

Thesis

ビタミンD結合タンパク(DBP)遺伝子多型と閉経後女性における
骨量・骨代謝マーカとの関連

埼玉医科大学産婦人科学教室

(指導：畑 俊夫教授)

清水 省志

骨は形成・吸収(リモデリング)を繰り返しながら、その構造、骨量、強度および体液のカルシウム濃度を維持している。加齢、閉経等により、リモデリングが破綻して骨量が低下し、骨の微細構造が変化して脆弱性が亢進した疾患が骨粗鬆症であり、高齢化社会が進むなか老後のQOLを左右する大きな因子と考えられる。

加齢における骨粗鬆症との相関を示す遺伝子マーカを検索するために、骨代謝に関連すると想定される遺伝性因子(Luteinizing Hormone- β subunit:LH- β , α 2-macroglobulin:A2M, Tumor Necrosis Factor- α :TNF- α , Vitamin D-Binding Protein:DBP)に着目し、その遺伝子多型と骨量、骨代謝マーカについて解析し検討を行った。

健康なボランティアの閉経後女性236名(年齢41-91歳, 閉経後1年以上, 平均年齢 \pm SD;64.3 \pm 9.2歳)の血液一般生化学検査, 骨形成マーカとしてアルカリフォスファターゼ, オステオカルシン, 骨吸収マーカとしてピリジノリン, デオキシピリジノリンそして脊椎骨密度データを用いた。

LH- β 遺伝子はエクソン2(Trp8ArgおよびIle15Thr置換), A2M遺伝子はVal1000Ile置換, TNF- α 遺伝子はプロモーター領域の-308G/A, -857C/Tの2カ所の置換, DBP遺伝子はエクソン11(Glu416AspおよびLys420Thr置換)について検討したところ, LH- β 遺伝子, A2M 遺伝子, TNF- α 遺伝子では多型と骨密度, 骨代謝マーカとの有意な相関は示さなかった。一方, DBP 遺伝子多型では骨代謝マーカであるアルカリフォスファターゼ, オステオカルシンおよびデオキシピリジノリンについて有意な相関が示された。DBPはビタミンDと結合し運搬する役割があり, 骨代謝に影響をおよぼしている可能性が考えられるが, DBP 遺伝子多型と骨密度との相関は有意ではなかった。

本研究により, DBP 遺伝子多型と種々の骨代謝マーカとの相関を示し, 骨代謝回転状態や将来における骨粗鬆症発症の遺伝子マーカの候補となりうることが示唆された。

Keywords: DBP, LH- β , A2M, TNF- α , 遺伝子多型, 骨粗鬆症, 骨吸収, 骨形成

緒言

骨は脊椎動物の支持組織であるとともに、体液のカルシウム恒常性維持のためのカルシウム貯蔵庫としても機能している。そのため骨は、形成・吸収を繰り返しながら(リモデリング)、その構造、骨量および強度、そして体液のカルシウム濃度を維持している。本来は骨形成と骨吸収が等しいため骨量は一定に保たれるが、骨吸収が骨形成を上回ると骨量の低下がおこる。このように、リモデリングの破綻によって骨量

医学博士 甲第931号 平成16年3月31日(埼玉医科大学)

が減少し、骨の微細構造が変化して、脆弱性が亢進することによって骨折をきたしやすくなる疾患が骨粗鬆症である¹⁾。退行期骨粗鬆症は、大別すると低回転型骨代謝および高回転型骨代謝に分けられている。低回転型骨代謝は、加齢による骨芽細胞の機能低下が主体となり骨形成が低下することによって起こる。高回転型骨代謝は、閉経によって惹起されるエストロゲンの抗骨吸収作用の減弱により骨吸収が亢進することによって発症することが知られている。西暦2000年の厚生白書によれば、退行期骨粗鬆症の罹患者数は1200万人と推定されており、今後ますます進む高齢化社会に

においてその数は増加の一途をたどると思われ、大きな社会問題となっている。それ故、将来的な医療の観点から、骨折をひきおこし老後のQOLを低下させる骨粗鬆症は、早急に解決すべき重要な課題として考えられる。

加齢における骨量・骨代謝マーカーに影響すると考えられる候補因子として、エストロゲン^{2,3)}、アンドロゲン⁴⁾、副甲状腺ホルモン⁵⁾等のホルモン類および、ビタミンD⁶⁾、ビタミンK⁷⁾等のビタミン類の関与が指摘されている。閉経後のエストロゲン欠乏により、インターロイキン-1 β (IL-1 β)、インターロイキン-6 (IL-6)、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)の分泌が増加し、骨密度が低下することが報告されている⁸⁾。一方男性におけるアンドロゲンの欠乏が骨量減少を引き起こすことは、前立腺癌患者に対する抗アンドロゲン療法において認められている⁹⁾。血中カルシウム濃度により副甲状腺ホルモンの転写が制御されていることが示唆されており¹⁰⁾、*in vitro*でエストロゲンおよびプロゲステロンが副甲状腺ホルモンの分泌を増加させることが報告されている¹¹⁾。ビタミンDは肝臓および腎臓で代謝を受け活性型となり、腸管からのカルシウム代謝を調節している。ビタミンKはオステオカルシン分子のグルタミン残基をカルボキシル化して骨形成能に関与すると考えられる¹²⁾。

このような骨代謝機構の中で、加齢に伴う骨の代謝に関連する遺伝性因子として、Luteinizing Hormone- β subunit (LH- β)、 α 2-macroglobulin (A2M)、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、Vitamin D-Binding Protein (DBP)に注目した。

一般的にLHは下垂体前葉から放出されるホルモンとして、卵巣を刺激して排卵を促したり、プロゲステロン、エストラジオール産生を高めていることが知られている。またLH受容体は性腺以外に骨芽細胞にも存在しており、LH受容体ノックアウトマウスは雄では生後5ヶ月以降に骨密度の低下が見られ、雌では生後9~10週で骨量の減少が見られている。すなわち、LHシグナルの欠如が骨形成を減少または骨吸収を増加させていることを示している¹³⁾。

A2Mはアルツハイマー病に関連して見つかったタンパク分解酵素阻害物質であり¹⁴⁾、破骨細胞から誘導される酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP)はA2Mと複合体を形成することにより血清中で安定した形態をなしている^{15,16)}。また前立腺癌患者において骨転移があると血清A2Mは有意に低値であり、骨代謝との関連が示唆されている¹⁷⁾。

TNF- α は主に単球/マクロファージより産生され、多くの感染、炎症性疾患に関連する主要な因子であり、インスリン受容体からのシグナルを阻害することにより、インスリン抵抗性にも関与している¹⁸⁾。また、骨代謝に関しては、破骨細胞を活性化すること

により骨破壊性の関節炎を惹起させることが知られている¹⁹⁻²¹⁾。さらに卵巣摘出をしたマウスでは培養末梢血単球からのTNF- α 産生が亢進しているが、エストロゲン補充によって正常化する²²⁾。野生型マウスでは卵巣摘出により有意な骨密度の低下を示すが、TNFノックアウトマウスでは卵巣摘出による骨量の低下は示していない²³⁾。またTNF受容体I (p55)ノックアウトマウスでは卵巣摘出による骨量の低下は示さないが、TNF受容体II (p75)ノックアウトマウスでは卵巣摘出により有意な骨密度の低下を示す²³⁾。すなわちTNFシグナルはTNF受容体I (p55)を介しており、TNF量が骨代謝に影響を及ぼしていることが示唆されている。

DBPはビタミンDの主要なcarrier proteinとして、ビタミンDと結合し標的臓器に運搬する作用を持つと考えられている²⁴⁾。ビタミンDは肝臓に運ばれて、25位が水酸化を受けて25(OH)D₃になり、さらに腎臓に運ばれて、1位が水酸化され、活性型の1,25(OH)₂D₃となる²⁵⁾。1,25(OH)₂D₃は消化管に作用して、カルシウムの吸収を促進し、血中カルシウムを上昇させる²⁶⁾。その結合能は25(OH)D₃、24,25(OH)₂D₃で高く、1,25(OH)₂D₃で低い。活性型ビタミンDはDBPと結合している際の活性は低く、遊離されてその活性を示している²⁴⁾。またDBPは骨代謝にも関与しており、大理石骨病モデルラットの新生児に、DBPより変換されたmacrophage activating factor (DBP-maf)を投与すると、破骨細胞の機能が增強し骨髄腔の拡大が見られ、投与前は形態学的に異常であった破骨細胞が投与後に正常化している^{27,28)}。

本研究では、加齢に伴う骨代謝に影響する候補因子について、LH- β 、A2M、TNF- α 、およびDBP遺伝子多型と骨代謝の関連を検討し、それぞれの遺伝子多型と骨密度、骨代謝マーカーとの相関を探ると共に、将来的な骨粗鬆症の分子マーカーとしての可能性についても併せて検討した。

対象ならびに方法

対象は中部地方在住の健康なボランティアの非血縁閉経後女性236名(年齢41-91歳、閉経後1年以上、平均年齢 \pm SD; 64.3 \pm 9.2歳)で、血液一般生化学検査、骨代謝マーカーおよび脊椎骨密度(DXA: Dual Energy X-ray Absorptiometry, QDR-1000)データを使用した。

骨形成マーカーとして、骨芽細胞の酵素活性(アルカリフォスファターゼ: ALP)と骨形成の過程で放出される骨基質構成成分(オステオカルシン: Intact-OC)、骨吸収マーカーとして、骨吸収に伴いコラーゲンから放出される、I型コラーゲン架橋物質(ピリジノリン: PD, デオキシピリジノリン: DPD)を用いた。

すべての対象者に対し、研究の目的と抽出したゲノムDNAおよびそれにより得られたデータは研究のみ使用することを説明し、所轄官庁のガイドラインに

Table 1. PCR 反応条件およびプライマーセット

Gene	Position	Substitution	Primer · Reaction conditions · Used gel	Fragment	R.E.
LH-β	Trp8Arg	TGG/CGG	F5'-GAAGCAGTGTCTTCTCCCA-3'	660 bp	<i>NcoI</i> <i>FokI</i>
	Ile15Thr	ATC/ACC	R5'-GAAGAGGAGGCCTGAGAGT-3' 95°C-1min, 65°C-2min, 72°C-3min, 25cycles 3% Nusieve GTG agarose gel		
A2M	Val1000Ile	GTC/ATC	F5'-ATCCCTGAAACTGCCACCAA-3' R5'-GTAACCTGAAACCTACTGGAA-3' 95°C-30sec, 56°C-30sec, 72°C-1min, 25cycles 2% agarose gel	615 bp	<i>MboI</i>
TNF-α	-308	G/A	F5'-GAGGCAATAGGTTTGTGAGGGCCAT-3' R5'-GGGACACACAAGCATCAAG-3' 95°C-30sec, 59°C-1min, 72°C-2min, 35cycles 3.5% Nusieve GTG agarose gel	146 bp	<i>NcoI</i>
TNF-α	-857	C/T	F5'-GGCTCTGAGGAATGGGTTAC-3' R5'-CCTCTACATGGCCCTGTCTAC-3' 95°C-30sec, 59°C-1min, 72°C-2min, 35cycles 3.5% Nusieve GTG agarose gel	128 bp	<i>MaeII</i>
DBP	Glu416Asp	GAG/GAT	F5'-ACATGTACTAAGACCTTAC-3'	233 bp	<i>HaeIII</i> <i>StyI</i>
	Lys420Thr	AAG/ACG	R5'-GATTGGAGTGCATACGTTTC-3' 95°C-1min, 50°C-1min, 72°C-30sec, 35cycles 3.5% Nusieve GTG agarose gel		

R.E.;restriction enzyme

Ile/Ile:Ile/Thr:Thr/Th r=88.2:11.8:0%であった。Trp8Arg多型においてはTrp/Trp群が他群(Trp/Arg+Arg/Arg群)と比較し、アルカリフォスファターゼが有意に高値(p=0.004)であり、総コレステロールが有意に低値(p=0.011)であったが、骨密度、血中カルシウム、オステオカルシン、ピリジノリン、デオキシピリジノリン、トリグリセリドに有意差は示さなかった。Ile15Thr多型においては骨密度、血中カルシウム、骨代謝マーカー、総コレステロール、トリグリセリドには有意差を示すものはなかった(Table 2-a)。

アミノ酸変異をとまなうA2M Val1000Ile多型の分布は、A/A:A/G:G/G=89.4:10.6:0%であり、これらの多型においてはA/A群がA/G群と比較して総コレステロールが有意に高値(p=0.036)であったが骨密度、血中カルシウム、骨代謝マーカー、トリグリセリドには有意差を示すものはなかった(Table 2-a)。

TNF-αプロモーター領域の多型分布は、Position-308多型ではG/G:G/A:A/A=92.1:7.9:0%、Position-857多型ではC/C:C/T:T/T=54.7:42.1:3.2%であった。Position-308多型においては骨密度、血中カルシウム、骨代謝マーカー、総コレステロール、トリグリセリドには有意差を示すものはなく、-857多型において、C/C群が他群(C/T+T/T群)と比較しオステオカルシンが有意に低値(p=0.023)を示したが、骨密度、血中カルシウム、アルカリフォスファターゼ、ピリジノリン、デオキシピリジノリン、総コレステロール、トリグリセリドに有意差は示さなかった(Table 2-b)。

DBPエクソン11での多型分布はGc1S Homo:Gc1S Hetero:Gc1S(-)=6.3:33.5:60.2%であった。これらの多型と骨密度、血中カルシウム、総コレステロール、トリグリセリドにおいて有意差は得られなかった

(Table 2-b)。しかしながら骨代謝マーカーで有意差が示され、それを以下に示す。骨形成マーカーのアルカリフォスファターゼ値は、Gc1S Homo群はGc1S Hetero群(p=0.003)、Gc1S(-)群(P=0.007)、と比較して有意に低値を示した(Fig. 2)。さらにオステオカルシンではGc1S Homo群はGc1S(-)群(P=0.036)と比較して有意に低値を示した。一方、Gc1S Hetero群に対しては低い傾向を示したが、有意差は得られなかった(p=0.091)(Fig. 3)。骨吸収マーカーのデオキシピリジノリンは、Gc1S Homo群はGc1S(-)群(P=0.045)と比較して有意に低値であったが、Gc1S Hetero群に対しては低い傾向を示し、有意差は得られなかった(p=0.085)(Fig. 4)。Gc1SHomo群は他群(Gc1S Hetero+Gc1S(-)群)と比較して、骨形成マーカーのアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、骨吸収マーカーのデオキシピリジノリンで有意に低値を示し、骨吸収マーカーのピリジノリン低値の傾向を示した(Table 2-b)。

考 察

4種類の遺伝子、計6カ所の遺伝子多型と骨密度、骨代謝マーカーとの関連について検討した。LH-β Ile15Thr多型、A2M Val1000Ile多型、TNF-α -308多型では、骨密度および骨代謝マーカーにおいて有意差を示さなかった。LH-β Trp8Arg多型ではアルカリフォスファターゼにおいて有意差を示し、TNF-α -857多型ではオステオカルシンにおいて有意差を示したが、他の骨代謝マーカーおよび骨密度ではいずれも有意差を示すものはなかった。一方、DBPエクソン11多型では骨密度との相関は示さなかったが、Gc1S Homo群では骨形成マーカー、骨吸収マーカー双方が低値であった。

ヒトDBP 遺伝子は4番染色体上に存在し、そのタンパクはビタミンDの主要なcarrier proteinとしてビタミンDと結合し、標的臓器に運搬する役目を担っていると考えられている³²⁾。DBPエクソン11の多型におけるGc1S Homo群は他群(Gc1S Hetero+1S(-)群)と比較して骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼとオステオカルシン、骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリンがともに有意に低値であり、ピリ

ジノリンも低値の傾向が認められ、骨代謝が低回転型になっていることが示唆された。Gc1Sと他のallele(Gc1F, Gc2)との相違はcodon 416がAspからGluに置換されていることであり、またエクソン11がビタミンDとの結合部位の近傍であることより、このAspからGluへの置換がビタミンDの結合能力を低下させる可能性があると考えられる。同じエクソン11のcodon 420における多型は骨代謝マーカーおよび骨密度との

Table 2-a. 遺伝子多型における生化学データおよび骨密度の二群間での比較

Items	LH-β Trp8Arg			LH-β Ile15Thr			A2M Val1000Ile		
	Trp/Trp	Trp/Arg+Arg/Arg	P value	Ile/Ile	Ile/Thr	P value	A/A	A/G	P value
Number of subjects	203	33	—	208	28	—	211	25	—
Age (years)	65.9±9.6	63.6±9.5	n.s.	51.0±8.0	49.9±9.8	n.s.	63.8±9.0	65.4±9.7	n.s.
Height (cm)	150.2±6.6	150.2±5.1	n.s.	150.1±6.5	150.9±4.9	n.s.	150.8±6.1	151.8±7.6	n.s.
Body weight (kg)	50.7±8.2	50.9±8.0	n.s.	51.0±8.0	49.9±9.8	n.s.	51.4±7.9	50.2±8.4	n.s.
Lumber spine BMD (Z score)	0.04±1.37	0.45±1.75	n.s.	0.09±1.33	0.22±1.92	n.s.	0.07±1.40	0.12±1.40	n.s.
Total body BMD (Z score)	0.25±0.96	0.62±0.90	n.s.	0.33±0.95	0.42±0.92	n.s.	0.40±0.97	0.20±0.78	n.s.
Ca (mg/dl)	9.17±0.41	9.14±0.38	n.s.	9.17±0.39	9.15±0.49	n.s.	9.14±0.40	9.12±0.41	n.s.
P (mg/dl)	3.49±0.46	3.45±0.42	n.s.	3.50±0.46	3.55±0.38	n.s.	3.47±0.45	3.48±0.49	n.s.
AL-P (IU/l)	172.6±54.5	130.8±44.7	0.004	173.6±53.0	174.3±54.1	n.s.	168.8±48.3	176.7±53.5	n.s.
Intact-OC (ng/ml)	7.45±3.77	7.43±2.74	n.s.	7.53±3.74	7.51±2.76	n.s.	7.55±3.52	7.87±3.37	n.s.
PD (pmol/μmol of Cr)	34.8±11.1	32.0±9.3	n.s.	33.9±10.6	33.7±11.2	n.s.	33.6±10.2	38.1±13.7	n.s.
DPD (pmol/μmol of Cr)	7.69±2.90	6.70±1.80	n.s.	7.45±2.82	7.42±2.01	n.s.	7.46±2.31	7.88±2.66	n.s.
Intact PTH (pg/ml)	38.1±14.2	37.7±13.5	n.s.	38.3±14.2	37.3±14.7	n.s.	37.5±14.5	37.9±10.0	n.s.
Calcitonin (pg/ml)	24.5±10.0	23.2±10.0	n.s.	24.6±9.7	21.3±8.7	n.s.	22.8±9.6	22.8±8.8	n.s.
1,25-(OH) ₂ D ₃ (pg/ml)	35.1±12.6	30.8±9.9	n.s.	78.0±28.0	88.5±39.4	n.s.	33.7±12.6	31.5±11.5	n.s.
Total cholesterol (mg/dl)	194.8±34.5	212.9±40.3	0.011	197.2±35.1	201.4±37.8	n.s.	198.8±35.4	180.3±25.0	0.036
Triglyceride (mg/dl)	148.0±82.0	149.3±74.6	n.s.	151.7±83.8	131.9±62.1	n.s.	148.8±81.4	129.8±34.2	n.s.

BMD, bone mineral density; AL-P, alkaline phosphatase; OC, osteocalcin; PD, pyridinoline; DPD, deoxypyridinoline; All data are expressed as means±S.D.; n.s. means not statistically significant

Table 2-b. 遺伝子多型における生化学データおよび骨密度の二群間での比較

Items	TNF-α -308			TNF-α -857			DBP Exon11		
	G/G	G/A	P value	C/C	C/T+T/T	P value	1S homo	other	P value
Number of subjects	217	19	—	129	107	—	15	221	—
Age (years)	64.8±9.8	65.2±7.2	n.s.	64.9±8.9	64.7±10.5	n.s.	62.3±8.6	64.4±9.4	n.s.
Height (cm)	150.7±6.2	148.8±5.9	n.s.	150.3±6.1	150.7±6.2	n.s.	51.0±8.1	51.3±8.3	n.s.
Body weight (kg)	51.1±8.2	51.3±8.0	n.s.	50.7±8.0	51.6±8.5	n.s.	152.3±7.1	150.8±6.3	n.s.
Lumber spine BMD (Z score)	0.11±1.40	-0.22±1.17	n.s.	0.01±1.42	0.17±1.34	n.s.	0.33±1.26	0.08±1.42	n.s.
Total body BMD (Z score)	0.32±0.97	0.46±0.98	n.s.	0.31±1.01	0.36±0.91	n.s.	0.32±1.15	0.39±0.95	n.s.
Ca (mg/dl)	9.14±0.40	9.22±0.44	n.s.	9.16±0.43	9.14±0.35	n.s.	9.24±0.55	9.14±0.39	n.s.
P (mg/dl)	3.48±0.44	3.56±0.62	n.s.	3.46±0.48	3.51±0.42	n.s.	3.54±0.43	3.48±0.46	n.s.
AL-P (IU/l)	171.9±52.5	174.2±56.9	n.s.	170.5±49.3	174.0±50.6	n.s.	133.1±30.7	170.9±49.3	0.004
Intact-OC (ng/ml)	7.53±3.60	7.37±3.88	n.s.	7.05±3.40	8.07±3.80	0.023	5.64±2.85	7.60±3.55	0.044
PD (pmol/μmol of Cr)	33.6±10.5	36.9±11.5	n.s.	34.0±10.6	33.8±10.7	n.s.	29.1±10.0	34.5±10.9	n.s.
DPD (pmol/μmol of Cr)	7.40±2.63	7.88±2.73	n.s.	7.33±2.26	7.58±3.04	n.s.	6.25±2.15	7.56±2.32	0.049
Intact PTH (pg/ml)	37.9±13.5	41.2±21.1	n.s.	38.0±14.2	38.5±14.5	n.s.	32.6±9.1	37.7±14.3	n.s.
Calcitonin (pg/ml)	23.2±9.9	26.2±7.6	n.s.	23.3±9.5	23.7±10.1	n.s.	25.7±11.7	22.9±9.5	n.s.
1,25-(OH) ₂ D ₃ (pg/ml)	33.8±12.7	32.0±10.2	n.s.	33.9±13.3	33.9±11.4	n.s.	36.4±19.6	33.2±11.8	n.s.
Total cholesterol (mg/dl)	197.0±33.9	205.9±36.4	n.s.	200.2±36.3	195.1±30.6	n.s.	191.3±27.6	198.8±35.9	n.s.
Triglyceride (mg/dl)	148.6±81.8	147.8±84.2	n.s.	144.1±82.1	152.3±81.3	n.s.	137.9±100.8	149.0±80.3	n.s.

BMD, bone mineral density; AL-P, alkaline phosphatase; OC, osteocalcin; PD, pyridinoline; DPD, deoxypyridinoline; All data are expressed as means±S.D.; n.s. means not statistically significant

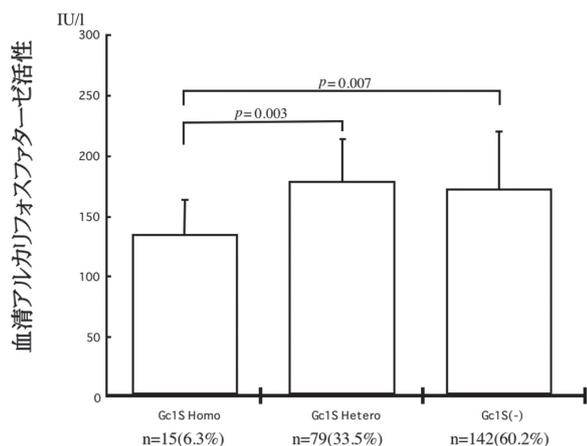


Fig. 2. DBP 遺伝子多型と血清アルカリフォスファターゼとの相関. 血清アルカリフォスファターゼは Gc1S Homo 群では他の群と比べて有意に低値であった ($p=0.003$: vs Gc1S Hetero 群, $p=0.007$: vs Gc1S(-) 群).

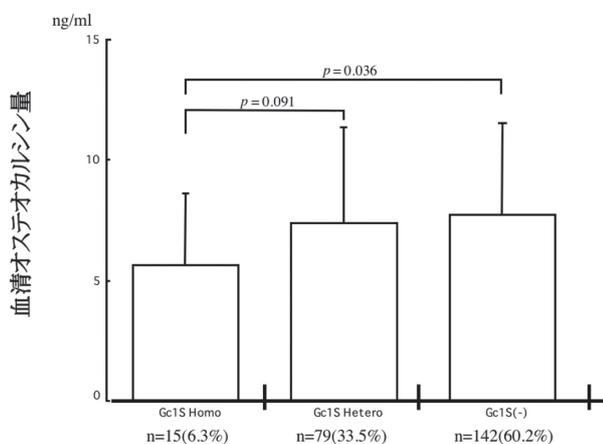


Fig. 3. DBP 遺伝子多型と血清オステオカルシンの相関. 血清オステオカルシンは Gc1S Homo 群では Gc1S(-) 群と比べて有意に低値であった ($p=0.036$: vs Gc1S(-) 群)が, Gc1S Hetero 群と比べ低い傾向にあったが有意差はなかった ($p=0.091$: vs, Gc1S Hetero 群).

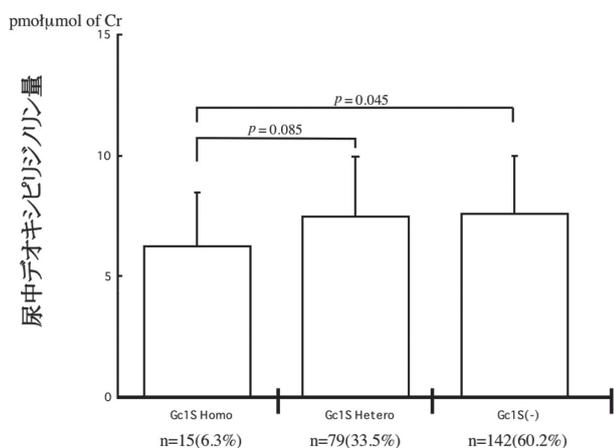


Fig. 4. DBP 遺伝子多型と血清デオキシピリジノリンとの相関. 血清デオキシピリジノリンは Gc1S Homo 群では Gc1S(-) 群と比べて有意に低値であった ($p=0.045$: vs Gc1S(-) 群)が, Gc1S Hetero 群と比べ低い傾向にあったが有意差はなかった ($p=0.085$: vs, Gc1S Hetero 群).

相関は見られず, この部位の Thr から Lys への置換はビタミン D との結合能には影響していない可能性があり, 運搬能への影響は少ないと推測される.

ビタミン D は肝臓に運ばれて, 25 位が水酸化される. その後, 腎臓に運ばれ, 血中カルシウムイオン濃度により, 1 位または 24 位が水酸化される²⁵⁾. すなわち, 血中カルシウムイオン濃度が低いとき (≤ 9 mg/dl) は 1 位が水酸化されて活性型のビタミン D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}$) が産生され, 血中カルシウムイオン濃度が高いとき (> 9 mg/dl) は 24 位が水酸化されて不活性型の $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ が産生される²⁵⁾. この間のビタミン D およびその代謝物の運搬を DBP が担っていると考えられている²⁴⁾. DBP は $25(\text{OH})\text{D}$, $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ に対しては高い親和性を持っているが, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ に対する親和性は低い²⁴⁾. すなわち 25 位の水酸基が DBP との親和性を高め, 1 位の水酸基が親和性を低下させていると考えられるが, これは活性型ビタミン D である $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ を組織で容易に遊離させるためと思われる. そして組織において遊離された $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ がビタミン D 受容体 (VDR) に結合し作用を発揮すると考えられる. VDR は核内に存在し, ステロイドホルモン・甲状腺ホルモン受容体スーパーファミリーに属する. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ と結合した VDR は転写活性領域が構造変化を起こし, 基本転写因子を活性化して, 標的遺伝子の転写を促進する. VDR ノックアウトマウスでは低カルシウムおよび, 低リン血症を呈し, くる病を発症するが, 高カルシウム食, 高リン食にて改善が認められる³³⁾. 本研究における DBP 遺伝子多型と血中カルシウム濃度, 血中リン濃度の間では有意な相関は示されておらず, 骨代謝において VDR を介したシグナル伝達への直接の影響は少ないか, もしくは代償する他の経路が存在するのかもしれない.

DBP ノックアウトマウスでは $25(\text{OH})\text{D}$ の血中半減期は極端に短く, 尿中への排泄量は野生型の 2.4 倍であり, 血中 $25(\text{OH})\text{D}$, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ の濃度はそれぞれ約 $1/10$, $1/6$ であった³²⁾. つまり, 血中レベルの濃度によりビタミン D の代謝・活性化に DBP が関与していることが示唆されている. しかしながら今回 DBP 遺伝子多型と血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ の間には相関は見られなかった理由として, codon 416 の Asp から Glu への置換がビタミン D 運搬能に影響をおよぼすことが示唆されるが, その程度は高くはないと考えられる. 最近になって報告された 384 人の日本人を対象に行った, 江面らの解析では, DBP 遺伝子について 13 種類の多型について検討し, 興味深いことに 4 種類のエクソン (C299C, D432E, T436K, および C445R) では, 骨密度と有意な相関が得られていないが, イントロン 1 およびイントロン 11 の多型と橈骨の骨密度との間での相関が示されている³⁴⁾. しかしながら本研究で行ったエクソン 11 における多型と骨密度の相関は示されて

いないこと、およびイントロン領域の多型で骨密度との有意な相関が得られることを考慮すると、プロモーターまたはエンハンサー領域での多型は、遺伝子の発現量に影響を及ぼし、骨密度に関連している可能性も考えられる。もしくは、これらの多型は別の場所にあるアミノ酸変化を伴う変異と連鎖しているのかもしれない。一方、DBPノックアウトマウスでは通常の食餌では血中カルシウム濃度、骨所見に変化は見られないものの、低ビタミンDストレス環境下状態が続くと野生型マウスでは骨変化は見られないのに対して、このDBPノックアウトマウスではビタミンD欠乏に伴う骨変化(osteoid seams: 骨縫合線の増大)が観察された³⁵⁾。このことは、骨代謝においてビタミンDがDBPと結合しVDRを介するシグナル経路と、他にDBPの結合を介さずにビタミンDの作用を発揮することが可能な経路が存在しているのかもしれない。

また他方でDBPは選択的な脱グリコシル化によりDBP-macrophage activating factor (DBP-maf)に変換され破骨細胞を活性化させることが知られており³⁶⁻³⁸⁾、DBPノックアウトマウスの場合DBP-mafも欠如しているため破骨細胞の活性化が抑えられる可能性があり、骨吸収は抑制されていると想定される。しかしDBP遺伝子エクソン11の多型はその部位から考慮すると、DBPからDBP-mafへ変換しているとは考えにくく、破骨細胞の活性化が影響する可能性は高くはない。

本研究ではDBP遺伝子多型と骨密度との間には相関は見られなかったが、少なくともGc1S Homo群では骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、骨吸収マーカーであるデオキシピリジノリンの有意な減少が示され、DBPの多型がこれらの骨代謝マーカー減少と相関があることが示唆された。この骨代謝の破綻が長期的に続くことにより骨密度の変化がおこる可能性があり、今後長期的な追跡検討をしていく必要があると考えられた。

結 論

DBP遺伝子エクソン11多型と骨量との相関は認められなかったが、骨代謝マーカーとの有意な相関が示された。一方、他の報告ではイントロン領域の多型と骨密度に相関が得られることを考慮すると、DBPの量的な変化による長期的な骨代謝の破綻が骨密度の変化をおこす可能性があり、DBP遺伝子多型が将来的な骨密度の変化を予期するマーカーとなりうる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導いただいた埼玉医科大学産婦人科学教室 畑俊夫教授、石原理教授、同大学分子生物学教室 禾泰壽教授に深謝いたします。また直接ご指導いただいた埼玉医科大学ゲノム医学研究

センター遺伝子情報制御部門 井上聡客員教授、同大学分子生物学教室 津久井通講師、東京大学医学部附属病院老年病科 加藤みほり氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Khosla S, Melton LJ, Riggs BL. Clinical spectrum. Osteoporosis, Raven press, NY, 1995,205-23.
- 2) Manolagas SC, Jilka RL. Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis. *N Engl J Med* 1995;332:305-11.
- 3) Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, et al. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J Biol Chem* 2000;275:21372-9.
- 4) Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, et al. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9416-21.
- 5) Parisien M, Silverberg SJ, Shane E, de la Cruz L, Lindsay R, Bilezikian JP, et al. The histomorphometry of bone in primary hyperparathyroidism: preservation of cancellous bone structure. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:930-8.
- 6) Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, et al. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem* 2004;279:16754-66.
- 7) Tabb MM, Sun A, Zhou C, Grun F, Errandi J, Romero K, et al. Vitamin K2 regulation of bone homeostasis is mediated by the steroid and xenobiotic receptor SXR. *J Biol Chem* 2003;278:43919-27.
- 8) Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, De Groote D, Zangerle PF, Collette J, et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas* 1997;26:63-71.
- 9) Ross RW, Small EJ. Osteoporosis in men treated with androgen deprivation therapy for prostate cancer. *J Urol* 2002;167:1952-6.
- 10) Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. Direct regulation by calcium of cytoplasmic messenger ribonucleic acid coding for pre-proparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *J Clin Invest* 1983;72:1851-5.
- 11) Greenberg C, Kukreja SC, Bowser EN, Hargis GK,

- Henderson WJ, Williams GA. Parathyroid hormone secretion: effect of estradiol and progesterone. *Metabolism* 1987;36:151-4.
- 12) Hauschka PV, Frenkel J, DeMuth R, Gundberg CM. Presence of osteocalcin and related higher molecular weight 4-carboxyglutamic acid-containing proteins in developing bone. *J Biol Chem* 1983;258:176-82.
- 13) Yarram SJ, Perry MJ, Christopher TJ, Westby K, Brown NL, Lamminen T, et al. Luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice and transgenic human chorionic gonadotropin (hCG)-overexpressing mice (hCG alphabeta+) have bone phenotypes. *Endocrinology* 2003;144:3555-64.
- 14) Liao A, Nitsch RM, Greenberg SM, Finckh U, Blacker D, Albert M, et al. Genetic association of an alpha2-macroglobulin (Val1000Ile) polymorphism and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1998;7:1953-6.
- 15) Brehme CS, Roman S, Shaffer J, Wolfert R. Tartrate-resistant acid phosphatase forms complexes with alpha2-macroglobulin in serum. *J Bone Miner Res* 1999;14:311-8.
- 16) Ylipahkala H, Halleen JM, Kaija H, Vihko P, Vaananen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5B circulates in human serum in complex with alpha2-macroglobulin and calcium. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:320-4.
- 17) Kano H, Ohtani N, Mashiko T, Ohtani S, Nishikawa T, Egawa S, et al. Levels of alpha 2 macroglobulin can predict bone metastases in prostate cancer. *Anticancer Res* 2001;21:551-6.
- 18) Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:4854-8.
- 19) Ritchlin CT, Haas-Smith SA, Li P, Hicks DG, Schwarz EM. Mechanisms of TNF-alpha and RANKL-mediated osteoclastogenesis and bone resorption in psoriatic arthritis. *J Clin Invest* 2003;111:821-31.
- 20) Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNF-alpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology* 2002;143:1108-18.
- 21) Redlich K, Hayer S, Ricci R, David JP, Tohidast-Akrad M, Kollias G, et al. Osteoclasts are essential for TNF-alpha-mediated joint destruction. *J Clin Invest* 2002;110:1419-27.
- 22) Kimble RB, Matayoshi AB, Vannice JL, Kung VT, Williams C, Pacifici R. Simultaneous block of interleukin-1 and tumor necrosis factor is required to completely prevent bone loss in the early postovariectomy period. *Endocrinology* 1995;136:3054-61.
- 23) Roggia C, Gao Y, Cenci S, Weitzmann MN, Toraldo G, Isaia G, et al. Up-regulation of TNF-producing T cells in the bone marrow: a key mechanism by which estrogen deficiency induces bone loss in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13960-5.
- 24) Bishop JE, Collins ED, Okamura WH, Norman AW. Profile of ligand specificity of the vitamin D binding protein for 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs. *J Bone Miner Res* 1994;9:1277-88.
- 25) Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev* 1995;16:200-57.
- 26) Henry HL, Norman AW. *Metabolism of Vitamin D in "Disorders of bone mineral metabolism"* Raven press, NY, 1995,149-62.
- 27) Schneider GB, Benis KA, Flay NW, Ireland RA, Popoff SN. Effects of vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) infusion on bone resorption in two osteopetrotic mutations. *Bone* 1995;16:657-62.
- 28) Benis KA, Schneider GB. The effects of vitamin D binding protein-macrophage activating factor and colony-stimulating factor-1 on hematopoietic cells in normal and osteopetrotic rats. *Blood* 1996;88:2898-905.
- 29) Furui K, Suganuma N, Tsukahara S, Asada Y, Kikkawa F, Tanaka M, et al. Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) beta-subunit, associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78:107-13.
- 30) Skoog T, van't Hooft FM, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, et al. A common functional polymorphism (C->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. *Hum Mol Genet* 1999;8:1443-9.
- 31) Hirai M, Suzuki S, Hinokio Y, Hirai A, Chiba M, Akai H, et al. Variations in vitamin D-binding protein (group-specific component protein) are associated with fasting plasma insulin levels in Japanese with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:1951-3.
- 32) Guoth M, Murgia A, Smith RM, Prystowsky MB, Cooke NE, Haddad JG. Cell surface vitamin

- D-binding protein (GC-globulin) is acquired from plasma. *Endocrinology* 1990;127:2313-21.
- 33) Masuyama R, Nakaya Y, Tanaka S, Tsurukami H, Nakamura T, Watanabe S, et al. Links Dietary phosphorus restriction reverses the impaired bone mineralization in vitamin D receptor knockout mice. *Endocrinology* 2001;142:494-7.
- 34) Ezura Y, Nakajima T, Kajita M, Ishida R, Inoue S, Yoshida H, et al. Association of Molecular Variants, Haplotypes, and Linkage Disequilibrium within the Human Vitamin D-Binding Protein (DBP) Gene with Postmenopausal Bone Mineral Density. *J Bone Miner Res* 2003;18:1642-9.
- 35) Safadi FF, Thornton P, Magiera H, Hollis BW, Gentile M, Haddad JG, et al. Osteopathy and resistance to vitamin D toxicity in mice null for vitamin D binding protein. *J Clin Invest* 1999;103:239-51.
- 36) Swamy N, Ghosh S, Schneider GB, Ray R. Baculovirus-expressed vitamin D-binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) activates osteoclasts and binding of 25-hydroxyvitamin D(3) does not influence this activity. *J Cell Biochem* 2001; 81:535-46.
- 37) Adebajo OA, Moonga BS, Haddad JG, Huang CL, Zaidi M. A possible new role for vitamin D-binding protein in osteoclast control: inhibition of extracellular Ca²⁺ sensing at low physiological concentrations. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;249:668-71.
- 38) Gumireddy K, Reddy CD, Swamy N. Mitogen-activated protein kinase pathway mediates DBP-maf-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 2003;90:87-96.