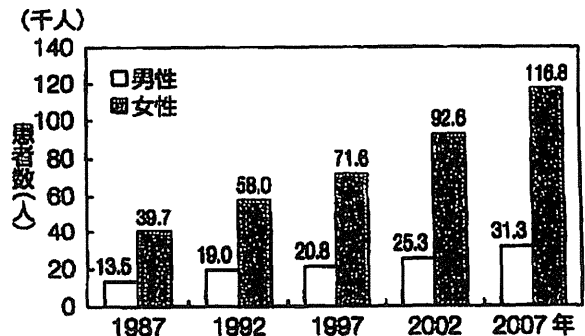


図2 大腿骨近位部骨折の頻度調査成績
(文献⁹⁾から作成)

た状況を鑑み、厚生労働省は、平成21(2009)年7月に「がん検診受診率50%」を目標とした強化対策に乗り出した。

昭和62(1987)年から大腿骨の骨折調査を行ってきた調査班は、平成17年の検診対象者拡大以降も、長年検診の重要性を訴えてこられた。しかしその声は行政には聞こえないらしい。グラフを見れば誰でもそう思う。調査の度に増加するグラフを見て憂慮しているだけでは事は改善しない。がん検診では受検率向上作戦が始まった。がん検診よりもはるかに低い受検率の骨粗鬆症検診の対策が進まない理由は、よくわからない。

検診に行かない理由

なぜ検診に行かないのか。研究班では全国の自治体と近隣住民にアンケートを依頼した。回答を寄せた自治体数は453、住民は255人(男性32、女性223)。

調査によると、「定期的に骨検診を受けている」と回答した住民は17%。全国平均より3倍も成績がよい(モデル検診を実施したH町は毎年20歳以上を対象に骨検診を実施している)。検診を受けない人に対し、「なぜ受けないのか」と質問してみた。「緊急性を感じない(35%)」、「必要性を感じない(15%)」の2つの回答で50%を占めた。それ以外では「時間がない(20%)」、「お金がかかる(15%)」が上位にきた。

がん検診に対する意識調査の結果¹³⁾と比較してみた。この調査の対象は20~40代の会社員・男

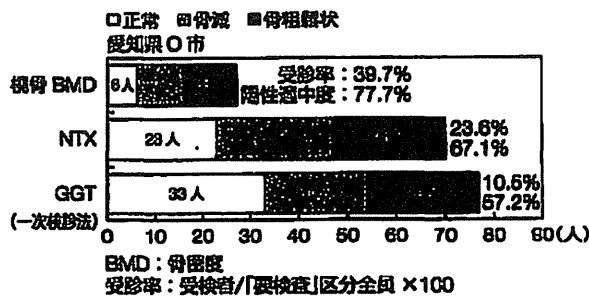


図3 平成21年度愛知県O市で実施した尿マーカーによるモデル骨検診後の二次検診成績
 従来の骨密度測定法より多くの有病者がスクリーニングされた。

女400人。彼らの94%は「がん検診は必要」と答えている。ところが58%の人は「受けたことがない」と回答している。理由を訊ねると(複数回答)、「お金がかかる(44.9%)」、「今のところ異常がない(43.8%)」、「検診のタイミングがわからない(43.1%)」がほぼ同じ割合で並び、「時間がない(35%)」が続いた。骨検診のときと似たようなものである。違うのは、検診の必要性の認識があるかないかだけである。必要性を認識していても検診率が低いことから、骨検診の受検率がよいわけがない。ちなみに10%の人は、がん検診を「受けたとは思わない」と答えていた。

自治体にも受検率が低い理由を訊ねてみた。「財政面の問題」とする回答がもっとも多く、次いで検診の「年齢制限」、「機会の少なさ」が上位にきた。運用面の問題も浮き彫りにされた。中には「骨検診は意味がない」と回答した自治体担当者もいた。住民・自治体双方の骨検診への関心の低さに課題がありそうだ。

尿マーカーは本当に検診に使えないのか？

自治体担当者の多くは、骨検診の受検率が低いのは「財政面の問題」だと言う。自治体の限られた保健衛生関連予算では、骨検診の優先順位は低いらしい。そういう事情のせい、受検者から費用の一部を徴収している自治体が多い(この点のがん検診も同じだが)。われわれの調査に協力し

てくれた自治体の担当者は、より多くの住民に受診してもらうには無料が理想という。それなら骨密度測定より少しでも安い尿マーカー検診の導入を考えたどうか。尿マーカーは、骨代謝の瞬間を捉えるもので、骨粗鬆症の診断基準である骨量を反映するものではない。もっともである。しかし、骨吸収の亢進状態にあることを知らせ、医療機関に行くきっかけを与えることくらいは出来るはずである。

今回モデル骨検診に用いたマーカーは2種類。既存のN-telopeptide of type I collagen (NTX)と、新規のマーカー候補タンパクγ-glutamyl transpeptidase (GGT)である。前者はすでに臨床応用されているが、後者は数年前に論文として発表されたもので¹⁴⁾、特に認知されたものではない。この2つのマーカーの検診性能を骨密度測定の場合と比較した。

2つ市町の協力を得て、3年間で延べ5,600人を調査した。初年度は尿マーカーが本当に使い物にならないのか調べてみた。このうちO市(被験者数761人)の検診結果を見てみると(図3)、骨密度測定では二次検診で21人が有病者と診断されたが、NTX検査では47人の有病者発見につながった。理由の1つに、尿マーカーの場合、「要精査」に区分される被験者が多いことがあり、必然的に二次検診受検者も増えることになる。この評価において興味深いのは一ある程度予想されていたことだが—骨密度低値とNTX高値が重なるケースはかなり少ないことである。つまり、骨密度測定ではNTX検査で見つかった有病者のかなりの人数を見逃していたことになる。同じことはNTX検査にも言える。おそらく、両方の検査で見逃されている人もいるだろう。ただ、見逃しの数はNTX検査の方が骨密度測定より少ないということである。費用面では、NTXによる検診コストは骨密度測定の6割なのに、有病者検出は2倍に増加した。すなわち、有病者の発見を効果とする費用対効果は、骨密度測定の3倍以上になる。スクリーニング効率とコストを考えたら、尿マーカー検診の方に軍配が上がった。

尿 GGT による骨検診

骨吸収が亢進すると尿中の GGT 値が高くなる。なぜそうなるのかはまだわからない。血清中の GGT は肝臓からの逸脱酵素であることから、肝疾患のバイオマーカーの一つとなっている。だから多くの人、GGT は肝臓特異的酵素と思っている。体内でもっとも多く GGT が発現しているのは腎臓の尿細管である。その量は肝臓の 1,000 倍にもなるらしい。培養尿細管上皮細胞を骨代謝に関わるホルモンなどで刺激すると、GGT の発現が上昇して徐々に培地中に遊離してくることが分かってきた。骨代謝に重要なビタミン D₃ は尿細管上皮細胞を標的細胞としており、何か関係があるかもしれない。

この尿 GGT を骨吸収マーカーとして、同じように検診で使ってみた。検査料が骨密度測定の 1/10 程度なので、もし使えそうなら自治体には都合がいい。同じ年の調査結果で見ると、O 市では NTX 検査とほぼ同じスクリーニング成績が得られた(図 3)。調査 2 年目も骨密度測定より成績がよいことが示された(図 4)。その一方で、この検査では擬陽性(false positive)の検出が多い。これは NTX 検査でも同じだが、GGT 検査ではさらに多い。このことは、先人が指摘するように、尿マーカーが骨密度減少を的確に反映していないことを意味する。だから検診に向かないという根拠にもなっている。しかし大腸がん検診では 96% は擬陽性だ。それでも検診の効果が出ているという。一次スクリーニングの陽性適中率にこだわると見逃すケースが増えるのだろう、と思っている。とは言うものの、検診精度をもう少し改善するための適正なカットオフ値や採尿のタイミング、対象年齢の絞り込みなど、いくつか課題は残っている。

おわりに

尿マーカーによる骨検診に異を唱える研究者がいるのは承知である。しかし、現行の骨検診も残念ながら機能しているとは言い難い。骨検診を始

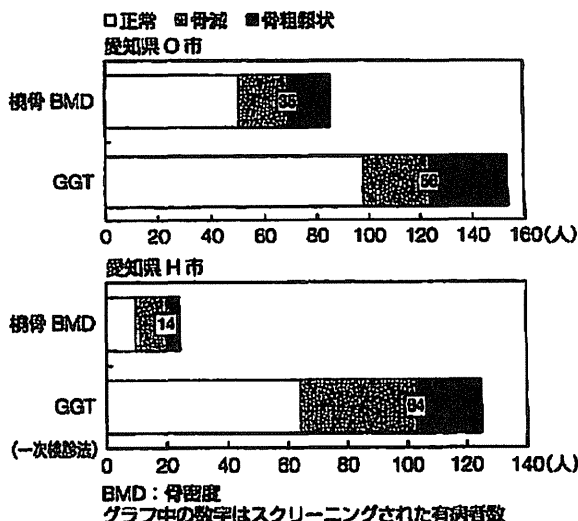


図 4 平成 22 年度愛知県 O 市と H 町で実施した尿マーカーによるモデル骨検診後の二次検診成績
前年度測定法より多くの有病者がスクリーニングされた。

めて以来、骨折者は減るどころか 3 倍に増えている。閉経すると骨吸収は亢進する。だから「閉経女性は全員、病院に行って骨を調べなさい」、それで済むなら骨検診はいらない。

今回調査を行って、多くの被験者は検査に行くきっかけを欲しがっていることがよくわかった。われわれの調査では、アンケートに回答を寄せたほとんどの自治体が、低コスト骨検診に興味を示している。今回の調査結果は、尿マーカーを検診に導入すれば確実にスクリーニング効率が上がると見込まれる。検査法の理屈ばかりを考えていても骨折者は減らない。この先の展望は、検診を指導する側と実施する側の意識次第ということになる。

文 献

- 1) Fujiwara S, et al.: Heel bone ultrasound predicts non-spine fracture in Japanese men and women. *Osteoporos Int* 16: 2107-2112, 2005
- 2) 藤原佐枝子: 骨代謝マーカーによる骨粗鬆症検診の実態と問題点. 実践骨代謝マーカー(編): 福永仁夫, pp 215-218, メディカルレビュー社, 2003
- 3) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会: 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011 年版. ライフサイエンス出版, 2011
- 4) Orimo H, et al.: Hip fracture incidence in Japan:



- estimates of new patients in 2007 and 20-year trends. Arch Osteoporos 4: 71-77, 2009
- 5) 原田敦, 他: 骨粗鬆症の医療経済学—疫学, 費用と介入別費用・効用分析. 日老医誌 42: 596-608, 2005
 - 6) Kanis JA, et al.: Treatment of established osteoporosis; a systematic review and cost-utility analysis. Health Technology Assessment 6: 1-146, 2002
 - 7) Stevenson M, et al.: A systematic review and economic evaluation of alendronate, etidronate, risedronate, raloxifene and teriparatide for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. Health Technol Assess 9: 1-160, 2005
 - 8) Jaglal SB, et al.: Population trends in BMD testing, treatment, and hip and wrist fracture rates; are the hip fracture projections wrong?. J Bone Miner Res 20: 898-905, 2005
 - 9) Kannus P, et al.: Nationwide decline in incidence of hip fracture. J Bone Miner Res 21: 1836-1838, 2006
 - 10) Sehgal A, et al.: A victory in the war on osteoporosis? Declining prevalence of hospitalization for non-traumatic hip fractures in US. Ann Rheum Dis 67 (suppl II): 55, 2008
 - 11) 新飯田俊平: 尿マーカーを用いた骨粗鬆症のスクリーニング. 運動器疾患の予防と治療. 長寿科学振興財団, 2011
 - 12) 厚生労働省: がん検診受検率 50% <http://www.gankenshin50.go.jp/campaign/outline/low.html>
 - 13) がん検診企業アクション事務局: がん検診に関する意識調査. www.gankenshin50.go.jp/pdf/research_100324.pdf
 - 14) Asaba Y, et al.: Urinary γ -glutamyltransferase (GGT) as a potential marker of bone resorption. Bone 39: 1276-1282, 2006



インフルエンザと小中学校の臨時休業


日置 敦巳 岐阜県健康福祉部

2011/2012 シーズン, 岐阜県内ではインフルエンザ A 香港型が流行し, 2 月からは B 型も加わって, インフルエンザによると見られる学級閉鎖等の臨時休業が前シーズン同様に多くなった。ここでは小中学校 576 校(小学校 378 校, 中学校 198 校)からの臨時休業の報告 979 件(小学校 782 件, 中学校 197 件)の状況について紹介する。

最初の臨時休業は 11 月 22 日, ピークは 1 月 24 日, 最終の休業は 5 月 2 日であった。報告のうち 80 件は同一学級での 2 回目の休業で, うち 18 件(1 回目の平均実質休業期間 2.1 日)は休業期間延長, 23 件(同 2.2 日)は授業再開翌日からの再休業, 13 件(同 3.1 日)は授業再開 1 か月以上経過後のものであった。報告の 62% が月曜日, 休業開始の 52% が火曜日に集中した。週明けの児童生徒の罹患状況を踏まえて学校医に相談し, 家庭に連絡をとり, 給食後に授業を打ち切って翌日以降臨時休業とするパターンが多いようである。臨時休業が行われた小中学校の割合を 5 つの 2 次医療圏別に見ると, 小学校では 49~81% (全県 63%), 中学校で 35~45% (同 44%) となっており, 県南部に位置する岐阜地域の小学校で最も割合が高かった。学校別では商業地が多い傾向であった。臨時休業の情報は地域

において, ハイリスク者等に対する予防対策強化への活用が期待される。また学年別では, 小学校 1 年での休業の割合が全小学校の 34% と最も高く, 中学校 3 年では全中学校の 7% と最も低かった。

臨時休業となった学級等における欠席者の割合の平均は, 小学校で 27%, 中学校で 25% であり, 市町村別に見ると 16~44%。患者の割合の平均は小学校 37%, 中学校 38% で, 市町村別では 18~53% と, いずれも市町村間で差が認められた。臨時休業期間に続く休日を加えた実質休業期間の平均値について市町村別に見ると, 小学校では 1.7~5.0 日(全県 2.6 日), 中学校で 1.0~4.0 日(同 2.6 日)と市町村間で差が認められた。多くの臨時休業は学級運営上の措置と推定された。地域での流行状況や臨時休業に期待される効果を踏まえた学校医による助言への期待は大きいようである。予防的な面では, インフルエンザ (H1N1) 2009 流行後, 児童生徒のマスク着用や手洗い, 手指消毒が定着し, 望ましい状況となっているようであるが, 厳格な予防となると, 休業期間中の塾等への外出自粛も含め, 課題がある。

 基礎研究

疾患領域別分子標的薬の基礎研究

加齢性疾患への microRNA 標的薬の可能性

Molecular targets for prevention of age-related diseases

新飯田俊平



基礎研究

Key words : microRNA, microRNA 治療, 核酸医薬

はじめに

生体分子の網羅的解析, オミックスが創薬研究のファースト・ステップとなってきた。次世代型シーケンサーの普及, 質量分析装置のスペック向上に加え, 生物学と数理科学が有機的に連携したバイオインフォマティクスの進歩が大きく影響している¹⁾。いまや分子標的薬はがん治療の専売特許ではない。関節リウマチ, ウイルス性肝炎, クローン病, 重度気管支喘息, 加齢性黄斑変性など対象疾患は多様である。著者らも, 認知症や骨・関節疾患などの加齢性疾患に対する治療標的分子の探索をオミックスベースで行っている。標的分子も, これまでのタンパク質中心から, 遺伝子はもとより, いまではノンコーディング RNA (non-coding RNA: ncRNA) にも可能性が出てきた。核酸を標的とする‘核酸医薬’の研究開発ではアンチセンス DNA や siRNA が中心だったが, microRNA (miRNA) を含む ncRNA を標的とする新たな核酸医薬開発戦略が注目されている。

 機能性 non-coding RNA

ncRNA は機能をもたない。以前はそう考えられていた。ところが‘機能性 ncRNA’が次々

と見つかっている。ゲノムプロジェクトや cDNA オミックスは, ゲノムから転写される相当数の ncRNA やセンス/アンチセンス RNA の存在を明らかにした²⁾。その後, わずか 20 残基ほどの小分子 ncRNA が遺伝子の発現制御に関与していることが発見された。miRNA と呼ばれる一群である³⁾。ショウジョウバエを使った研究では, X 染色体の遺伝子発現をまとめて制御する RNA (roX RNA)⁴⁾ や核内受容体の活性化を刺激する SRA⁵⁾ といった mRNA 型の高分子 ncRNA も見つかった。タンパク質をコードする遺伝子群は DNA 全体のわずか 2% ほどであるという。残された広大な領域が何もしていないと考えていたことの方が不自然と思っていたので, ncRNA 研究の進展には大いに注目している。

加齢性疾患のうち, アルツハイマー病は, 長く研究されていながらいまだにその病態の全容は不明である。有効な治療薬も開発されていない。今, 病態解析や創薬研究は疾患オミックスを基盤とする新時代に入った。ncRNA 解析とバイオインフォマティクスを合体させた RNomics による分子標的探索に期待が寄せられる。進展のなかったアルツハイマー病の創薬開発に新たな展開があるかもしれない。

Shumpei Niida: Laboratory of Genomics and Proteomics, National Center for Geriatrics and Gerontology 国立長寿医療研究センター 遺伝子蛋白質解析室

2 microRNA

miRNA は 20-25 塩基長ほどの低分子 ncRNA である。これまで 1,500 種類ほど見つかった。細胞内で miRNA が分解されないのは、RISC と呼ばれるタンパク質の乗り物で運ばれるからである。主に mRNA の翻訳を転写後レベルで抑制的に調節する。線虫などではゲノムからの遺伝子転写そのものを抑制することも報告されている⁶⁾。成熟した miRNA は、転写された mRNA の 3' UTR に存在する相補的な配列箇所⁷⁾に結合して遺伝子の翻訳を阻止する仕組みだ。場合によっては mRNA を分解することもある。miRNA の発見より少し前、small RNA による RNA 干渉 (RNAi) 機構が発見され、外から細胞内に挿入する siRNA 技術が遺伝子発現抑制の方法論として確立した。興味深いことに、塩基長が 30 を超える siRNA ではインターフェロンの誘導が起り、アポトーシスを引き起こす。RNAi の生理機能がトランスポゾンやウイルス感染から DNA を守るシステムと考えれば当然の反応だ。ところが miRNA ではこの反応は起らない。もともとゲノムから転写されてくるものだから、siRNA と一緒にすべきでないかもしれないが、この「短さ」が絶妙のようだ。

miRNA は、1 種類で複数の mRNA を標的にする。塩基長が短いので配列コードの組み合わせは多くない。結果的に相補的配列をもつ遺伝子の数は確率的に多くなる計算だ。in silico 解析によると、1 つの miRNA は平均 200 個の遺伝子を標的にするという。最近、数個の miRNA の導入で iPS 細胞が誘導されることも報告された⁸⁾。これも複数のターゲットをもつ miRNA ならではの特徴と推察できる。再生医療の分野では、これまでも増して miRNA が注目されるに違いない。

3 疾患と microRNA

機能性分子が細胞内で過剰になったり不足したりすると、たいがい具合の悪いことが起こる。炎症が起きたり、組織の線維化が起こったりす

る。実際、罹患した組織では miRNA の発現プロファイルに変動がみられることが多い。例えば、let-7 は多くのがん組織で発現が低下している^{10,11)}。この miRNA は RAS や c-myc などのがん遺伝子の発現を調節していることが知られている^{10,11)}。一方で、特定のがんのみで特異的な変動を示す miRNA もある⁹⁾。このような miRNA はバイオマーカーへの応用も考えられている。疾患で変動がある miRNA の発現量を元に戻すことで細胞の常態を取り戻そうという考えが miRNA 治療である。基本的な戦略は 2 とおり。一つは、発現が亢進した miRNA に対するアゴニスティックな核酸分子を作ってその作用を抑制する方法。もう一つは、発現が低下した miRNA の代わりに、合成 miRNA を作って補充する方法である (図 1)。ウイルスが増殖する際、体内の miRNA が使われることがある¹²⁾。このような場合にもウイルスが利用する miRNA に対する阻害核酸分子を細胞に挿入する。この事例では、mir-122 を標的にした慢性 C 型肝炎の核酸医薬が既に第 II 相の臨床試験にあり¹³⁾、その成果も上々という (表 1)。mir-15/195 や mir208/499 は、心疾患の標的分子として前臨床試験が行われている。ほかにも多くの miRNA が新たな核酸治療薬候補として研究されている (表 1)。

4 アルツハイマー病と microRNA

日本は既に超高齢社会に突入した。2030 年には 3 人に 1 人が高齢者になるという。拡大する加齢性疾患の罹患者数とそれに伴う医療費は今後更に深刻化する。特にアルツハイマー病などの認知症は、家族の問題、介護の問題が複雑に絡んだ社会問題となっている。現在 100 万人といわれるアルツハイマー病患者も、2030 年には 250 万人に達すると予想されている。地球規模では 6500 万人を超えるという。医学的にも、市場性においても注目される疾患である。

現時点でのアルツハイマー病の治療法は、一定期間疾患の進行を遅らせるというもので、まだ根本的な治療法はない。創薬の新たな切り口として、アルツハイマー病に関連する miRNA



基礎研究

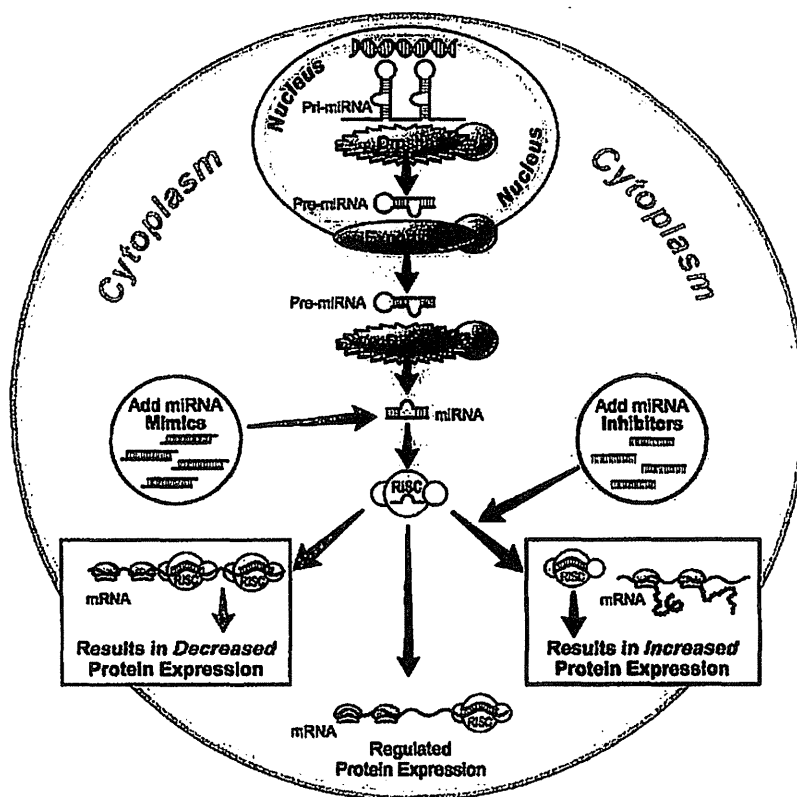


図1 miRagen Therapeutics社(米国)のホームページにある miRNA 治療薬のコンセプトを示す図

標的とする miRNA の動態に応じて、合成 miRNA またはアンチセンス miRNA を作って導入することで、タンパク質への翻訳を抑制して細胞内のタンパク合成を正常化させる。

研究が盛んになってきた。最近の3年間だけでも70編近い論文が発表された。これらの記載から miRNA を並べると50種類にもなる(表2)。ちなみに、アルツハイマー病モデルマウスでは20種類程度報告されている。そのうちヒトと共通するものは13種類であった。

アルツハイマー病の発症にはアミロイドβタンパク質(β-amyloid: Aβ)の脳内集積による神経変性と、タウ(Tau)タンパク質の線維化による神経原線維変化が関与しているといわれている。miR-124, 298はAβが前駆体から切り出されるとき作用する酵素BACE1の発現を制御しているという^{14,15)}。著者らもアルツハイマー病患者の脳脊髄液や血漿中のRNomicsを検討し

ている。今のところ、表2にあるmiRNAが統計的に有意に変動している様子はないが、別途疾患群で有意に発現量を変化させている数個のmiRNAを同定した。この中には、アルツハイマー病の発症とかかわる遺伝子を標的とするmiRNAが含まれている。一方、アルツハイマー病モデルマウスの脳のRNomicsから、発現変化の大きかったものを選び出し、培養神経細胞にそのmiRNAを強制発現させてみた。その結果、Aβの蓄積は有意に抑制された。今度は疾患モデルマウスの脳で発現するトランスジェニックマウスを作製し、その解析を目指している。しかしながら、表に挙げたmiRNAも含め、有効な標的分子がみつかったも、脳への薬物送達

表 1 開発中の miRNA 創薬の標的と対象疾患

標的 miRNA	対象疾患	開発段階
miRNA-122 (開発記号 SPC3649)	C 型肝炎	第 II 相
miRNA-15/195	心筋梗塞後リモデリング	非臨床
miRNA-208/499	慢性心不全	
miRNA-21	循環器疾患など	基礎研究
miRNA-29	先天性外眼筋繊維症 心筋線維化	
miRNA-34	前立腺がんなど	
miRNA-92/126	末梢動脈疾患	
miRNA-122	C 型肝炎	
miRNA-143/145	血管形成術後の再狭窄	
miRNA-191	肝臓がん	
miRNA-206	筋萎縮性側索硬化症	
miRNA-499	筋萎縮	
miRNA-let-7	非小細胞肺癌	
miRNA-Rx01	固形がん	
miRNA-Rx02	非小細胞肺癌など	
miRNA-Rx03	固形がん	
miRNA-Rx05	前立腺がん	

表 2 アルツハイマー病関連論文から抽出した microRNA

ヒト				
miR-9	miR-15a	miR-15b	miR-16	miR-18b
miR-29a	miR-29b1	miR-30c	miR-34a	miR-34c
miR-101	miR-103	miR-107	miR-124	miR-128
miR-130	miR-137	miR-144	miR-146a	miR-148-b
miR-211	miR-216	miR-325	miR-369-3p	miR-485-5p
miR-506	miR-515-3p	miR-590-3p	miR-612	miR-615
miR-181a	miR-181c	miR-629	miR-637	miR-657
miR-661	miR-768-3p	Let-7i	miR-06164	miR-09369
miR-15903	miR-32339	miR-45496	miR-44691	
マウス				
miR-9	miR-21	miR-29a	miR-29b1	miR-30c
miR-34a	miR-34c	miR-103	miR-106b	miR-107
miR-124	miR-137	miR-148-b	miR-181c	miR-298
miR-328	miR-361	miR-409-3p	Let-7i	
アカゲザル・チンパンジー				
miR-101	miR-144			
細胞系				
miR-17	miR-20a	miR-29a	miR-29b1	miR-34a
miR-101	miR-124	miR-137	miR-147	miR-153
miR-181c	miR-323-3p	miR-644	miR-655	

太字はヒトの研究成果と共通する microRNA。これらがすべて実際の疾患と関連しているかは保証されていない。

技術(DDS)が他の疾患以上に難しい。この問題をどう解決するかを含めて今後の核酸医薬研究に注目したい。

おわりに

2008年、日本で最初の核酸医薬、マクジェン(アプタマー)が承認された。適応は加齢性黄斑変性症。ごく最近にも、大学発のベンチャーが核酸医薬開発に名乗りを上げた。核酸医薬の分野に新しいカテゴリーの分子が登場し、開発の選択肢が増えた。核酸医薬開発から撤退したと

いわれていたメガ・ファーマーも siRNA 研究を継続していたことが伝わってきた。抗体医薬と違って開発コストも低い。ポスト抗体医薬といわれるこの分野の市場性をみてのことではないか。

一方、核酸医薬開発には DDS 技術の開発が表裏一体となって存在する。加えて、生体内での安定性の問題、核酸の細胞膜透過性の課題などまだ残されたハードルがある。しかし、これらもいずれは克服され、新たな創薬パラダイムが形成されるに違いない。



基礎研究

文献

- 1) Mount DW: バイオインフォマティクス第2版, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2005.
- 2) Carninci P, et al: FANTOM Consortium: RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group): The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309: 1559-1563, 2005.
- 3) Ambros V, et al: A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279, 2003.
- 4) Kelley RL: Path to equality strewn with roX. *Dev Biol* 269: 18-25, 2004.
- 5) Lanz RB, et al: A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97: 17-27, 1999.
- 6) Grishok A, et al: Transcriptional silencing of a transgene by RNAi in the soma of *C. elegans*. *Gene Dev* 19: 683-696, 2005.
- 7) Anokye-Danso F, et al: Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8: 376-388, 2011.
- 8) Miyoshi N, et al: Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8: 633-638, 2011.
- 9) Volinia S, et al: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2257-2261, 2006.
- 10) Lee YS, Dutta A: The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev* 21: 1025-1030, 2007.
- 11) Büssing I, et al: let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends Mol Med* 14: 400-409, 2008.
- 12) Jopling CL, et al: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309: 1577-1581, 2005.
- 13) <http://www.santaris.com/news/2011/11/05/santaris-pharma-phase-2a-data-miravirsin-shows-dose-dependent-prolonged-viral-reduct>
- 14) Fang M, et al: The miR-124 regulates the expression of BACE1/ β -secretase correlated with cell death in Alzheimer's disease. *Toxicol Lett* 209: 94-105, 2012.
- 15) Boissonneault V, et al: MicroRNA-298 and microRNA-328 regulate expression of mouse beta-amyloid precursor protein-converting enzyme 1. *J Biol Chem* 284: 1971-1981, 2009.

Measurement of peroxiredoxin-4 serum levels in rat tissue and its use as a potential marker for hepatic disease

RITSU ITO¹, MOTOKO TAKAHASHI², HIDEYUKI IHARA¹, HIROKI TSUKAMOTO¹, JUNICHI FUJII³ and YOSHITAKA IKEDA¹

¹Division of Molecular Cell Biology, Department of Biomolecular Sciences, Faculty of Medicine, Saga University, Saga 849-8501; ²Department of Biochemistry, Sapporo Medical University School of Medicine, Chuo-Ku, Sapporo 060-8556; ³Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate School of Medical Science, Yamagata University, Yamagata 990-9585, Japan

Received January 23, 2012; Accepted April 24, 2012

DOI: 10.3892/mmr.2012.935

Abstract. Peroxiredoxin (Prx)-4, a secretable endoplasmic reticulum (ER)-resident isoform of the mammalian Prx family, functions as a thioredoxin-dependent peroxidase. It is acknowledged that Prx-4 plays a role in the detoxification of hydrogen peroxide, and potentially other peroxides, which may be generated during the oxidative folding of proteins and oxidative stress in the ER. The present study was undertaken in order to specifically quantify the tissue levels of Prx-4. To accomplish this, an enzyme-linked immunosorbent assay was developed using a specific polyclonal antibody produced by immunizing a rabbit with native recombinant rat Prx-4 protein. The assay was used to detect Prx-4 in the range of 0.1 and 10 ng/ml, and to investigate tissue distribution in rats. Using this immunoassay, we found that the serum levels of Prx-4 were substantially lower in asymptomatic Long-Evans Cinnamon rats, a rat model of Wilson's disease, compared to normal rats. In addition, the treatment of rat hepatoma cells with N-acetylcysteine led to a significant increase in the release of Prx-4 protein into the medium; thus, it appears likely that the secretion of Prx-4 is associated with the redox state within cells. These results suggest that serum Prx-4 has potential for use as a biomarker for hepatic oxidative stress.

Introduction

Since many organisms that live under aerobic conditions are exposed to reactive oxygen species (ROS), they have developed a protective or defensive system against oxidative stress, which includes the production of a variety of antioxidant enzymes, including superoxide dismutases, catalase and glutathione

peroxidases (1-3). These enzymes are important in detoxifying ROS, some of which are generated during cellular respiration. In addition to these enzymes, a distinct class of antioxidant proteins has been identified and is referred to as peroxiredoxins (Prxs) (4-6).

Prx is a family of proteins that act on peroxides in a thioredoxin-dependent manner (4). In mammals, this protein family consists of six members, Prx-1 to -6 (4,7). Their common feature is the presence of two redox-sensitive cysteine residues in the active site, thus referred to as a 2-Cys type, with the exception of Prx-6, which has a single catalytic cysteine and is thus referred to as a 1-Cys type. During the reduction of peroxides by the 2-Cys-type Prx, the sulfhydryl groups of these two cysteines are oxidized to a disulfide linkage, which are then reduced by thioredoxin (4). Prxs-1-4 are highly homologous in terms of protein structure involving the two active site cysteine residues, while Prx-5 is classified as an atypical 2-Cys Prx due to its low homology (4,7). It is well-known that oxidative stress is closely associated with a number of pathological processes, and thus, the role of the Prx family has been investigated in numerous diseases (8-12). The expression of certain members of the Prx family are altered in a number of human malignancies (13-18). In addition to their role in the detoxification of peroxides, it is also considered that this family is involved in intracellular signal transduction involving H₂O₂ (4,6,19,20).

Among the Prx family members, Prx-4 uniquely contains an N-terminal signal peptide (21). The expression of this protein is relatively high in the testis, pancreas and liver, as demonstrated by immunoblotting data. While the majority of the Prx family members are present within cells, for example, in the cytosol for Prx-1 and Prx-2 and in the mitochondria for Prx-3, Prx-4 appears to reside in the endoplasmic reticulum (ER) and is secretable due to the presence of a cleavable signal peptide (21,22). Therefore, Prx-4 has the potential to be present in extracellular fluids, such as serum. Thus, the quantification of Prx-4 may also be useful for the clinical examination of pathological conditions using serum samples. Although an attempt to examine the serum levels of Prx-4 has recently been reported for sepsis in humans, a complete quantification was not accomplished due to the unavailability of a standard sample and the use of an arbitrary unit which was unique to this

Correspondence to: Dr Yoshitaka Ikeda, Division of Molecular Cell Biology, Department of Biomolecular Sciences, Faculty of Medicine, Saga University, 5-1-1 Nabeshima, Saga 849-8501, Japan
E-mail: yiked@med.saga-u.ac.jp

Key words: peroxiredoxin, oxidative stress, Long-Evans Cinnamon rat, enzyme-linked immunosorbent assay, liver