

B. 研究方法

ブタ腎近位尿細管上皮細胞 LLC-PK を用いて、培地中にフォルスコリンを添加し、対照群とともに細胞ホモジネートおよび培地中の GGT 活性を測定し分泌の亢進を確認し、それと同時にそれぞれのサンプルで GnT-III 活性も測定した。測定は、ピリジルアミノ化 (PA 化) した糖鎖の蛍光基質を糖受容基質とし、UDP-GlcNAc を糖供与体として反応させ、反応産物を ODS カラムを用いた HPLC システムにて分離定量した。尿サンプルについても、同様に GnT-III 活性を測定した。

C. 研究結果

LLC-PK1 細胞へのフォルスコリン添加により、培地中への GGT 分泌が有意に増加した。また、細胞ホモジネートの GGT 酵素活性には変化がなく、これまでと同じ結果が再現性よく得られた。GGT 活性を測定したものと同一のサンプルを用いて GnT-III 活性を測定したところ、フォルスコリン添加群、対照群ともに培地では活性が検出限界以下であった。一方、細胞ホモジネートでは、フォルスコリン添加群で GnT-III 活性が高い傾向が認められた。ただし、検出できる限界付近で活性が認められるため、残念ながらサンプル間でのバラつきが大きく明らかな統計的有意差は出なかった。

GGT 分泌と GnT-III による糖鎖構造変化に相関があれば、GGT および GnT-III 活性は同じような挙動を示すと考えられるため、尿中サンプルにおける両酵素活性の相関性の検討を試みた。しかし、結果的には、GGT 活性は再現よく測定出来るものの、尿サンプルでは GnT-III 活性の測定そのものがうまくいかないことが判明した。この活性測定では、蛍光ラベルした基質を用い、反応産物と未反応基質を蛍光検出器付きの HPLC で分離し定量するものである。尿サンプルでの測定に関してはこれまで報告がなく、実際に測定してみると、使用する基質および反応生成物とクロマトグラム上に重なって溶出されるような蛍光物質が尿には多量に含まれていることが分かった。そのため、活性の有無の検討以前に、測定系そのものを尿サンプル用に改良する必要があることが分かり、今後の課題となった。

D. 考察

GnT-III の発現にともなう糖タンパク質糖鎖の大きな構造変化はこれまでも多数知られており、この糖鎖構造の変化によって糖タンパク質の機能や輸送が影響を受けることも数多く報告されている。LLC-PK1 細胞を使った検討において、実験条件の設定、とくに感度の問題もあって有意差は認められなかったものの、GnT-III 活性は増加する結果を得ており、GGT 分泌との相関があるらしいことが分かってきた。

GnT-III の作用による糖鎖構造の大きな変化として、まずサイズが小さくなることが知られている。これは GnT-III の作用によって付加される bisecting GlcNAc という構造が、それ以降に作用する一部の糖転移酵素の作用を抑制する性質があるためである。

GGT は種によって異なるものの、5本から7本程度のアスパラギン結合型糖鎖が付加されており、これによってプロテアーゼの作用を防御している。実際、非特異的なプロテアーゼを試験管内で強力に作用させても、失活分解することはない。GnT-III が働くことによって糖鎖が小さくなったり、その他の構造変化によってプロテアーゼに対する感受性が変化することは十分考えられることである。

このようなしくみによれば、PTHなど細胞内 cAMP レベルの増加によって、尿細管上皮に存在する他の糖タンパク質が影響を受けること無く、GGT のみ特異的に遊離させることを上手く説明出来る可能性がある。これについては今後も検討を加えていきたいと考えている。前回報告書に述べたような、がんやアルコール性肝疾患、とくにがん組織において GnT-III 活性が増加することは多く報告があり、このような病態における血中 GGT の増加についても、同様のメカニズムで説明出来るかも知れない。実際、ラットの肝化学発がんモデルでは、GGT の発現と GnT-III 活性の増加は比較的パラレルな動きをすることが報告されている。

一方、尿中における糖転移酵素活性の測定については、かなりの困難を解決しなくてはならないことが分かった。しかし、おそらくこのような難しさのため、尿中糖転移酵素活性を指標にした病態に解析は行われなかったとも考えられ、今後適切に測定系を改良できたならば、これまで検討出来なかった、尿中糖タンパク質の糖鎖構造やその合成系に関わる糖転移酵素活性を検討することによって、病態を評価する新しい手立てになる可能性もある。

また、GGT 分泌や糖転移酵素活性とは直接関連がないが、GnT-III 活性測定を妨害する未知の蛍光物質は、クロマトグラフィ上分離されるものとして、少なくとも5種類含まれていることが分かった。興味深いことに、これらの物質の中には含有比が各個体サンプル間で多様性のあるものがあり、もしかすると、病態や代謝など何らかの個体の状態を反映する指標になるのではという可能性を感じさせる。これを明らかにするためには、そのような未知蛍光物質を実際に分離し同定する必要がある。それにはかなりの検討が必要と予想されるが、分光学的な性質を解析するのはある程度可能と考えられるので、このような点から糸口を探ることが出来るのではと考えている。

E. 結論

糖転移酵素の発現、とくに GnT-III 活性の変動と GGT 分泌をさらに検討することにより、糖鎖構造の変化がある種の糖タンパク質の遊離に関与することを明らかに出来ると考えている。また、これまでそれほど検討されていない尿中の糖転移酵素活性や尿中糖タンパク質の糖鎖プロファイルあるいは蛍光検出 HPLC で認められた未知の蛍光物質など、尿サンプルを用いた病態解析やモニタリングなどにおいて新しい指標となる可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ihara H, Hanashima S, Tsukamoto H, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Ikeda Y: Difucosylation of chitooligosaccharides by eukaryote and prokaryote α 1,6-fucosyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1830(10): 4482-4490, 2013.

Takahashi M, Hasegawa Y, Ikeda Y, Wada Y, Tajiri M, Ariki S, Takamiya R, Nishitani C, Araki M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kuroki Y: Suppression of Heregulin b Signaling by the Single N-Glycan Detection Mutant of Soluble ErbB3 Protein. *J. Biol. Chem.* 288(46): 32910-32921, 2013.

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 accounts for the low lipopolysaccharide responder phenotype of BALB/c B cells. *J. Immunol.* 190(1): 195-204, 2013.

Tsukamoto H, Ihara H, Ito R, Ukai I, Suzuki N, Kimoto M, Tomioka Y, Ikeda Y: MD-2-dependent human Toll-like receptor 4 monoclonal antibodies detect extracellular association of Toll-like receptor 4 with extrinsic soluble MD-2 on the cell surface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440(1): 31-36, 2013.

Ihara H, Tsukamoto H, Taniguchi N, Ikeda Y: An assay for α 1,6-fucosyltransferase (FUT8) activity based on the HPLC separation of a reaction product with fluorescence detection. *Methods Mol. Biol.* 1022: 335-348, 2013 (総説) .

2. 学会発表

浜之上誠, 池田義孝, 高松 研: 分裂期神経幹細胞特異的に限定的に発現する糖転移酵素 GnT-V. *Neuro 2013* (第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学大会)、2013, 6, 20-23.

浜之上誠, 池田義孝, 緒方 徹, 高松 研: 糖転移酵素 GnT-V の神経幹細胞における特異的発現と神経再生への関与. 第36回日本分子生物学会年会、2013, 12, 3-6.

井原 秀之, 池田 義孝: Cloning, expression and characterization of silkworm a1,6-fucosyltransferase. 第 86 回日本生化学会大会、2013,9,11-13、横浜.

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

3. FRAX を用いた骨粗鬆症患者のスクリーニング

分担研究者 田中伸哉 (埼玉医科大学)

研究協力者 森脇佐和子 (国立長寿医療研究センター)

河合磨奈実 (国立長寿医療研究センター)

日野 優子 (国立長寿医療研究センター)

愛知県東浦町保健センター

半田医師会健康管理センター

骨粗鬆症の治療は効果的に骨折を防止するが、日本では骨検診の拡充が十分でない。われわれは至適な骨粗鬆症患者スクリーニングを明らかにするため、2年間にわたり横断研究をおこなった。43～75歳の女性 237名を対象に体測定、腰椎および大腿骨頸部骨密度測定、胸椎および腰椎 X線撮影、FRAXによる10年間の骨粗鬆症骨折確率計算をおこなった。

予測因子を多重ロジスティック回帰分析でおこなった後、選択された予測因子についてROC解析をおこない適切なカットオフ値を求めた。72名(30.4%)が骨粗鬆症と診断された。多重ロジスティック解析をおこなったところ予測因子は10年間の骨折確率のみであった。ROC解析ではAUCが0.777となりカットオフ値を7%にすると感度は74.3%で特異度は65.7%となった。対象を70歳以下の210人にすると、有病率は29.5%となった。ROC解析によるAUCは0.797で、カットオフ値を7%にすると感度は69.4%で特異度は72.3%となった。FRAXによる10年間の骨粗鬆症骨折確率は骨粗鬆症患者のスクリーニングに有用であることが明らかになった。

キーワード: Fracture risk assessment tool, FRAX, 骨粗鬆症検診

A. 研究目的

骨粗鬆症とは骨量が減少し、骨の微細構造が障害された結果、骨折が起こりやすくなった全身の骨の状態と定義されている¹⁾。一旦、骨粗鬆症による脆弱性骨折が発生すると、別の部位でも引き続き骨折が起こり、骨折の重積は高齢者の日常生活動作(activity of daily living: ADL)を制限し、生活の質(quality of life: QOL)を急激に悪化させる²⁾。したがって、骨粗鬆症の発症早期に診断し治療を開始することが重要である。

日本では1200～1300万人の骨粗鬆症患者がいると予測されているが³⁾、その約7割が未治療のまま放置されていると言われている。高齢化社会を迎えるにあたってさらに

その数はさらに、増加し、ADL、QOLの低下した高齢者により医療費負担がさらに増加することは必至である。骨粗鬆症による骨折患者の増加は個人のみでなく、各自治体、さらには国全体の問題である。

自治体でおこなっている健康診断では、骨粗鬆症検診を5年に1度受検することを推奨しているが、有料であることや疾患に対する意識の低さのため受検者は5%程度にとどまっている。

我々は、より安価な骨検診の実施により、疾患に対する意識も高まることを期待し尿中 γ -GTPや体組成計による計測値を骨検診にもちいることを検討してきた。そこで、2012年度に愛知県の2自治体の中高年女性を対象に横断研究をおこなってきたが、その結果、骨折リスク評価ツール(fracture risk assessment tool: FRAX)による10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率⁴⁾、踵骨骨密度(quantitative ultra sound: QUS)に良好な患者検出能があることが明らかになった。しかし、踵骨QUSは、2013年に発表された原発性骨粗鬆症の診断基準(2012年度改訂版)に含まれてない⁵⁾、測定機器の購入、維持費を考慮すると安価な骨検診にはふさわしくない。また、2012年度研究では、対象者数が少ないことより結果の妥当性に検証の余地があった。

この研究の目的は安価な骨粗鬆症患者のスクリーニング方法を確立するために、FRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率を求めると同時に、人体測定、脊椎X線像、腰椎および大腿骨頸部骨密度を測定し、多重解析によって骨粗鬆症の予測因子を明らかにし、受診者動作特性解析(receiver operating characteristic analysis: ROC解析)により評価すること。

B. 研究方法

① 研究のタイプ；横断研究

② 対象；骨検診は2012年と2013年の7月～12月におこなった。2012年度は愛知県在住の東浦町および大府市在住の骨粗鬆症検診受検のボランティアで43～75歳(平均60.5±7.89歳)の女性99人。2013年度は大府市在住のボランティアで44～75歳(平均61.4±7.38歳)の女性138人。合計は237人で平均年齢は61.0±7.59歳。

③ 評価項目；身長、体重、体組成計(タニタ社製MC-980A)による体脂肪率、全身の推定筋肉量、第2-4腰椎骨密度測定、左大腿骨頸部骨密度測定および胸椎・腰椎2方向の単純X線撮影、FRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率。なお、10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率の計算には、大腿骨頸部骨密度は用いず、身長・体重より求めた。

④ 骨粗鬆症診断は原発性骨粗鬆症の診断基準2012年度版⁵⁾に準じ、第2-4腰椎と左大腿骨頸部骨密度、胸椎・腰椎2方向の単純X線撮影および骨折歴の問診よりおこなった。

⑤ 統計学的解析；身長、体脂肪率、筋肉量、BMI、FRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率を説明因子、骨粗鬆症の有無を目的因子として多重ロジスティック解析をおこない、骨粗鬆症の予測因子を明らかにした。骨粗鬆症の予測因子に関してはROC

解析をおこない、曲線下面積 (area under the curve: AUC) を求めることにより検出能を確認した。また、感度および特異度から至適なカットオフ値を求めた。

C. 研究結果

72人 (30.4%) が骨粗鬆症と診断された。50歳未満の対象者の5%はFRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率が5%以上であった。50~60歳未満の38.8%、60~70歳未満の96.3%、70歳以上の全員が5%以上であった。また、50%未満の対象者の0%、50~60歳未満の6.0%、60~70歳未満の2.7%、70歳以上の37.5%がFRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率が15%以上であった (図1)。



図1.

身長、体脂肪率、筋肉量、BMI、10年間の骨折確率を説明因子として多重ロジスティック解析をおこなったところFRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率が予測因子として抽出された (オッズ比 1.26; 95%信頼区間 (confidential interval: CI) : 1.16 ~ 1.37) (表1)。

変数名	β	SE (β)	p値	オッズ比	95%信頼区間
体脂肪率	0.0246	0.0632	0.697	1.025	0.906~1.159
筋肉量	-0.0237	0.1219	0.846	0.977	0.769~1.240
BMI	-0.1755	0.1519	0.248	0.839	0.623~1.130
身長	-0.0471	0.0585	0.421	0.954	0.851~1.069
FRAX	0.2308	0.0421	0.000	1.260	1.160~1.367

表1.

ROC 解析では AUC が 0.777 となった。カットオフ値を FRAX による 10 年間の主要骨粗

鬆症骨折発生確率7%にすると感度は74.3%で特異度は65.7%となった(図2)。さらに対象を70歳以下の210人とすると、62人が骨粗鬆症と診断され有病率は29.5%となった。骨粗鬆症のFRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率のみであった(オッズ比1.34; 95%CI: 1.21~1.49)(表2)。ROC解析によるAUCは0.797で、カットオフ値を7%にすると感度は69.4%で特異度は72.3%となった(図3)。

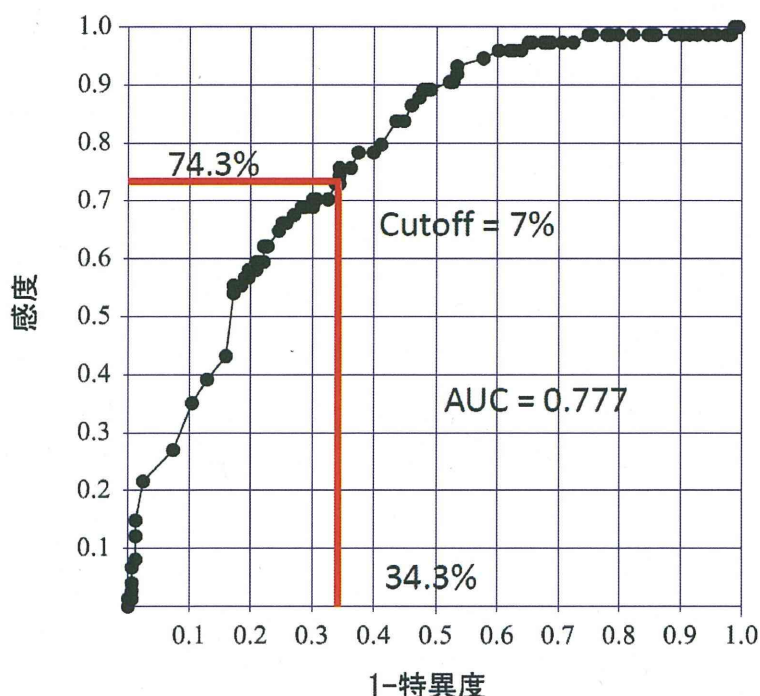


図2. ROC解析

変数名	β	SE (β)	p値	オッズ比	95%信頼区間
体脂肪率	-0.0340	0.0815	0.676	0.967	0.824~1.133
筋肉量	-0.1068	0.1426	0.454	0.899	0.680~1.188
BMI	0.0012	0.2092	0.996	1.001	0.664~1.508
身長	0.0064	0.0677	0.092	1.006	0.881~1.149
FRAX	0.2923	0.0534	0.000	1.341	1.207~1.489

表2.

D. 考察

愛知県の自治体在住の中・高年女性を対象におこなった2年間に亘る横断研究の結果、FRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率は骨粗鬆症の予測因子であることが明らかになった。ROC解析の結果では、全年齢を対象とした場合でも、70歳以下を対

象とした場合でも良好な検出率であった。カットオフ値は7%が至適と考えられた。

今研究結果を骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011 年版における¹⁾、FRAX の扱いの論拠となっている藤原らの報告と比較すると、年齢層別にみた 10 年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率はほぼ一致している⁶⁾。FRAX による評価はこの研究の根幹をなす部分であり、妥当な結果と判断できる。同時に、藤原らの研究の対象は広島コホートに登録された女性で、一方、今研究の対象は愛知在住の女性であることから、FRAX による評価が日本国内において大きなばらつきがないことが予測された。したがって、今研究結果をもとに、骨粗鬆症患者のスクリーニングを各自治体での骨検診に用いても妥当な結果が得られると期待される。

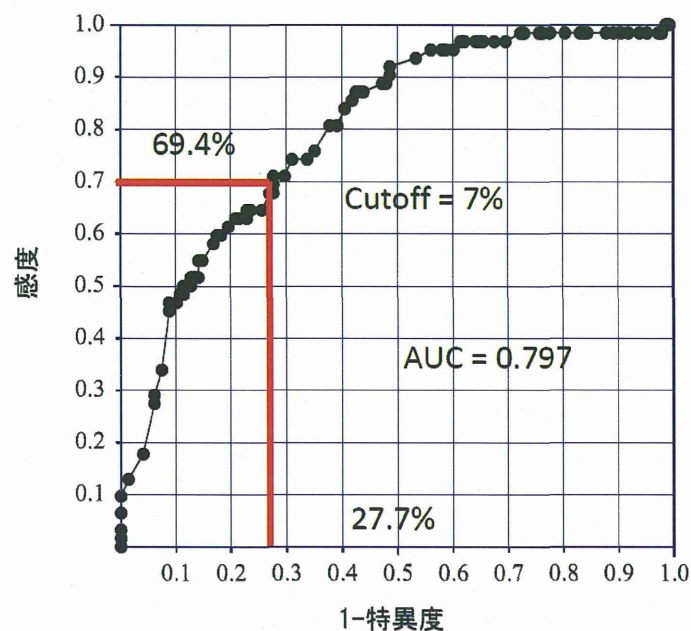


図 3. ROC 解析

今研究の結果からは、骨粗鬆症患者のスクリーニングに用いる場合はカットオフ値を7%に設定することが妥当であるという結果をえた。現在使用されている骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2011 年版には、治療開始基準として FRAX の主要骨粗鬆症骨折発生確率が取り入れられている。このガイドラインでは 15%以上で骨密度が 80%未満の場合に治療を開始することが推奨されている¹⁾。今研究の結果はガイドラインのカットオフ値と大きな乖離があるが、当然ながら治療開始基準には医療経済的な側面が影響しており特異度を高く設定すべきであり、高い感度が要求されるスクリーニングとは性質を異にしている。そこで、実際の骨粗鬆症患者の年齢層別割合と比較するため、7%以上になる割合を年齢層別にみると（図表なし）50～60 歳未満の 19.4%、60～70 歳未満の 55.5%、70 歳以上の全員が該当する。50 歳代の約 15%、60 歳代の約 30%、70 歳以上の約 50%が骨粗鬆症に罹患していると報告されていることから、FRAX による 10

年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率を骨粗鬆症患者のスクリーニングに用いる場合、70歳未満を対象としてカットオフ値を7%に設定することが妥当だと考えられた。

未治療の骨粗鬆症患者は多く、国・自治体は積極的に対策を講じるべきだが、従来の骨密度測定を必要とする骨検診は地方自治体もしくは個人の負担が普及の妨げの一因となっている。そこで、われわれは安価な骨粗鬆症患者のスクリーニング方法の探索のため、横断研究をおこない、多重ロジスティック解析により予測因子を抽出することを試みた。身長、BMI、体脂肪率、筋肉量をFRAXによる10年間の骨粗鬆症骨折発生確率を説明因子として用いたが、骨折確率のみが予測因子として抽出された。過去の研究との妥当性や研究方法から信憑性の高い結果と考えられる。治療開始基準とは乖離が生じているが、約70%という感度はスクリーニングツールとしては寧ろ不足みである。高い特異度を保持しつつ、他の予測因子により感度を上昇させることを研究の目的としたが、FRAXの妥当性を確認する結果にとどまった。

E. 結論

安価な骨粗鬆症患者のスクリーニングには、FRAXによる10年間の主要骨粗鬆症骨折発生確率が有用であることが明らかになった。骨粗鬆症患者のスクリーニングには対象を70歳未満としカットオフ値を7%とすることが妥当であり、この場合、感度は69.4%で特異度は72.3%であった。

F. 参考文献

- 1) 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，東京，64-67，2011
- 2) Hagino H, Nakamura T, Fujiwara S, et al: Sequential change in quality of life for patients with incident clinical fracture: a prospective study. *Osteoporos Int*, 20(5): 955-961, 2009
- 3) 山本逸雄：骨粗鬆症人口の推定. *Osteoporosis Jpn*, 7: 10-11, 1999
- 4) The World Health Organization Fracture Risk Assessment Tool (www.shef.ac.uk/FRAX)
- 5) 原発性骨粗鬆症診断基準改訂検討委員会：原発性骨粗鬆症の診断基準（2012年度改訂版）. *Osteoporosis Japan*, 21(1): 9-21, 2013
- 6) 藤原佐枝子，細井孝之，五來逸雄：生活習慣の改善と骨粗鬆症予防に関する調査研究（その2）. *Osteoporosis Japan*, 17(4): 681-688, 2009

G. 健康危険情報

なし

H. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 田中伸哉, 石井正明, 河野義彦, 宮島 剛, 足立 善, 斉藤文則, 織田弘美: 副甲状腺ホルモン連日投与製剤と週1回製剤の椎体骨折治癒期における局所的、全身的な投与効果の違いを明らかにすること. Osteoporosis Japan 21(4): 732-739, 2013
- 2) 宮島 剛, 河野慎次郎, 田中伸哉, 金潤澤, 田中淳司, 小澤栄人, 和田幸人, 河崎浩明, 遠藤真里, 織田弘美: Phase Contrast Radiography の骨強度評価への応用-Cut off point の設定. Osteoporosis Japan 21(2): 375-379, 2013
- 3) 宮島 剛、織田 弘美、田中 伸哉、金 潤澤、田中 啓仁、東 博彦: 大腿骨頸部骨折と転子部骨折の発生機序の差異 有限要素解析による検討. Hip Joint 39:410-413, 2013

2. 学会発表

- 1) 骨粗鬆症の予防と簡便なチェック法. 研究成果等普及啓発事業による成果発表会 (愛知県・東浦町)2013年12月15日

I. 知的財産権の出願・登録状況

なし

4. コストを抑えた骨粗鬆症検診のあり方に関する検討

研究分担者 田中 清(京都女子大学家政学部食物栄養学科・教授)

椎体圧迫骨折は、骨粗鬆症性骨折として最も頻度の高いものである。身長低下は単なる加齢変化ではなく、椎体骨折がその最も重要な原因である。昨年度の本報告書において、身長低下は椎体骨折の存在をよく予測し、そのカットオフ値として約 4cm が妥当であることを示した。本年度はその成果をふまえて、各種ガイドラインの記述と対比させて、骨粗鬆症検診における身長低下の意義を考察した。

海外における最近のガイドラインでは、骨粗鬆症診断において、骨密度測定のみこだわることではなく、骨折リスクが非常に重視されている。椎体骨折の存在は、次の椎体骨折や大腿骨近位部骨折などのリスクを何倍にも高める。身長低下者をスクリーニングすることは、検診コストをほとんどかけることなしに、既存骨折を持つ例を見だし、再骨折を予防することに有用と考えられる。コストを最小限にした骨粗鬆症スクリーニングの方法としては、身長低下に FRAX を組み合わせるのが妥当な方法であると考えられた。

キーワード: 身長低下, 椎体骨折, 骨粗鬆症検診, コスト, 医療経済評価

A. 研究目的

骨粗鬆症に限らず、臨床的評価を行う際には、真のエンドポイントと代替(surrogate)エンドポイントを区別する必要がある。例えば LDL コレステロールを低下させる薬物を用いて、冠動脈疾患予防のための介入試験を行った結果を評価する場合、真のエンドポイントは冠動脈疾患予防であり、血清 LDL 濃度は代替エンドポイントである。糖尿病であれば、慢性合併症予防が真のエンドポイントであり、血糖値や HbA1c は代替エンドポイントである。評価指標としては、真のエンドポイントがより重要であることは言うまでもない。

骨粗鬆症における真のエンドポイントは骨折の予防であり、骨密度・骨代謝マーカーなどはいずれも代替エンドポイントである。したがって骨粗鬆症治療における効果判定は、その介入による骨折抑制が最も重視される。このように考えると、骨粗鬆症検診において見いだすべきは、何よりも骨折リスクの高い対象者である。しかし従来の骨粗鬆症検診においては、このような点が十分考慮されてこなかったように思われる。

昨年度の報告書において、身長低下が椎体圧迫骨折を持つ対象者を見いだすのに有用であることを報告した。身長低下に注目したのは2つの理由がある。まず1点目は、

椎体圧迫骨折は、高齢者における身長低下の最も重要な原因であり、身長低下を有する例は、骨粗鬆症性骨折の中で最も頻度の高い椎体圧迫骨折を持つ可能性が高いことから、より真のエンドポイントに近い検診ができるのではないかと考えたことである。次に身長低下の評価には、ほとんど追加費用がかからないことから、各自治体にとって、コストをかけないで骨粗鬆症検診を行うのに好適の方法であると考えられた。

そこで本報告書においては、昨年度までの成果をふまえて、骨粗鬆症のスクリーニングに関する各種ガイドラインの記述を検討して、身長低下を骨粗鬆症検診に用いることの意義について考察を行った。

B. 研究方法と結果と考察

目的にも書いたように、今年度の報告書は、昨年度までの調査研究結果をふまえて、それを各種ガイドラインと対比させて考察するものであるため、方法・結果・考察と分けて、テーマ毎に一括して記述した。

①. 骨粗鬆症に対する考え方

表 1 に原発性骨粗鬆症の診断基準（2012 年度改訂版）を示すが、脆弱性の椎体骨折または大腿骨近位部骨折ありの場合、骨密度測定をするまでもなく骨粗鬆症と診断される。またその他の脆弱性骨折ありの場合は骨密度が YAM（若年成人平均値；Young Adult Mean）の 80%未満、脆弱性骨折なしの場合骨密度が YAM の 70%未満にて、骨粗鬆症と診断される。

近年世界的に骨折リスクが非常に重視されるようになっており、骨粗鬆症の診断に関しても、骨密度だけではなく、対象者のトータルの骨折リスクで判定する流れになってきており、骨粗鬆症スクリーニングにおいても、このような概念を取り入れるべきものと考えられた。

低骨量をきたす骨粗鬆症以外の疾患または続発性骨粗鬆症を認めず、骨評価の結果が下記の条件を満たす場合、原発性骨粗鬆症と診断する。

I. 脆弱性骨折 ^(注1) あり
1. 椎体骨折 ^(注2) または大腿骨近位部骨折あり
2. その他の脆弱性骨折 ^(注3) があり、骨密度 ^(注4) がYAMの80%未満
II. 脆弱性骨折なし
骨密度 ^(注4) がYAMの70%以下または-2.5SD以下

YAM：若年成人平均値（腰椎では20～44歳，大腿骨近位部では20～29歳）

表 1. 原発性骨粗鬆症の診断基準（2012 年度改訂版）から抜粋

②. 各種ガイドラインにおけるスクリーニングに対する考え方

1. 骨粗鬆症スクリーニングのための DXA 検査に関する推奨 (US Preventive Services Task Force; 2011)

この推奨においては、DXA による骨密度測定検査の適応として、65 歳以上の女性では「脆弱性骨折の既往や、続発性骨粗鬆症なし」、65 歳未満の女性では「10 年間の骨折リスクが、他の危険因子を持たない 65 歳女性と同等またはそれ以上」とされている。ここで 65 歳以上では、推奨の対象が既存骨折を持たない例となっているが、これは既存の脆弱性骨折ありの場合、DXA を行わなくても骨粗鬆症と診断されるため、DXA 検査は必要という考えに基づくものである。

2. National Osteoporosis Foundation (NOF) のガイドライン

(文献) Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis 2013

このガイドラインの中の Who should be tested? という項において、患者の治療方針決定に役立つのでなければ、いずれの方法であろうと、骨密度測定の適応はないと述べられ、具体的内容は US Preventive Services Task Force に準拠するとされている。

3. ヨーロッパのガイドライン

(文献) Kanis J et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. Osteoporos Int 24(1):23-57, 2013

このガイドラインにおいては、骨折リスクに関して、高い方と低い方の 2 つの閾値を設定しており、2 つの閾値間の範囲でのみ DXA による骨密度測定の適応ありとしている。骨折リスクが閾値未満では DXA の適応なしというのは、DXA 検査を行っても、骨折リスクが低ければ治療適応ではないので、DXA を行う意義は乏しいという考え方によるものである。また骨折リスクが閾値以上であっても DXA の適応なしというのは、DXA を行うまでもなく治療適応なので検査不要という考え方によるものであるが、さらにもし DXA を行って骨密度が低くないという結果が出た場合、治療適応ではないと分類されて、むしろ混乱する恐れもあると述べられている。

これも非常に割り切った、明快なガイドラインであるが、薬物療法の対象となるような高リスク者ではなくても、低～中リスク者に対しても、生活習慣改善は行うべきであり、私見としては、この考え方はあまりに薬物療法に寄りすぎているように思われる。

③. 骨粗鬆症スクリーニングに対する医療経済評価

(文献) Nayak S et al. Cost-effectiveness of different screening strategies for osteoporosis in postmenopausal women. Ann Intern Med. 155(11):751-61, 2011

骨粗鬆症に対する医療経済評価については、わが国からの報告が非常に乏しいが、そのほとんどすべてが薬物療法に対するものである。骨粗鬆症スクリーニングに対する医療経済評価については、日本だけではなく、海外でも報告がきわめて乏しく、最近のまとまったものとして

は、ここに示すものがほとんど唯一に近い。

本論文においては、非常に多くの骨折リスク・背景因子別に、どのような対象者に対して、どの方法でスクリーニングを行い、治療を行った場合の費用対効果が研究されている。この論文の詳細は省くが、骨粗鬆症患者を1名見出すのに要する費用を、各種検査法ごとに比較しているのではなく、そのスクリーニングによって患者を見出し、治療によって骨折を予防したことに関する分析が行われている。

繰り返しになるが、骨粗鬆症患者を見出すのに必要なスクリーニング費用を比較するのではなく、トータルとして骨折関連医療費削減効果とスクリーニング費用が検討されている。社会に及ぼすインパクトを考えた場合確かにその通りであり、アウトカムとして骨折関連費用を用いた費用効果分析であろうと、QOLを考慮した生存年数(QALY)を用いた費用効用分析であろうと、骨折予防がエンドポイントである。

④. コストを抑えた骨粗鬆症検診のあり方 (案)

表2に示すように、健診項目として、アンケート調査により「若い時の身長」「50歳以降、強い外力によらず骨折したことは？」の2項目を聴取するとともに、FRAXを用いた骨折リスクの評価を行う。その結果により対応として、身長低下ありの場合、骨粗鬆症による椎体圧迫骨折ありの可能性が高いので、強く受診勧奨を行う。身長低下なしの場合、FRAXのリスクをあわせ評価し、受診勧奨を行う。

1. 健診項目
a. アンケートにより、以下の内容を聴取
・若い時の身長
・50歳以降、強い外力によらず骨折したことは？
b. 骨折リスクの評価 (FRAX)
2. 対応
a. 身長低下ありの場合
骨粗鬆症による椎体圧迫骨折ありの可能性が高いので、強く受診勧奨
b. 身長低下なしの場合
FRAXのリスクにより受診勧奨

表2 コストを抑えた骨粗鬆症検診について (案)

身長低下は、非常に感度・特異度に優れ、しかもほとんどコストが発生しないことから、骨粗鬆症スクリーニングの方法として優れているが、身長低下を有するということは椎体骨折を持つということであり、既存骨折を有する例を見だし、再骨折を予防することには極めて有用と考えられる。椎体骨折はしばしば軽視されるが、内臓諸機能の低下を起し、ADL・QOL低下、

さらには死亡率増加にもつながる。またいったん椎体骨折が起こると、次の椎体骨折のリスク、大腿骨近位部骨折のような、より重大な骨折のリスクを何倍にも高めることが知られている。国際骨粗鬆症財団(IOF)をはじめ、国際的にも近年再骨折予防の重要性が、広く認識されつつある。このような状況を考えて、身長低下によるスクリーニングの意義は非常に大きいものと考えている。

ただ身長低下は、既存骨折を持たない対象者に対する新規骨折予防の目的には用いることはできない。この目的のためには FRAX のような、骨折リスク予測ツールを用いるのが現実的であると考えられるが、FRAX に関しては、田中伸哉(分担研究者)の報告書に述べられるので、ここでは省略する。

C. 結論

身長低下と FRAX による骨粗鬆症スクリーニングを行うことは、骨粗鬆症検診にかけられる費用が限られている状況において、有効かつ現実的な手段と考えられる。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

Yoh K, Kuwabara K, Tanaka K. Detective value of historical height loss and current height/knee height ratio for prevalent vertebral fracture in Japanese postmenopausal women. J Bone Miner Metab (published online: 13/Oct/2013)

田中清, 小林慎, 坂巻弘之: 骨粗鬆症治療の医療経済 日本臨床 2013年増刊号 最新の骨粗鬆症学 -骨粗鬆症の最新知見- pp.652-656, 2013

2. 学会発表

Kuwabara A, Tanaka K, Yoh K. Clinical usefulness of historical height loss and current height/knee height ratio in the nutritional assessment of the elderly. IUNS 20th International Congress of Nutrition, 2013 Granada (Spain)

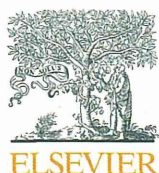
F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表(平成25年度)

著者・タイトル・雑誌名・巻(号):ページ	発表年
1 Moriwaki S, Suzuki K, Muramatsu M, Nomura A, Inoue F, into T, Yoshiko Y, <u>Niida S</u> : Delphinidin, one of the major anthocyanidins, prevents bone loss through the inhibition of excessive osteoclastogenesis in osteoporosis model mice. PLoS One	In press
2 Inomata M, Ito T, <u>Niida S</u> , Murakami Y: Atg5 regulates formation of MyD88 condensed structures and MyD88-dependent signal transduction. Biochem Biophys Res Commun: doi:10.1016/j.bbrc.2013.06.094.	2013
3 Ihara H, Hanashima S, Tsukamoto H, Yamaguchi Y, Taniguchi N, <u>Ikeda Y</u> : Difucosylation of chitooligosaccharides by eukaryote and prokaryote α 1,6-fucosyltransferases. Biochim Biophys Acta 1830(10): 4482-4490.	2013
4 Takahashi M, Hasegawa Y, <u>Ikeda Y</u> , Wada Y, Tajiri M, Arika S, Takamiya R, Nishitani C, Araki M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kuroki Y: Suppression of Heregulin b Signaling by the Single N-Glycan Detection Mutant of Soluble ErbB3 Protein. J Biol Chem 288(46): 32910-32921.	2013
5 Tsukamoto H, Fukudome K, Takao S, Tsuneyoshi N, Ohta S, Nagai Y, Ihara H, Miyake K, <u>Ikeda Y</u> , Kimoto M: Reduced surface expression of TLR4 by a V254I point mutation accounts for the low lipopolysaccharide responder phenotype of BALB/c B cells. J Immunol 190(1): 195-204.	2013
6 Tsukamoto H, Ihara H, Ito R, Ukai I, Suzuki N, Kimoto M, Tomioka Y, <u>Ikeda Y</u> : MD-2-dependent human Toll-like receptor 4 monoclonal antibodies detect extracellular association of Toll-like receptor 4 with extrinsic soluble MD-2 on the cell surface. Biochem Biophys Res Commun 440(1): 31-36.	2013
7 Ihara H, Tsukamoto H, Taniguchi N, <u>Ikeda Y</u> : An assay for α 1,6-fucosyltransferase (FUT8) activity based on the HPLC separation of a reaction product with fluorescence detection. Methods Mol Biol 1022:335-348.	2013
8 田中伸哉, 石井正明, 河野義彦, 宮島 剛, 足立 善, 齊藤文則, 織田弘美: 副甲状腺ホルモン連日投与製剤と週1回製剤の椎体骨折治癒期における局所的、全身的な投与効果の違いを明らかにすること, Osteoporosis Japan 21(4): 732-739.	2013
9 宮島 剛, 河野慎次郎, 田中伸哉, 金潤澤, 田中淳司, 小澤栄人, 和田幸人, 河崎浩明, 遠藤真里, 織田弘美: Phase Contrast Radiographyの骨強度評価への応用-Cut off pointの設定, Osteoporosis Japan 21(2): 375-379.	2013
10 宮島 剛, 織田弘美, 田中伸哉, 金潤澤, 田中啓仁, 東博彦: 大腿骨頸部骨折と転子部骨折の発生機序の差異 有限要素解析による検討, Hip Joint 39: 410-413, 2013	
11 Yoh K, Kuwabara K, <u>Tanaka K</u> . Detective value of historical height loss and current height/knee height ratio for prevalent vertebral fracture in Japanese postmenopausal women. J Bone Miner Metab (published online)	2013
12 田中清, 小林慎, 坂巻弘之: 骨粗鬆症治療の医療経済 日本臨床 2013年増刊号 最新の骨粗鬆症学 -骨粗鬆症の最新知見- pp.652-656.	2013

Ⅲ. 別 刷



Atg5 regulates formation of MyD88 condensed structures and MyD88-dependent signal transduction



Megumi Inomata^{a,*}, Takeshi Into^a, Shumpei Niida^b, Yukitaka Murakami^a

^aDepartment of Oral Microbiology, Division of Oral Infections and Health Sciences, Asahi University School of Dentistry, 1851 Hozumi, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

^bLaboratory of Genomics and Proteomics, National Center for Geriatrics and Gerontology, 35 Gengo, Morioka, Obu, Aichi 474-8522, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 June 2013

Available online 2 July 2013

Keywords:

Autophagy

Condensed structures

MyD88

Signal transduction

Toll-like receptors (TLRs)

ABSTRACT

MyD88 is known as an essential adaptor protein for Toll-like receptors (TLRs). Previous studies have shown that transfected MyD88 forms condensed structures in the cytoplasm. However, upon TLR stimulation, there is little formation of endogenous MyD88 condensed structures. Thus, the formation of MyD88 condensed structures is tightly suppressed, but the mechanism and significance of this suppression are currently unknown. Here we show that Atg5, a key regulatory protein of autophagy, inhibits the formation of MyD88 condensed structures. We found that endogenous MyD88 had already formed condensed structures in Atg5-deficient cells and that the formation of condensed structures was further enhanced by TLR stimulation. This suppressive effect of Atg5 may not be associated with autophagic processes because MyD88 itself was not degraded and because TLR stimulation did not induce LC3 punctate formation and LC3 conversion. Immunoprecipitation analysis revealed that Atg5 could interact with MyD88. Furthermore, Atg5 deficiency increased formation of the MyD88–TRAF6 signaling complex induced by TLR stimulation, and it enhanced activation of NF- κ B signaling but not MAPKs and Akt. These findings indicate that Atg5 regulates the formation of MyD88 condensed structures through association with MyD88 and eventually exerts a modulatory effect on MyD88-dependent signaling.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

MyD88 works as an important signaling adaptor molecule not only in Toll-like receptors (TLRs) but also in interleukin (IL)-1 receptor (IL-1R) [1–3]. After receptor ligation, MyD88 forms a signaling complex, so-called ‘Myddosome’, through recruitment of IL-1R-associated kinases (IRAK)-4 and IRAK-1/2 [4]. Myddosome activates downstream signaling through interaction with tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6), which serves as both of an E3 ubiquitin ligase and a signaling scaffold to catalyze polyubiquitination of target proteins [5] or to synthesize free polyubiquitin chains [6]. The action of TRAF6 ultimately activates transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1)-mediated nuclear factor (NF)- κ B signaling and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascades, which leads to the transcription of a wide variety of genes involved in innate and adaptive immunity [7,8].

Many research groups have revealed the signaling function of MyD88 in TLRs/IL-1R, whereas several groups, including our group, have shown characteristic subcellular localization of MyD88. Transfected MyD88 results in formation of condensed structures

in the cytoplasm [9–13]. Condensed structures of MyD88 have generally been regarded as signaling complexes or myddosomes because major signaling molecules are found within the structures [9,10]. However, upon TLR stimulation, endogenous MyD88 hardly forms such condensed structures [13]. Therefore, the formation of MyD88 condensed structures is strictly suppressed, but the mechanism and significance of this suppression have not yet been clarified.

Autophagy sequesters intracellular constituents within autophagosomes, followed by delivery to lysosomes, in response to nutrient starvation and other metabolic stresses [14,15]. Autophagosome formation proceeds through a series of stages, including nucleation of the isolation membrane and elongation and closure of the membrane [14,15]. Several essential components of the autophagic machinery, so-called autophagy-related proteins (Atgs), have been identified by genetic screening in yeast [16,17]. Most of the Atgs are highly conserved in mammalian cells [18]. Analysis of Atgs has revealed two ubiquitin-like conjugation systems required for autophagosome formation [19]. One of these systems mediates the conjugation of Atg5–Atg12. Formation of the Atg5–Atg12 conjugate facilitates activation of the other conjugation system, which induces lipidation of LC3 (mammalian homolog of Atg8). The protein LC3 is proteolytically cleaved by Atg4 to generate cytosolic LC3-I, which subsequently conjugates with phosphatidylethanolamine to form membrane-associated LC3-II.

* Corresponding author. Fax: +81 58 3291422.

E-mail address: inomata@dent.asahi-u.ac.jp (M. Inomata).

The Atg5–Atg12 conjugate and LC3-II localize to the isolation membrane throughout its elongation process [19]. The Atg5–Atg12 conjugate finally dissociates from the membrane upon completion of autophagosome formation, while LC3-II remains on the isolation membrane and is regarded as a key marker for the autophagosome [14].

In this study, we investigated the mechanism involved in the suppression of MyD88 condensed structure formation. Here we show that Atg5 suppresses the formation of MyD88 condensed structures. Subsequently, this suppression leads to inhibition of formation of the MyD88–TRAF6 complex induced by TLR stimulation and control of MyD88-mediated signaling.

2. Materials and methods

2.1. Reagents, antibodies and DNA constructs

The synthetic bacterial triacylated lipopeptide Pam₃CSK₄ and highly purified *Escherichia coli* LPS were purchased from Invivogen. The *Streptomyces* product coumermycin A1 was purchased from Sigma–Aldrich. Anti-MyD88 rabbit polyclonal antibody (ab2064) was obtained from Abcam. Anti-Flag M2 monoclonal antibody (F3165) was purchased from Sigma–Aldrich. Phosphorylation-specific antibodies to p38 (4631), JNK (4671), ERK (4376), Akt Thr308 (4056) and NF- κ B p65 (3033) and antibodies to p38 (9212), JNK (9258), ERK (9102), I κ B α (9242) and Atg5 (8540) were obtained from Cell Signaling Technology. Rabbit polyclonal antibodies to TRAF6 (sc-7221), Akt1/2/3 (sc-8312), β -actin (sc-8432) and HA (sc-805) were purchased from Santa Cruz Biotechnology. Anti-LC3 monoclonal antibodies (M115-3 and M152-3) were obtained from MBL.

The expression plasmid for an N-terminal Flag epitope-tagged mouse MyD88 (Flag-MyD88) was previously described [20]. The plasmid encoding Flag-MyD88 C-terminally fused to *E. coli* DNA gyrase subunit B (Flag-MyD88-GyrB) was previously described [13]. The expression plasmid for hemagglutinin epitope (HA)-tagged Atg5 was a kind gift from N. Mizushima (Tokyo University, Tokyo, Japan). Transfection of plasmids into cells was performed using Lipofectamine 2000 reagent (Life Technologies).

2.2. Cell culture

Atg5-knockout (KO) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) [21] and wild-type control MEFs were kindly provided by N. Mizushima. Human embryonic kidney (HEK) 293T cells were cultured under normal conditions as described previously [22]. Wild-type and Atg5 KO MEFs expressing Flag-MyD88-GyrB were generated by stable transfection of the plasmid and were maintained in media containing 1 mg/ml G418 (Roche).

2.3. Microscopy and image analysis

For immunofluorescence microscopy, cells were seeded on Lab-Tek chamber 4-well permanox slides (Nunc) and fixed at -20°C with methanol for 30 min. Immunostaining was then carried out with a primary antibody and Alexa488-conjugated secondary antibody (Life Technologies). Fluorescent images were obtained as described previously [13]. The percentage of cells with more than 10 microscopy-visible condensed structures of MyD88 was quantified by counting cells in 10 different images of microscopic fields that included at least 15 cells. Results, shown as means \pm standard deviation (SD), are representative of three independent experiments.

2.4. Immunoblotting and densitometry analysis

Cells seeded on 6-well plates were lysed with 250 μl of lysis buffer [13] at 4°C for 15 min. The lysates were mixed with $2 \times$ SDS sample buffer containing 2-mercaptoethanol, boiled, separated on 10–20% gradient SDS-PAGE, and then transferred to Immobilon-P transfer membranes (Millipore). The membranes were blocked in 5% skim milk in PBS. Immunoreactive bands were detected using the antibodies described above and visualized as described previously [13]. Densitometric quantification of the immunoblot bands was performed using an Epson ES-H7200 scanner and ImageJ densitometry software (Version 1.6, National Institutes of Health). Values of the bands of phosphorylated proteins were normalized to the total levels of respective proteins and expressed as relative values.

2.5. Immunoprecipitation

HEK293T cells seeded on 6-well plates were transfected with the plasmids encoding Flag-MyD88 together with the plasmids encoding HA-Atg5. Cells were lysed with 250 μl of lysis buffer [13] at 4°C for 15 min. After clarification by centrifugation at 15,000 \times g for 10 min, cell lysates were immunoprecipitated using 25 μl anti-Flag M2 agarose (Sigma–Aldrich) for 1 h at 4°C on a rotating platform. The beads were washed four times with 1 ml of lysis buffer, boiled with SDS sample buffer containing 2-mercaptoethanol, and subjected to immunoblotting using the indicated antibodies. Immunoprecipitation of Flag-MyD88-GyrB was performed as described previously [13]. Results are representative of three separate experiments.

2.6. Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SD ($n = 3$). *P* values were calculated by Student's *t* test and considered significant at a value of 0.01.

3. Results

3.1. Atg5 is involved in suppression of MyD88 condensed structure formation

We previously found that there was little formation of MyD88 condensed structures after TLR stimulation and that such structures are related to cytoplasmic aggregation of sequestosome 1 (SQSTM1; also known as p62) and histone deacetylase (HDAC) 6 [13]. Both SQSTM1 and HDAC6 are autophagy-related ubiquitin-binding proteins, which mediate aggregation of polyubiquitinated proteins, ultimately leading to degradation of them by autophagy [23]. However, the correlation between autophagy and MyD88 condensed structures has not been clarified. Therefore, we first examined the role of the autophagy-related protein Atg5, a key regulator of autophagy, in formation of MyD88 condensed structures. In wild-type MEFs, LPS and Pam₃CSK₄, both of which activate MyD88-dependent signaling, only weakly induced formation of MyD88 condensed structures (Fig. 1A). In contrast, surprisingly, in Atg5 KO MEFs, MyD88 was already present as condensed structures (Fig. 1A). Cells containing MyD88 condensed structures were increased by approximately 15% (Fig. 1B). Furthermore, in Atg5 KO MEFs, LPS and Pam₃CSK₄ increased MyD88 condensed structures (Fig. 1A). Cells containing MyD88 condensed structures were increased by approximately 30% after 60 min of stimulation (Fig. 1B). These results suggest that Atg5 is involved in suppression of MyD88 condensed structure formation.