

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592274

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) Research on the prevention of osteonecrosis of the femoral head by analyzing genetic polymorphism

研究代表者

井上 重洋 (Inoue, Shigehiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10184748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ステロイド性大腿骨頭壊死症発生に關する遺伝子の多型性を解析するために、マイクロアレイを用いて一次スクリーニングを行って候補遺伝子を絞り込み、候補遺伝子の塩基配列を解析して大腿骨頭壊死症発生に關連する遺伝子を発見することを目的とした。絞り込んだ候補遺伝子からSNP解析を行った。ステロイド性大腿骨頭壊死症と關連するSNPsを同定し、關連性の調査を試みたが、新規のSNPsを同定するには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to prevent steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (ONFH) by analyzing genetic polymorphism. First, we made a short list of candidate gene by primary screening with microarray. Then, we tried to detect the gene related with the steroid-induced ONFH by analyzing the base sequence of the candidate gene and analyze the single nucleotide polymorphism (SNPs) of the candidate gene. We detected the SNPs related with steroid-induced ONFH, and analyzed the association with each SNPs. However, we cannot detect the new SNPs related with steroid-induced ONFH.

研究分野：医歯薬学

キーワード：特発性大腿骨頭壊死症 遺伝子多型 SNPs

### 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) は阻血性壊死によって大腿骨頭が圧潰し、股関節機能が失われる難治性疾患である。ステロイド性が過半数を占め、医原性の側面も持つため予防法の確立が必要である。ステロイド性 ION の発生には疾患関連遺伝子などの多型が関与しているとされている。我々はこれまでに P-glycoprotein (P-gp) の ABCB1 遺伝子多型、ApolipoproteinB (Apo) 遺伝子多型と ION 発生との関連性を報告してきた。ION のような多因子疾患では、P-gp (ABCB1) 遺伝子多型、ApoB 遺伝子多型、Apo(a) phenotype 以外にも複数の遺伝因子や環境因子が関与していると考えられる。今後さらに解析を進め、ION 発生リスクをステロイド投与前から明らかにすることで、ION 発生の予防が可能になると考える。

### 2. 研究の目的

ION 発生に関与する遺伝子的多型性を解析するために、まずマイクロアレイを用いて一次スクリーニングを行って候補遺伝子を絞り込む。絞り込まれた候補遺伝子については、シーケンサーを用いた直接塩基配列決定法を用いて多型部位の配列確認を行う。現在までに有意差を確認した ABCB1 遺伝子、ApoB 遺伝子および apo(a) の phenotype に加え、今後解析していくうえで有意差を認められた複数の遺伝子多型を統計学的に解析し統合する。遺伝子多型間の interaction (交互作用) を検討することで、ハイリスク患者のスクリーニングを行うことができる。そして、より精度の高い発生予測システムを構築し、ION 発生の予防に役立てることを目的とする。

### 3. 研究の方法

京都府立医科大学整形外科に受診されている ION 患者のうち、本研究への同意をいただき、末梢血採血を施行した 125 例を対象とした。そのうちステロイド投与の背景因子が同じく、ステロイド投与とプロトコルが control されている腎移植症例に対して解析を行った。

1988 年 1 月から 2012 年 12 月の京都府立医科大学で腎移植を施行された症例 564 例中、ステロイド投与直後から単純 X 線像と MRI で定期的に ION スクリーニングを施行可能であった 382 例を対象とする。そのうち本研究への同意を得られ末梢血からゲノム DNA サンプルを採取できた 36 例とした。

#### 1) 臨床情報の解析

術後 2 週間までのステロイド投与量、術後 2 週間までの体重あたりのステロイド投与量、年齢、性別、急性拒絶反応の有無、移植腎の種類、タクロリムス、シクロスポリン、ミコフェノール酸モフェチル、ミゾリピンおよびバシリキシマブの 5 剤の免疫抑制剤と ION 発生のリスク因子についてロジスティック回

帰モデルを用いて単変量解析と多変量解析を行った。

#### 2) 遺伝子解析

1 次スクリーニングとしてマイクロアレイを行い ION 発生群と非発生群での遺伝子発現を解析し、疾患発生に関与すると思われる候補遺伝子の絞り込みを行った。次に候補遺伝子の絞り込みを行った後、シーケンサーを用いた直接塩基配列決定法から、多型部位の配列確認を行った。リアルタイム PCR を用いて、効率よく大量の single nucleotide polymorphism; SNP 解析を行った。また、制限酵素認識配列がある部位については、PCR-restriction fragment length polymorphism; PCR-RFLP を施行した。統計解析により同定した SNPs が遺伝子の機能に与える影響を検証するために、プロモーター領域の SNP であれば、リポーターアッセイ、それ以外の SNP であれば変異体作成 (site-directed mutagenesis) を行った。

### 4. 研究成果

1) 単変量解析では術後 2 週間までのステロイド投与量で低用量群に対する中用量群、低用量群に対する高用量群、PSL2w/kg で低用量群に対する高用量群と術前透析のなしに対する術前透析ありで crude odds ratio (OR) が有意に上昇した。また、死体腎に対する生体腎、ミコフェノール酸モフェチル、ミゾリピンおよびバシリキシマブで有意に crude odds ratio が低下した。

多変量解析では、年齢、性別、急性拒絶反応の有無、移植腎の種類、免疫抑制剤の種類および術後 2 週間までの体重あたりのステロイド投与量では ION 発生との間に統計学的に有意差はなかった。

ION 発生率は低用量群、中用量群、高用量群でそれぞれ 4.9、7.4、31.3% で、ステロイド投与量の増加に伴い発生率は上昇した。中用量群での ION 発生の OR は低用量群に比べて上昇 (crude OR = 2.75, adjusted OR=1.63) し、高用量群における ION 発生の OR も低用量群に比べて統計学的に有意な上昇を認められた (crude OR=7.54, adjusted OR=3.94)。さらに、術後 2 週間のステロイド投与量と AVN の発生との間には統計学的に有意な量反応関係を認められた (trend p=0.005)。

2) マイクロアレイを用いて一次スクリーニングを行い、ION 発生に関与する候補遺伝子の絞り込みを行ったが、新たな候補遺伝子を絞り込むことは困難であった。過去に有意差を確認した Lipoprotein(a) [Lp(a)] を構成する Apolipoprotein(a)[apo(a)] の phenotype と ABCB1 遺伝子、ApoB 遺伝子およびその受容体である CBP 遺伝子の関連性を解析した。

Lp(a) 遺伝子と ION 発生との関連では明らかな統計学的有意差は認めなかった。

apo(a) の phenotype と ION 発生との関連では isoform の、B、S1、S2 を 1 つでも含む phenotype LMW では S3、S4 のみを含む

phenotype HMW よりも有意に ION 発生のリスクが上昇した。

本研究での haplotype の頻度は日本人での過去の報告とほぼ一致していた。apo(a)の haplotype と ION 発生との関連では、明らかな統計学的有意差は示さなかった。

ABCB1 遺伝子、ApoB 遺伝子およびその受容体である CBP 遺伝子と ION 発生との関連では、ABCB 遺伝子の TT+TC は TT と比較して明らかな統計学的有意差はなかった。ApoB 遺伝子は、CC と比べ CT+TT では単変量解析およびほかの 2 つの遺伝子で調整した多変量解析でも約 4 倍の odd ratio(OR)の上昇を認めた。

CBP 遺伝子では GG と比べて AG+AA では単変量解析でも多変量解析でも約 4 倍の OR を示した。

ION 発生には血管内皮細胞障害や脂質代謝異常、ステロイド投与後に生じる酸化ストレス障害、凝固線溶系の異常が関連しているとされている。そこで、それぞれに関連している SNP と ION との関連についても検討した。血管内皮細胞障害関連の SNP として GJA4(C1019T)、脂質代謝関連の SNP として LPL(S447X)、FABP2(G2445A)、CETP(RS708272)、凝固線溶系関連の SNP として THBD(C2136T)、酸化ストレス関連の SNP として p22-PHOX(C242T)、eNOA(G894T)、eNOS(T-786C)、PON1(Arg192Gln)、PON1(Leu54Met) と ION 発生との関連について統計学的に検討した。いずれの SNP も ION 発生との間に有意差はみとめなかった。

本研究ではステロイド投与の背景因子が同じく、ステロイド投与プロトコールが control されている腎移植症例に対して解析を行った。症例数が少なかったため、過去の報告と同様の結果になったと考える。症例の蓄積を継続し、その他の背景因子を持つステロイド性 ION やアルコール性の ION の症例もあわせて遺伝子解析を続けていく予定である。

## 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 5 件)

林 成樹, 藤岡 幹浩, 齊藤 正純, 池上 徹, 齋木 大器, 上島 圭一郎, 久保 俊一、大径骨頭を用いた metal on metal THA 術後早期に骨溶解を生じた一例、日本人工関節学会誌、平成 25 年 12 月、査読無し

Hayashi S, Fujioka M, Ikoma K, Saito M, Ueshima K, Ishida M, Kuribayashi M, Ikegami A, Mazda O, Kubo T. Evaluation of femoral perfusion in a rabbit model of steroid-induced osteonecrosis by dynamic contrast-enhanced MRI with a high magnetic

field MRI system. J Magn Reson Imaging. 2015 Apr、査読有

Saito M, Ueshima K, Fujioka M, Ishida M, Goto T, Arai Y, Ikoma K, Fujiwara H, Fukushima W, Kubo T. Corticosteroid administration within 2 weeks after renal transplantation affects the incidence of femoral head osteonecrosis. Acta Orthop. 2014 Jun、査読有

齊藤 正純, 上島 圭一郎, 藤岡 幹浩, 石田 雅史, 西久保 芳樹, 林 成樹, 池上 徹, 久保 俊一セメントレスカップを用いた人工股関節再置換術の短期成績、Hip Joint、平成 26 年 8 月、査読なし

Ikegami A, Ueshima K, Saito M, Ikoma K, Fujioka M, Hayashi S, Ishida M, Fujiwara H, Mazda O, Kubo T. Femoral perfusion after pulsed electromagnetic field stimulation in a steroid-induced osteonecrosis model. Bioelectromagnetics. 2015 May、査読有

[学会発表](計 7 件)

上島 圭一郎, 藤岡 幹浩, 井上 重洋, 徳永 大作, 齊藤 正純, 久保 俊一、人工股関節全置換術・人工骨頭置換術後の大腿骨ステム周辺骨折に対する治療成績、日本整形外科学会学術集会、平成 25 年 5 月 23-26 日、広島市

藤岡 幹浩, 林 成樹, 齊藤 正純, 池上 徹, 石田 雅史, 生駒 和也, 松田 修, 久保 俊一、大腿骨頭壊死症の病態と基礎 高磁場 MRI を用いたステロイド性骨壊死モデルの血流評価、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 25 年 10 月 17-18 日、千葉市

Saito M, Ueshima K, Fujioka M, Nishikubo Y, Inoue S, Kubo T. Long term results of Opti-Fix Plus total hip system with the conventional polyethylene liner. 12eme Congres de L'Association Franco Japonaise d'Orthopedie. 2013.5.31, Kyoto, Japan

Hayashi S, Fujioka M, Ikoma K, Saito M, Ueshima K, Ishida M, Kuribayashi M, Ikegami A, Mazda O and Kubo T. Evaluation of femoral perfusion in a rabbit model of steroid-induced osteonecrosis with a high magnetic field MRI system. 60th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2014. 3.15-18. New Orleans, Louisiana, USA

石田 雅史, 上島 圭一郎, 井上 重洋, 藤岡 幹浩, 齊藤 正純, 林 成樹, 池上 徹, 久保 俊一、特発性大腿骨頭壊死症における人工骨頭置換術と人工股関節全置換術の成績、第 88 回日本整形外科学会学術集会、平成 27 年 5 月 21-24 日、神戸市

上島 圭一郎, 齊藤 正純, 石田 雅史, 林 成樹, 池上 徹, 藤岡 幹浩, 久保 俊一、特発性大腿骨頭壊死症の予防と治療の新戦略 基礎的研究からみた予防と治療の新戦略、第 88 回日本整形外科学会学術集会、平成 27 年

5月21-24日、神戸市

齊藤 正純, 上島 圭一郎, 石田 雅史, 林成樹, 池上 徹, 山田 学, 藤岡 幹浩, 久保俊一、腎移植後大腿骨頭壊死症と術後早期のステロイド量および免疫抑制剤の関連、第88回日本整形外科学会学術集会、平成27年5月21-24日、神戸市

[ 図書 ] (計1件)

井上重洋、久保俊一、金芳堂、股関節学、2014年、1247

## 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：101847748

### (2) 研究協力者

林 成樹 (Hayashi Shigeki)

京都府立医科大学医学研究科 大学院生