

「ステロイド性大腿骨頭壊死症の遺伝子分析 —チトクロームP450を対象として—」

京都府立医科大学整形外科

久保 俊一
高橋 謙治

初めに、筆頭演者の久保のスケジュールがどうしてもつきませんで、高橋が代わりにご報告させていただくことをお詫び申し上げます。

ステロイド剤は強力な抗炎症作用・免疫抑制作用を有し、さまざまな疾患に対して治療目的で使用されます。しかし、ステロイド使用により、多くの場合、合併症が出現します。整形外科領域では、骨粗鬆症のほかに大腿骨頭壊死症（以下ION）の発生が問題となります。臓器移植後など、同一プロトコールでステロイドを投与しているにもかかわらず、IONの発生が同じ経過をたどらないことを経験します。これはステロイドに対する感受性に個体差が存在する可能性を示しています。

ステロイド感受性に関連する因子として、ステロイド代謝酵素、ステロイドによる酵素誘導、輸送蛋白Pグライコプロテイン、あるいはグルココルチコイドレセプターなどが考えられます。これらの因子の個人差には、その遺伝子の個人々人の多型が関与していると考えられます。

遺伝子多型の中で解析方法として、DNA配列上の一塩基変異多型（SNP）が注目されており、種々の疾患との関連が報告されています。SNPは1,000塩基対に1ヶ所ほど存在し、遺伝子の発現量や機能に影響を与える可能性があります。

本研究の目的は、ION発生に関連するSNPを同定することにより、基礎疾患治療前、すなわちステロイド投与前にIONリスク患者

をスクリーニングする方法を確立すること、そして、ステロイド投与量を個人々人で調節するテラーメイド・メディシンの開発を目指します。

ステロイドを初めとする脂溶性薬物の代謝は第1相、第2相反応を経て尿中に排泄されます。第1相反応にはCYP450が関与します。CYP450には、現在までに50種類ほどの分子種が報告されておりますが、ステロイド代謝には、この中でも、CYP3A4という分子種が中心的な役割を果たします。また、他の複数の分子種の関与の可能性も報告されています。

まず、ステロイド代謝に中心的な役割を果たすCYP3A4についての検討を行いました。

対象は当院で腎移植後ION患者26名です。同意を得られた患者より末梢血採血後、ゲノムDNAを抽出しました。

直接塩基配列決定法を用いてCYP3A4のプロモーターに存在するER6およびXREMという酵素誘導に関与する領域のSNPの存在の有無を検討しました。また、すでに文献的に報告されているCYP3A4*4、*5、*6という翻訳領域のSNPについて、PCR、RFLPを用いて検討しました。

結果ですが、ER6、XREMのプロモーター領域のSNPは確認できませんでした。CYP3A4*6で、1例のみヘテロバリエーションが存在いたしましたが、CYP3A4*4、*5については全例でSNPを認めず、wild typeでした。

CYP2D6*2				
	Case	Control	Odds ratio (95%CI)	
			Crude	Adjusted
それ以外	23	51	1	1
*2/*2	3	3	2.2 (0.4-11.8)	4.7 (0.6-39.1)

The model includes gender, age at renal transplantation, and steroid pulse therapy after renal transplantation.

図 1

CYP2D6*10B				
	Case	Control	Odds ratio (95%CI)	
			Crude	Adjusted
Others	21	45	1	1
*10B /*10B	5	9	1.2 (0.4-4.0)	1.8 (0.5-2.9)

The model includes gender, age at renal transplantation, and steroid pulse therapy after renal transplantation.

図 2

次に、ステロイド代謝に部分的に関与する可能性のある CYP2D6、CYP2C19 に関する検討結果をお示しいたします。

対象は、当院移植外科で腎移植を施行された 80 例で、そのうち 26 例が ION を発生した症例です。男性 60 例、女性 20 例、年齢は 16 ～ 62 歳で平均 38 歳でした。

末梢血よりゲノム DNA を抽出し、Gene チップ解析装置を使用し、ステロイド代謝に部分的に関与する可能性のある CYP2D6、CYP2C19 の SNP 解析を施行しました。統計解析には多変量解析を用いました。

CYP2D6*2 の結果ですが、*1 (wild type)、*2、*10B の 3 種類のアレルが出現しました。スライドに示しますように、*2 のホモバリエントで、それ以外の遺伝子型の ION 発生危険率を 1 としますと、多変量解析にて、この群で 4.7 のオッズレシオの上昇を認めました (図 1)。

*10B についても同様の解析を施行しました。*10B ホモバリエントで、オッズレシオは 1.8 と上昇を認めましたが、統計学的に有意には至っておりませんでした (図 2)。

CYP2C19 に関しては、ION 発生のオッズレシオを上昇させる遺伝子型は認めませんでした。

CYP450 の中でステロイド代謝に中心的な役割を果たす CYP3A4 には、現在までに 19 種類の SNP が報告されています。また、CYP3A4 は個人間の酵素活性差が非常に大きいという報告があります。さらに、CYP3A4 はグルココルチコイドにより酵素誘導を受けることが知られております。また、Sumida らは、ヒト肝細胞において CYP3A4 代謝活性と mRNA 量との間に相関があることを示し、酵素誘導が酵素活性の個人差の原因である可能性を報告しました。

ヒト CYP3A4 のプロモーター領域で誘導に関与している領域は ER6 および XREM です。われわれは、これらの酵素誘導の個人差に影響を与える可能性のある領域について SNP の検索を施行しましたが、現在までのところ、明らかな SNP を同定することはできていません。

また最近、CYP3A4*4、*5、*6 という翻訳領域のアレルが同定され、ステロイド代謝の低下が報告されたので、ION 患者 26 人に対し検討を加えました。CYP3A4*6 で、1 例のみヘテロバリエントでしたが、その他は wild type であり、*5、*6 に関しては全例が wild type でした。これらの SNP と ION 発生の関連の可能性は低いと考えております。

また、CYP2D6 および CYP2C19 について、Gene チップを用いて検討しました。Gene チップを用いることにより、一度に大量の SNP 解析が可能になります。本検討では統計学的に有意ではありませんが、CYP2D6*10B および *2 ホモバリエントで ION 発生のオッズレシオ上昇を認めました。

CYP2D6*10Bは日本人を初めとする東洋人で頻度の高いアレルで、代謝に関して中間型の活性を持つことから、薬物代謝において非常に重要なSNPであるとされています。また、CYP2D6*2の活性はwild typeに劣ることが報告されています。

以上、CYP2D6*10Bおよび*2によりステロイド代謝活性低下がION発生に関与している可能性が考えられますが、現在、症例数が少ないこともあり、今後、症例数を増やして統計学的有意差を検討していく必要があると考えています。

抄録にはありませんが、現在、輸送蛋白であるPグリコプロテインについて検討を進めているので、あわせて報告させていただきます。

PグリコプロテインはATPをエネルギー源として、薬物を能動的に、細胞内から細胞外へ輸送する細胞膜蛋白として機能しています。

基質となる薬物は多岐にわたり、抗がん剤、シクロスポリン、FK506などの免疫抑制剤、高脂血症治療剤、さらにステロイドも基質になります。

Pグリコプロテインは血管内皮細胞を含め、さまざまな正常組織に発現していることが確認されております。

現在、予備的検討として、PグリコプロテインをコードするMDR1遺伝子のSNPのうち、比較的よく研究されているC3435TというSNPについて検討いたしております。

MDR1のSNPにより、Pグリコプロテインのファンクションが低下した場合、そこにステロイドの負荷が加わると、細胞にステロイドが蓄積し、IONが発生するという仮説を考えました。

方法ですが、末梢血からゲノムDNA採取後、直接塩基配列決定法でSNPを確認していきます。

現在までのデータを示します。スライドは20数例の結果ですが、現在これの、約2倍の症例数の解析が終わっております。遺伝子多型のうちのTを2つ持つTTというホモバリエントのタイプでION発生がほとんど見られないという結果が、現在50例行った結果でも認めておりまして、統計学的にも明らかな有意差を認めております。この機序に関しては、今後また考察して報告させていただきたいと思います(図3)。

	MDR1 C3435T	
	+	-
CC	4	5
CT	5	7
TT	0	3

図3

今後ですが、CYP2D6*2および*10B、ホモバリエントのION発生に対する統計学的有意性の有無の確認、MDR1遺伝子のSNPについての検討、さらに、病態に直接関連する凝固線溶遺伝子のSNPの検討を考えております。

最後に、研究助成をいただいた日本股関節研究振興財団に厚く御礼を申し上げます。ありがとうございました。

伊丹 ありがとうございました。大変専門的で難しいお話をいただきましたが、どなたか、ご質問はございますか。ないようですので、どうもありがとうございました。