〈原 著〉

遺伝子情報を活用した骨粗鬆症診療システムの開設

森 聖二郎¹⁾ 千葉 優子¹⁾ 山本 精三²⁾ 細井 孝之³⁾ 堀内 敏行¹⁾
上宮 文¹⁾ 田村 嘉章¹⁾ 荒木 厚¹⁾ 井藤 英喜¹⁾

要 約 目的：オーダーメイド診療システムの確立を目指したパイロット的な取り組みとして「遺伝子情報を活用した骨粗鬆症診療システム」を開設した。**方法：**ビスフォスフォネート剤に活性型ビタミンD剤を併用することの可否ならびに有用性を、「トランスフォーミング増殖因子β1 (TGF-β1) 遺伝子の T869C 多型 (以下 TGF-SNP と呼ぶ) を活性型ビタミンD剤に対する反応性の指標」に、「血清 25 水酸化ビタミンD (25OHD) 値をビタミンD充足状況の指標」に用いてオーダーメイドで決定した。**結果：**エントリーされた 112 症例の初期データを解析したところ、脊椎骨折を有する例が TGF-SNP の CC 型 30 例中 6 例であるのに対し、CT/TT 型では 82 例中 35 例あり、CC 型で骨折罹患率が有意 ($p = 0.027$) に低値を示した。TGF-SNP が CC 型では CT/TT 型に比較して脊椎骨折罹患率が低いことは、D 不足群 (25OHD < 22 ng/mL) でも充足群 (25OHD ≥ 22 ng/mL) でもともに認められた。また同じ遺伝子型であれば、D 不足群が充足群に比較して骨折罹患率が高値であった。すなわち、D 充足群で TGF-SNP が CC 型の症例がもっとも脊椎骨折の罹患率が低く (脊椎骨折罹患率 12%)、一方、D 不足群で CT/TT 型ではもっとも罹患率が高かった (同 50%)。そして、D 不足群で CC 型 (同 31%) あるいは D 充足群で CT/TT 型 (同 38%) では、骨折罹患率は中間的な値であった。活性型ビタミンD剤が投与され 1 年以上経過を観察し得た 44 症例において、大腿骨頸部骨密度は、CC 型では前値に対して平均 101.6% と増加したが、CT/TT 型では 97.9% と減少した。すなわち、CC 型が CT/TT 型に比較して活性型ビタミンD剤に対する反応性が良好であることも確認された。**結論：**TGF-SNP と 25OHD は、脊椎骨折罹患率に影響を及ぼす重要な因子であることが示された。さらに、これら 2 つの指標により、活性型ビタミンD剤の至適量を予測できる可能性が示唆された。

Key words：一塩基多型、オーダーメイド医療、25 水酸化ビタミンD、脊椎圧迫骨折、トランスフォーミング増殖因子 β1

(日老医誌 2008; 45: 655-659)

緒 言

骨粗鬆症の成因には何らかの遺伝的素因が関わっていることは明らかであるが、たった 1 個の遺伝子ではなく、一つ一つの相対危険はそれほど大きくない複数の遺伝子に加え、複数の環境要因が組み合わさって発症すると考えられている。こういった遺伝的素因、すなわち疾患易罹患性を決定しているのは遺伝子多型であるという考え方が現在は主流であり、その中でも DNA の一塩基多型

である SNP (single nucleotide polymorphism) は解析の容易さもあり、日々膨大なデータが集積しつつある。現在までに世界中から数多くの骨粗鬆症易罹患性決定遺伝子の SNP が報告され¹⁾²⁾、我が国でも国立長寿医療センター研究所から詳細な検討成績が報告されている。しかしながら、今のところ日常臨床に応用し得るほどの信頼性を広く獲得している候補遺伝子は見あたらない。

個人の遺伝情報に応じた医療、すなわちオーダーメイド医療において、個人の SNP 情報は、詳細な家族歴の聴取だけでは得られない、生育環境などのバイアスを排除した個人に特有の体質情報としての意義を有している可能性がある。しかしながら、SNP 情報だけで一義的にオーダーメイド医療ができるはずはなく、従来から利用されている臨床情報と合わせて総合的に判断する必要があることは言うまでもない。

山田ら³⁾は、TGF-β1 (transforming growth factor-β1)

1) S. Mori, Y. Chiba, T. Horiuchi, F. Kamimiya, Y. Tamura, A. Araki, H. Ito: 東京都老人医療センター内分秘科

2) S. Yamamoto: 同 整形外科

3) T. Hosoi: 国立長寿医療センター先端医療部

受付日: 2008. 6. 12, 採用日: 2008. 7. 22

第 45 回日本老年医学会関東甲信越地方会優秀演題賞受賞

図1 ビスフォスフォネート製剤に活性型ビタミンD製剤の併用を決定する手順
血清25OHD値とTGF-SNPによって活性型ビタミンD製剤を併用するか否か、ならびに併用する場合はその投与量を決定する方法を示す。

遺伝子のT869C多型(以下、本稿ではTGF-SNPと呼ぶ)が骨粗鬆症に対する治療に与える影響について報告している。それによると、閉経後女性で活性型ビタミンD製剤によって治療された症例のうち、TGF-SNPがTT型およびCT型では無治療例と同程度の骨密度(bone mineral density: BMD)年減少率であったが、CC型では1.6%の年増加率を認め、CC型とTT型およびCT型との間に有意差を認めたとしている。この結果は、TGF-SNPが閉経後骨粗鬆症の活性型ビタミンD製剤による治療効果を予測する上で有効な指標となりうることを示唆している。

一方、日本人のビタミンD摂取量は決して十分とは言えず、当センター骨粗鬆症外来に通院する症例の血清25水酸化ビタミンD(25OHD)値は平均22 ng/mLであり、骨折リスクを低下させるために必要とされている30 ng/mLを大きく下回っている⁴⁾。そこで我々は、ビスフォスフォネート製剤に活性型ビタミンD製剤を併用することの可否ならびに有用性を、「TGF-SNPを活性型ビタミンD製剤に対する反応性の指標」に、「血清25OHD値をビタミンD充足状況の指標」に用いて、オーダーメイドで決定することを試みた。

方 法

東京都老人医療センター骨粗鬆症外来に通院している症例で、ビスフォスフォネート製剤を服用していても最近6カ月間に骨密度の改善が認められない症例から同意を得て採血を行った。TGF-SNPは全血よりDNAを抽出、当該DNA領域をPCR(polymerase chain reaction)で増幅した後、直接シーケンス法で決定した。血清

25OHD値はラジオイムノアッセイ2抗体法で測定した。

TGF-SNPがCC型をビタミンD高反応型、CT/TT型をビタミンD低反応型と判定した。25OHDが22 ng/mL以上を正常高値(ビタミンD充足)、それ未満を正常低値(ビタミンD不足)とした。そして、図1に示すとおり、CC型(高反応型)かつビタミンD不足には活性型ビタミンD製剤1 μg/日投与、CC型(高反応型)かつビタミンD充足、ないしはCT/TT型(低反応型)かつビタミンD不足には活性型ビタミンD製剤0.5 μg/日投与、CT/TT型(低反応型)かつビタミンD充足には活性型ビタミンD製剤を投与しない、という方法でオーダーメイド診療を行った。なお、本研究は東京都老人医療センター倫理委員会にて、倫理的に問題ないことが確認され、平成17年12月26日に承認された。

統計学的有意水準は $p < 0.05$ とし、連続変数の差の検定にはunpaired t-testを、頻度の差の検定にはカイ2乗検定を用いた。

結 果

現時点でエントリーされている112症例の初期データを解析した。全例とも女性で、表1に示すとおり、年齢、身長、体重、血清25OHD、血清BAP(骨型アルカリフォスファターゼ)、尿中NTX(I型コラーゲン架橋N-テロペプチド)にはCC型とCT/TT型との間で有意差を認めなかった。DEXA(dual energy x-ray absorptiometry)法による腰椎、大腿骨頸部ならびに橈骨のBMDに関しても、遺伝子型による有意差を認めなかった。

一方、表2に示すとおり、胸腰椎レントゲン写真上、脊椎骨折を有する例がCC型30例中6例であるのに対し、CT/TT型では82例中35例あり、CC型で骨折罹患率が有意($p = 0.027$)に低値を示した。

表3に示すとおり、TGF-SNPがCC型の症例ではCT/TT型の症例に比較して脊椎骨折罹患率が低いことは、ビタミンD不足群(25OHD < 22 ng/mL)でも充足群(25OHD ≥ 22 ng/mL)でもともに認められた。また同じ遺伝子型であれば、D不足群が充足群に比較して骨折罹患率が高値であった。すなわち、D充足群でTGF-SNPがCC型の症例がもっとも脊椎骨折の罹患率が低く(12%)、一方、D不足群でCT/TT型ではもっとも罹患率が高かった(50%)。そして、その他の場合、すなわちD不足群でCC型(脊椎骨折罹患率31%)あるいはD充足群でCT/TT型(同38%)では、骨折罹患率は中間的な値であることが判明した。

活性型ビタミンD製剤に対する反応性に関しては、本剤を投与され1年以上経過を観察し得た44症例で検

表1 遺伝子型と各種臨床指標(エントリーされた112症例の初期データ)

	CC 型 (30 例)	CT/TT 型 (82 例)
年齢 (歳)	73.7 ± 6.9	72.5 ± 7.7
身長 (cm)	149.7 ± 6.2	149.1 ± 5.8
体重 (kg)	45.0 ± 6.1	47.3 ± 7.2
血清 25OHD (ng/mL)	22.2 ± 3.9	22.4 ± 4.6
血清 BAP (U/L)	27.1 ± 9.9	26.3 ± 10.5
尿中 NTX (nmolBCE/mmol・Cr)	45.3 ± 18.4	46.1 ± 32.2
腰椎 BMD (g/cm ²)	0.745 ± 0.135	0.761 ± 0.128
大腿骨頸部 BMD (g/cm ²)	0.614 ± 0.084	0.614 ± 0.079
橈骨 BMD (g/cm ²)	0.400 ± 0.060	0.389 ± 0.073

平均値 ± 標準偏差

表2 脊椎骨折の罹患率

	CC 型	CT/TT 型
骨折あり	6 例	35 例
骨折なし	24 例	47 例

$p = 0.027$

討した。表4に示すとおり、腰椎 BMD は CC 型と CT/TT 型との間で差を認めず、前値に比較して CC 型では 100.4%、CT/TT 型では 101.3% であった。一方、大腿骨頸部 BMD では両遺伝子型の間に明らかな反応性の差が認められ、CC 型では前値に対して 101.6% と増加したが、CT/TT 型では 97.9% と減少した。すなわち、CC 型が CT/TT 型に比較して活性型ビタミン D 製剤に対する反応性が良好であることが確認された。

考 察

山田ら⁵⁾は、TGF-SNP と BMD との関連を 287 例の閉経後女性で検討し、CC 型では CT/TT 型に比較して腰椎 BMD が有意に高値であったと報告している。さらに山田ら⁶⁾は、TGF-SNP と脊椎骨折との関連を 457 例の閉経後女性で検討し、CC 型では CT/TT 型に比較して脊椎骨折罹患率が有意に低値であったと報告している。

今回の我々の成績は、本質的に山田らの報告と矛盾しない。腰椎 BMD に関しては、山田らの報告と異なり、我々の検討した症例では CC 型と CT/TT 型との間に有意差は認められなかった。しかしながら、山田らも、BMD データで補正してもなお脊椎骨折罹患率は CC 型が CT/TT 型よりも有意に低値であったと報告している。以上のことから、TGF-SNP は BMD とは独立して脊椎骨折に影響を及ぼしうと推察される。

TGF-β1 は骨芽細胞でも産生・分泌され、活性化された TGF-β1 は骨芽細胞を刺激することにより骨マトリッ

表3 遺伝子型と脊椎骨折との関係に及ぼす血清 25OHD の影響

	25OHD < 22 ng/mL		25OHD ≥ 22 ng/mL	
	CC 型	CT/TT 型	CC 型	CT/TT 型
骨折あり	4 例	17 例	2 例	18 例
骨折なし	9 例	17 例	15 例	30 例
骨折率	31%	50% ^a	12% ^b	38% ^c

$p = 0.008$ (a vs b), $p = 0.05$ (b vs c)

クスの形成を促進することが知られている。TGF-SNP は TGF-β1 遺伝子上においてシグナルペプチドをコードする領域に位置しているため⁷⁾、Leu10→Pro 置換によってシグナルペプチドの構造が大きく変化し、TGF-β1 の分泌効率が変化する可能性が推測される。事実、山田らは⁸⁾、血中 TGF-β1 濃度は TT 型 < CT 型 < CC 型の順に増加すると報告している。TGF-SNP と脊椎骨折との関連は、本 SNP が骨微小環境における TGF-β1 濃度にも影響し、骨マトリックス形成を変化させることにより骨質を変化させた結果であるのかも知れない。

表3に示した脊椎骨折と TGF-SNP ならびに血清 25OHD 値との関係は、あくまでも骨折罹患率であり、将来の骨折リスクを占うことができるか否かに関してはさらに検討を要する。しかしながら我々は現在、図2に示す方法によって各症例の脊椎骨折リスクを評価し、高リスク症例ではより注意深い転倒予防などの指導を行い、一方で低リスク症例では薬物療法開始基準をやや緩めに判定するなどして、リスクに応じた治療方針の設定を行っている。

表4に示したとおり、活性型ビタミン D 製剤に対する反応性に関して腰椎 BMD では差を認めなかった理由は不明であるが、この年代(平均年齢 73 歳)では一般に腰椎には変形性脊椎症の影響が強く出ているため、

表4 活性型ビタミンD製剤を服用していた44症例のBMDの年次変化
(%前値)

腰椎		大腿骨頸部	
CC型(17例)	CT/TT型(27例)	CC型(16例)	CT/TT型(27例)
100.4±10.6	101.3±4.8	101.6±5.1 ^a	97.9±5.6 ^b

$p = 0.035$ (a vs b), 平均値 ± 標準偏差

図2 脊椎骨折のリスクを評価する手順
図1に示したアルゴリズムと同様の手続きにより脊椎骨折のリスクを評価している。

BMD自体が過大評価され数値が実際の骨粗鬆症の程度を反映していない可能性がある。

我々が新規に開設したオーダーメイド骨粗鬆症外来は、まだ単一のSNP情報のみを利用している段階である。将来的には、骨粗鬆症の病態に関わることが知られている複数のSNP情報を有機的に活用することにより、より精度の高い骨折リスク評価ないし薬剤反応性予測が可能となるよう漸次システムのバージョンアップをはかる必要がある。とは言え、まずは単純なシステムで、患者への説明と文書による同意取得、迅速なSNP解析、SNP情報を含む個人情報保護体制の整備、SNP情報の診療への応用、といった一連の流れが確立され、主たる業務を担うメディカルコーディネーターを養成できたことは、今後の発展に向けた準備段階として一定の成果があったと考えている。

最後に指摘しておかねばならないが、本研究の対象は112例であり、遺伝子相関解析としてはサンプルサイズが小さいので、現時点では偶発的所見である可能性を否定できない。また、TGF-SNPが骨密度や脊椎骨折と相関するという報告がある一方で、相関を認めなかったとする報告も多く⁹⁾、対象の人種差や年齢差が研究成績に大きく影響する可能性もある。したがって、今後さらに

症例数を増やしていく過程で、現行システムでエントリーした症例の経過観察、特に各遺伝子型における新規骨折の頻度ならびに活性型ビタミンD製剤の併用効果を評価し、TGF-SNPを利用することがどの程度の臨床的有用性をもたらすのかを明らかにしていかなければならないと考えている。

文 献

- 1) Ralston SH, de Crombrughe B: Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Gene & Dev* 2006; 20: 2492-2506.
- 2) Hirschhorn JN, Gennari L: Bona fide genetic associations with bone mineral density. *N Engl J Med* 2008; 358: 2403-2405.
- 3) Yamada Y, Harada A, Hosoi T, Miyauchi A, Ikeda K, Ohta H, et al: Association of transforming growth factor-β1 genotype with therapeutic response to active vitamin D for postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 415-420.
- 4) Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R: Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005; 16: 713-716.
- 5) Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, et al: Association of a polymorphism of the transforming growth factor-β1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in Japanese women. *J Bone Miner Res* 1998; 13: 1569-1576.
- 6) Yamada Y, Miyauchi A, Takagi Y, Nakauchi K, Miki N, Mizuno M, et al: Association of a polymorphism of the transforming growth factor-β1 gene with prevalent vertebral fractures in Japanese women. *Am J Med* 2000; 109: 244-247.
- 7) Derynck R, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, et al: Human transforming growth factor-β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature* 1985; 316: 701-705.
- 8) Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A: Association of a polymorphism of the transforming growth factor-β1 gene with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 452-460.
- 9) Langdahl BL, Uitterlinden AG, Ralston SH, Trikalinos TA, Balcells S, Brandi ML, et al: Large-scale analysis of association between polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 gene (TGFB1) and osteoporosis: the GENOMOS study. *Bone* 2008; 42: 969-981.

The implementation of personalized treatment for osteoporosis

Seijiro Mori¹⁾, Yuko Chiba¹⁾, Seizo Yamamoto²⁾, Takayuki Hosoi³⁾, Toshiyuki Horiuchi¹⁾,
Fumi Kamimiya¹⁾, Yoshiaki Tamura¹⁾, Atsushi Araki¹⁾ and Hideki Ito¹⁾

Abstract

Aim: To establish personalized treatment of osteoporosis.

Methods: A T869→C polymorphism in exon 1 of the transforming growth factor-β1 gene, which results in a Leu→Pro substitution at amino acid 10, is reported to be associated with the rate of bone loss as well as the response to active vitamin D treatment. Therefore, we determined this single nucleotide polymorphism (SNP) to estimate the need of active vitamin D treatment. We also determined serum level of 25 hydroxy-vitamin D to evaluate a degree of vitamin D fulfillment. Based on these data, we categorized postmenopausal patients into four groups; C homozygote with vitamin D deficiency patients to whom 1 μg/day active vitamin D was administered, C homozygote without vitamin D deficiency patients or those who bore at least one T-allele with vitamin D deficiency to whom 0.5 μg/day active vitamin D was administered, and patients who bore at least one T-allele without vitamin D deficiency to whom no drug was given. The patients were checked up every 6 months with regard to changes in bone mineral density and occurrence of fresh fractures.

Results: The SNP was associated with prevalent vertebral fractures; the frequency of the T allele was significantly greater in patients with vertebral fractures. Furthermore, the serum level of 25 hydroxy-vitamin D was significantly lower in patients with vertebral fractures, which were observed in 17 out of 34 patients who bore at least one T-allele as well as vitamin D deficiency, while only 2 of 15 homozygous C-allele carriers without vitamin D deficiency suffered from fractures.

Conclusion: These findings suggest that the SNP in combination with the serum level of 25 hydroxy-vitamin D can predict fracture risk in postmenopausal osteoporosis.

Key words: *Single nucleotide polymorphism (SNP), Personalized treatment, 25 hydroxy-vitamin D, Vertebral fracture, Transforming growth factor-β1 (TGF-β1)*

(Nippon Ronen Igakkai Zasshi 2008; 45: 655–659)

1) Department of Endocrinology, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

2) Department of Orthopedics, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

3) Department of Advanced Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology