

## Functional Regulation of sErbB3 by N-Glycan

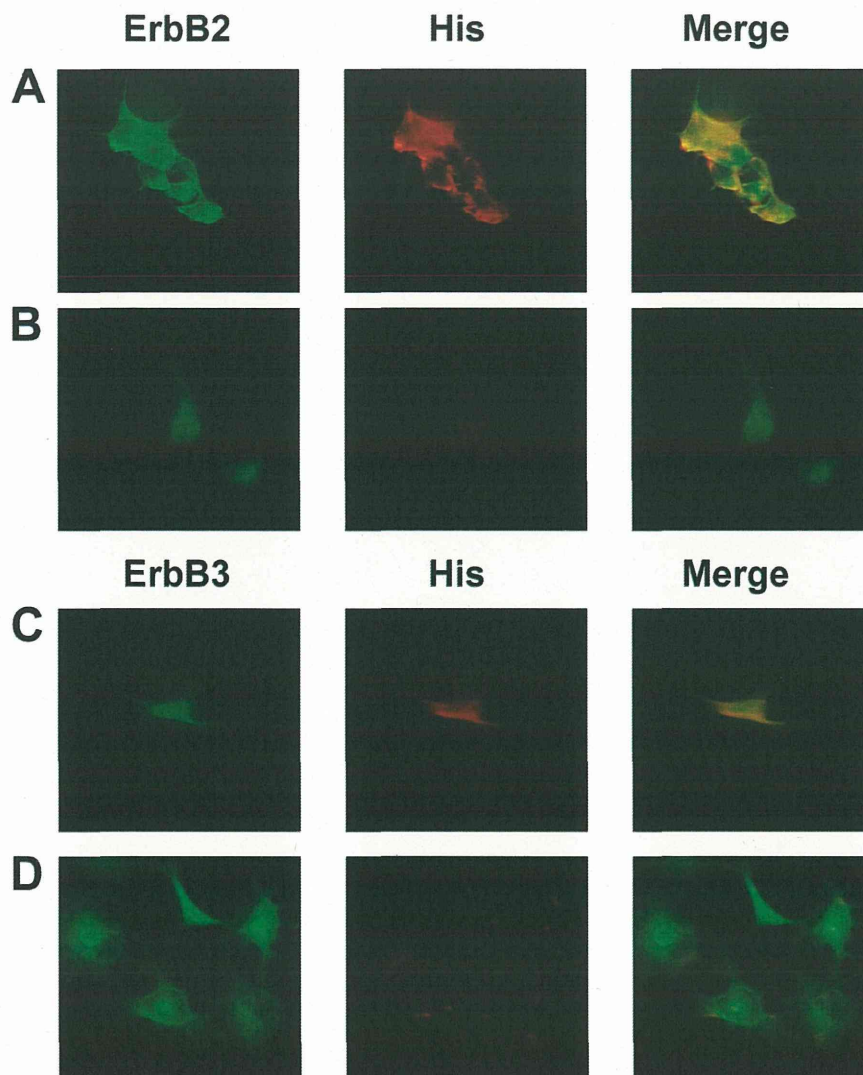


FIGURE 5. Colocalization of sErbB3 and ErbB2 or ErbB3 on cell surface. MCF7 cells were incubated with (panel A and C) or without (panel B and D) sErbB3 for 2 h, rinsed with PBS (–), and fixed with 4% paraformaldehyde and were subsequently stained with anti-ErbB2 (panels A and B), anti-ErbB3 (panel C and D), and anti-His antibodies. The images were obtained using a fluorescence microscope.

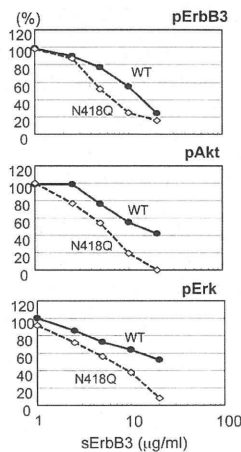
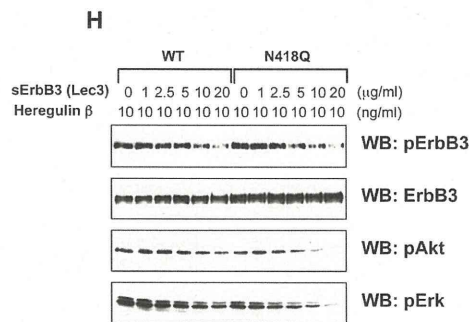
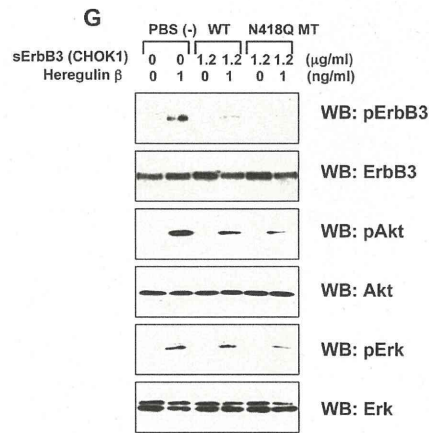
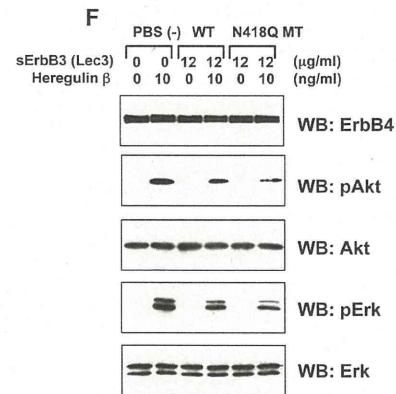
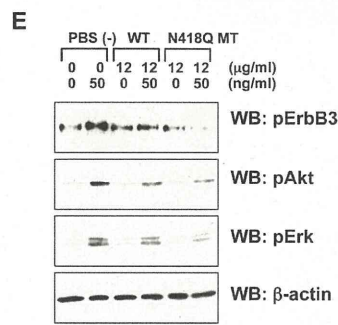
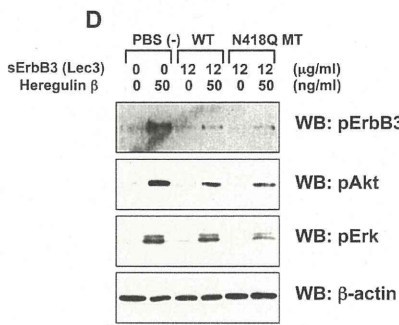
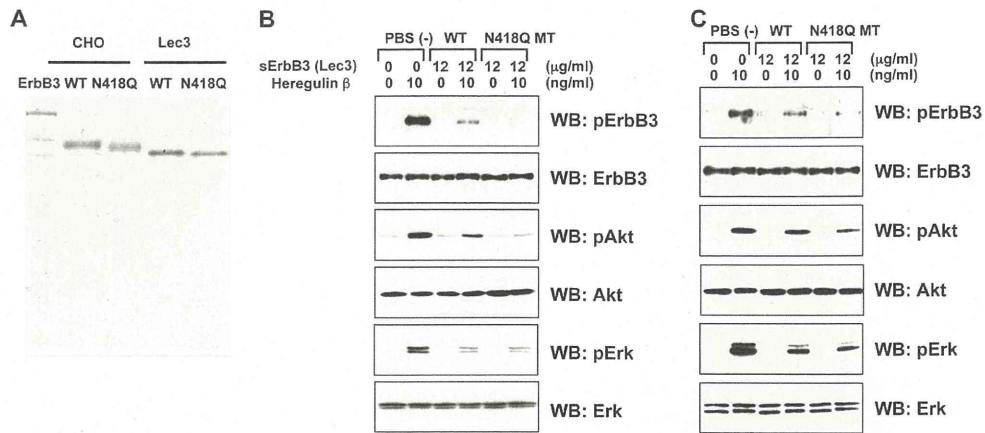
duced in CHOK1 cells was also shown to have suppressing effects (Fig. 6G). When dose dependence was examined, it was revealed that the N418Q mutant of sErbB3 has ~2–3-fold inhibitory effects of heregulin signaling in ErbB3-transfected CHOK1 cells (Fig. 6H).

*sErbB3 N418Q Mutant Exhibits Synergy with Anticancer Drug, Lapatinib*—We next examined the combined signaling-inhibitory effects of sErbB3 with lapatinib, an ErbB2 tyrosine kinase inhibitor. As shown in Fig. 7A, sErbB3 augmented the inhibitory effects of lapatinib, and the additive effects were more significant in the sErbB3 N418Q mutant. We also examined the combined effects of sErbB and lapatinib on cell proliferation of MCF7 cells. As shown in Fig. 7B, sErbB3 augmented the inhibitory effects of lapatinib, and the sErbB3 N418Q mutant exhibited more significant effects.

*Structures of N-Glycan on Asn-418 in sErbB3*—Although it was suggested that the N-glycan on Asn-418 of ErbB3 is involved in the functional regulation of ErbB3 and sErbB3, whether Asn-418 of ErbB3 is really glycosylated has not been

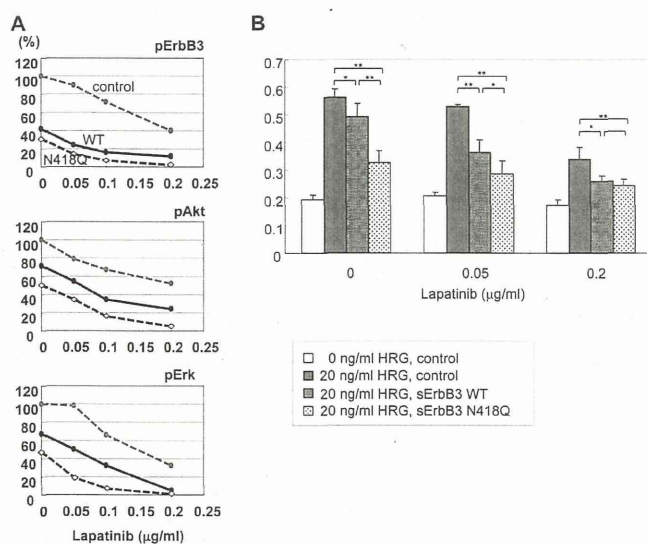
determined, and if it is, the structure of the N-glycan has also not been determined. To clarify this issue, purified sErbB3 was subjected to enzymatic proteolysis, and the glycosylated peptide was then isolated by reversed phase chromatography. The glycosylated peptide was identified in wild type sErbB3 but was missing in the N418Q mutant sample (Fig. 8A). Amino acid sequencing of the peptide backbone by collision-induced dissociation MS/MS indicated that the isolated peptide contains Asn-418 (Fig. 8B), and ETD MS/MS confirmed that Asn-418 is glycosylated (Fig. 8C). We determined the N-glycan profiles on Asn-418 of sErbB3 from Lec3.2.8.1 cells (Fig. 8D) and from CHOK1 cells (Fig. 8E) using MALDI linear TOF MS. The results indicate that the dominant population of N-glycan on Asn-418 of sErbB3 produced from Lec3.2.8.1 cells was a high mannose type composed of five mannoses (so called Man5), and that from CHOK1 cells was LacNAc2Man3GlcNAc2 with or without sialic acid. Furthermore, any unglycosylated peptide containing Asn-418 ( $m/z$  1120.6) was not found in a tryptic peptide mixture, indicating that Asn-418 is nearly 100% glycosylated in wild type sErbB3.

Functional Regulation of sErbB3 by N-Glycan





## Functional Regulation of sErbB3 by N-Glycan



**FIGURE 7. sErbB3 N418Q mutant exhibits synergy with anticancer drug lapatinib.** *A*, MCF7 cells were incubated with the indicated concentrations of lapatinib for 4 h and then treated with wild type or N418Q mutated sErbB3 for 2 h. The cells were stimulated with 10 ng/ml heregulin  $\beta$  for 10 min at 37 °C. The cell lysate was prepared and subjected to Western blotting using the indicated antibodies. Densitometric analysis was performed using a Luminous analyzer. The data are representative of three independent experiments. *B*, MCF7 cells were plated in quadruplicate in a 96-well plate at a cell density of 2000 cells/well. After serum starvation for 16 h, the cells were treated with the indicated concentrations of lapatinib and sErbB3 and stimulated with 20 ng/ml heregulin  $\beta$  (HRG). Cell proliferation was assayed after 72 h using the WST-1 reagent. The data are representative of three independent experiments. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

## DISCUSSION

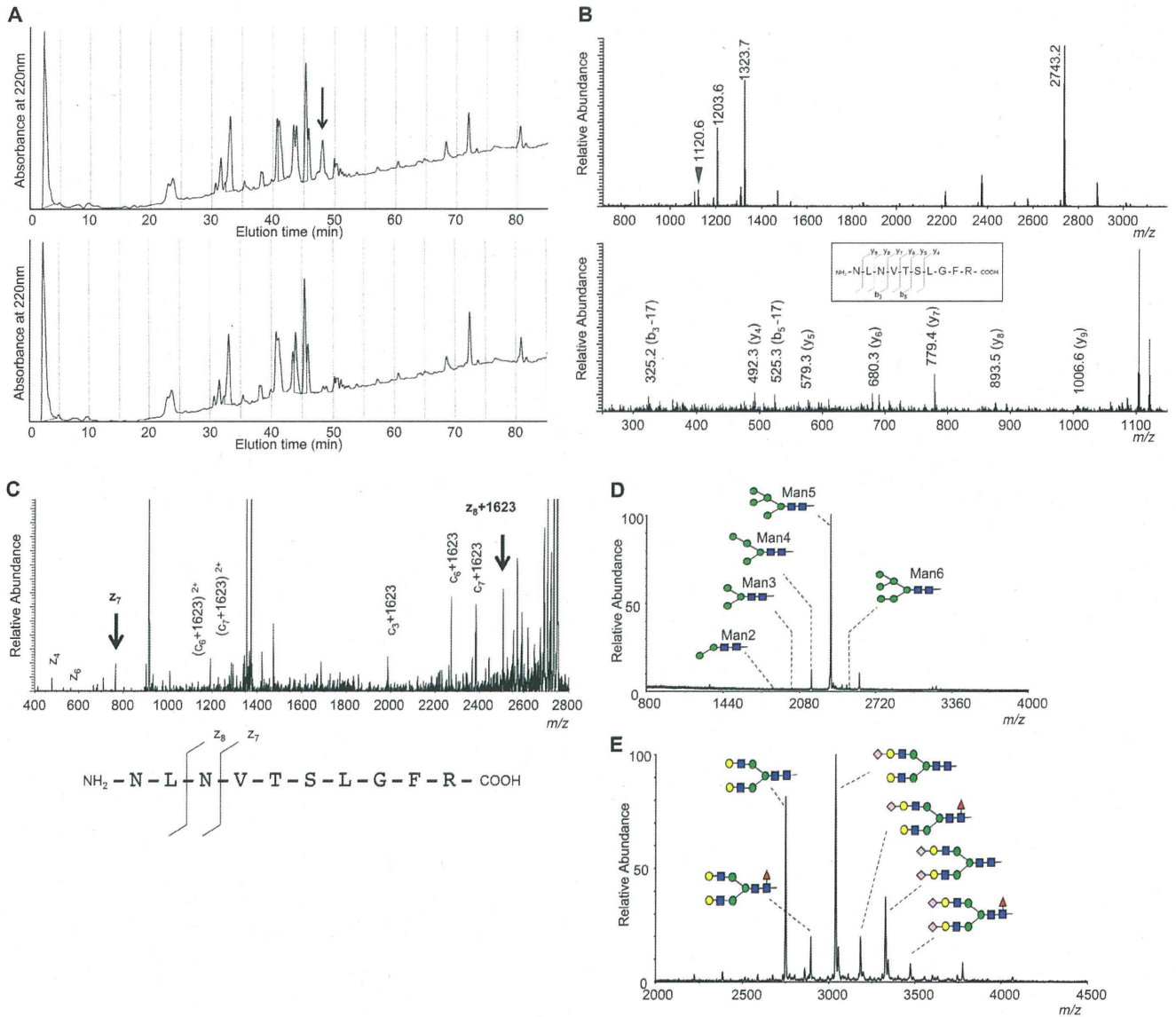
In this study we have compared the suppressive effects of sErbB2, sErbB3, and sErbB4 on heregulin signaling and determined that sErbB3 suppresses signaling most effectively. It was suggested that sErbB3 suppresses heregulin signaling through the ErbB3-containing heterodimer in MCF7 cells and that it acts not on ligands, but on cell surface molecules, probably ErbB receptors. Immunohistochemical analysis also suggested the binding of sErbB3 to cell surface ErbB2 and ErbB3. By deleting *N*-glycan on Asn-418, the suppressive effects were enhanced by 2–3-fold, and synergistic effects for lapatinib were also up-regulated. We have determined the structure of *N*-glycan on Asn-418 of sErbB3, and it was suggested that the *N*-glycan is involved in functional regulation of sErbB3 (Fig. 9A).

Among the ErbB family, ErbB3 is the only member that lacks a functional tyrosine kinase domain. The role of ErbB3, which is not found to be mutated or amplified in cancers, had remained unclear for years. However, recent evidence indicates that ErbB3 plays an important role in cancer development, and considerable research efforts are focused on developing new ther-

apies targeting ErbB3 (34–36). ErbB3 is devoid of kinase activity and thus forms a heterodimer with another ErbB receptor that provides a surrogate kinase domain to mediate downstream signaling. It has been reported that ErbB2/ErbB3 is the most mitogenic heterodimer in the ErbB family (37, 38), which is consistent with the present data (Fig. 3A). It is noteworthy that siRNA for ErbB3 alone was sufficient to suppress EGFR, ErbB2, ErbB3, Akt, and Erk phosphorylation, and phosphorylation of ErbB3 and Erk are almost correlated (Fig. 3A). A recent study has also suggested the importance of higher order complexes of ErbB2/ErbB3 heterodimers in ErbB2 phosphorylation and downstream signaling (39). Because sErbB3 efficiently suppresses heregulin-induced phosphorylation of EGFR and ErbB2 in addition to ErbB3 (Fig. 1B), it is possible that sErbB3 also interferes with the formation of higher order complexes of ErbB receptors.

Sugar chains play a role in a variety of biological events by affecting the physicochemical properties of glycoproteins. It has been reported that protein structure, stability, hydrophilicity, and protein-protein interactions are affected by glycosylation. Because most of the molecules involved in cell-cell communication are glycosylated, it is important to determine the mechanisms by which glycosylation regulates protein functions for signal transduction study. To date, we have been focused on the functions of *N*-glycans of cell surface molecules, which are implicated in signaling regulation (40–44). Among them, *N*-glycans of ErbB receptors are of interest in matters regarding cancer biology (19–24, 45). Based on our observations that deletion of *N*-glycan on Asn-420 of EGFR leads to ligand-independent oligomerization (19) and deletion of *N*-glycan on Asn-418 of ErbB3 leads to ligand-independent ErbB2/ErbB3 heterodimer formation and activation of PI3K/Akt and Ras/Erk pathways (23), we hypothesized that *N*-glycans in domain III of ErbB receptors are involved in prevention of ligand-independent dimer formation. Ligand binding is thought to induce rotation of a ridged body containing domains I and II, which leads to the structure changing from the tethered form to the extended form and allows dimerization of ErbB receptors (1–4). In the structural model of the extended form, the *N*-glycan on Asn-418 is placed in between domain I and III, potentially causing steric hindrance (Fig. 9B). The *N*-glycan might be involved in the maintenance of ErbB receptors in the tethered form in the absence of the ligand, and therefore, the ErbB3 N418Q mutant might change the structure from the tethered form to the extended form with less energy. Interestingly, the structural studies have revealed that ErbB2 (26) and *Drosophila* EGFR (46), which lack the corresponding *N*-glycan in domain III, are in the extended form without ligand stimulations. It has been reported that the addition of an *N*-glycan alters the aspar-

**FIGURE 6. sErbB3 N418Q mutant suppresses heregulin  $\beta$  signaling more effectively than wild type.** *A*, wild type and N418Q-mutated sErbB3 were produced in CHOK1 cells or Lec3.2.8.1 cells and purified as described under "Experimental Procedures." One  $\mu$ g of each protein was subjected to SDS-PAGE followed by Coomassie Brilliant Blue R-250 staining. *B*, MCF7 cells were serum-starved for 16 h, incubated with the indicated concentrations of wild type or N418Q-mutated sErbB3 produced in Lec3.2.8.1 cells for 2 h, and stimulated with 10 ng/ml heregulin  $\beta$  for 10 min at 37 °C. The cell lysate was prepared, and 15.0  $\mu$ g of protein/lane were subjected to Western blotting (WB) using indicated antibodies. *C*, The same experiment as *panel B* was performed with ErbB3-transfected CHOK1 cells. *D* and *E*, the same experiment as *panel B* was performed with T47D cells (*D*) or BT474 cells (*E*). *F*, the same experiment as *panel B* was performed with ErbB4-transfected CHOK1 cells. *G*, the same experiment as *panel B* was performed with sErbB3s produced in CHOK1 cells. The heregulin  $\beta$  concentration used was 1 ng/ml. *H*, ErbB3-transfected CHOK1 cells were serum-starved for 16 h, incubated with the indicated concentrations of wild type or N418Q-mutated sErbB3 for 2 h, and stimulated with 10 ng/ml heregulin  $\beta$  for 10 min at 37 °C. The *left panel* shows Western blotting with indicated antibodies, and the *right panel* displays the densitometric evaluation. The data are representative of three independent experiments.



**FIGURE 8. Determination of the structures of N-glycans on Asn-418 in sErbB3.** A, reversed phase chromatograms of proteolytically treated wild type (upper) and N418Q mutated (lower) sErbB3. The purified wild type and N418Q mutated sErbB3 were S-carbamidomethylated and digested with lysyl endopeptidase and trypsin. The glycosylated peptides in the digest were enriched by hydrophilic affinity and then purified by reversed phase chromatography using an isocratic elution with 3.5% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid for 10 min followed by a gradient elution of acetonitrile (3.5–55%, v/v) in 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid for 75 min. The arrow indicates the glycosylated peptide that exists in wild type sErbB3 but not in the N418Q mutant. B, MALDI QIT mass spectra of the glycosylated peptide. MALDI ion trap MS caused a loss of N-linked glycan from the glycosylated peptide due to ion activation upon ionization, and the resulting unglycosylated peptide ion was observed at  $m/z$  1120.6 indicated by an arrowhead (upper spectrum). The ion at  $m/z$  2743.2 contained an intact glycan. Collision-induced dissociation MS/MS of the precursor ion at  $m/z$  1120.6 generated the product ions specific to the sequence shown in the inset (lower spectrum). C, ETD MS/MS spectrum of the glycosylated peptide ion at  $m/z$  915.6, which is a triple-charged precursor ion containing an N-glycan of 1623 Da. ETD generated the product ions at  $m/z$  763.4 and  $m/z$  2501.3 for  $z_7$  and  $z_8$  ions, respectively (arrows). The mass of the latter ion indicates that Asn-418 is glycosylated. Assignment of product ions is indicated below the mass spectrum. D and E, MALDI linear TOF mass spectrum of the glycosylated peptide containing Asn-418 from sErbB3 produced in Lec3.2.8.1 cells (D) or CHOK1 cells (E). The illustration indicates the structure of N-glycan on Asn-418 of sErbB3. The intensity of the signals allows a rough estimation of the relative abundances of the molecules. Blue square, N-acetylglucosamine; green circle, mannose; yellow circle, galactose; purple diamond, sialic acid; red triangle, fucose.

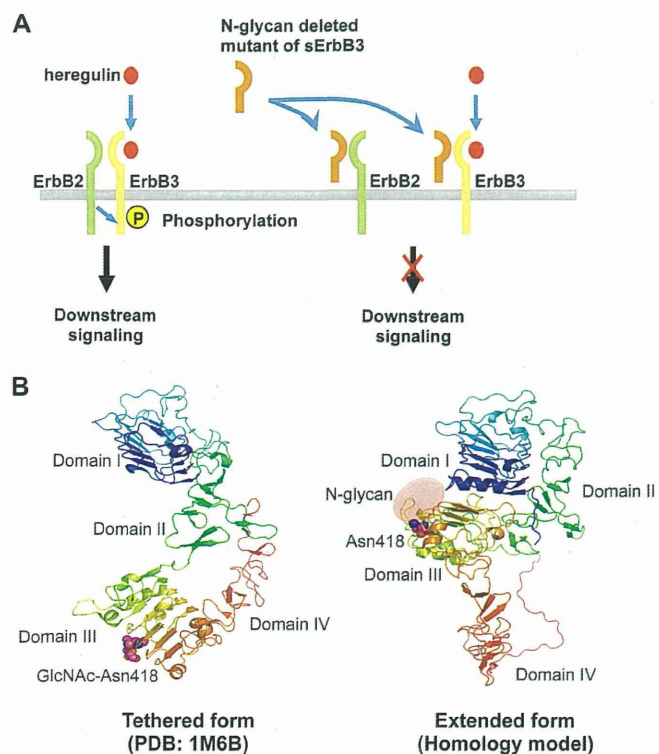
agine side chain torsion angle distribution and reduces its flexibility, and it may be involved in stabilizing the protein folding (47). Similar effects might act on oligomerization of ErbB receptors. Because it has been suggested that N-glycans are involved in the oligomerization of other receptors as well (48, 49), it is assumed that some N-glycans might act to prevent unnecessary protein-protein interactions.

In the present study we focused on the anticancer effects of sErbB3 and found that the deletion of N-glycan on Asn-418 of

sErbB3 significantly enhanced the suppressive effects on heregulin signaling. Previous studies on p85-sErbB3 and TRAP-Fc suggested that they trap ligands to suppress downstream signaling; however, we have shown that sErbB3 acts on cell surface molecules (Figs. 2 and 5). We assume that sErbB3 binds to ErbB2/ErbB3 heterodimers on the cell surface, and the N418Q mutant of sErbB3 binds at a higher frequency. Because we have confirmed that ErbB2/ErbB3 heterodimers could form in the Lec3.2.8.1 cells (data not shown), sErbB3 produced in



## Functional Regulation of sErbB3 by N-Glycan



**FIGURE 9. Schematic model for heregulin signal suppression by N418Q mutant of sErbB3 and structural model of N-glycosylation on Asn-418 of sErbB3.** *A*, scheme of heregulin signal suppression by N418Q mutant of sErbB3. *B*, structural model of the tethered and extended forms of sErbB3. The place of hypothetical N-glycan on Asn-418 is indicated as a red circle.

Lec3.2.8.1 cells could bind to ErbB2 on the cell surface. It is likely that sErbB2, which lacks an intramolecular tether and is in extended form without ligands, binds to cell surface ErbB receptors more easily than sErbB3 or sErbB4. However, as shown in Fig. 1*B*, the suppressive effects of heregulin signaling of sErbB2 were far less pronounced than other sErbBs. Alvarado *et al.* (46) has suggested that conformational change of the ErbB receptor from the tethered form to the extended form is not sufficient for dimerization or activation. They consider that the fact that sErbB2 does not form homodimers or heterodimers *in vitro* (50, 51) suggests sErbB2 is stringently autoinhibited, and they presume the existence of unknown ligands for ErbB2. Deletion of N-glycan on Asn-418 of ErbB3 might cause not only conformational changes from tethered form to extended form but also other changes that increase the affinity to cell surface ErbB receptors.

Because both of the sErbB3 with high mannose type and complex type N-glycans have shown similar results (Fig. 6, *B–G*), it seems that the extent of the effect does not vary with the structural difference of the N-glycan. However, for better understanding of the role of the N-glycan, the importance of the terminal structure remains to be determined. Moreover, lectin blotting with peanut agglutinin suggested that ErbB3 has no O-glycan (data not shown), but there is no evidence that excludes the participation of O-glycan. It is necessary to clarify whether O-glycan is involved in functional regulation of ErbB.

In conclusion, the results indicate that sErbB3 exhibits strong suppressive effects on heregulin signaling by acting cell

surface ErbB receptor dimers, especially those containing ErbB3. Manipulation of N-glycan of sErbB3 enhances the suppressive effects, and up-regulates the synergistic effects with lapatinib, thereby suggesting that N-glycan is involved in the physicochemical property of ErbB3. It seems likely that sErbB3 plays a role in regulating the functional properties of the cells, such as migration, invasion, or metastasis, via inhibiting heregulin signaling. Because sErbB3 occurs naturally, the sErbB3 N418Q mutant might be a potent anticancer drug with fewer side effects.

## REFERENCES

- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003) EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol. Cell* **11**, 507–517
- Burgess, A. W., Cho, H. S., Eigenbrot, C., Ferguson, K. M., Garrett, T. P., Leahy, D. J., Lemmon, M. A., Sliwkowski, M. X., Ward, C. W., and Yokoyama, S. (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol. Cell* **12**, 541–552
- Dawson, J. P., Bu, Z., and Lemmon, M. A. (2007) Ligand-induced structural transitions in ErbB receptor extracellular domains. *Structure* **15**, 942–954
- Lemmon, M. A. (2009) Ligand-induced ErbB receptor dimerization. *Exp. Cell Res.* **315**, 638–648
- Yarden, Y., and Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–137
- Wheeler, D. L., Huang, S., Kruser, T. J., Nechrebecki, M. M., Armstrong, E. A., Benavente, S., Gondi, V., Hsu, K. T., and Harari, P. M. (2008) Mechanisms of acquired resistance to cetuximab. Role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* **27**, 3944–3956
- Hudziak, R. M., Lewis, G. D., Winget, M., Fendly, B. M., Shepard, H. M., and Ullrich, A. (1989) p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects *in vitro* and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1165–1172
- Baselga, J., Norton, L., Albanell, J., Kim, Y. M., and Mendelsohn, J. (1998) Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res.* **58**, 2825–2831
- Fry, D. W., Kraker, A. J., McMichael, A., Ambrosio, L. A., Nelson, J. M., Leopold, W. R., Connors, R. W., and Bridges, A. J. (1994) A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Science* **265**, 1093–1095
- Ward, W. H., Cook, P. N., Slater, A. M., Davies, D. H., Holdgate, G. A., and Green, L. R. (1994) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching, and discovery of a potent inhibitor. *Biochem. Pharmacol.* **48**, 659–666
- Rusnak, D. W., Affleck, K., Cockerill, S. G., Stubberfield, C., Harris, R., Page, M., Smith, K. J., Guntrip, S. B., Carter, M. C., Shaw, R. J., Jowett, A., Stables, J., Topley, P., Wood, E. R., Brignola, P. S., Kadwell, S. H., Reep, B. R., Mullin, R. J., Alligood, K. J., Keith, B. R., Crosby, R. M., Murray, D. M., Knight, W. B., Gilmer, T. M., and Lackey, K. (2001) The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors. Potential therapy for cancer. *Cancer Res.* **61**, 7196–7203
- Doherty, J. K., Bond, C., Jardim, A., Adelman, J. P., and Clinton, G. M. (1999) The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 10869–10874
- Azios, N. G., Romero, F. J., Denton, M. C., Doherty, J. K., and Clinton, G. M. (2001) Expression of herstatin, an autoinhibitor of HER-2/neu, inhibits transactivation of HER-3 by HER-2 and blocks EGF activation of the EGF receptor. *Oncogene* **20**, 5199–5209
- Lee, H., Akita, R. W., Sliwkowski, M. X., and Maihle, N. J. (2001) A naturally occurring secreted human ErbB3 receptor isoform inhibits heregulin-stimulated activation of ErbB2, ErbB3, and ErbB4. *Cancer Res.* **61**, 4467–4473
- Lindzen, M., Carvalho, S., Starr, A., Ben-Chetrit, N., Pradeep, C. R., Köstler, W. J., Rabinkov, A., Lavi, S., Bacus, S. S., and Yarden, Y. (2012) A recombinant decoy comprising EGFR and ErbB-4 inhibits tumor growth



- and metastasis. *Oncogene* **31**, 3505–3515
16. Yoon, S. J., Nakayama, K., Hikita, T., Handa, K., and Hakomori, S. I. (2006) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase is modulated by GM3 interaction with N-linked GlcNAc termini of the receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18987–18991
  17. Kawashima, N., Yoon, S. J., Itoh, K., and Nakayama, K. (2009) Tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor is regulated by GM3 binding through carbohydrate to carbohydrate interactions. *J. Biol. Chem.* **284**, 6147–6155
  18. Liu, Y. C., Yen, H. Y., Chen, C. Y., Chen, C. H., Cheng, P. F., Juan, Y. H., Chen, C. H., Khoo, K. H., Yu, C. J., Yang, P. C., Hsu, T. L., and Wong, C. H. (2011) Sialylation and fucosylation of epidermal growth factor receptor suppress its dimerization and activation in lung cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 11332–11337
  19. Tsuda, T., Ikeda, Y., and Taniguchi, N. (2000) The Asn-420-linked sugar chain in human epidermal growth factor receptor suppresses ligand-independent spontaneous oligomerization. Possible role of a specific sugar chain in controllable receptor activation. *J. Biol. Chem.* **275**, 21988–21994
  20. Sato, Y., Takahashi, M., Shibukawa, Y., Jain, S. K., Hamaoka, R., Miyagawa, J. i., Yaginuma, Y., Honke, K., Ishikawa, M., and Taniguchi, N. (2001) Overexpression of N-acetylglucosaminyltransferase III enhances the epidermal growth factor-induced phosphorylation of ERK in HeLaS3 cells by up-regulation of the internalization rate of the receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 11956–11962
  21. Gu, J., Zhao, Y., Isaji, T., Shibukawa, Y., Ihara, H., Takahashi, M., Ikeda, Y., Miyoshi, E., Honke, K., and Taniguchi, N. (2004)  $\beta$ 1,4-N-Acetylglucosaminyltransferase III down-regulates neurite outgrowth induced by costimulation of epidermal growth factor and integrins through the Ras/ERK signaling pathway in PC12 cells. *Glycobiology* **14**, 177–186
  22. Takahashi, M., Tsuda, T., Ikeda, Y., Honke, K., and Taniguchi, N. (2004) Role of N-glycans in growth factor signaling. *Glycoconj. J.* **20**, 207–212
  23. Yokoe, S., Takahashi, M., Asahi, M., Lee, S. H., Li, W., Osumi, D., Miyoshi, E., and Taniguchi, N. (2007) The Asn-418-linked N-glycan of ErbB3 plays a crucial role in preventing spontaneous heterodimerization and tumor promotion. *Cancer Res.* **67**, 1935–1942
  24. Takahashi, M., Yokoe, S., Asahi, M., Lee, S. H., Li, W., Osumi, D., Miyoshi, E., and Taniguchi, N. (2008) N-Glycan of ErbB family plays a crucial role in dimer formation and tumor promotion. *Biochim. Biophys. Acta* **1780**, 520–524
  25. Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003) The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell* **11**, 495–505
  26. Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003) Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **421**, 756–760
  27. Cho, H. S., and Leahy, D. J. (2002) Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether. *Science* **297**, 1330–1333
  28. Bouyain, S., Longo, P. A., Li, S., Ferguson, K. M., and Leahy, D. J. (2005) The extracellular region of ErbB4 adopts a tethered conformation in the absence of ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15024–15029
  29. Chen, W., and Stanley, P. (2003) Five Lec1 CHO cell mutants have distinct Mgat1 gene mutations that encode truncated N-acetylglucosaminyltransferase I. *Glycobiology* **13**, 43–50
  30. Hong, Y., and Stanley, P. (2003) Lec3 Chinese hamster ovary mutants lack UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase activity because of mutations in the epimerase domain of the Gne gene. *J. Biol. Chem.* **278**, 53045–53054
  31. Wada, Y., Tajiri, M., and Yoshida, S. (2004) Hydrophilic affinity isolation and MALDI multiple-stage tandem mass spectrometry of glycopeptides for glycoproteomics. *Anal. Chem.* **76**, 6560–6565
  32. Tajiri, M., Yoshida, S., and Wada, Y. (2005) Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins. Application of a hydrophilic affinity method for glycopeptide enrichment. *Glycobiology* **15**, 1332–1340
  33. Wada, Y., Tajiri, M., and Ohshima, S. (2010) Quantitation of saccharide compositions of O-glycans by mass spectrometry of glycopeptides and its application to rheumatoid arthritis. *J. Proteome Res.* **9**, 1367–1373
  34. Sithanandam, G., and Anderson, L. M. (2008) The ERBB3 receptor in cancer and cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther.* **15**, 413–448
  35. Baselga, J., and Swain, S. M. (2009) Novel anticancer targets. Revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 463–475
  36. Campbell, M. R., Amin, D., and Moasser, M. M. (2010) HER3 comes of age. New insights into its functions and role in signaling, tumor biology, and cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1373–1383
  37. Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunakaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., and Yarden, Y. (1996) A hierarchical network of inter-receptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5276–5287
  38. Pinkas-Kramarski, R., Soussan, L., Waterman, H., Levkowitz, G., Alroy, I., Klapper, L., Lavi, S., Seger, R., Ratzkin, B. J., Sela, M., and Yarden, Y. (1996) Diversification of Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling by combinatorial receptor interactions. *EMBO J.* **15**, 2452–2467
  39. Zhang, Q., Park, E., Kani, K., and Landgraf, R. (2012) Functional isolation of activated and unilaterally phosphorylated heterodimers of ERBB2 and ERBB3 as scaffolds in ligand-dependent signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 13237–13242
  40. Shibukawa, Y., Takahashi, M., Laffont, I., Honke, K., and Taniguchi, N. (2003) Down-regulation of hydrogen peroxide-induced PKC delta activation in N-acetylglucosaminyltransferase III-transfected HeLaS3 cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 3197–3203
  41. Isaji, T., Gu, J., Nishiuchi, R., Zhao, Y., Takahashi, M., Miyoshi, E., Honke, K., Sekiguchi, K., and Taniguchi, N. (2004) Introduction of bisecting GlcNAc into integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 reduces ligand binding and down-regulates cell adhesion and cell migration. *J. Biol. Chem.* **279**, 19747–19754
  42. Lee, S. H., Takahashi, M., Honke, K., Miyoshi, E., Osumi, D., Sakiyama, H., Ekuni, A., Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Kadomatsu, K., and Taniguchi, N. (2006) Loss of core fucosylation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 impairs its function, leading to the upregulation of serum levels of insulin-like growth factor-binding protein 3 in Fut8<sup>-/-</sup> mice. *J. Biochem.* **139**, 391–398
  43. Li, W., Takahashi, M., Shibukawa, Y., Yokoe, S., Gu, J., Miyoshi, E., Honke, K., Ikeda, Y., and Taniguchi, N. (2007) Introduction of bisecting GlcNAc in N-glycans of adenyl cyclase III enhances its activity. *Glycobiology* **17**, 655–662
  44. Osumi, D., Takahashi, M., Miyoshi, E., Yokoe, S., Lee, S. H., Noda, K., Nakamori, S., Gu, J., Ikeda, Y., Kuroki, Y., Sengoku, K., Ishikawa, M., and Taniguchi, N. (2009) Core fucosylation of E-cadherin enhances cell-cell adhesion in human colon carcinoma WiDr cells. *Cancer Sci.* **100**, 888–895
  45. Takahashi, M., Kuroki, Y., Ohtsubo, K., and Taniguchi, N. (2009) Core fucose and bisecting GlcNAc, the direct modifiers of the N-glycan core. Their functions and target proteins. *Carbohydr. Res.* **344**, 1387–1390
  46. Alvarado, D., Klein, D. E., and Lemmon, M. A. (2009) ErbB2 resembles an autoinhibited invertebrate epidermal growth factor receptor. *Nature* **461**, 287–291
  47. Petrescu, A. J., Milac, A. L., Petrescu, S. M., Dwek, R. A., and Wormald, M. R. (2004) Statistical analysis of the protein environment of N-glycosylation sites. Implications for occupancy, structure, and folding. *Glycobiology* **14**, 103–114
  48. Xu, J., He, J., Castleberry, A. M., Balasubramanian, S., Lau, A. G., and Hall, R. A. (2003) Heterodimerization of  $\alpha$ 2A- and  $\beta$ 1-adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **278**, 10770–10777
  49. Watty, A., and Burden, S. J. (2002) MuSK glycosylation restrains MuSK activation and acetylcholine receptor clustering. *J. Biol. Chem.* **277**, 50457–50462
  50. Horan, T., Wen, J., Arakawa, T., Liu, N., Brankow, D., Hu, S., Ratzkin, B., and Philo, J. S. (1995) Binding of Neu differentiation factor with the extracellular domain of Her2 and Her3. *J. Biol. Chem.* **270**, 24604–24608
  51. Ferguson, K. M., Darling, P. J., Mohan, M. J., Macatee, T. L., and Lemmon, M. A. (2000) Extracellular domains drive homo- but not hetero-dimerization of erbB receptors. *EMBO J.* **19**, 4632–4643

◎ 骨折の二次予防

# 骨折および身長低下と 生命予後の関連

田中伸哉<sup>1)</sup>\* 田中 清<sup>2)</sup> 宮島 剛<sup>1)</sup>\* 織田弘美<sup>1)</sup>\*\*

1) 埼玉医科大学整形外科 \*調師 \*\*教授 2) 京都女子大学家政学部食物栄養学科 教授

## プライマリ・ケアにおけるポイント

骨粗鬆症による大腿骨近位部骨折や脊椎圧迫骨折をはじめとした脆弱性骨折後のQOL低下は著しく、回復には長期間を要する。また、これらの骨折患者では別の部位に再び骨折を生じる危険率が高く、すみやかに骨粗鬆症の治療が導入されなければQOLの低下が繰り返される。また、大腿骨近位部骨折の発生後1年以内の死亡率は約10～30%と非常に高い。脊椎圧迫骨折についても非骨折者と比較して死亡率が高いことは多くの報告から明らかである。メタアナリシスによると骨粗鬆症治療の導入により生命予後の改善が期待できる。骨粗鬆症患者のスクリーニングと診断、未治療の骨折症例に対してはすみやかな治療導入が重要である。

### はじめに

欧米諸国で大腿骨近位部骨折の患者数が減少しつつあるなか、日本では高齢化に伴い患者数の増加が続いている。骨粗鬆症関連骨折の発生は生活の質の低下をもたらすのみでなく、消化器、呼吸器、循環器疾患を引き起こし、さらには死亡率を上昇させる。近年の研究により、骨粗鬆症関連

骨折や身長低下は合併する内臓疾患とは独立した死亡の予測因子であることが明らかになった。骨粗鬆症治療により死亡率の上昇を抑制できる可能性がある。骨折に先立つ骨粗鬆症の診断・治療、未治療の骨折症例であれば骨折発生後すみやかな治療の導入が重要である。

## I 骨粗鬆症関連骨折の発生率

オーストラリアのダボ(Dubbo)では60歳以上の住民を対象として、骨粗鬆症の前向き研究が行われている<sup>1)</sup>。この研究によると1989～2000年の12年間に生じた大腿骨近位部骨折(大腿骨頸部骨折と転子部骨折)の発生率は女性が759±57/100,000人・年、男性が329±45/100,000人・年であり、骨粗鬆症関連骨折は女性では年間4%ずつ、男性では6%ずつ減少している。鳥取県でHaginoらが医療機関のデータをもとに35歳以上

の患者を対象に行った調査によると<sup>2)</sup>、2004～2006年の大腿骨近位部骨折の発生は244.8/100,000人・年(女性の発生が368.0/100,000人・年、男性が99.1/100,000人・年)であり、50歳以上の女性が一生のうちに大腿骨近位部骨折を起こす危険率は20.0%であり、男性の危険率は5.6%であった。1986～1988年の骨折数と比較すると、女性では3.3倍に、男性では2.3倍に増加しており、高齢化がその一因と考えられる。日本全国の医療

機関を対象とした調査によると、男女とも高齢者における大腿骨近位部骨折の発生は増加の一途を辿っている<sup>3)</sup>。

生活環境の違いや人種差も骨折の発生率に影響する。Rossらは、広島在住の日本人女性はハワイの日系アメリカ人に対して椎体骨折のオッズ比が1.8 (95%信頼区間(confidence interval: CI): 1.3~2.5)であり、2椎体以上の骨折については3.2 (95%CI: 2.0~5.2)であったと報告している。ミネソタのコカシアンは日系アメリカ人に対して椎体骨折のオッズ比が1.5 (95%CI: 1.1~2.1)、2椎体以上の骨折に

ついては1.9 (1.2~3.2)であった<sup>4)</sup>。

椎体骨折について、Cooperはアメリカ合衆国在住の50歳以上の白人女性を対象に調査を行い、疼痛を伴う臨床的椎体骨折の発生率は5.3/1,000人・年であり、35%が罹患すると述べている<sup>5)</sup>。このなかで、X線学的な椎体骨折の発生率は約3倍の15.1/1,000人・年であったとしている。ただし、臨床の場ではX線学的椎体骨折を正確に診断することは難しい。身長低下や胸椎後弯の程度、さらに、年齢、身長、骨粗鬆症の有無を加味したスクリーニング法が有用とされている<sup>6~8)</sup>。

## II 骨粗鬆症関連骨折の臨床上の問題点と引き続き骨折および身長低下と死亡率

### ① 生活の質の低下

70~79歳の762人の男女を対象とした縦断的コホート研究によると、大腿骨近位部骨折、脊椎骨折、上腕骨折患者では、「旋回」、「速歩」、「椅子からの立ちあがり」、「足底でのタップ」、「つぎ足起立」、「握力」、「片脚立ち」、「バランス能力」の8項目のうち7項目に低下がみられた<sup>9)</sup>。また、55歳以上の女性1,010人を対象にした横断コホート研究によると、大腿骨近位部骨折のオッズ比は歩行能力の低下が3.6、階段を下る困難さが4.1であった。椎体骨折のオッズ比は前屈の困難さが3.1、物をもつ困難さが3.4、階段を下る困難さが4.2であった<sup>10)</sup>。また、生活の質(quality of life: QOL)の低下は手関節部の骨折では6ヵ月で受傷前とほぼ同等に回復するが、大腿骨近位部骨折では最も長引き1年経過しても完全に回復しないことが多い。椎体骨折や身長低下はQOL低下の独立した予測因子である。椎体骨折後のQOL回復にはほぼ1年を要する<sup>11,12)</sup>。

### ② 骨粗鬆症関連骨折の合併症

一方の股関節に骨折が生じた場合、反対側も骨

折が生じる危険性は2.1~4倍と報告されている。また、椎体変形や既存の椎体骨折はほかの部位の椎体骨折や大腿骨近位部骨折の予測因子となる。たとえば、既存の椎体骨折がある場合、大腿骨近位部骨折を生じる危険性は2.3倍になり、他部位に新たな椎体骨折を生じる危険性は4.4倍になる<sup>13~15)</sup>。大腿骨近位部骨折を生じた患者の81.9%に既存の椎体骨折が生じていたことが報告されている<sup>16)</sup>。さらに、椎体骨折についての詳細な検討の結果、1椎体に既存の骨折がある場合、1年間に新たな椎体骨折を生じる危険性は3.4倍であり、2椎体以上に骨折がある場合は7倍であると報告されている<sup>17)</sup>。

### ③ 骨折および身長低下と死亡率

骨粗鬆症関連骨折のある住民では死亡率が増加することが示唆されている。大腿骨近位部骨折後の死亡率の比は年齢と性別で標準化すると、女性が2.18~2.43、男性が3.17~3.51、椎体骨折ではそれぞれ1.66~1.82、2.12~2.38、主要骨粗鬆症骨折では1.65~1.92、2.22~1.70と報告されている<sup>18,19)</sup>。椎体骨折や脊椎後弯の増強、身長低



表1 年齢により層別化したコックス回帰解析によるすべての死因に関するハザード比

1994～1995年のベースラインにおける因子		ハザード比	95%信頼区間
性別	女性/男性	0.39	0.28～0.53**
40代に始まる2cm以上の身長低下	あり/なし	1.76	1.31～2.38**
悪性腫瘍の既往	あり/なし	1.55	1.12～2.15**
心血管疾患の既往	あり/なし	1.32	1.03～1.71*
糖尿病の既往	あり/なし	1.48	1.07～2.05*
放射線被曝線量	1 Gyの増加当たり	1.22	1.01～1.48*
飲酒習慣	時々/なし	1.14	0.82～1.57
	しばしば/なし	0.55	0.36～0.84**
	過去に/なし	1.86	1.02～3.39*
	不明/なし	0.71	0.51～0.99*

\* : p<0.05,  
\*\* : p<0.01.

(文献35)より)

下は食道裂孔ヘルニア、逆流性食道炎、肺機能低下や心血管疾患に関連し、死亡率の上昇にも影響することが示唆される<sup>20-25)</sup>。しかし、FIT試験(fracture interventional trial)に参加した55～81歳の女性、6,459人を対象とした前向き研究により、椎体骨折、大腿骨近位部骨折は合併症とは独立した死亡の予測因子であり<sup>26)</sup>、さらに椎体変形については年齢、治療、喫煙、活動性、高血圧、冠動脈疾患、閉塞性肺疾患、健康状態、股関節部骨密度、BMIで補正しても死亡の相対危険率は1.14(95%CI:1.02～1.27)であることが明らかになった<sup>27)</sup>。椎体変形や既存の椎体骨折は骨密度とは独立した新たな椎体骨折の予測因子であることから<sup>28-30)</sup>、引き続き生じる椎体骨折によって体型が変化し、内臓疾患の併発に伴い死亡率が上昇するものと考えがちだが、3,124人の女性について65歳時と80歳時に身長測定と脊椎X線撮影を行ったHillerらの前向き研究により、5cm以上の身長低下が、椎体骨折および骨密度とは独立した死亡率上昇の予測因子(ハザード比:1.41(95%CI:1.09～1.83))であることが明か

になった<sup>31)</sup>。

わが国においては、Shirakiらが既存の主要骨粗鬆症骨折は年齢、認知症、心血管疾患、血清クレアチニン値とは独立した死亡の予測因子であると報告している(ハザード比:1.390(95%CI:1.129～1.719))<sup>32)</sup>。また、Ikedaらは60～80歳の女性419人と男性210人について調査し、10年間の生存率は椎体骨折がない場合が86%、1～2椎体に骨折がある場合が69%、3椎体以上に骨折がある場合が50%であったこと、年齢、性別、椎体骨折が独立した死亡の予測因子であることを明らかにしている<sup>33)</sup>。椎体骨折の死亡についてのハザード比は3.28(95%CI:1.77～6.10)であった。中野らは若年での椎体骨折および男性であることにより死亡率が上昇すると述べている<sup>34)</sup>。原子爆弾の被曝者を対象とした研究であるが、Masunariらによると、40代に始まる2cm以上の身長低下が性別、悪性腫瘍、心血管疾患、糖尿病、放射線被曝線量、飲酒とは独立した死亡の予測因子とされている(ハザード比:1.76(95%CI:1.31～2.38))。表1)<sup>35)</sup>。

### III 骨粗鬆症治療による骨折の抑制と生命予後

高齢者が骨折を生じること自体が死亡率を上昇させるのか、骨折を容易に生じる高齢者であるから死亡率が高いのか疑問が生じる。すなわち、骨

粗鬆症関連骨折の抑制が骨粗鬆症治療薬の投与により死亡率を抑制できるか否かが問題になる。Bollandらは二重盲検ランダム化プラセボコント

表2 死亡に対する骨粗鬆症治療の効果

薬剤	研究	治療群n/N	対照群n/N	相対リスク(95%信頼区間)	Weight (%)
アンドロネート	Black, 1996	24/1,022	21/1,005	1.12 (0.63~2.01)	3
	Cummings, 1998	37/2,214	40/2,218	0.93 (0.59~1.44)	5
	計	61/3,236	61/3,223	1.00 (0.70~1.41)	p=0.98
リセドロネート	Harris, 1999	15/813	15/815	0.94 (0.47~1.89)	2
	Reginster, 2000	11/407	17/407	0.65 (0.31~1.36)	2
	McClung, 2001	114/3,162	127/3,184	0.90 (0.71~1.16)	17
	計	140/4,382	160/4,406	0.88 (0.70~1.10)	p=0.27
ストロンチウム*	Meunier, 2004	29/826	21/814	1.36 (0.78~2.37)	3
	Reginster, 2005	142/2,526	159/2,503	0.88 (0.71~1.10)	21
	計	171/3,352	180/3,317	1.94 (0.77~1.15)	p=0.54
ゾレドロネート	Black, 2007	130/3,862	112/3,852	1.16 (0.90~1.48)	15
	Lyles, 2007	101/1,054	141/1,057	0.72 (0.56~0.91)	19
	計	231/4,916	253/4,909	0.90 (0.76~1.08)	p=0.26
デノスマブ**	Cummings, 2008	70/3,902	90/3,906	0.78 (0.57~1.06)	12
	計	70/3,902	90/3,906	0.78 (0.57~1.06)	p=0.11
	総計	673/19,788	744/19,761	0.90 (0.81~1.00)	p=0.044

Test for heterogeneity=23%, p=0.23

0.5 0.7 1 1.4 2  
治療群優位 対照群優位

\* : 日本ではストロンチウムは未認証。  
 \*\* : デノスマブの日本での適応は多発性骨髄腫による骨病変および固形がん骨転移による骨病変。(文献36)より

ロール研究(double-blind random controlled trial : RCT)によって骨折抑制効果の確認された薬剤について、死亡率の低下をエンドポイントに再解析を行い、骨粗鬆症治療により有意に死亡率が抑制されることを明らかにした(相対リスク0.90 (95%CI : 0.81 ~ 1.00, p=0.044), 表2)<sup>39)</sup>。

すでに椎体骨折がある患者に対して、薬物治療は引き続き他部位の椎体骨折や大腿骨近位部骨折を著明に抑制する。骨粗鬆症患者は椎体骨折に起因する急性もしくは慢性の腰背部痛を主訴に受診することが多く、的確な診断・治療の開始が引き続き骨折、さらには死亡率の上昇を防止することにつながる。現在、骨粗鬆症治療の主体は骨吸収抑制薬であるが、これにはビスホスホネート、選択的エストロゲン受容体調整薬(selective estrogen receptor modulator : SERM)、カルシトニンがある。RCTによりビスホスホネートは椎体骨折および非椎体骨折の危険率を減少することが報告されており、SERMやカルシトニンについても椎体骨折の抑制効果が報告されている<sup>37~41)</sup>。SERM

の骨密度増加効果は著明でないものの、椎体骨折の既往の有無にかかわらず、椎体骨折の発生を抑制する。注射薬であるカルシトニンは椎体骨折後の疼痛の抑制や日常生活動作制限の改善に有効であり、また、多種類の内服薬を使用している患者にも使用しやすい。重度の骨密度低下のない新鮮椎体骨折患者に対する骨粗鬆症治療の導入に有効である。また、ビタミンDについては、老人ホームやアパート住まいの高齢者を対象とした研究において、カルシウムとの併用により非椎体骨折を32%、股関節部の骨折を43%減少させたとの報告がある<sup>42)</sup>。骨形成促進薬である副甲状腺ホルモン誘導体テリパラチドは閉経後女性の椎体骨折および非椎体骨折を抑制する<sup>43)</sup>。椎体骨折による背部痛発生の抑制効果についても報告されており、骨密度の低下した患者の新鮮椎体骨折発症時の第一選択薬と考えられる。

骨粗鬆症治療により椎体骨折の危険率は明らかに抑制され、非椎体骨折についても抑制効果の報告が散見される。骨粗鬆症治療は骨粗鬆症の可能



性のある患者に対してすみやかに導入されるべきである。椎体骨折や非椎体骨折の抑制により虚弱な高齢者の背部痛や日常生活動作の制限を予防し

QOLを維持できること、さらに合併症の予防にもつながることを念頭に置く必要がある。



参考文献

- 1) Chang KP, Center JR, Nguyen TV, et al: Incidence of hip and other osteoporotic fractures in elderly men and women: Dubbo Osteoporosis Epidemiology Study. *J Bone Miner Res*, 19 (4) : 532-536, 2004.
- 2) Hagino H, Katagiri H, Okano T, et al: Increasing incidence of hip fracture in Tottori Prefecture, Japan: trend from 1986 to 2001. *Osteoporos Int*, 16 (12) : 1963-1968, 2005.
- 3) Hagino H, Sakamoto K, Harada A, et al: Nationwide one-decade survey of hip fractures in Japan. *J Orthop Sci*, 15 (6) : 737-745, 2010.
- 4) Ross PD, Fujiwara S, Huang C, et al: Vertebral fracture prevalence in women in Hiroshima compared to Caucasians or Japanese in the US. *Int J Epidemiol*, 24 (6) : 1171-1177, 1995.
- 5) Cooper C, Melton LJ: Vertebral fractures. *BMJ*, 304 (6830) : 793-794, 1992.
- 6) Ensrud KE, Black DM, Harris F, et al: Correlates of kyphosis in older women. The Fracture Intervention Trial Research Group. *J Am Geriatr Soc*, 45 (6) : 682-687, 1997.
- 7) Coles RJ, Clements DG, Evans WD: Measurement of height: practical considerations for the study of osteoporosis. *Osteoporos Int*, 4 (6) : 353-356, 1994.
- 8) Vogt TM, Ross PD, Palermo L, et al: Vertebral fracture prevalence among women screened for the Fracture Intervention Trial and a simple clinical tool to screen for undiagnosed vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. *Mayo Clin Proc*, 75 (9) : 888-896, 2000.
- 9) Greendale GA, DeAmicis TA, Bucur A, et al: A prospective study of the effect of fracture on measured physical performance: results from the MacArthur Study-MAC. *J Am Geriatr Soc*, 48 (5) : 546-549, 2000.
- 10) Greendale GA, Barrett-Connor E, Ingles S, et al: Late physical and functional effects of osteoporotic fracture in women: the Rancho Bernardo Study. *J Am Geriatr Soc*, 43 (9) : 955-961, 1995.
- 11) Hagino H, Nakamura T, Fujiwara S, Oeki M, et al: Sequential change in quality of life for patients with incident clinical fractures: a prospective study. *Osteoporos Int*, 20 (5) : 695-702, 2009.
- 12) Masunari N, Fujiwara S, Nakata Y, et al: Historical height loss, vertebral deformity, and health-related quality of life in Hiroshima cohort study. *Osteoporos Int*, 18 (11) : 1493-1499, 2007.
- 13) Klotzbeucher CM, Ross PD, Landsman PB, et al: Patients with prior fracture have an increase risk of future fractures: a summary of the literature and statistical synthesis. *J Bone Miner Res*, 15 (4) : 721-739, 2000.
- 14) Hagino H, Sawaguchi T, Endo N, et al: The risk of a second hip fracture in patients after their first hip fracture. *Calcif Tissue Int*, 90 (1) : 14-21, 2012.
- 15) Black DM, Arden NK, Palermo L, et al: Prevalent vertebral deformities predict hip fractures and new vertebral deformities but not wrist fractures. Study of osteoporotic fractures research group. *J Bone Miner Res*, 14 (5) : 821-828, 1999.
- 16) Sakuma M, Endo N, Oinuma T, et al: Incidence and outcome of osteoporotic fractures in 2004 in Sado City, Niigata Prefecture, Japan. *J Bone Miner, Metab*, 26 (4) : 373-378, 2008.
- 17) Lindsay R, Silverman SL, Cooper C, et al: Risk of new vertebral fracture in the year following a fracture. *JAMA*, 285 (3) : 320-323, 2001.
- 18) Bliuc D, Nguyen ND, Milch VE, et al: Mortality risk associated with low-trauma osteoporotic fracture and subsequent fracture in men and women. *JAMA*, 301 (5) : 513-521, 2009.
- 19) Center JR, Nguyen TV, Schneider D, et al: Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study. *Lancet*, 353 (9156) : 878-882, 1999.
- 20) Yamaguchi T, Sugimoto T, Yamada H, et al: The presence and severity of vertebral fractures is associated with the presence of esophageal hiatal hernia in postmenopausal women. *Osteoporos Int*, 13 (4) : 331-336, 2002.
- 21) Schlaich C, Minne HW, Bruckner T, et al: Reduced pulmonary function in patients with spinal osteoporotic fractures. *Osteoporos Int*, 8 (3) : 261-267, 1998.
- 22) Cooper C, Atkinson EJ, Jacobsen SJ, et al: Population-based study of survival after osteoporotic fractures. *Am J Epidemiol*, 137 (9) : 1001-1005, 1993.
- 23) Ismail AA, O'Neill TW, Cooper C, et al: Mortality associated with vertebral deformity in men and women: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Osteoporos Int*, 8 (3) : 291-297, 1998.
- 24) von der Recke P, Hansen MA, Hassager C: The association between low bone mass at the menopause and cardiovascular mortality. *Am J Med*, 106 (3) : 273-278, 1999.

- 25) Wannamethee SG, Shaper AG, Lennon L, et al: Height loss in older men: associations with total mortality and incidence of cardiovascular disease. *Arch Intern Med*, 166 (22) : 2546-2552, 2006.
- 26) Cauley JA, Thompson DE, Ensrud KC, et al: Risk of mortality following clinical fractures. *Osteoporos Int*, 11 (7) : 556-561, 2000.
- 27) Ensrud KE, Thompson DE, Cauley JA, et al: Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass. Fracture Intervention Trial Research Group. *J Am Geriatr Soc*, 48 (3) : 241-249, 2000.
- 28) Lunt M, O'Neill TW, Felsenberg D, et al: Characteristics of a prevalent vertebral deformity predict subsequent vertebral fracture: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Bone*, 33 (4) : 505-513, 2003.
- 29) Hasselius R, Karlsson MK, Nilsson BE, et al: Prevalent vertebral deformities predict increased mortality and increased fracture rate in both men and women: a 10-year population-based study of 598 individuals from the Swedish cohort in the European Vertebral Osteoporosis Study. *Osteoporos Int*, 14 (1) : 61-68, 2003.
- 30) Morosano ME, Menoyo I, Caferra DA, et al: Vulnerability of healthy vertebrae in patients with and without previous vertebral fracture. *Bone*, 48 (4) : 820-827, 2011.
- 31) Hillier TA, Lui LY, Kado DM, et al: Height loss in older women: Risk of hip fracture and mortality independent of vertebral fractures. *J Bone Miner Res*. doi: 10.1002/jbmr.558, 2011.
- 32) Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S: Established osteoporosis associated with high mortality after adjustment for age and comorbidities in postmenopausal Japanese women. *Intern Med*, 50 (5) : 397-404, 2011.
- 33) Ikeda Y, Sudo A, Yamada T, et al: Mortality after vertebral fractures in a Japanese population. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 18 (2) : 148-152, 2010.
- 34) 中野哲雄: 骨粗鬆症性椎体圧迫骨折の死亡率. *Osteoporosis Jpn*, 17 (2) : 207-210, 2009.
- 35) Masunari N, Fujiwara S, Kasagi F, et al: Height loss starting in middle age predicts increased mortality in elderly. *J Bone Miner Res*. doi: 10.1002/jbmr.513, 2011.
- 36) Bolland MJ, Grey AB, Gamble GD, et al: Effect of osteoporosis treatment on mortality: a meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*, 95 (3) : 1174-1181, 2010.
- 37) Reginster J, Minne HW, Sorensen OH, et al: Randomized trial of the effects of risedronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *Osteoporos Int*, 11 (1) : 83-91, 2000.
- 38) Black DM, Thompson DE, Bauer DC, et al: Fracture risk reduction with alendronate in women with osteoporosis: the Fracture Intervention Trial. FIT Research Group. *J Clin Endocrinol Metab*, 85 (11) : 4118-4124, 2000.
- 39) Harris ST, Watts NB, Genant HK, et al: Effects of risedronate treatment on vertebral and nonvertebral fractures in women with postmenopausal osteoporosis: a randomized controlled trial. Vertebral Efficacy With Risedronate Therapy (VERT) Study Group. *JAMA*, 282 (14) : 1344-1352, 1999.
- 40) Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, et al: Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA*, 282 (7) : 637-645, 1999.
- 41) Chesnut CH 3rd, Silverman S, Andriano K, et al: A randomized trial of nasal spray salmon calcitonin in postmenopausal women with established osteoporosis: the prevent recurrence of osteoporotic fractures study. PROOF Study Group. *Am J Med*, 109 (4) : 267-276, 2000.
- 42) Chapuy MC, Arlot ME, Dubœuf F, et al: Vitamin D3 and calcium to prevent hip fractures in the elderly women. *N Engl J Med*, 327 (23) : 1637-1642, 1992.
- 43) Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, et al: Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med*, 344 (19) : 1434-1441, 2001.



## 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

田中伸哉<sup>1)</sup> 石井正明<sup>2)</sup> 河野義彦<sup>1,3)</sup> 宮島 剛<sup>1,4)</sup>  
足立善博<sup>5)</sup> 斉藤文則<sup>6)</sup> 織田弘美<sup>1)</sup>

### 背 景

副甲状腺ホルモン (PTH) の 1~34 番目のアミノ酸に相当するペプチド (以下テリパラチド) の間歇投与が骨芽細胞性骨形成を促進することが明らかにされてきた。テリパラチドの間歇投与は骨形成を促進するが、両薬剤の第 3 相臨床試験の結果、投与間隔によって骨代謝マーカーの推移に違いが生じることが明らかになった<sup>1,2)</sup>。連日投与では骨芽細胞の初期の分化マーカーである、PINP が上昇し、週 1 回投与では成熟骨芽細胞の分化マーカーであるオステオカルシンが上昇する。

骨折部位において、初期には I 型コラーゲン合成が促進されることから、幼弱な骨芽細胞が動員され旺盛な仮骨形成が起こり、リモデリング期にはオステオカルシン (OC) を分泌する成熟した骨芽細胞により層板骨の形成が行われると考えられる<sup>3)</sup>。椎体骨折治癒期において、テリパラチドの投与間隔の違いが、骨折の治癒、疼痛、生活の質 (quality of life) にいかなる影響を与えるか明らかにすることで、連日投与と週 1 回投与の 2 剤の投与に適した病態を明らかにできる可能性がある。

### 1 目 的

本研究の目的は骨粗鬆症による脆弱性椎体骨

折を生じた患者に、テリパラチドの連日間歇投与もしくは週 1 回間歇投与を行い、骨代謝マーカーの推移にどのような違いがみられるか明らかにすることと、患者の QOL の改善にどのような違いが生じるか明らかにすることである。

### 2 対 象

現病歴、理学所見、エックス線もしくは MRI 所見より、2 週間以内に発生したと判断される骨粗鬆症による新鮮椎体骨折を有する 60 歳以上の閉経後女性で、臨床試験の主旨を理解し、本臨床試験参加の文書同意が得られた患者を対象とした。ただし、この研究を行うにあたり定めた「重症骨粗鬆症の判断基準」(表 1) を参照にし、テリパラチドの適応については、骨折治癒促進作用を考慮し新規脆弱性骨折がある場合は別に 1 点を付加し 3 点以上になる症例に限定した。

#### 【除外対象】

① 続発性骨粗鬆症患者、もしくは②その他、担当医師が本研究の対象として不適と判断した患者は除外対象とした。

#### 【臨床試験デザイン】

埼玉医科大学病院、埼玉医科大学かわごえクリニック、小川日本赤十字病院、関越病院、若葉病院の 5 施設共同で研究を行い、中央割付に

**Key words** : テリパラチド、骨代謝マーカー、骨粗鬆症患者 QOL 評価質問表 (JOQOL)、Roland Morris disability questionnaire (RDQ)

<sup>1)</sup> 埼玉医科大学整形外科、<sup>2)</sup> 関越病院整形外科、<sup>3)</sup> 武蔵台病院整形外科、<sup>4)</sup> 埼玉医科大学かわごえクリニック骨粗鬆症外来、<sup>5)</sup> 若葉病院整形外科、<sup>6)</sup> 小川日本赤十字病院整形外科

よる無作為化比較試験 (RCT) とした。割付因子は年齢, 陳旧性椎体骨折数とした。

#### 【方 法】

試験群は, ①テリパラチド 20  $\mu$ g 連日投与群 (フォルテオ<sup>®</sup>皮下注キット 600  $\mu$ g); dTPD 群, ②テリパラチド 56.5  $\mu$ g 週 1 回投与群 (テリボン<sup>®</sup>皮下注用 56.5  $\mu$ g); wTPD 群, とし, それぞれの用法用量に従って 24 週間投与する。また, 各群 L-アスパラ銀酸カルシウム水和物を 400 mg/day 併用する。

#### 【検査項目】

骨密度測定 (腰椎・大腿骨頸部) (埼玉医科大学病院, 埼玉医科大学かわごえクリニック, 関越病院のみ) (0 週, 24 週)

脊椎エックス線撮影; 新規骨折椎体中心の仰臥位および立位側面像と立位正面像 (0 週, 4 週, 8 週, 12 週, 24 週), 胸椎・胸腰椎移行部・腰椎 3 部位の立位正面像と側面像 (0 週, 24 週)

骨代謝マーカー: procollagen type I amino-terminal propeptide (P1NP), bone alkaline phosphatase (BAP), osteocalcin (OC), under-carboxylated osteocalcin (ucOC), tartrate resistant acid-phosphatase-5b (TRACP-5b), urinary type I collagen cross-linked N-telopeptide (uNTX) (0 週, 4 週, 8 週, 12 週, 24 週)

#### 25(OH)D (0 週)

患者自記式の腰背部痛 (visual analog scale: VAS), 生活の質アンケート調査 (骨粗鬆症患者 QOL 評価質問表: the Japanese osteoporosis quality of life questionnaire: JOQOL 調査表), および腰痛による日常生活動作 (activity of daily living: ADL) 調査 (Roland Morris disability questionnaire: RDQ), 上部消化管障害 (gastroesophageal reflux disorder: GERD) 調査 (the quality of life and utility evaluation survey technology questionnaire: QUEST) を実施する (0 週, 4 週, 8 週, 12 週, 24 週)。

#### 【臨床試験期間中に許容される治療・処置】

下記の治療・処置に制限は設けないが, 処置・処方内容および期間について記録する。①温熱療法, 干渉波など, ②着脱可能な体幹装具の装

着 (体幹ギブスは除く), ③各種鎮痛薬 (経口, 坐剤, 経皮)

#### 【統 計】

試験開始時の両群の調査項目については Mann-Whitney U 検定を用いて行った。

### 3 結 果

#### 1) 試験開始時年齢および諸検査データ

2012 年 8 月から 2013 年 8 月までの間に 10 症例が研究に登録された (表 2)。dTPD 群が 4 症例, wTPD 群が 6 症例であった。年齢, 陳旧性椎体骨折数を用いた最小化法によりランダム化を行った結果, 現時点では, 年齢, 身長, 体重, 陳旧性椎体骨折数, および P1NP; BAP, OC, ucOC, TRACP-5b, 25(OH)D の血中濃度と, uNTX 濃度, 腰椎 BMD, 大腿骨頸部 BMD, 全大腿骨近位部 BMD (%YAM で判定), VAS, JOQOL, RDQ, QUEST のいずれにも有意差は認めなかった (表 3)。

25(OH)D の血中濃度は 1 症例を除いて全員が 20ng/mL 以下であった。

#### 2) 脱落症例

dTPD 群の 1 症例, wTPD 群の 2 症例が試験開始後に脱落した。dTPD 群の 1 症例は開始直後から強い嘔気が生じた。制吐剤, 服用前の水分摂取など方法を講じたが症状を緩和することができなかった。wTPD 群の 2 症例の脱落理由は腎機能の悪化と認知症の悪化であった。腎機能悪化の 1 症例は登録後間もなく他医により指摘を受け中止したものであり, wPTH の副作用というよりは当初より除外すべき症例であった。認知症悪化は 12 週から 24 週の間に着しくなり, 家族から 24 週目の質問表への回答が困難であるという報告を受けた。骨代謝マーカー測定および脊椎エックス線撮影は行うことができた。

#### 3) 骨折治癒

dTPD 群の 1 症例 (dTPD3) および (wTPD2) のそれぞれ 1 症例は骨折治癒の確認に 12 週を要したが, 他の症例では 4 週ないし 8 週で骨癒合が確認された。dTPD 群の 1 症例では, 当初の腰痛の原因となった骨折椎体の骨癒合は 4 週目の



表 1 この研究を行うに際し考案した重症骨粗鬆症の基準

骨折リスク因子	点
70%YAM $\geq$ BMD>65%	1
65%YAM $\geq$ BMD>60%	2
60%YAM $\geq$ BMD	3
ステロイド投与	1
既存椎体骨折	1 椎体 1 2 椎体以上 2
合計	3 $\leq$

新規脆弱性骨折がある場合はさらに 1 点を付加し、3 点以上であればテリパラチド投与の適応とする。

表 2 症例の概要

群	症例番号	年齢(歳)
テリパラチド 連日投与 (dTPD) 群	dTPD1	76
	dTPD2	84
	dTPD3	81
	dTPD4	75
テリパラチド 週 1 回投与 (wTDP) 群	wTPD1	68
	wTPD2	74
	wTPD3	86
	wTPD4	82
	wTPD5	85
	wTPD6	85

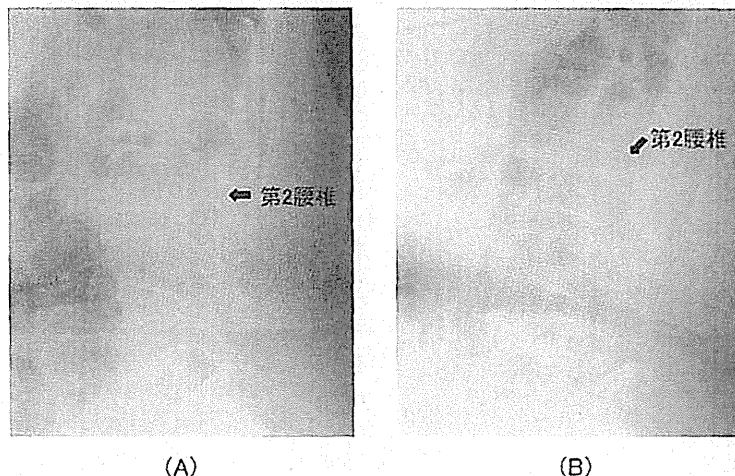


図 1 4 週で骨癒合したが 12 週で他椎体に骨折を生じた症例  
研究登録時の腰椎側面エックス線像 (A) と 12 週後の腰椎側面エックス線像 (B)。第 4 腰椎は骨癒合しているが、第 2 腰椎に新たな椎体骨折が生じた。

エックス線像で確認されたが、12 週目のエックス線像で新たに第 2 腰椎の骨折が観察された (dTPD1) (図 1A, B)。12 週目のエックス線像で骨癒合が確認された dTPD3 および wTPD2 の 2 症例は第 2~4 腰椎の骨密度がそれぞれ若年成人平均の 37% と 47% であった。wTPD2 では 12 週目のエックス線像で第 9 胸椎の骨折が生じ、24 週のエックス線像で第 10 胸椎に骨折が生じていた (図 2A, B)。

#### 4) 骨代謝マーカーの推移

dTPD 群の採血・採尿はテリパラチドの最終投与から約 1 日を経て行った。dTPD 群ではいずれのマーカーもベースラインより上昇する傾向があった。現時点では有意差検定を行っていない。24 週の時点で PINP の上昇は約 5 倍になっており、ucOC は PINP の上昇に続いている。OC の上昇は 3 倍程度となっているが、BAP の上昇は予想より緩やかである。uNTX および TRACP-5b

骨粗鬆症治療薬内服歴	陳急性椎体骨折数	新規椎体骨折の部位	骨密度 (%YAM)			エックス線像で骨折治癒が確認できる時期	経過中の新たな骨折	備考
			第 2~4 腰椎	左大腿骨頸部	左全股関節部			
なし	2	第 3 腰椎	86	76	78	4 週	なし	
なし	2	第 11 胸椎	73	87	93	4 週	なし	
なし	4	第 2 腰椎	37	66	62	12 週	なし	
なし	1	第 12 胸椎	82	65	72	不検	不検	悪心のため脱落
なし	5	第 4 腰椎	62	74	79	4 週	第 2 腰椎	
なし	3	第 8 胸椎	47	52	49	12 週	第 9, 10 胸椎	
なし	2	第 7, 8 胸椎	不検	不検	不検	8 週	なし	認知症悪化
なし	2	第 4 腰椎	103	74	79	8 週	現状でなし	
なし	5	第 11 胸椎	70	67	67	観察中	現状でなし	
なし	2	第 12 胸椎	不検	不検	不検	不検	不検	腎不全で脱落

表 3 テリパラチド連日投与群 (dTPD 群) とテリパラチド週 1 投与群 (wTPD 群) の試験開始時の各検査項目の比較

	dTPD (n=4)	wTPD (n=6)*	Mann-Whitney U 検定
年齢 (歳)	79.4±4.07	79.2±7.24	NS
身長 (cm)	145.7±8.39	147.1±7.16	NS
体重 (kg)	51.2±10.78	51.1±6.52	NS
陳旧性椎体骨折数 (個)	2.3±1.26	3.1±1.47	NS
P1NP (mg/L)	45.0±12.22	74.2±31.17	NS
BAP (mg/L)	17.6±7.38	23.1±10.29	NS
OC (ng/L)	7.0±0.98	9.7±6.59	NS
ucOC (ng/mL)	3.26±0.43	9.8±4.03	NS
TRACP-5b (mU/dL)	345.3±73.65	516.3±228.49	NS
uNTX (nmolBCE/mmol・CRE)	54.8±15.15	60.4±41.29	NS
25(OH)D (ng/mL)	18.75±1.5	18.2±6.05	NS
BMD (L2-4) (%YAM)	69.5±22.34	70.5±23.67	NS
BMD (Left Femoral Neck) (%YAM)	73.5±22.34	65.5±12.77	NS
BMD (Left Hip Total) (%YAM)	76.3±12.97	71.25±15.24	NS
VAS	69.7±15.37	67.0±22.70	NS
JOQOL	61.2±14.90	51.3±13.38	NS
RDQ	13.3±7.23	14.8±8.87	NS
QUEST	4.3±4.04	2.4±3.58	NS

P1NP : procollagen type I amino-terminal propeptide, BAP : bone alkaline phosphatase, OC : osteocalcin, ucOC : under-carboxylated osteocalcin, TRACP-5b : tartrate resistant acid-phosphatase-5b, uNTX : urinary type I collagen cross-linked N-telopeptide, VAS : visual analogue scale, JOQOL : the Japanese osteoporosis quality of life questionnaire, RDQ : Roland Morris disability questionnaire, QUEST : the quality of life and utility evaluation survey technology questionnaire

\* : 骨密度測定は n=4

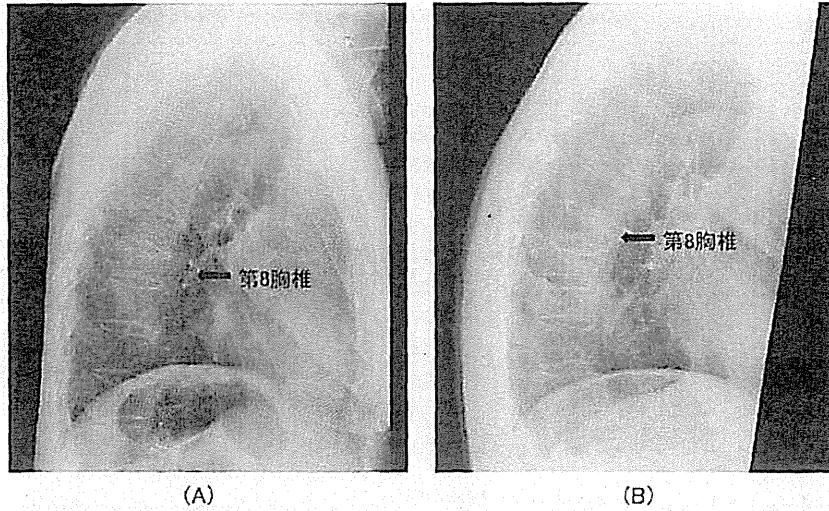


図 2 12 週で他の椎体に骨折を生じ VAS, JOQOL の悪化がみられた症例  
研究に登録した際の胸椎エックス線側面像 (A) と 24 週後の胸椎エックス線側面  
像 (B)。研究期間中第 9, 10 胸椎に新たな椎体骨折が生じた。

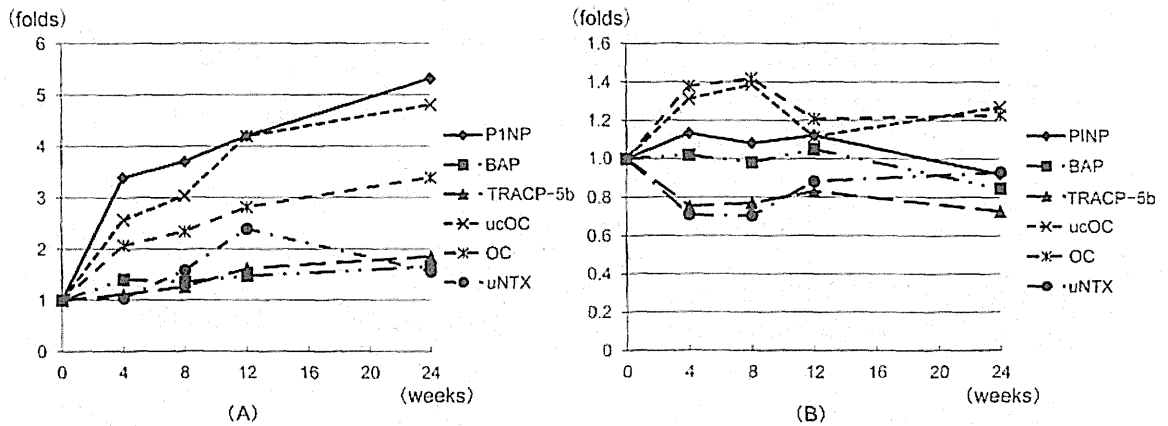


図 3 テリパラチド連日投与群 (dTPD 群) とテリパラチド週 1 投与群 (wTPD 群) の骨代謝マーカーの推移  
dTPD 群におけるマーカーの推移 (A) と wTPD 群のマーカーの変化 (B)

P1NP : procollagen type I amino-terminal propeptide, BAP : bone alkaline phosphatase, OC : osteocalcin, ucOC : under-carboxylated osteocalcin, TRACP-5b : tartrate resistant acid-phosphatase-5b, uNTX : urinary type I collagen cross-linked N-telopeptide

も 24 週で 2 倍程度に上昇している (図 3A)。  
wPTH 群の採血・採尿はテリパラチドの最終  
投与から 1 週間を経て行った。いずれのマーカー  
も大きな変化はないが、わずかに OC が上昇し、  
ucOC がほぼ同程度の変化を示している。  
P1NP と BAP はいずれもほとんど変化がない。  
TRACP-5b は徐々に低下する傾向を示している。

uNTX はいったん低下したものの 24 週目にはベ  
ースラインに戻りつつある (図 3B)。

### 5) 疼痛, QOL, 上部消化管障害

VAS は dTPD 群の 1 症例 (dTPD3), wTPD  
群の 1 症例 (wTPD2) を除いて 4 週目には 50%  
程度低下した (図 4A)。dTPD3 は、12 週目の  
立位および仰臥位エックス線像で骨折椎体の骨

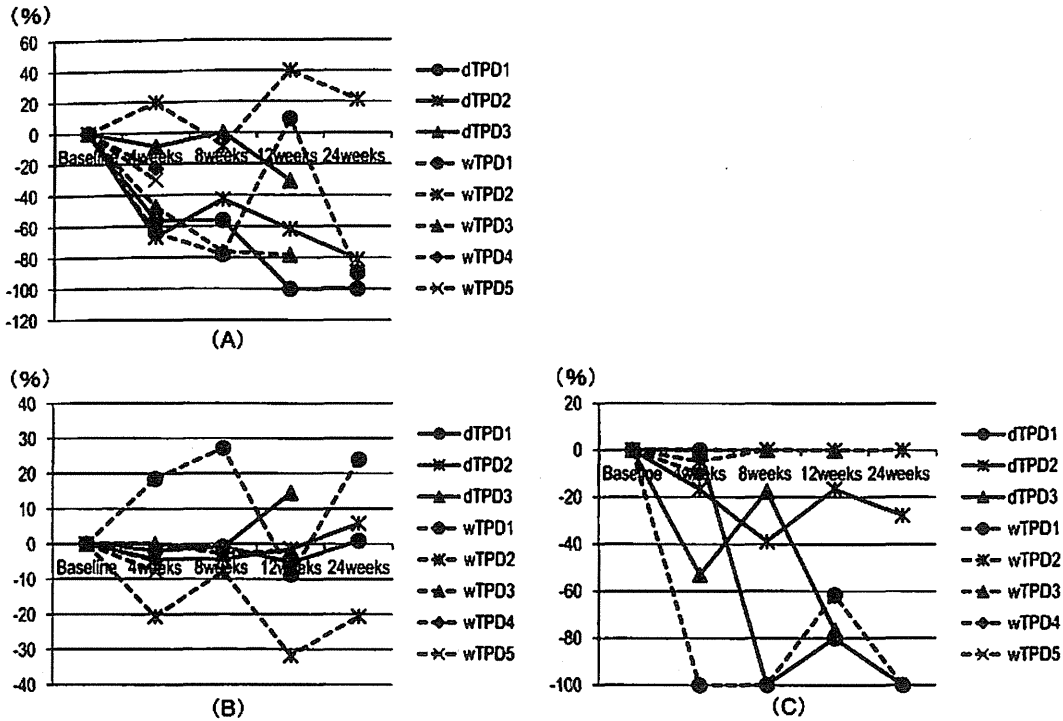


図 4 VAS, JOQOL, RDQ の推移

Visual analogue scale : VAS の推移 (A) , The Japanese osteoporosis quality of life questionnaire : JOQOL の推移 (B) , Roland Morris disability questionnaire : RDQ の推移 (C)

癒合が確認され、VAS と JOQOL および RDQ が改善した。4 週目に疼痛の増強した wTPD の 1 症例 (wTPD2) は 8 週目でベースラインと同等になったものの 12 週目には再び増悪した。12 週目、24 週目のエックス線像で新たな骨折が 2 椎体に生じていることが明らかになった (図 2A, B)。4 週目、8 週目で VAS が改善したものの 12 週目に再び疼痛の増強した 1 症例 (wTPD1) では、同時期のエックス線像で第 2 腰椎に新たな骨折が観察された (図 1A, B)。

JOQOL は試験期間中に新たな椎体骨折を生じた 2 症例 (wTPD1 と wTPD2) 以外の症例では、12 週目以降 24 週目の間に改善がみられた (図 4B)。RDQ の変化は JOQOL と同様の傾向を示しているが、VAS を強く反映した (図 4C)。一方、wTPD2 では、VAS の悪化が JOQOL ほど RDQ には反映されなかった。

GERD に関しては dTPD2 の 1 症例で 8 週目を

除き高い値を示した。wTPD2 の 1 症例は QUEST による評価が安定しなかった (図 5)。

#### 4 考 察

骨折の危険性の高い骨粗鬆症による脆弱性椎体骨折を生じた症例に対し、テリパラチドの連日製剤もしくは週 1 回製剤を投与し、骨代謝マーカー、疼痛、QOL、上部消化管障害の変化を追跡した。連日製剤の投与により骨形成マーカー、骨吸収マーカーが徐々に上昇したが、週 1 回製剤では骨形成マーカーは 8 週までわずかに上昇、骨吸収マーカーは徐々に低下した。VAS, JOQOL, RDQ は 1 例を除いて継続可能であった全症例で、4 週間で改善した。連日製剤では継続可能であったいずれの症例も VAS, JOQOL および RDQ の改善がみられた。

テリパラチド連日製剤ではこれまでの報告と同様、投与開始後徐々に P1NP を始めとした骨形



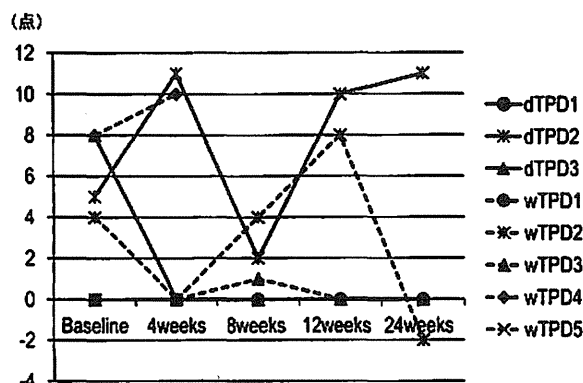


図5 QUEST の推移

QUEST : the quality of life and utility evaluation survey  
technology questionnaire

成マーカーと骨吸収マーカーが上昇した。一方、週1回製剤では、4週目と8週目でOCが約1.4倍まで上昇したが、その後は約1.2倍で推移した。テリパラチドの連日投与では骨芽細胞の動員、分化が促進されるため、寿命の長い骨芽細胞では蓄積効果が生じ、盛んに骨形成が促進されるものと思われる。一方、週1回製剤では、投与後7日目ということもあり生化学検査では蓄積効果を証明することはできなかった。8週目は骨折治癒のリモデリング期にあたり、この時期にOCが最も高くなっていたことから、リモデリングが促進された可能性がある。

両投与方法によって、PINP、OCおよびucOCの関係に違いが生じていることは興味深い現象である。連日投与ではucOCの発現はPINPとほぼ同様に推移をしている。一方、週1回製剤ではucOCとOCが同様に推移している。週1回製剤のOCとucOCの関係から、健常人ではucOCはOCの合成に伴い、ある一定の割合で血中に放出されるものと考えられる<sup>45)</sup>。すなわち、週1回投与ではOCのカルボキシル化が正常に行われ類骨形成→骨化が滞りなく行われているのに対し、連日投与では旺盛な類骨形成に対してカルボキシル化オステオカルシンの供給が追いついておらず、両群で骨梁の成熟度に違いが生じている可能性がある。

試験開始後4週でVASが改善しなかった2症

例はいずれも骨密度が著しく低下していた。他の症例はエックス線像から判定すると8週までに骨癒合が得られているのに対し、この2症例では12週を要していた。骨皮質の菲薄化と骨梁の減少が著しい状態では骨折治癒により多くの時間が要するものと考えられる。一方、研究開始時と比較して24週間VASが改善することがなかった週1回製剤の1症例は試験開始時から食欲が低下していた。QUESTに対する不安定な回答から、テリパラチド投与の副作用として生じる消化器症状の複雑さがうかがえる。24週後には4kgの体重減少と骨密度の低下、2椎体の新規椎体骨折が生じていた。テリパラチド投与にしばしば伴う消化器症状の発現は、骨の状態をむしろ悪化させる危険性があり早急な対応が必要である。極端な骨密度の低下や投薬による体調不良が生じていなければ、テリパラチドの投与は新規椎体骨折による疼痛を4週で改善することが明らかになった。

週1回製剤の1症例で、試験開始後8週目から12週目の間に隣接椎体に新たな骨折を生じた。研究開始時の第2～4腰椎骨密度は若年成人平均の62%であり異常なほど低値とはいえない。25(OH)D濃度が低値であることも一因と考えられる。しかし、治験Ⅲ相試験の結果から椎体骨折抑制効果は20週のころに急激に上昇することから考えると、12週の段階では十分な骨

強度が得られていない可能性がある。第 2~4 腰椎の骨密度が 24 週までに約 4% 上昇することを考えると、椎体骨折抑制効果は骨密度上昇に遅れて発現することになる<sup>2)</sup>。リモデリングを促進する作用のあるテリパラチドの間歇投与では、骨密度増加に反映するミニモデリングと同時に骨梁の再生が強度に関与している可能性がある<sup>9)</sup>。テリパラチドを連日投与された閉経後女性の骨単位活性化率 (activation frequency : Ac.f) は 0.5/年であるのに対し、週 1 回投与では 0.4 年である<sup>7,8)</sup>。連日投与では椎体骨折抑制効果がより早く出現する可能性がある。

#### ま と め

骨折の危険性の高い骨粗鬆症による脆弱性椎体骨折を生じた症例に対し、テリパラチドの連日製剤もしくは週 1 回製剤を投与し、骨代謝マーカー、疼痛、QOL、上部消化管障害の変化を追跡した。連日製剤の投与では骨形成マーカー、骨吸収マーカーともに上昇し、週 1 回製剤では骨形成マーカーがわずかに上昇し骨吸収マーカーは低下した。マーカーの推移から連日投与では骨梁形成が盛んに行われ、週 1 回投与では成熟した骨梁形成が行われている可能性がある。骨密度の低下が著しい場合を除けば、いずれの製剤でも椎体骨折を 8 週までに癒合させ、疼痛および QOL を改善した。一方、副作用である消化器症状への対応の重要性が明らかになった。

#### 文 献

- 1) Bilezikian JP. Combination anabolic and antiresorptive therapy for osteoporosis: opening the anabolic window. *Curr Osteoporos Rep* 2008;6:24-30.
- 2) Nakamura T, et al. Randomized teriparatide (human parathyroid hormone (PTH) 1-34) once weekly efficacy research (TOWER) trial for examining the reduction in new vertebral fractures in subjects with primary osteoporosis and high fracture risk. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(9):3097-106.
- 3) Nagashima M, et al. Bisphosphonate (YM529) delays the repair of cortical bone defect after drill-hole injury by reducing terminal differentiation of osteoblasts in the mouse femur. *Bone* 2005;36:502-11.
- 4) Cairns JR, Price PA. Direct demonstration that the vitamin K-dependent bone Gla protein is incompletely  $\gamma$ -carboxylated in humans. *J Bone Miner Res* 1994;9:1989-997.
- 5) Tanaka S, et al. Lower osteocalcin and osteopontin contents of the femoral head in hip fracture patients than osteoarthritis patients. *Osteoporos Int* 2011;22: 587-97.
- 6) Ma YL, et al. Teriparatide increases bone formation in modeling and remodeling osteons and enhances IGF-II immunoreactivity in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2006;21:855-64.
- 7) Miki T, et al. Effect and safety of intermittent weekly administration of human parathyroid hormone 1-34 in patients with primary osteoporosis evaluated by histomorphometry and microstructural analysis of iliac trabecular bone before and after 1 year of treatment. *J Bone Miner Metab* 2004;22:569-76.
- 8) Recker RR, et al. Comparative effects of teriparatide and strontium ranelate on bone biopsies and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2009;24:1358-68.