

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591761

研究課題名（和文）遺伝子多型解析によるステロイド性大腿骨頭壊死症の予防法の開発

研究課題名（英文）Genetic analysis for predicting the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head

研究代表者

井上 重洋（INOUE SHIGEHIRO）

京都府立医科大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10184748

研究成果の概要：

Apolipoprotein B (ApoB) 遺伝子がステロイド性大腿骨頭壊死症の発生と関連をもつことが明らかになっている。この発見はステロイドが ION を誘発する機序の解明の一助となると考えている。ステロイド投与前に ApoB、ABCB1 および CBP の遺伝子多型を解析し、ステロイド性大腿骨頭壊死症を発生しやすい患者を同定する方法を考案した。この方法により将来開発される有効な予防措置を効率よく適応することができると考えている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：特発性大腿骨頭壊死症、遺伝子多型、ステロイド

1. 研究開始当初の背景

特発性大腿骨頭壊死症（idiopathic osteonecrosis of the femoral head, ION）は青壮年層に多発し、進行性に股関節の変形破壊をきたして起立・歩行障害を引き起こし、患者の quality of life (QOL) が著しく侵される関節疾患である。本疾患の病因は明らかではないが、ステロイド剤の使用やアルコール多飲との関連が示唆されている。その発症患者数は年々増加傾向にあり、特に近年では

SLE などの免疫異常を伴う疾患、腎疾患、臓器移植後など種々の疾患治療の目的にステロイド剤を使用した患者での ION 患者が増加しており、ION 患者の約半数がステロイド剤に誘発されたと推測されている。しかし、ステロイド剤が本疾患を誘発する機序は不明であり、有効な予防法と根本的な治療法がないのが現状である。従って、本疾患を克服するために有効な予防法を開発することが重要な課題の1つである。

高容量のステロイド剤投与を受けた患者のすべてに ION が発生するわけではなく、投与量および投与方法を含むステロイド治療歴がほぼ同じであるにもかかわらず、ION を発生する患者としない患者が存在する。このことから、ステロイドの感受性には個体差が存在することが推察される。このような薬物反応性の個体差の原因として、薬剤感受性遺伝子、疾患関連遺伝子などの遺伝子多型や、それによって導かれるタンパク質の遺伝的多形性が考えられる。現在までに以下の ION の発生予測因子を発見してきた。輸送蛋白である P-glycoprotein をコードする ABCB1 (別名 multidrug resistance 1; MDR1) の C3435T (exon26) とグルココルチコイド受容体の転写共役因子の cAMP-response element binding protein-binding protein (CBP) (rs3751845) が ION 発生に関連があることを明らかにしてきた。精度の高い ION 発生予測をするためには ION と関連する複数の遺伝子多型の影響を考慮して予測する必要がある。

2. 研究の目的

ION 発生と関連がある遺伝子多型を明らかにし、精度の高い ION 発生予測法を考案し効率の良い ION 予防法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

京都府立医科大学では 1970 年から現在までに 600 例以上の腎移植が施行された。これらの患者のうち、移植後に ION 発生が確認され、定期的に当院に通院している 34 例の ION 患者を症例とし、腎移植後 1 年以上経過例で定期的に単純 X 線写真、磁気共鳴画像法 (MRI)、骨シンチグラムで全身に骨壊死が発生していないことを確認している患者 124 例を対照とした。ION の診断には厚生労働省特発性大腿骨頭壊死症調査研究分科会の診断基準を用いた。本研究を開始するにあたり、京都府立医科大学におけるヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得た。また、患者に対して専用の同意書を作成し、文書による同意を得た。

(1) ION の病因として注目されている脂質代謝異常、凝固・線溶系異常および酸化ストレスに関連する物質の遺伝子多型および虚血性心疾患や angioplasty 後の再狭窄などの血管病変と関連の深いと報告されている遺伝子多型を候補遺伝子として選定し遺伝子解析を行った。Apolipoprotein B (ApoB,

G12619A)、Apolipoprotein A (ApoA, G-75A, C83T)、lipoprotein lipase (LPL, S447X)、fatty acid-binding protein 2 (FABP2, G2445A)、cholesteryl ester transfer protein (CETP) (rs708272)、thrombomodulin (THBD, C2136T)、NADH/NADPH oxidase p22 phox (p22-PHOX, C242T)、eNOS (G894T)、eNOS (T-786C)、paraoxonase (PON1, Arg192Gln, Leu54Met)、quinoid dihydropteridine reductase (QDPR, rs3733570)、6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (PTS, rs3819331)、superoxide dismutase (SOD) {SOD1 (rs2070424, rs699473), SOD3 (rs2284659)}、heme oxygenase-1 (HO-1, A-413T) および Connexin-37 (GJA4, C1019T) について、ゲノタイピングを行った。それぞれの遺伝子多型と ION 発生との関連について Fisher 検定を用いて解析した。この検定で有意な関連があった遺伝子多型と ION 発生との関連を logistic regression model を用いて Odds ratio (OR) および、95% 信頼区間 (CI) を算出した。多変量解析を、性別、移植時年齢、移植後に用いた免疫抑制剤の種類 (Cyclosporine、Tacrolimus)、ステロイド投与プロトコール (少量、中等量、大量)、そしてゲノタイプに基づき施行し、ION 発生との関連を検討した。

(2) われわれが ION 発生と関連があることを明らかにした輸送タンパクの ABCB1 遺伝子、脂質代謝の ApoB 遺伝子、そして受容体の CBP 遺伝子を 2 カテゴリーに分類した (表 1)。

表 1. 3 遺伝子の出現頻度とカテゴリーの分類

	症例 n(%)	対照 n(%)	症例 n(%)	対照 n(%)	
ABCB1 gene	(n=30)	(n=121)	ABCB1 gene	(n=30)	(n=121)
TT	2 (7)	28 (23)	TT	2 (7)	28 (23)
TC	15 (50)	54 (45)	TC+CC	28 (93)	93 (77)
CC	13 (43)	39 (32)			
ApoB gene	(n=33)	(n=122)	ApoB gene	(n=33)	(n=122)
CC	27 (82)	115 (94)	CC	27 (81)	115 (94)
CT	6 (18)	6 (5)	CT+TT	6 (18)	7 (6)
TT	0 (0)	1 (1)			
CBP gene	(n=34)	(n=123)	CBP gene	(n=34)	(n=123)
GG	23 (68)	105 (85)	GG	23 (68)	105 (85)
AG	11 (32)	18 (15)	AG	11 (32)	18 (15)
AA	0 (0)	0 (0)			

<解析 1>

3 遺伝子とステロイド性大腿骨頭壊死症との関連を明らかにするために、logistic regression model を用いて odds ratio (OR) と 95%信頼区間 (95%CI) を計算し、同じモデル内で、互いの影響を調整して解析した。

<解析 2>

遺伝子の 2 つずつの組合せと ION との関連を logistic regression model を用いて解析した。

<解析 3>

交互作用を検討し、additive model で Synergistic index を計算した (式)。

$$\text{Synergistic index} = \frac{\text{RR(AB)}-1}{\text{RR(A}\bar{\text{B}})+\text{RR}(\bar{\text{A}}\text{B)}-2} \dots (式)$$

4. 研究成果

(1) 脂質代謝関連の ApoB (G12619A)、ApoA (G-75A, C83T)、LPL (S447X)、FABP2 (G2445A)、CETP (rs708272)、凝固線溶系関連の THBD (C2136T)、生体内酸化ストレス関連の p22-PHOX (C242T)、eNOS (G894T)、eNOS (T-786C)、PON1 (Arg192Gln)、PON1 (Leu54Met)、QDPR (rs3733570)、PTS、(rs3819331)、SOD1 (rs2070424, rs699473)、SOD3 (rs2284659)、HO-1 (A-413T) そして血管内皮細胞関連因子である GJA4 (C1019T) について解析を行ったが、ION 発生と有意な関連を認めなかった。

(2) 脂質代謝に関連する ApoB C7623T で ION 発生との間に強い関連があり、T allele を含む症例で ION 発生の危険性が高い (adjusted odds ratio=6.37、p=0.011)。

多変量モデルには、他の遺伝子の影響を調整するために ION と関連を示した 3 つの factor (ABCB1 遺伝子、ApoB 遺伝子、CBP 遺伝子) を同じモデルに含めた。3 遺伝子とステロイド性大腿骨頭壊死症との関連を示す (表 2)。2 遺伝子ずつの組合せと ION との関連を検討した。ABCB1 遺伝子と CBP 遺伝子の SNP の組合せで 4 つのグループに分け、ABCB1 TT、CBP GG の症例を基準としたときの 3 グループの OR を計算した (表 3)。

モデルには ApoB 遺伝子も調整因子として含めた。ABCB1 TT、CBP AG の症例 (OR=6.55)、ABCB1 TC+CC、CBP GG の症例 (OR=6.45) では、いずれも OR の上昇を示したが、有意ではなかった。ABCB1 TC+CC、CBP AG の症例では、OR=22.91 となり、有意な OR の上昇を認めた。この結果を図 1 に示す。

次に additive model で Synergy index (S)

を計算した。(式) にあてはめて計算すると $S=(22.91-1)/(6.55-1+6.45-1)=1.99 (>1)$ となった。Synergy index が 1 より大となり、ABCB1 遺伝子と CBP 遺伝子に交互作用が存在すると考えられた。つまり、ABCB1 TC+CC、CBP AG の両方を有する個体ではさらにリスクが高くなることが判明した。

表 2. 3 遺伝子と ION の関連

			univariate		multivariate [§]	
	症例 n(%)	対照 n(%)	*OR (95%CI)	P Value	OR (95%CI)	P Value
ABCB1 gene	(n=30)	(n=121)				
TT	2 (7)	28 (23)	1		1	
TC+CC	28 (93)	93 (77)	4.22 (0.95-18.8)	0.059	5.03 (1.08-23.4)	0.039
ApoB gene	(n=33)	(n=122)				
CC	27 (82)	115 (94)	1		1	
CT+TT	6 (18)	7 (6)	3.65 (1.14-11.7)	0.030	4.59 (1.21-17.4)	0.025
CBP gene	(n=34)	(n=123)				
GG	23 (68)	105 (85)	1		1	
AG+AA	11 (32)	18 (15)	2.80 (1.16-6.70)	0.022	3.77 (1.42-9.99)	0.008

§This model includes ABCB1 gene, ApoB gene, and CBP gene.
*OR=odds ratio, 95%CI=95% confidence interval

表 3. ABCB1 遺伝子と CBP 遺伝子の交互作用

Interaction variables		^a Odds ratio (95% CI)	P Value
ABCB1 gene	CBP gene		
TT	GG	1	
TT	AG	6.55 (0.33-130)	0.218
TC+CC	GG	6.45 (0.78-53.3)	0.084
TC+CC	AG	22.9 (2.42-217)	0.006

^aPairs of risk factors were analyzed with adjustment for the third risk factor (ApoB gene).

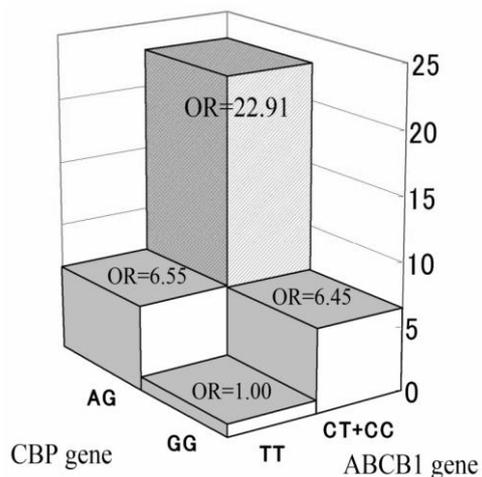


図 1
ABCB1 遺伝子と CBP 遺伝子の組み合わせ

ステロイドが ION を誘発する機序は未だ不明であり、有効な予防措置がとれないのが現状である。本研究によって ApoB 遺伝子が ION の発生と関連があることが明らかになり、ステロイドが ION を誘発する機序の解明の一助となると考えている。ステロイド投与前に ApoB、ABCB1 および CBP の遺伝子多型を解析すれば、ステロイド性 ION を発生しやすい患者を同定することが可能になる。この方法により将来開発される有効な予防措置を効率よく適応することができると考えている。予防措置を行うための基盤を築いた本研究は意義深い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Fujioka M, et al. Genetic analysis for prevention of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. Clin Calcium, 17(6), 894-900, 2007. (査読無)
- ② Kuribayashi M, Fujioka M, et al. Combination analysis of three polymorphisms for predicting the risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head, J Orthop Sci, 13(4), 297-303, 2008. (査読有)
- ③ 栗林正明, 藤岡幹浩ほか. ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子解析. 関節外科, 27(2), 109-113, 2008. (査読無)
- ④ 栗林正明, 藤岡幹浩ほか. ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子解析. 整形・災

害外科, 51(7), 880-881, 2008. (査読無)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 栗林正明ほか. ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子多型解析による発生予測—3 遺伝子による検討—, 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2007 年 10 月 25 日, 浜松市.
- ② Kuribayashi M, et al. Combination analysis of three polymorphisms predicts the risk for Steroid-induced osteonecrosis of the femoral head. 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2008 年 3 月 2 日, San Francisco, USA.
- ③ 栗林正明ほか. ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子多型解析—酸化ストレス関連物質—. 第 35 回日本股関節学会学術集会. 2008 年 12 月 5 日, 大阪市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 重洋 (INOUE SHIGEHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 10184748

(2) 研究分担者

藤岡 幹浩 (FUJIOKA MIKIHIRO)
京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 50360029