

学位論文題名

Estrogen receptor α polymorphism as a genetic marker for bone loss, vertebral fractures and susceptibility estrogen

(骨量減少, 脊椎圧迫骨折, エストロゲン感受性に対する
遺伝子マーカーとしてのエストロゲンレセプター α 遺伝子多型)

学位論文内容の要旨

はじめに

骨粗鬆症は高齢化社会において年々増加している疾患であり、早期発見、早期治療が骨折の発症予防に重要である。骨粗鬆症には遺伝的素因が関与していることが知られており、骨粗鬆症との関連が指摘されている候補遺伝子は、若年期の最大骨量の獲得あるいは閉経後の骨量減少のいずれかに影響を及ぼすことで骨粗鬆症の発症に関与すると考えられている。ヒトの遺伝子多型と骨量との関連については、Morrisonらが1994年に初めてvitamin D receptor(VDR)遺伝子多型について報告した。ついでestrogen receptor α (ER α) 遺伝子多型、apoprotein E遺伝子多型、collagen type I遺伝子多型などと骨量との関連が報告されてきているが、一致した成績は得られていない。エストロゲンは骨代謝において重要な役割を果たしており、ER α 遺伝子多型と骨量との関連について研究することは骨粗鬆症・骨塩減少症の予知、予防のために有用であると思われる。ER α 遺伝子多型であるPvuII・XbaI遺伝子多型が、骨量、脊椎圧迫骨折、閉経後の骨量減少の程度、ホルモン補充療法(HRT)に対する反応性について有用な遺伝子マーカーであるかを検討することを本研究の目的とした。

対象と方法

1995年3月から1998年10月までの間に受診し、骨密度(BMD)を測定、インフォームドコンセントをうけた女性(n=569)の中から次に該当する283人を除外した286人を対象とした。除外基準は医学的合併症、骨代謝に影響を及ぼす可能性のある薬剤の摂取、早発閉経、卵巣摘出の既往、腰椎の高度な変形、週3回以上の定期的な運動、閉経前女性であった。対象(N=286)の平均年齢は 60.0 ± 5.4 歳(44-75歳、M $\pm$ SD)、平均閉経年齢は 50.3 ± 2.9 歳、平均閉経後年数は 9.50 ± 5.4 年であった。WHOのcriteriaによる分類(1994)では、対象の88人(30.8%)が骨粗鬆症、96人が骨塩減少症(33.5%)、102人(35.7%)が正常であった。少なくとも1つ以上の脊椎圧迫骨折をもつ女性48人を骨折群、骨折群と年齢とBMIを一致させた骨折のない女性149人を対照として非骨折群と分類した。58人にHRT(0.625mg/dayの結合型エストロゲンの連続投与あるいは経皮エストラジオール2mg隔日投与、子宮をもつ女性は2.5mg/dayのMPAを併用)による治療を開始した。ER α 遺伝子多型は、末梢血よりDNAを抽出後、制限酵素PvuII, XbaIの切断部位を挟むintron 1の部分をPCR法にて増幅し、PvuII, XbaIを用いてRFLP(restriction fragment length polymorphism)解析を行った。切断断片

はP、p (PvuII)、X、x (XbaI)で表現し、切断点を持つものをp、x、持たないものをP、Xと分類した。骨密度はDEXA法(Hologic QDR 2000)で第2腰椎から第4腰椎を測定した。BMDは年齢による影響を除くためにZ-scoreで比較した。統計学的解析は、BMDとの関連の検討ではANOVA、FisherのPLSD(protected least-significant-difference)、脊椎圧迫骨折の検討では χ^2 square test、閉経後の骨量減少との解析では相関解析、HRT後のBMD変化の検討ではnon-paired t testを用いた。P value 0.05未満で統計学的に有意差ありと判定した。

成績

1)対象女性(N=286)のPvuII、XbaIによるRFLPの頻度は、PPXX 3.9% (n=11), PPXx 8.4% (n=24), PPxx 5.9% (n=17), PpXx 22.4% (n=64), Ppxx 30.0% (n=86), ppXx 0.4% (n=1), ppxx 29.0% (n=83)であった。ER α 遺伝子多型の型別のZ-score(M $\pm$ SE)は、PPXX 0.02 $\pm$ 0.31, PPXx 0.51 $\pm$ 0.21, PPxx -0.22 $\pm$ 0.21, PpXx 0.28 $\pm$ 0.15, Ppxx 0.19 $\pm$ 0.12, ppXx 0.54, ppxx 0.52 $\pm$ 0.12であり、PPxx群のZ-scoreは他の多型を併せた群のZ-scoreに比べて有意(p<0.05)に低かった。また、Pxを2つもつ haplotype (PPxx)を11群、Pxを1つもつ haplotype (PPXx, Ppxx)を10群、Pxをもたないもの(PPXX, ppXx, ppxx)を00群として分類し解析した結果、11群のZ-scoreは00群のZ-scoreに比べて有意(p<0.05)に低かった。2)骨折群(n=48)、非骨折群(n=149)におけるER α 遺伝子多型の出現頻度(骨折群 vs 非骨折群)はそれぞれPPXX 4.1% vs 2.0%, PPXx 6.1% vs 10.1%, PPxx 8.2% vs 4.1%, PpXx 20.4% vs 16.9%, Ppxx 28.6% vs 30.4%, ppXx 0.0% vs 0.7%, ppxx 32.6% vs 35.8%であった。閉経後10年以内では、骨折群で9人中2人(22.2%)がPPxx、非骨折群で39人中2人(5.1%)がPPxxであり、PPxx群は他の多型を併せた群に比べて骨折頻度が高い傾向(p=0.09)を示した。3)遺伝子多型別に閉経後年数とZ-scoreとの関連について検討した結果、閉経後10年以内では、pp群でのみ閉経後年数が経過するにつれてZ-scoreが明らかに減少した(r=0.365, p<0.05)。4)HRT施行後のBMDの変化率の検討では、HRT開始6ヵ月後のBMDの平均変化率(M $\pm$ SE)は、PP 4.5 $\pm$ 0.9%, Pp 4.0 $\pm$ 0.7%, pp 7.4 $\pm$ 2.6% (M $\pm$ SE)であり、pp群の変化率はPp群の変化率に比べて大きい傾向(p=0.08)であった。閉経後10年以内の女性では、HRT開始6ヵ月後のBMDの平均変化率はPP 4.8 $\pm$ 1.6%, Pp 5.3 $\pm$ 0.5%, pp 14.2 $\pm$ 5.3%であり、pp群の変化率はPp、PP群の変化率に比べてそれぞれ有意(p<0.01, p<0.05)に大きかった。

考察

骨粗鬆症に対する遺伝子多型の関連について、4つの観点から検討した。第1は、ER α 遺伝子多型が閉経後女性において低骨量の遺伝的マーカーになりうるかという点である。ER α 遺伝子多型と骨量との関連については多くの報告があるが、いまだ成績は一致していない。その原因として、対象集団の人種、年齢、閉経状態、生活環境などの背景の違いが関連していると思われる。閉経前の女性を対象に含んだ報告もあるが、ER α 遺伝子多型の骨粗鬆症の遺伝子マーカーとしての役割を検討するには、対象を閉経後女性に限定するべきであろう。本研究ではP、xが閉経後の低骨量に関連することが明らかとなった。第2は、ER α 遺伝子多型が骨粗鬆症性骨折の遺伝的マーカーになりうるかという点である。本研究では骨折群で非骨折群に比べてPPxx群の頻度が高い傾向を示した。これらの結果は、PPxx多型は低骨量を予知するのみならず、閉経後10年以内の比較的若い女性において脊椎圧迫骨折のリスクを予知するのに有用であることを示している。第3は、ER α 遺伝子多型が閉経後の骨量減少に関連があるかという点である。ER α 遺伝子多型は年齢に伴う骨量減少よりも若年期の最大骨量に影響しているとの報告もある。Z-scoreは年齢にmatchした数値であるので、骨量が平均的速度で減少したならばZ-scoreは変化しないと考えられる。本研究ではエストロゲンの減少の影響が大きい閉経後10年以内に、pp群で閉経後年数とZ-scoreとの間に負の相関を認めたことから、pp群では他群に比べて骨量減少速度が大きい可能性が示された。しかしこのことはpp多型が必ずしも骨粗鬆症のハイリスクで

あることを意味しているのではなく、閉経後早期ではpp多型がエストロゲンの減少に対して反応が大きいことを示したと思われる。第4は、ER α 遺伝子多型がHRTによるBMDの変化率に関連しているかという点である。本研究ではpp群では他群に比べて治療開始6ヵ月後にBMD増加が大きい傾向を示した。よって、pp多型は他の多型に比べてエストロゲンレベルの変化に対する感受性が高い可能性が示された。以上の結果から、本研究は、ER α 遺伝子多型は骨粗鬆症ならびに骨粗鬆症性骨折のハイリスク女性を抽出するのに有用であることを明らかにするとともに、エストロゲン感受性にも関わることを初めて示唆した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 三 浪 明 男

副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

Estrogen receptor α polymorphism as a genetic marker for bone loss, vertebral fractures and susceptibility estrogen

(骨量減少, 脊椎圧迫骨折, エストロゲン感受性に対する
遺伝子マーカーとしてのエストロゲンレセプター α 遺伝子多型)

エストロゲンは骨代謝において重要な役割を果たしており、estrogen receptor α (ER α) 遺伝子多型と骨量との関連について研究することは骨粗鬆症・骨塩減少症の予知、予防のために有用であると思われる。ER α 遺伝子多型である PvuII・XbaI 遺伝子多型が、骨量、脊椎圧迫骨折、閉経後の骨量減少の程度、ホルモン補充療法(HRT)に対する反応性について有用な遺伝子マーカーであるかを検討することを本研究の目的とした。

骨密度(BMD)測定後、インフォームドコンセントをうけた女性(n=569)の中から除外基準(医学的合併症、骨代謝に影響を及ぼす可能性のある薬剤の摂取、早発閉経、など)を有する283人を除いた286人を対象とした。対象(N=286)の平均年齢は 60.0 ± 5.4 歳(44-75歳、 $M \pm SD$)、平均閉経年齢は 50.3 ± 2.9 歳、平均閉経後年数は 9.50 ± 5.4 年であった。WHOのcriteriaによる分類(1994)では、対象の88人(30.8%)が骨粗鬆症、96人が骨塩減少症(33.5%)、102人(35.7%)が正常であった。少なくとも1つ以上の脊椎圧迫骨折をもつ女性48人を骨折群、骨折群と年齢とBMIを一致させた骨折のない女性149人を対照として非骨折群と分類した。ER α 遺伝子多型は、末梢血よりDNAを抽出後、制限酵素 PvuII, XbaI の切断部位を挟む intron 1 の部分をPCR法にて増幅し、PvuII, XbaI を用いてRFLP(restriction fragment length polymorphism)解析を行った。切断断片はP、p (PvuII)、X、x (XbaI)で表現し、切断点を持つものをp、x、持たないものをP、Xと分類した。骨密度はDEXA法(Hologic QDR 2000)で第2腰椎から第4腰椎を測定した。BMDは年齢による影響を除くためにZ-scoreで比較した。

1)対象女性(N=286)のPvuII, XbaIによるRFLPの頻度は、PPXX 3.9% (n=11), PPXx 8.4% (n=24), PPxx 5.9% (n=17), PpXx 22.4% (n=64), Ppxx 30.0% (n=86), ppXx 0.4% (n=1), ppxx 29.0% (n=83)であった。ER α 遺伝子多型の型別のZ-score(Mean $\pm$ SE)は、PPXX 0.02 ± 0.31 , PPXx 0.51 ± 0.21 , PPxx -0.22 ± 0.21 , PpXx 0.28 ± 0.15 , Ppxx 0.19 ± 0.12 , ppXx 0.54, ppxx 0.52 ± 0.12 であり、PPxx群のZ-scoreは他の多型を併せた群のZ-scoreに比べて有意($p < 0.05$)に低かった。また、Pxを2つもつhaplotype (PPxx)を11群、Pxを1つもつhaplotype (PPXx, Ppxx)を10群、Pxをもたないもの

(PPXX, PpXX, ppXx, ppxx)を00群として分類し解析した結果、11群のZ-scoreは00群のZ-scoreに比べて有意($p<0.05$)に低かった。2)骨折群($n=48$)、非骨折群($n=149$)におけるER α 遺伝子多型の出現頻度(骨折群 vs 非骨折群)は両群間に差はなく、閉経後10年以内では、骨折群で9人中2人(22.2%)がPPxx、非骨折群で39人中2人(5.1%)がPPxxであり、PPxx群は他の多型を併せた群に比べて骨折頻度が高い傾向($p=0.09$)を示した。3)遺伝子多型別に閉経後年数とZ-scoreとの関連について検討した結果、閉経後10年以内では、pp群でのみ閉経後年数が経過するにつれてZ-scoreが明らかに減少した($r=0.365$, $p<0.05$)。4)閉経後10年以内の女性では、HRT開始6ヵ月後のBMDの平均変化率はPP $4.8 \pm 1.6\%$, Pp $5.3 \pm 0.5\%$, pp $14.2 \pm 5.3\%$ であり、pp群の変化率はPp、PP群の変化率に比べてそれぞれ有意($p<0.01$, $p<0.05$)に大きかった。

公開発表に際し、副査の三浪教授から、椎体骨折診断時の椎体終板の低下の判断の難しさ、骨量減少速度の大きさから治療上の指標としてのppの可能性、ER β とER α との相互作用について、また副査の藤本教授から、ppをもつ女性へのビスフォスフォネートの投与、閉経前の骨量減少に対する予防薬のあり方などについて質問があった。最後に、主査の石橋教授から、ER α 遺伝子多型とエストロゲン感受性との関連について、骨量減少と圧迫骨折とを区別して検討した理由などについて質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象症例の統計学的解析結果、文献的情報、自身の臨床経験をもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、骨量減少、脊椎圧迫骨折、エストロゲン感受性に対する遺伝子マーカーとしてのER α 遺伝子多型の意義を示唆した本研究の成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。