

エストロゲン受容体遺伝子多型の  
機能及び臨床応用に関する研究

2013 年

渡邊 加奈子

## 目次

緒言.....	1
第1章 更年期障害患者におけるER遺伝子多型解析.....	4
序論.....	4
第1節 更年期障害患者のHRT実施状況とER $\alpha$ 及びER $\beta$ 遺伝子多型との相関解析.....	6
第2節 更年期障害治療における処方薬剤の実態とER $\beta$ 遺伝子多型との相関解析.....	20
考察.....	27
小括.....	31
第2章 関節リウマチ患者におけるER $\beta$ 遺伝子多型解析.....	32
序論.....	32
第1節 CAリピート多型解析.....	33
第2節 Rsa多型解析.....	39
考察.....	46
小括.....	48
第3章 転写活性化作用に対するCAリピート多型の機能解析.....	49
序論.....	49
第1節 転写活性化作用に対するCAリピート多型の機能解析.....	50
考察.....	55
小括.....	57
総括.....	58
参考文献.....	59
主論文目録.....	67
謝辞.....	68

## 緒言

現在我が国は未曾有の高齢社会となり、平成 23 年時点で全人口の 20%超が 65 歳以上の高齢者である。また、女性は男性よりも長寿であり、人口に占める男性と女性の比率は 3 対 4 と女性の方が多く [1]。このような社会背景を踏まえ、男女の違いに配慮した医療、すなわち性差医療の推進が必要とされている [2]

性差医療 (Gender-specific Medicine、GSM) とは、「男女比が圧倒的に女性に傾いている病態、発症率は同じでも男女間に臨床的に差を見るもの、いまだ生理的・生物学的解明が女性で遅れている病態、社会的な女性の地位と健康の関連等に関する研究を進め、その結果を疾病の診断、治療法、予防措置へ反映することを目的とした医療改革」と定義される [3]。性差医療の概念が提唱される前までは、生殖機能を除き疾病の発症機序や病態には性差がないという前提があり、性差を意識しない医療が展開されてきた [4]。また、1960 年代のサリドマイド事件や 1970 年代の Diethylstilbestrol (DES) 事件等を重く見て、Food and Drug Administration (以下、FDA) が 1977 年に「妊娠の可能性のある女性を薬の治験に参加させないこと」との通達を出した。しかしながら、その結果、多くの臨床試験の対象患者から女性が除外されたため、男女双方に発症する疾患における女性のデータが欠落した [5]。このように女性の健康に関するデータが少ないことを問題とし、1986 年に National Institute of Health (NIH) が、女性及び少数民族・人種を臨床試験等の調査研究の対象に含めることを提言した。また、1993 年に FDA は、1977 年に発出した「妊娠の可能性のある女性を薬の治験に参加させないこと」との通達を廃止し、さらに 1998 年には新医薬品の臨床評価における性別、年齢別、人種別の治験データの収集・解析を義務付けた [4, 6]。現在、日米欧州医薬品規制調和国際会議 (以下、ICH) の E8 ガイドライン「臨床試験の一般指針」では、第 I 相試験で薬物動態の情報収集を考慮すべき集団として、代謝・排泄障害 (腎・肝疾患) を有する患者、高齢者、小児、人種に加えて女性が挙げられている [7]。また、医薬品の申請資料作成にあたっては、性別も含めた上記の部分集団における有効性及び安全性の考察も行われている [8]。

本邦において性差医療の概念は、1999 年の日本心臓病学会にて千葉県衛生研究所所長 兼 千葉県立東金病院副院長の天野恵子博士により初めて紹介された。そしてその実践の一つとして、2001 年 5 月鹿児島大学附属病院第一内科における日本初の女性専門外来を始め、2004 年 12 月末には 47 都道府県すべてに女性専門外来が開設され、その数は 300 を超えた [9]。また、本邦の医薬品開発においても、上記の ICH ガイドラインを踏まえ、性別を考慮したデータ収集や、性差の有無等を添付文書に情報提供する医薬品が増えている。

性差医療を推進するにあたり、女性ホルモンに着目することが重要である。女性は、性腺機能の成長から老化過程に伴い、初経と閉経に代表される女性ホルモンの変化が生じる [10]。女性ホルモン (エストロゲン) は、 $17\beta$ -エストラジール、エストロン、エストリオール等のステロイドホルモンの総称であり、女性生殖器の発達機能維持に重要な役割を果たすだけでなく、男女ともに心血管系や筋骨格系、免疫系、中枢神経系等において多彩な生理作用を有することが知られている [11]。エストロゲンの作用はエストロゲンレセプター (estrogen receptor、以下、ER) を介してもたらされる。ER には  $\alpha$  及び  $\beta$  の 2 種類の isoform が存在し、それぞれ 1986 年及び 1996 年に

初めてクローニングされた。ER $\alpha$  遺伝子は 6q25.1 に位置し 8 個の exon からなる約 400 kb の遺伝子であり、595 個のアミノ酸をコードしている。一方 ER $\beta$  遺伝子は 14q23-24.1 に位置し 9 個の exon からなる遺伝子であり、530 個のアミノ酸をコードしている [12]。ER $\alpha$  及び $\beta$ は共に核内レセプタースーパーファミリー、すなわちリガンドが結合することにより二量体を形成して、特異的なホルモン応答性エレメント (hormone response element: HRE) に結合し、標的遺伝子の発現を制御する核内受容体のグループに属している [13]。エストロゲンが核内で ER のリガンド結合領域に結合すると、ER は $\alpha$ 、 $\beta$ それぞれのホモダイマーあるいはヘテロダイマーとなり、DNA 結合領域を介してゲノム上のエストロゲン応答配列 (estrogen responsive element、以下、ERE) に結合する。そして、転写共役因子や転写調節因子群の相互作用により標的遺伝子の転写が活性化されると考えられている [13]。一般に核内受容体は、その構造と機能上の特徴から、N 末端より A から F の 6 つの領域に分けて考えることができ、リガンドが結合する領域は C 末端の E/F 領域に存在し、核移行シグナルの多くは D 領域に存在する。核内受容体はリガンド誘導性転写制御因子として働くが、多くの場合、転写を促進する activation function 1 (以下、AF-1) 及び activation function 2 (以下、AF-2) と呼ばれる転写促進領域が存在する。AF-1 は N 末端 A/B 領域に存在し、恒常的な転写促進能を有する一方、AF-2 は C 末端 E/F 領域に存在し、リガンドの結合によりその活性が誘導される [14]。また ER に関しては、ERE を介さない様々な経路も見出されており、転写調節の機構がさらに複雑化している [15]。

ER $\alpha$  及び $\beta$  は、基本的には上記のメカニズムを有する一方で、相同性や転写調節機構、組織分布等の点で相違が認められる [16, 17]。相同性については、ER $\alpha$  と $\beta$  では DNA 結合領域において 90%以上の高いホモロジーを示す一方 [17]、転写調節領域において ER $\beta$  は $\alpha$  に比べて AF-1 が短くなっており、ホモロジーがあまり高くはない [18]。組織分布について、ER $\alpha$  及び $\beta$  は共に幅広い臓器・組織に分布しており、ER $\alpha$  は主に子宮、睾丸、下垂体、卵巣、腎臓、副睾丸、副腎等に、ER $\beta$  は前立腺、卵巣、肺、膀胱、脳、子宮、睾丸等に分布している [16, 19]。しかしながら、ER $\alpha$  に関しては、ノックアウトマウスを用いた検討で、ER $\beta$  に比べ生殖機能に特に重要な役割を果たすことが報告されている [20]。また脳では ER $\alpha$  に比べ ER $\beta$  の発現量が多いことが知られており、ER $\beta$  がセロトニン神経の存在する縫線核や自律神経の中枢である視床下部にも存在しているという報告、並びに ER $\beta$  が不安行動に関与しているとの報告が多く出されている [21, 22]。このように、エストロゲンの多彩な生理作用は、ER の両受容体自身の発現量や標的遺伝子における転写調節の違いといった様々なファクターが相互に関連した結果生じていると考えられる。

以上のような ER の機能解明に向けた研究のほか、ER に関して遺伝子多型解析が盛んに行われている。遺伝子多型とは、塩基あるいは多型の変化が人口の 1%以上の頻度で存在しているものと定義され、①1 個の塩基がほかの塩基に置き換わっているもの (single nucleotide polymorphisms、以下、SNPs)、②1 から数十塩基が欠損や挿入しているもの、③2 塩基から数十塩基を 1 単位とする配列が繰り返し存在する部位において、その繰り返し回数が個人間で異なるもの (variable number of tandem repeat: VNTR) 及び繰り返し単位が 2~4 塩基のもの (マイクロサテライト多型) に分類される [23]。ER には SNPs やマイクロサテライト多型等の遺伝子多型が数多く存在する [24, 25]。

現在までに ER 遺伝子多型との関連が報告されている疾患には、骨密度 [26, 27]、変形性骨関

節炎 [28]、脂質レベルの変化 [29]、静脈性潰瘍 [30]、不安症 [31]、アルツハイマー病 [32]、パーキンソン病 [33]、性転換症 [34]、子宮筋腫 [35]、ホルモン補充療法 (hormone replacement therapy、以下、HRT) を実施している閉経後女性の乳癌 [36] 及び更年期障害 [37] 等があり、特に閉経後女性において罹患率の高い疾患に関する検討が多く行われている。したがって、ER 遺伝子多型の観点から、性差医療の発展及びテーラーメイド医療の樹立に向けて一助となる可能性が考えられる。

以上の背景より、本研究では、女性に特徴的な疾患について遺伝子多型という切り口からエビデンスを構築し臨床応用することを目的とし、ER 遺伝子多型の解析を行った。第 1 章では、閉経期のエストロゲン低下により引き起こされる更年期障害について、第 2 章では、女性で罹患率の高いことで知られる関節リウマチ (rheumatoid arthritis、以下、RA) について、ER 遺伝子のマイクロサテライト多型及び SNPs との関連を検討した。さらに第 3 章では、今後の ER 遺伝子多型解析研究の一助となるよう、ER 遺伝子多型の機能に関する検討を行った。

なお、遺伝子情報は個人のプライバシーに深く関わる重要な情報であるため、その取り扱いには十分配慮した。また、本研究は千葉大学大学院薬学研究院、千葉県立東金病院の倫理審査委員会及び千葉大学大学院医学研究院、生命倫理審査委員会の承認を得て行った。

## 第1章 更年期障害患者における ER 遺伝子多型解析

### 序論

女性の一生は性ホルモンの変動から思春期、性成熟期、更年期、そして老年期に分類される。中でも、45歳から55歳における更年期は性成熟期から老年期への移行期間であり、急激なエストロゲン低下による身体的影響が大きい。

更年期障害は「更年期に現れる多種多様の症候群で、器質的変化に相応しない自律神経失調症を中心とした不定愁訴を愁訴とする症候群」と定義され、性腺機能の変化が視床下部の神経活動に変化をもたらし、神経性・代謝性のさまざまな生体変化を引き起こすことによると考えられている [38]。頻度の高い身体症状としては、のぼせ、動悸、発汗、冷えを一連の症状とする血管運動神経症状や、肩こり、腰痛等の骨格筋症状、外陰部や皮膚の老化、その他めまい、頭痛等が挙げられる。また精神神経症状としては、抑うつ、不安、意識低下、睡眠障害等が認められる [39]。更年期障害の症状は非常に多彩で個人差が大きいことが知られているが、なぜ個人差が生じるのかについては明らかになっていない。

更年期障害の薬物療法としては、HRT や漢方製剤、中枢神経系用剤（抗うつ薬・向精神薬）等が用いられている。また、HRT は 1990 年代初頭より本邦で更年期障害の治療法として普及した。更年期障害に対する HRT は、血管運動神経系症状（ホットフラッシュ、発汗等）の軽減、骨代謝異常の改善、膣萎縮症状の改善等の効果が認められている一方で、乳癌や子宮内膜癌、血栓症等のリスクを上昇させる可能性が明らかにされている。2002 年に、米国で施行されていた HRT の大規模無作為化比較試験である Women's Health Initiative (WHI) 試験において、浸潤性乳癌の罹患が試験中止の基準を超えたとの報告 [40] がなされて以降、HRT のリスクとベネフィットのバランスを慎重に検討した上で投与すべきであり、最小有効用量をなるべく短い期間で投与すべきであるとの議論が国内外でなされてきた。また、日本産科婦人科学会及び日本女性医学学会により発行された「ホルモン補充療法ガイドライン」[41]においても、HRT の有用性が記載されている一方、HRT の使用にあたりリスクとベネフィットを十分に検討すべきであること、及びホルモン剤に対する反応性には個人差があるため副作用予防の観点から少ない用量を用いることが望ましい等の注意点が記載されている。このように、HRT の実施にあたっては、更年期障害患者の個々の症状や反応性に応じた治療が望まれている。

更年期の女性ではエストロゲン分泌の急激な低下がみられることから、更年期女性で多くみられる疾患について、ER 遺伝子多型との関連を検討した研究が盛んに行われている。ER $\alpha$  遺伝子の intron 1 に存在する SNP である rs2234693 (T/C (以下、PvuII 多型)) 及び rs9340799 (A/G、(以下、Xba I 多型)) は、2004 年には更年期障害のホットフラッシュと膣乾燥症状との相関が報告された [37] ほか、PvuII 多型では心血管疾患リスク [42] やうつ症状 [43] との相関が、Xba I 多型では骨密度 [44, 45] との相関が報告されている。また、ER $\alpha$  遺伝子の exon 8 に存在する rs2228480 (G/A) では骨密度との関連が報告されている [44]。ER $\beta$  遺伝子の 5'-領域に存在する rs3020450 (G/A) 及び rs1271572 (G/T) はそれぞれ子宮筋腫 [35] 及び HRT を実施している閉経後女性の乳癌 [36] との相関が、exon 5 に存在する rs1256049 (G/A (以下、Rsa 多型)) はうつ症状 [46]

及び排卵障害 [47]、intron 5 に存在する D14S1026 (以下、CA リピート多型) は骨密度 [27, 48, 49] 等との相関が報告されている。

以上を踏まえ、本章では、更年期障害患者における HRT 実施状況と ER 遺伝子多型との相関を検討することを目的とし、ER $\alpha$  遺伝子多型 (*Pvu* II 多型、*Xba* I 多型、rs2228480) 及び ER $\beta$  遺伝子多型 (rs3020450、rs1271572、*Rsa* 多型、CA リピート多型) を解析した。

## 第1節 更年期障害患者のHRT実施状況とER $\alpha$ 及びER $\beta$ 遺伝子多型との相関解析

### 1. 方法

#### 対象患者

2002年11月から2004年12月までに千葉県立東金病院を受診した更年期障害患者のうち、除外基準の患者を除く189例（46～65歳）を対象とした。なお、研究の意義を十分理解して頂いたのちに書面での同意を得た。

#### <除外項目>

- ・両側卵巣摘出を受けた場合
- ・内分泌機能異常がある場合
- ・血管運動神経症状に対する薬物療法の治療歴がある場合
- ・過去に他院でHRTを実施していた場合

#### 更年期障害症状の調査

更年期障害症状の調査は、書面を用いた対面聞き取り方式により行った。項目は、年齢、閉経年齢、血管運動神経症状、精神神経症状、筋・頭痛症状の3症状の自覚スコアとした。自覚スコアについては、以下の1～5の5段階表示として評価を行った。

- 1=自覚症状なし
- 2=自覚症状はあるが、日常生活に影響なし
- 3=自覚症状があり、やや日常生活に影響あり
- 4=自覚症状があり、明らかに日常生活に影響あり
- 5=自覚症状が強く、日常生活に深刻な影響あり

#### 更年期障害治療

当該患者に対して、更年期障害治療（HRT、漢方、抗うつ薬、カウンセリング等）が実施された。HRTは必要最小限の用量及び期間で実施された。各患者のHRT実施状況は院内の電子オーダーリングシステムにより調査した。なお、更年期障害治療の経験を十分有した臨床医5名が各患者の治療を行った。

#### 遺伝子多型解析

QIAamp<sup>®</sup> DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) を用い、ヒトNDAの抽出を行った。まず、滅菌チューブにProteaseを20 $\mu$ L入れ、末梢血200 $\mu$ Lを加えた。次にBuffer ALを200 $\mu$ L添加し、15秒間ボルテックスにより混和した。56 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートし、スピンドウンした後、Ethanolを200 $\mu$ L添加し、再び15秒間ボルテックスにより混和した。混合液を注意深くQIAamp spin columnに移し、8,000rpmで1分間遠心した。続いてカラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW1を500 $\mu$ L添加し、8,000rpmで1分間遠心した。再びカラムを新しいコレクションチューブに移し、Buffer AW2を500 $\mu$ L添加し、14,000rpmで3分間遠心した。そしてカラムを滅菌チューブ



ブに移し、Buffer AE 200  $\mu$ L を添加し室温で 5 分間インキュベートした後、8,000rpm で 1 分間遠心し、DNA を得た。

抽出したヒト DNA を用い、ER $\alpha$  遺伝子多型及び ER $\beta$  遺伝子多型を以下のように解析した。

#### <SNPs>

Polymerase chain reaction (以下、PCR 反応) の反応液調製は LightTyper 384 PCR Kit (Roche Applied Science) を用い、1 サンプルの全量を 5  $\mu$ L として行った。乾燥させたテンプレート DNA を 10 ng、FastStart Taq DNA polymerase を 0.5 U 使用し、また MgCl<sub>2</sub> stock solution を最終濃度 4 mM、PCR Nucleotide Mix を最終濃度 0.2 mM、Forward primer を最終濃度 0.05  $\mu$ M、Reverse primer を最終濃度 0.5  $\mu$ M、Anchor probe 及び Detecion probe を各 0.2  $\mu$ M となるよう加えた。さらに PCR-Reaction Buffer (10 $\times$ conc.) を 0.5  $\mu$ L、滅菌超純水を適量加えた。なお、使用したプライマー及びプローブを Table1-1-1 に示す。

PCR 反応は GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) にて、94 $^{\circ}$ C-10 分の反応後、94 $^{\circ}$ C-15 秒、55 $^{\circ}$ C-15 秒、72 $^{\circ}$ C-15 秒を 40 サイクル実施し、その後 72 $^{\circ}$ C-15 秒の反応を行った。

PCR 産物を用い、融解曲線測定による SNP 解析を行った。PCR 産物に対し 94 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱処理を行い、PCR 産物を一本鎖の状態にした。続いて 40 $^{\circ}$ C で 1 分間の熱処理を行い、予めチューブに加えてある Anchor probe 及び Detecion probe をアニールさせた。そして LightTyper (Roche Applied Science) にサンプルをセットして融解曲線測定を行い、得られた結果から genotype を決定した。

連鎖不均衡検定にあたっては、Haploview program を用い、Pearson の相関係数を算出して評価した。

#### <ER $\beta$ CA リピート多型>

抽出した DNA は PCR 反応を行った。反応液調製は 1 サンプルの全量を 25  $\mu$ L として行った。テンプレート DNA を 50 ng、FastStart Taq DNA polymerase を 1 U 使用し、また MgCl<sub>2</sub> stock solution を最終濃度 1.5 mM、PCR Grade Nucleotide Mix を最終濃度 0.2 mM、各プライマー (Forward : 5'-HEX-GGTAACCATGGTCTGTACC-3' (HEX: hexachloro-6-carboxyfluorescein)、Reverse : 5'-AACAAAATGTTGAATGAGTGGG-3') を最終濃度 0.3  $\mu$ M となるよう加えた。さらに PCR reaction buffer (10 $\times$ conc.) を 2.5  $\mu$ L、滅菌超純水を適量加えた。

PCR 反応は GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) にて、PCR 条件として 95 $^{\circ}$ C-12 分の反応後、95 $^{\circ}$ C-30 秒、52 $^{\circ}$ C-30 秒、72 $^{\circ}$ C-30 秒を 34 サイクル実施し、その後 72 $^{\circ}$ C-7 分の反応を行った。

蛍光標識された DNA フラグメントを、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてキャピラリー電気泳動を行った。1 サンプルにつき GeneScan<sup>TM</sup> 500 Size Standard (0.15  $\mu$ L) 及び Hi-Di<sup>TM</sup> Formamide (9.85  $\mu$ L) の混合液を 10  $\mu$ L ずつ 96 穴プレートにアプライした後、蛍光標識されたサンプル DNA (1  $\mu$ L) を加え、Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer にセットして泳動を行った。泳動後、GeneMapper<sup>®</sup> Software Version 4.0 (Applied Biosystems) を用いて DNA フラグメントの相対的なサイズ値を算出した。そしてフラグメントサイズから CA リピート数を決定した。

## 統計解析

genotype 間の年齢、身長、体重、BMI 等の量的変数については、一般化線形モデルによる解析を行った。更年期症状スコアの比較は、Wilcoxon の順位和検定により行った。Genotype と HRT 実施状況の比較は、カイ二乗検定及びロジスティック回帰分析を行った。有意水準は危険率 5%未満とした。なお、繰り返し検定を行った際には Bonferroni 修正を用い、危険率 5%を検定回数で除した値を有意水準とした。

Table 1-1-1 Primers and probes used for genotyping

Gene	Target polymorphisms	Primers and probes	Sequence
	rs number		
ER $\alpha$	rs2234693 ( <i>Pvu</i> II)	Forward primer	5'-GGTTATGTGGCAATGACGTA
		Reverse primer	5'-CATTAGAGACCAATGCTCATCC
		Anchor probe	5'-LC Red 640-TGCTTTGTCTCTGTTTCCCAGAGACCCTGA-Phosphate
		Detection probe	5'-GTTCCAAATGTCCCAGCCGTTT-Fluorescein
	rs9340799 ( <i>Xba</i> I)	Forward primer	5'-TTCATCTGAGTTCCAAATGTCC
		Reverse primer	5'-TACTACCTGCACCAGAATATGTTAC
		Anchor probe	5'-ATTTCAGAACCATTAGAGACCAATGCTCATCCC-Fluorescein
		Detection probe	5'-LC Red 640-CTCCAGACCACACTCAGGGT-Phosphate
	rs2228480	Forward primer	5'-GGGCTCTACTTCATCGCA
		Reverse primer	5'-AAGCCATTGGTGTGGA
		Anchor probe	5'-GAACCGTGTGGGAGCCAGGGA-Fluorescein
		Detection probe	5'-LC Red 640-TCTCAGACCGTGGCAGGGAA-Phosphate
ER $\beta$	rs3020450	Forward primer	5'-CTTCATTCAGGGCACCTGTA
		Reverse primer	5'-GCCTTGGAACTCCAAGC
		Anchor probe	5'-TCAACCTAACCTTGTGGCTGGGAGAAG-Fluorescein
		Detection probe	5'-LC Red 640-AGCCCAGGATTTCTACGGAGAG-Phosphate
	rs1271572	Forward primer	5'-CATGTCCCTTATGCCACC
		Reverse primer	5'-GAGACTAGGACCACAGTCTTAAC
		Anchor probe	5'-LC Red 640-GGTCACATGCTACTTTCCTTTTCATTTTCATCAGC-Phosphate
		Detection probe	5'-GGGCTCTACAATGGCCTG-Fluorescein
	rs1256049 ( <i>Rsa</i> )	Forward primer	5'-AAGTCAGAGAAGAAACACAATGTA
		Reverse primer	5'-TTTGTGGAGCTCAGCCT
		Anchor probe	5'-AACACCTCCATCCAACAGCTCTCCA-Fluorescein
		Detection probe	5'-LC Red 640-AGCCGCACTTGGTCGAAC-Phosphate

## 2. 結果

融解曲線測定による SNP 解析について、Rsa 多型の実例を Fig.1-1-1 に示した。解析では、major allele である G allele のホモタイプ (GG genotype)、minor allele である A allele のホモタイプ (AA genotype)、そして G allele と A allele のヘテロタイプ (GA genotype) について変曲点の異なる 3 種類の融解曲線パターンが得られた (Fig.1-1-1A)。そして、それぞれの曲線について負の 1 次導関数をプロットして描かれたグラフの結果、GG genotype では約 68°C の付近に、AA genotype では約 58°C の付近に、そして GA genotype では約 68°C と約 58°C にそれぞれピークが得られ、融解温度 (Tm) と判断した (Fig.1-1-1B)。各 SNP の minor allele の頻度は、Pvu II 多型が 0.426、Xba I 多型が 0.341、rs2228480 が 0.130、rs3020450 が 0.196、rs1271572 が 0.429、Rsa 多型が 0.312 であった。

CA リpeat多型解析では、1 人の対象者における 2 つの allele が同じ CA リpeat数を有する場合 (ホモタイプ) は 1 本のピークが、異なる CA リpeat数を有する場合 (ヘテロタイプ) は 2 本のピークが検出され、同時に泳動したサイズスタンダードに基づいて算出された DNA フラグメントのサイズ値から CA リpeat数を決定した (Fig.1-1-2, Table 1-1-2)。なお、PCR 反応によって CA リpeat多型領域が増幅されていることがキャピラリーシーケンスにより確認された (Fig.1-1-3)。

CA リpeatの allele 頻度分布は Fig.1-1-4 のとおりであり、14CA リpeat数が 14 リpeat (以下、14CA) から 26 リpeat (以下、26CA) までの範囲で 12 種類確認され、18CA 及び 23CA で頻度が高かった。

更年期障害患者 189 例のうち、33 例は 1 年を超えて HRT が実施されており、17β-エストロジオールや結合型エストロゲンの経口投与又は経皮投与、及び必要に応じてメドロキシプロゲステロンの投与が行われていた。一方、156 例は 1 年を超える HRT は必要とせず、1 年以下の HRT の実施又は漢方、抗うつ薬等の薬物療法等が行われていた。1 年超の HRT が実施された患者を HRT (+) 群、1 年を超える HRT を必要としなかった患者を HRT (-) 群とし、以降の検討を行った。

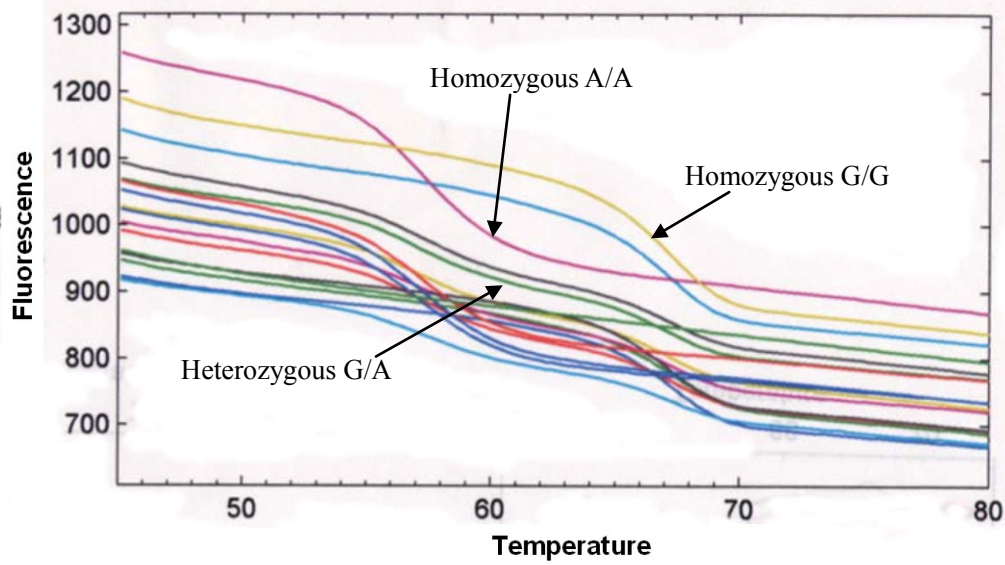
HRT (+) 群及び HRT (-) 群における患者背景を Table 1-1-3 及び Table 1-1-4 に示した。HRT (+) 群の平均年齢は HRT (-) 群に比べ若く、統計学的に有意な違いが認められた。体重及び BMI についても、HRT (+) 群の方が HRT (-) 群に比べ比較的大きかった。また、更年期症状のスコアについて、HRT (+) 群及び HRT (-) 群の血管運動神経症状スコア (平均値±標準偏差) はそれぞれ 3.8±1.2 点及び 2.5±1.3 点、精神神経症状スコアは 3.8±1.2 点及び 2.8±1.5 点であり、HRT (+) 群では血管運動神経症状及び精神神経症状のスコアが HRT (-) 群に比べ有意に高かった (P<0.001)。筋頭痛症状のスコアは統計学的に有意ではないものの、HRT (+) 群で 3.8±1.3 点であり、HRT (-) 群 3.2±1.5 点に比較し高い傾向が認められた。

検討した全ての ERα 及び ERβ 遺伝子多型は Hardy-Weinberg 平衡に従っていることが確認された。各多型の頻度を HRT (+) 群及び HRT (-) 群で比較した結果 (Table 1-1-5 及び Table 1-1-6)、ERα の rs2228480 において、HRT (+) 群では HRT (-) 群に比べて minor allele を 1 つ以上有する頻度が有意に高かった (OR : 2.62, 95% CI : 1.03–3.92, P = 0.016)。また、ERβ の Rsa 多型において、HRT (+) 群では HRT (-) 群に比べて minor allele を 2 つ有する頻度が有意に高かった (OR : 6.35, 95% CI : 2.38–16.92, P < 0.001)。一方、ERβ の rs1271572 においては、HRT (+) 群で HRT (-) 群に比べて minor allele を 1 つ以上有する頻度が有意に低かった (OR : 0.30, 95% CI : 0.14–0.65, P = 0.002)。

ERβのCAリピート多型について、allele頻度が高かった18CA、22CA及び23CAに着目し、これらのCAリピートの有無に基づき検討を行った。その結果、HRT (+) 群ではHRT (-) 群に比べて18CAを2つ有する頻度が有意に高かった (OR : 8.00, 95% CI : 2.56–25.02, P < 0.001)。一方、HRT (+) 群ではHRT (-) 群に比べて22CAを1つ以上有する頻度 (OR : 0.19, 95% CI : 0.04–0.85, P = 0.018)、及び23CAを1つ以上有する頻度 (OR : 0.39, 95% CI : 0.17–0.93, P = 0.029) が有意に低かった。

ERβ 遺伝子多型について、Haploview を用いて連鎖不均衡の検討を行った。CA リピート多型の18CA は Rsa 多型との間に強い連鎖不均衡の関係が示された ( $r^2 = 0.78$ )。一方、18CA と rs1271572 ( $r^2 = 0.27$ )、18CA と rs3020450 ( $r^2 = 0.09$ ) とは連鎖不均衡の関係は示されなかった。23CA と rs1271572、23CA と Rsa 多型及び 23CA と rs3020450 との相関係数 ( $r^2$ ) はそれぞれ 0.22、0.14 及び 0.05 と低く、22CA とこれら SNP との相関係数もいずれも低かった。

(A) Melting curves



(B) Temperature peaks graphs

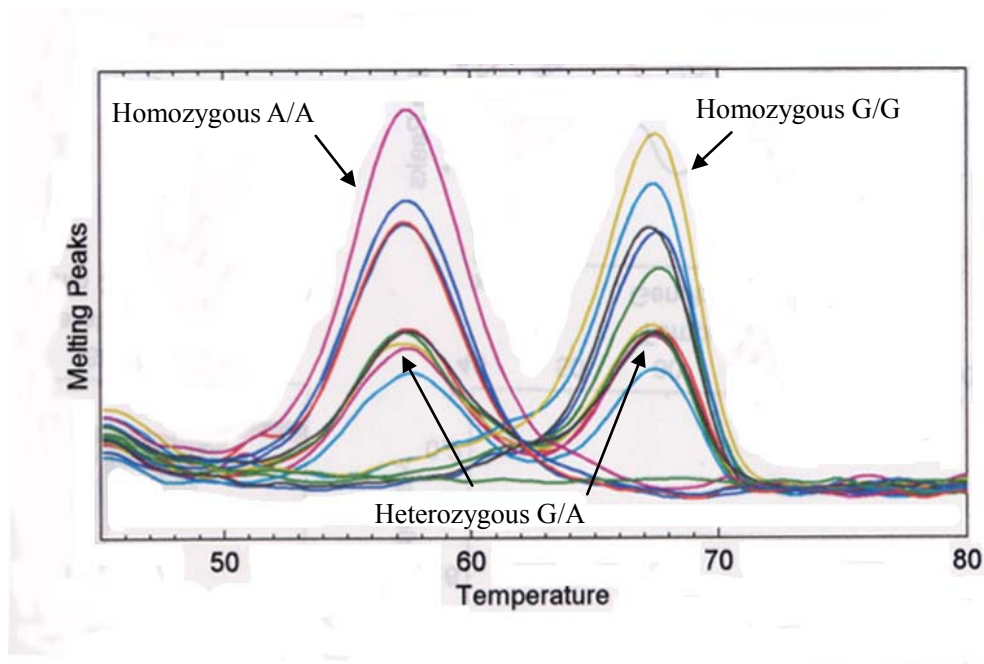
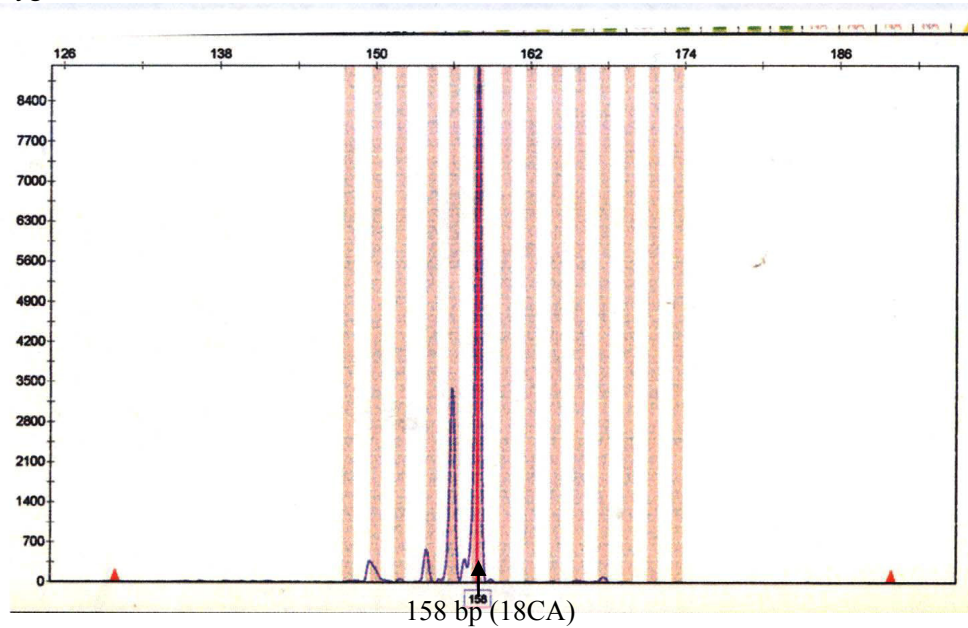


Fig.1-1-1 Melting curve analysis of the three possible allelic variants of Rsa polymorphism. (A) Allelic variants are represented by melting curves of different shapes. (B) Peaks with different  $T_m$  values are shown from the first negative derivative of the fluorescence versus temperature graphs.

(A) Homozygous



(B) Heterozygous

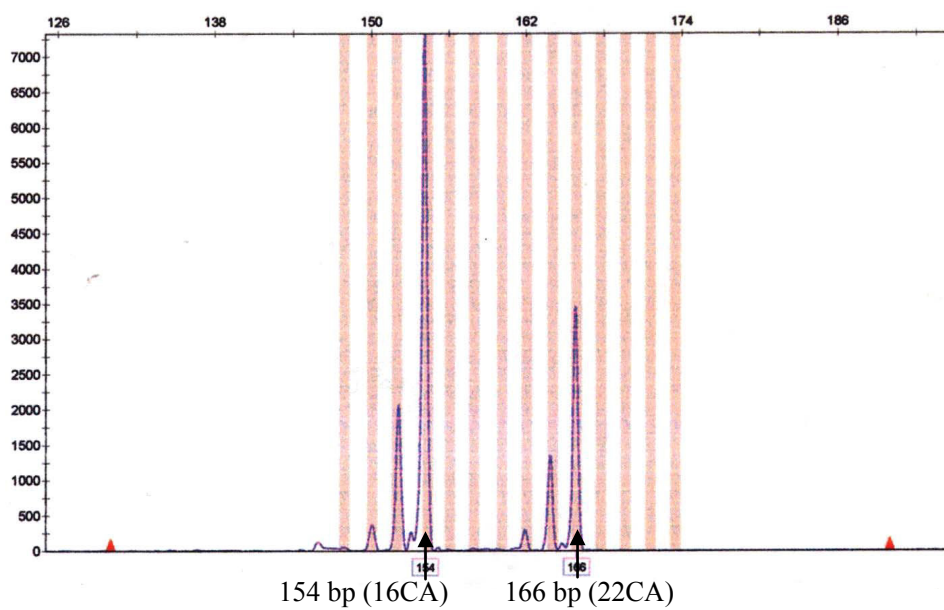


Fig.1-1-2 Profiles of DNA fragment analysis for CA repeats polymorphism of ER $\beta$  gene. (A) homozygous sample and (B) heterozygous sample.

Table 1-1-2 Correlation between the fragment sizes and the number of CA repeats

CA	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
Size (bp)	150	152	154	156	158	160	162	164	166	168	170	172	174

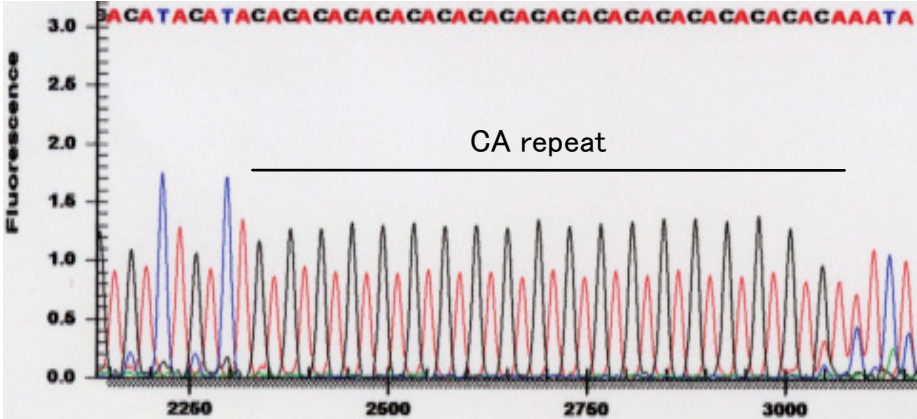


Fig.1-1-3 Nucleotide sequence from CA repeats polymorphism of ERβ gene after direct sequencing of the DNA fragment.



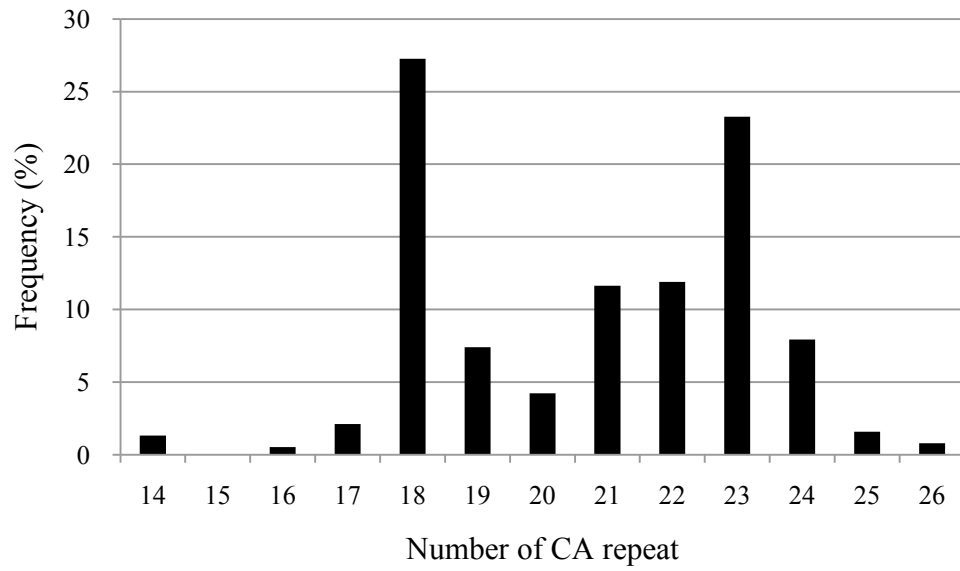


Fig.1-1-4 Frequency distribution of CA repeat polymorphism of estrogen receptor-β in Climacteric disorder patients.

Table 1-1-3 Clinical features of women of HRT (+) and HRT (-) groups

Characteristics	HRT (+) (n=33)			HRT (-) (n=156)			P-value
	n	mean	S.D	n	mean	S.D	
Age, y	33	52.2	3.4	156	55.0	4.4	0.001*
Age of menopause, y‡	18	49.4	1.7	118	50.0	3.3	0.728
Height, cm	31	155.9	3.9	151	155.5	5.2	0.663
	N/A	2		5			
Body weight, kg	31	58.3	10.9	152	55.3	8	0.053
	N/A	2		4			
BMI, kg/m <sup>2</sup>	30	24.1	4.3	151	22.9	3.2	0.130
	N/A	3		5			

BMI, Body Mass Index.

‡ Age of menopause of women who had natural menopause N/A, not available. S.D., standard deviation.

\*  $P < 0.05$

Table 1-1-4 Severity of menopausal symptoms in HRT (+) and HRT (-) groups

Menopausal symptoms	Score	HRT (+) (n=33)		HRT (-) (n=156)		P-value
		n	(%)	n	(%)	
Vasomotor symptoms	1	2	6.1	48	31.0	< 0.001***
	2	3	9.1	30	19.3	
	3	7	21.2	36	23.2	
	4	8	24.2	28	18.1	
	5	13	39.4	13	8.4	
	N/A			1		
Psychological symptoms	1	2	6.1	50	32.3	< 0.001***
	2	2	6.1	21	13.5	
	3	8	24.2	21	13.5	
	4	8	24.2	37	23.9	
	5	13	39.4	26	16.8	
	N/A			1		
Musculoskeletal symptoms	1	4	12.1	33	21.3	0.051
	2	0	0	22	14.2	
	3	7	21.2	28	18.1	
	4	9	27.3	23	14.8	
	5	13	39.4	49	31.6	
	N/A			1		

The severity of menopausal symptoms 1 = none; 2 = minor problem; 3 = slight interference with normal life; 4 = definite interference with normal life; and 5 = debilitating symptom.

N/A, not available

\*\*\* $P < 0.001$

Table 1-1-5 Association of ER $\alpha$  and ER $\beta$  polymorphisms with HRT status

Gene	rs number dbSNP/UniSTS	MA	MAF	number of allele	HRT (+) (n=33)		HRT (-) (n=156)		P-value	
					n	(%)	n	(%)		
ER $\alpha$	rs2234693 ( <i>Pvu</i> II)	G	0.426	2	6	18.2	25	16.0	0.761	
				0 + 1	27	81.8	131	84.0		
				0	10	30.3	49	31.4		
	rs9340799 ( <i>Xba</i> I)	G	0.341	1 + 2	23	69.7	107	68.6	0.958	
				2	1	3.0	5	3.2		
				0 + 1	32	97.0	151	96.8		
	rs2228480	A	0.130	0	9	27.3	57	36.5	0.31	
				1 + 2	24	72.7	99	63.5		
				2	1	3.0	4	2.6		
	ER $\beta$	rs3020450	A	0.196	0 + 1	32	97.0	152	97.4	1
					0	20	60.6	125	80.1	
					1 + 2	13	39.4	31	19.9	
rs1271572		T	0.428	2	3	9.1	5	3.2	0.146 <sup>a</sup>	
				0 + 1	30	90.9	151	96.8		
				0	25	75.8	98	62.8		
rs1256049 ( <i>Rsa</i> )		A	0.312	1 + 2	8	24.2	58	37.2	0.157	
				2	9	15.1	28	18.0		
				0 + 1	24	84.9	128	82.0		
D14S1026 (CA repeat)		CA18	0.272	0	19	57.6	45	28.8	0.002 <sup>*a</sup>	
				1 + 2	14	42.4	111	71.2		
				2	10	30.3	10	6.4		
D14S1026 (CA repeat)	CA22	0.119	0 + 1	23	69.7	146	93.6	< 0.001 <sup>***b</sup>		
			0	12	36.4	79	50.6			
			1 + 2	21	63.6	77	49.4			
D14S1026 (CA repeat)	CA23	0.233	2	8	24.2	6	3.8	< 0.001 <sup>***b</sup>		
			0 + 1	25	75.8	150	96.2			
			0	13	39.4	87	55.8			
D14S1026 (CA repeat)	CA22	0.119	1 + 2	20	60.6	69	44.2	0.087		
			2	0	0	4	2.6			
			0 + 1	33	100	152	97.4			
D14S1026 (CA repeat)	CA23	0.233	0	31	93.9	117	75.0	0.018 <sup>*a</sup>		
			1 + 2	2	6.1	39	25.0			
			2	1	3.0	9	5.8			
D14S1026 (CA repeat)	CA23	0.233	0 + 1	32	97.0	147	94.2	1.000 <sup>a</sup>		
			0	25	75.8	86	55.1			
			1 + 2	8	24.2	70	44.9			

SNP, single nucleotide polymorphism. MA, minor allele. MAF, minor allele frequency.

<sup>a</sup>Fisher's exact test <sup>b</sup>significantly different after adjustment for multiple comparison analysis ( $P < 0.0071$ ).

\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$

Table 1-1-6 Odds ratio in long-term prescribing HRT for ER $\alpha$  and ER $\beta$  polymorphisms

Gene	rs number	genotype/ number of allele	OR	95% CI
ER $\alpha$	rs2228480	0	1	
		1 + 2	2.62	1.03-3.92
ER $\beta$	rs1271572 <sup>a</sup>	0	1	
		1 + 2	0.30	0.14-0.65
	rs1256049 (Rsa) <sup>a</sup>	0 + 1	1	
		2	6.35	2.38-16.92
	D14S1026 (18CA repeat) <sup>a</sup>	0 + 1	1	
		2	8.00	2.56-25.02
	D14S1026 (22CA repeat)	0	1	
		1 + 2	0.19	0.04-0.85
	D14S1026 (23CA repeat)	0	1	
		1 + 2	0.39	0.17-0.93

the Odds Rates (ORs) in table 1-6 are these based on the data presented in table1-5

95%CI, 95% confidence intervals

SNP, single nucleotide polymorphism.

<sup>a</sup>significantly different after adjustment for multiple comparison analysis ( $P < 0.0071$ ).

## 第2節 更年期障害治療における処方薬剤の実態と ER $\beta$ 遺伝子多型との相関解析

### 1. 方法

#### 対象患者

千葉県立東金病院を受診した女性患者のうち、閉経後1年以上経過している者を対象とし、そのうち以下の除外項目に該当する者を除く127例を抽出した。ただし、閉経後1年未満の者についても、E2（血中エストラジオール濃度） $\leq 20$  pg/mLかつFSH（血中卵胞刺激ホルモン濃度） $\geq 30$  mIU/mLの場合は採用とした。なお、研究の意義を十分理解して頂いたのちに書面での同意を得た。

#### <除外項目>

- ・ いずれかの調査項目に回答漏れが認められた場合
- ・ 子宮疾患または卵巣疾患の既往歴がある場合
- ・ 甲状腺機能亢進症または甲状腺機能低下症の既往歴がある場合
- ・ 生活習慣病（糖尿病、高血圧、高脂血症）に対する薬物治療が行われている場合

#### 更年期障害症状の調査

第1節に従った。

#### 更年期障害治療

第1節に従った。

#### 処方調査

対象患者に処方された薬剤のうち、更年期障害の諸症状に対して3ヶ月以上処方された薬剤を院内オーダリングシステムにより抽出し、薬効分類コードにより分類した。そしてこのうち、漢方製剤、中枢神経系用剤、ホルモン製剤（1年超の使用）の薬剤の使用率を調査した。

#### 遺伝子多型解析

第1節に従った。

#### 統計解析

自覚症状スコアに関する genotype 間の比較については Kruskal-Wallis 検定又は Steel 検定を行った。また、処方薬剤に関する genotype 間の比較についてはカイ二乗検定または Fisher's exact 検定を行った。有意水準は危険率5%未満とした。なお、2 $\times$ 2 Fisher's exact 検定を繰り返し行った際には Bonferroni 修正を用い、危険率5%を検定回数で除した値を有意水準とした。

## 2. 結果

対象患者の CA リピート多型の allele 頻度分布は、14CA から 26CA の範囲で 12 種類の CA リピートが確認された。23CA で最も頻度が高く (25.9%)、次いで 18CA (23.6%)、21CA (16.1%)、22CA (12.6%) であった。そこで中央値 21CA をカットオフ値とし、21CA 以下を short allele (S)、22CA 以上を long allele (L) と区分し、genotype による検討を行ったところ、各 genotype における人数は、SS genotype 43 例 (33.9%)、SL genotype 56 例 (44.1%)、LL genotype 28 例 (22.0%) であった。また、Rsa 多型の allele 頻度は G allele が 0.658、A allele が 0.342 となり、genotype 頻度は GG genotype が 65 例 (51.2%)、GA genotype が 52 例 (40.9%)、AA genotype が 10 例 (7.9%) であった。両遺伝子多型とも genotype 頻度は Hardy-Weinberg 平衡に従っていることが確認された。また、年齢、閉経年齢、身長、体重、及び BMI についていずれも genotype 間で有意な差は認められなかった (Table 1-2-1)。

血管運動神経症状、精神神経症状、筋・頭痛症状の 3 症状における自覚スコアの平均値を genotype 間で比較した。その結果、全ての症状において CA リピート多型 SS genotype 及び Rsa 多型 AA genotype が最も高いスコアを有していることが示され、特に血管運動神経症状においては SS genotype と LL genotype、AA genotype と GG genotype との間に有意な差が認められた (Table1-2-2)

次に、更年期障害患者に対する薬物療法と両遺伝子多型との相関を検討するため、上記の 127 例のうち更年期障害に対する薬物治療が実施され同意の得られた 80 例において処方実態調査を行った。対象患者に処方されたホルモン製剤、中枢神経系用剤、及び漢方製剤の内訳をそれぞれ Fig.1-2-1、Fig.1-2-2 及び Table1-2-3 に示した。ホルモン製剤は計 19 剤が処方されており、エストロゲン製剤を単独で使用する患者が 4 例 (36.4%)、エストロゲン製剤とプロゲステロン製剤を併用する患者が 7 例 (63.6%) であった (Fig.1-2-1)。中枢神経系用剤は計 89 剤が処方されており、主な薬剤はベンゾジアゼピン系薬剤 (34.8%)、催眠導入剤 (25.8%)、SSRI 等の抗うつ薬 (22.5%)、スルピリド (16.9%) であった (Fig.1-2-2)。漢方製剤は 46 種類、計 150 剤が処方されており、このうち 28.7%は三大婦人科用漢方処方として知られている加味逍遙散 (16.7%)、桂枝茯苓丸 (8.0%)、当归芍薬散 (4.0%) で占めていた (Table1-2-3)。

ホルモン製剤 (1 年超の使用)、漢方製剤 (三大婦人科用漢方処方) 及び中枢神経系用剤の使用患者の割合を CA リピート多型及び Rsa 多型の genotype 毎にそれぞれ比較した結果、CA リピート多型 SS genotype 及び Rsa 多型 AA genotype においてホルモン製剤の使用率が有意に高いことが示された (Fig.1-2-3)。一方、漢方製剤及び中枢神経系用剤については genotype 間で使用率に違いは認められなかった。

Table 1-2-1 Clinical characteristics of 127 menopausal women classified by polymorphisms of ER $\beta$  gene

(A) CA repeat polymorphism

	genotype			<i>P</i> -value
	SS (n=43)	SL (n=56)	LL (n=28)	
Age (y)	56.9 $\pm$ 6.1	57.0 $\pm$ 6.6	55.9 $\pm$ 7.3	0.562
Age at Menopause (y)	50.2 $\pm$ 3.3	49.5 $\pm$ 5.8	48.7 $\pm$ 4.9	0.608
Height (cm)	154.7 $\pm$ 4.6	155.3 $\pm$ 5.2	155.0 $\pm$ 4.9	0.857
Weight (kg)	53.8 $\pm$ 7.8	53.4 $\pm$ 8.0	53.1 $\pm$ 9.4	0.942
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.5 $\pm$ 3.3	22.2 $\pm$ 3.4	22.1 $\pm$ 3.5	0.854

Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

*P*-values are shown as the data by 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test

(B) Rsa polymorphism

	genotype			<i>P</i> -value
	GG (n=65)	GA (n=52)	AA (n=10)	
Age (y)	56.8 $\pm$ 7.0	56.9 $\pm$ 6.5	54.8 $\pm$ 3.5	0.628
Age at Menopause (y)	49.1 $\pm$ 5.9	50.1 $\pm$ 3.4	49.5 $\pm$ 3.9	0.972
Height (cm)	155.0 $\pm$ 4.9	154.7 $\pm$ 5.0	156.9 $\pm$ 4.4	0.417
Weight (kg)	53.3 $\pm$ 8.5	53.6 $\pm$ 7.9	53.8 $\pm$ 7.7	0.964
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.2 $\pm$ 3.5	22.5 $\pm$ 3.4	21.8 $\pm$ 2.6	0.828

Values are expressed as mean $\pm$ S.D.

*P*-values are shown as the data by 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test



Table 1-2-2 Clinical scores of women with menopausal disorder classified by polymorphism of ER $\beta$  gene

(A) CA repeat polymorphism

	genotype			P-value
	SS (n=43)	SL (n=56)	LL (n=28)	
Vasomotor symptoms	2.58 $\pm$ 1.38	2.30 $\pm$ 1.43	1.82 $\pm$ 1.09	0.037*
Psychological symptoms	2.77 $\pm$ 1.52	2.34 $\pm$ 1.53	2.14 $\pm$ 1.35	0.156
Musculoskeletal symptoms	2.88 $\pm$ 1.56	2.66 $\pm$ 1.50	2.79 $\pm$ 1.50	0.795

Values are shown as mean  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ : SS vs. LL by Steel test and other p-values are shown as the data by Kruskal-Wallis test.

(B) Rsa polymorphism

	genotype			P-value
	GG (n=65)	GA (n=52)	AA (n=10)	
Vasomotor symptoms	2.09 $\pm$ 1.37	2.33 $\pm$ 1.29	3.40 $\pm$ 1.26	0.011*
Psychological symptoms	2.40 $\pm$ 1.48	2.37 $\pm$ 1.53	3.10 $\pm$ 1.45	0.322
Musculoskeletal symptoms	2.80 $\pm$ 1.54	2.63 $\pm$ 1.51	3.20 $\pm$ 1.40	0.535

Values are shown as mean  $\pm$  S.D.

\* $P < 0.05$ : AA vs GG by Steel test and other p-values are shown as the data by Kruskal-Wallis test.

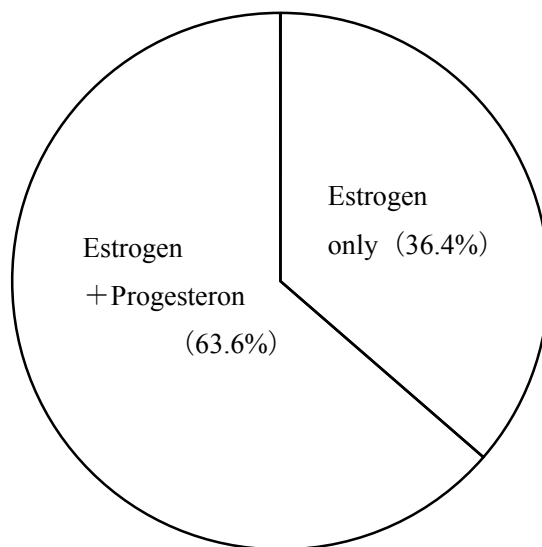


Fig.1-2-1 Details of the prescription of hormonal agents.

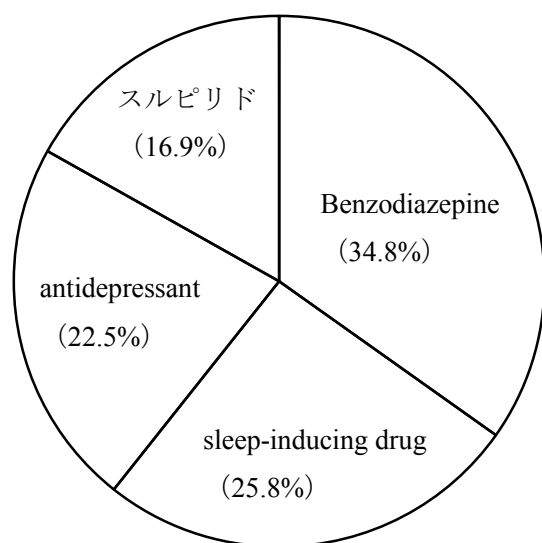
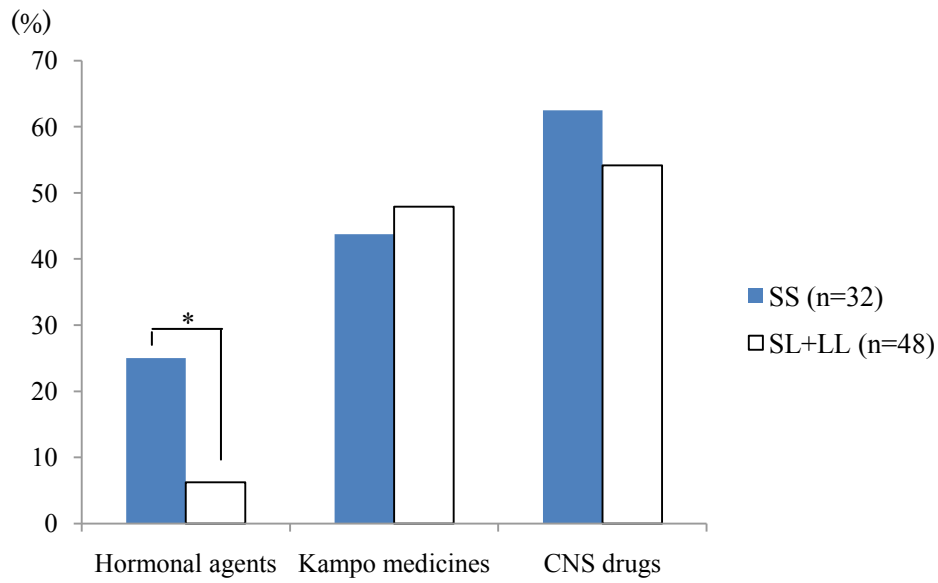


Fig.1-2-2 Details of the prescription of central nervous system (CNS) drugs

Table 1-2-3 Details of the prescription of Kampo medicines.

方剂名	処方数	(%)
加味逍遥散	25	16.7
桂枝茯苓丸	12	8.0
呉茱萸湯	10	6.7
半夏厚朴湯	9	6.0
苓桂朮甘湯	7	4.7
防風通聖散	6	4.0
当帰四逆加呉茱萸生姜湯	6	4.0
当帰芍薬散	6	4.0
桃核承気湯	5	3.3
防已黄耆湯	5	3.3
半夏白朮天麻湯	4	2.7
抑肝散加陳皮半夏	3	2.0
六君子湯	3	2.0
六味丸	3	2.0
補中益気湯	3	2.0
温経湯	3	2.0
その他 (2剂以下)	40	26.7

(A) CA repeat polymorphism



(B) Rsa polymorphism

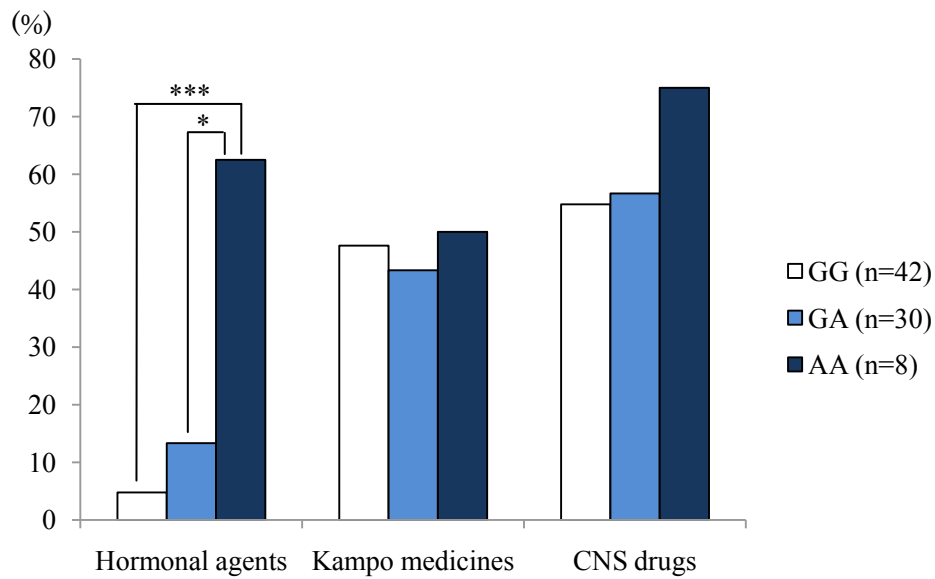


Fig.1-2-3 Frequencies of the prescription for Hormonal agents, Kampo medicines, CNS drugs and according to (A) CA repeats polymorphism and (B) Rsa polymorphism of ER $\beta$  gene. Hormonal agents are used more than 1 year. Kampo medicines are shown as Kamishoyosan, Keishibukuryogan and Tokishakuyakusan. Differences were considered significant at \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

## 考察

更年期障害患者に対する HRT の実施にあたっては、個々の症状や反応性に応じた治療が望まれていることから、本章では ER 遺伝子多型に着目し、ER $\alpha$  及び ER $\beta$  遺伝子多型と HRT 実施状況との関連を解析した。その結果、ER $\beta$  遺伝子多型において、HRT 実施状況との相関が見いだされ、更年期障害の治療薬選択に応用できる可能性が示唆された。

本研究では、東金病院女性外来を受診した更年期障害患者が対象とされ、当該患者に対して、HRT、漢方又は抗うつ薬の投与、並びにカウンセリング等の更年期障害治療が実施された。また、HRT は必要最小限の用量及び期間で実施された。その結果、33 例の患者が、1 年を超えて HRT が実施され（以下、HRT (+) 群）、17 $\beta$ -エストラジオールや結合型エストロゲンの経口投与又は経皮投与、及び必要に応じてメドロキシプロゲステロンの投与が行われた。一方、156 例の患者は 1 年を超える HRT は必要とせず、1 年未満の HRT の実施又は漢方、抗うつ薬等の薬物療法等が行われた（以下、HRT (-) 群）。ホルモン補充療法ガイドラインでは、HRT の使用にあたりリスクとベネフィットを十分に検討すべきであること、及びホルモン剤に対する反応性には個人差があるため副作用予防の観点から少ない用量を用いることが望ましい等の注意点が記載されている [41]。したがって、本研究における上記の HRT 使用状況も、実臨床での HRT の使用実態に即し、個々の患者の症状や反応性に応じた治療結果が反映されているものと考えられる。

更年期障害の諸症状の評価にあたっては、東金病院女性専用外来を受診した患者を対象とした過去の調査 [50] で発症頻度の高かった血管運動神経症状、精神神経症状、筋・頭痛症状の 3 症状を選択し、各症状の自覚スコアを 1 点から 5 点までのスコアで評価した。更年期障害症状をスコア化する手法として、Kupperman 更年期指数、簡易更年期指数、及び日本産婦人科学会生殖内分泌委員会が作成した更年期スコア表等、種々の評価表が編み出されている [51]。これらの評価法は、症状のスコア化の手法に違いはあるものの、血管運動神経症状、精神神経症状、筋・頭痛症状の 3 症状の評価を中心とし、各症状を客観的かつ簡便に評価できる点で有用とされている。本研究で使用した上記のスコア評価においても、更年期症状の主要症状である血管運動神経症状、精神神経症状、筋・頭痛症状を、実際の診療下で簡便に評価する手法として妥当であったと考える。更年期障害症状のスコアを HRT (+) 群及び HRT (-) 群で比較した結果、HRT (+) 群では血管運動神経症状及び精神神経症状スコアが HRT (-) 群と比較して有意に高かったことから、これらの症状の重症度に応じて HRT の長期使用が行われたものと考えられる。

第 1 節で検討を行った ER $\alpha$  及び ER $\beta$  遺伝子の各 SNP の minor allele の頻度は、アジア人で報告されている allele 頻度にほぼ一致していた [52]。また、CA リピート多型の allele 頻度は、18CA で最も高く (27.2%)、次いで 23CA (23.3%)、22CA (11.9%) であった。CA リピート多型の allele 頻度分布に関しては様々な報告があるものの、13CA から 30CA の範囲内で約 15 種類確認されている報告が多く、また日本人や中国人のようなアジア人では二峰性分布をとるとの報告がなされていることから [53, 54]、今回の結果はアジア人での分布傾向が反映されたものと考えられる。

遺伝子多型解析の結果、ER $\alpha$  遺伝子多型のうち HRT 実施状況との相関が認められたものは rs2228480 のみであり、骨粗鬆症等の閉経後女性に特徴的な疾患との相関 [45] が知られている Pvu II 多型及び Xba I 型については今回 HRT 実施状況との相関は認められなかった。2004 年に

Malacara らは更年期障害のホットフラッシュと腔乾燥症状との相関を報告しているものの [37]、これらの相関はそれほど強くはなく、更年期うつ症状等の精神症状との関連も認められなかった。その後 Woods らの報告 [55] 及び Bechlioulis らの報告 [56] においても、ER $\alpha$  の Pvu II 多型及び Xba I 型ではホットフラッシュの重症度との相関は認められていないことから、本研究ではこれらの報告と一貫した検討結果が得られていた。

一方、ER $\beta$  遺伝子多型に関しては、今回の検討で ER $\beta$ CA リピート多型、Rsa 多型及び rs1271572 について HRT 実施状況との相関が認められた。特に、HRT (+) 群では、HRT (-) 群に比べて ER $\beta$ CA リピート多型の 18CA 及び Rsa 多型の minor allele である A allele の頻度が高く、さらに、両多型に関しては連鎖不均衡が認められた。近年、血管運動神経症状の治療に対して ER $\beta$  選択的アゴニストが有用である可能性が示唆されており、ER $\beta$  選択的アゴニストの 1 つである MF101 は、中等度及び重度のホットフラッシュを有する閉経後女性を対象とした第 II 相試験において、MF101 群でプラセボ群と比較して投与 12 週後のホットフラッシュ回数が有意に減少した [57]。したがって、更年期障害の血管運動神経症状の発現において ER $\beta$  が何らかの関与を示す可能性が考えられる。

血管運動神経症状の典型症状であるホットフラッシュの発症要因としては、エストロゲンレベルの低下によって血中エンドルフィン・セロトニンレベルが低下しノルエピネフリン産生のフィードバック障害が喪失した結果、体温調節中枢が異常をきたすことでホットフラッシュが発症するという説 [58] や、閉経期前後での血中 17 $\beta$ -エストラジオールレベルの低下に伴う血中性ホルモン結合グロブリン (Sex hormone-binding globulin、以下、SHBG) レベルの低下 [59] 等諸説考えられている。このうち SHBG に関しては CA リピート多型との相関が報告されており、21CA リピート以下の allele のホモタイプ (SS genotype) では 22CA リピート以上のホモタイプ (LL genotype) 及びヘテロタイプ (SL genotype) に比べ SHBG レベルが低い傾向が認められたことから [60]、CA リピートがホットフラッシュの発症に何らかの影響をもたらす可能性が考えられる。また、Rsa 多型とホットフラッシュとの相関を検討した報告は現時点で存在しないものの、Rsa 多型は CA リピート多型と連鎖不均衡の関係にあること、及び排卵障害のような卵巣機能に及ぼす疾患との相関が認められていること [47] 等を踏まえると、Rsa 多型に関してもホットフラッシュとの何かしらの関与を示す可能性が考えられる。また今回の検討において HRT (+) 群では、血管運動神経症状に加え精神神経症状についても症状が重い結果であった (Table1-1-4)。脳では ER $\alpha$  に比べ ER $\beta$  の発現量が多くなっていることが知られており、ER $\beta$  がセロトニン神経の存在する縫線核や自律神経の中枢である視床下部にも存在すること [21]、及び ER $\beta$  が不安行動に関与しているとの報告が多く出されていることから [22]、更年期障害の精神神経症状の発現においても ER $\beta$  が何らかの関与を示す可能性が考えられる。

以上より、更年期障害の諸症状の発現及び HRT 実施状況において ER $\beta$  遺伝子多型、特に CA リピート多型及び Rsa 多型との相関が明らかとなったことから、第 2 節では更年期障害患者に処方されたホルモン製剤以外の薬剤も含め、処方実態調査を行い、両多型と治療薬選択との相関をさらに検討した。本検討にあたり、甲状腺機能疾患では更年期障害との鑑別を要する発汗や精神症状が発現するとの報告 [39, 61]、血清中脂質レベルが不安状態や抑うつ状態と相関しているとの報告 [62]、さらに体脂肪率の増加に伴い更年期障害の血管運動神経症状が増加するという報告 [63] 等を踏まえ、更年期障害治療と遺伝子多型との相関をより明確に検討できるよう「甲状腺機能亢

進症または甲状腺機能低下症の治療歴がある症例」及び「生活習慣病（糖尿病、高血圧、高脂血症）に対する薬物治療が行われている症例」を除外対象とした。また、CA リピート多型解析に関する初期の報告では特定のリピートの長さを有することが疾患に関連しているという結果が多く報告されており [53, 54]、第 1 節では 18CA、22CA 及び 23CA に特化して検討を行ったが、最近の研究では CA リピートの頻度分布を長いリピートと短いリピートとして大別し allele とし、その genotype と症状との相関を検討する報告が増加している [26, 28]。そこで第 2 節では、第 1 節における CA リピート多型頻度の中央値 21CA リピートをカットオフ値とし、21CA 以下を short allele (S)、22CA 以上を long allele (L) と区分し、genotype による検討を行った。なお CA リピート allele 頻度のカットオフ値は Fytali らによる報告 [28] とも一致している。

第 2 節において、まず更年期障害の 3 症状の平均自覚スコアを CA リピート多型及び Rsa 多型の各 genotype 間で比較した結果、CA リピート多型 SS genotype 及び Rsa 多型 AA genotype において血管運動神経症状の平均自覚スコアが有意に高く、両 genotype と血管運動神経症状の発症リスクとの関連性が示唆されていることを確認した。その上で、両多型と治療薬選択との相関をさらに検討した結果、第 1 節の検討結果と同様に CA リピート多型 SS genotype 及び Rsa 多型 AA genotype において、1 年超のホルモン製剤の使用率が有意に高いことが示されたことから、両遺伝子多型の genotype が治療薬選択の指標の一つとなる可能性が示唆された。HRT においては、エストロゲン製剤の単独療法他、エストロゲンによる子宮内膜増殖作用を軽減する目的で、プロゲステロンを連続的あるいは 1 ヶ月のうち一定期間（約 12 日間）逐次的に併用する方法等があり [64]、今回の調査においてもエストロゲン製剤とプロゲステロン製剤の併用療法を行っている患者が約 6 割と多かった。今後の検討では、さらに対象患者数を増やし、HRT の投与方法の違いも考慮して遺伝子多型との相関を検討することも有益と考える。

一方、漢方製剤（三大婦人科用漢方処方）については両遺伝子多型ともに、genotype 間で使用率に有意な違いは認められなかった。今回の検討では、三大婦人科用漢方処方と呼ばれている加味逍遥散、当帰芍薬散、桂枝茯苓丸の処方割合が全体の約 30%を占めていた。加味逍遥散は、虚実中間証から虚証のもので、血管運動神経症状や特に精神神経症状等の多彩な不定愁訴がある患者に用いられる。当帰芍薬散は、虚証で疲れやすく、筋肉は軟弱で、顔色が青白く冷え性で、貧血傾向があり、むくみやすく、めまい、頭痛、動悸等がある患者に対して選択されることが多い。桂枝茯苓丸は、駆瘀血剤としてホットフラッシュに有効であり、虚実中間証からやや実証で、比較的体力があり貧血傾向は顕著ではない患者に選択されることが多い [65]。今回の検討では、血管運動神経症状の発症リスクの高かった genotype でホルモン製剤の使用率との相関が見られた一方、桂枝茯苓丸では相関が見られなかった。Noguchi らは、卵巣摘出ラット及び GnRH アナログ投与ラットを用いた検討において、桂枝茯苓丸が CGRP による皮膚温上昇の亢進に対し 17 $\beta$ -エストラジオールと同様の改善効果を有することを報告している [66, 67]。しかしながら、桂枝茯苓丸は、ER $\alpha$  発現細胞である MCF-7 細胞に対する増殖作用や ER $\alpha$  依存的な転写活性化作用が見られないため、エストロゲン様活性をもたないことが示唆されている [67, 68]。したがって ER への関与に対する 17 $\beta$ -エストラジオールと桂枝茯苓丸のこうした違いが、今回の検討結果の違いに影響を及ぼした可能性が考えられる。

また、中枢神経系用剤についても、両遺伝子多型ともに、genotype 間で使用率に有意な違いは

認められなかった。最近の報告では、ホットフラッシュを有する更年期女性で不安症状やうつ症状が強く、血管運動神経症状と精神神経症状との関連性が示唆されている [69] ことから、今後症例数を増やし、ホルモン製剤との併用状況等も含めた検討を行うことにより、血管運動神経症状と精神神経症状における治療薬選択に対する両遺伝子多型の関与を検討することが重要と考える。

本研究結果で得られた知見を踏まえて、個々の患者に適した更年期障害治療の一助となるよう、今後さらに症例数や医療機関を増やし検討を進めることが期待される。



## 小括

- ER $\alpha$  及び ER $\beta$  遺伝子多型解析の結果、HRT (+) 群では HRT (-) 群に比べて、ER $\alpha$  遺伝子の rs2228480 (A allele)、ER $\beta$  遺伝子の CA リピート多型 (18CA リピート) 及び Rsa 多型 (A allele) の頻度が有意に高かった。一方、HRT (+) 群では HRT (-) 群に比べて、ER $\beta$  遺伝子の rs1271572 (T allele)、CA リピート多型 (22CA リピート及び 23CA リピート) の頻度が有意に低かった。このうち、ER $\beta$  遺伝子の CA リピート多型 (18CA リピート) 及び Rsa 多型 (A allele) との間に連鎖不均衡が認められた。
- 処方薬剤実態調査の結果、CA リピート多型 SS genotype 及び Rsa 多型 AA genotype において血管運動神経症状の自覚症状が有意に強く、1 年超のホルモン製剤の使用率も有意に高かった。一方、漢方製剤及び中枢神経系用剤については genotype 間で自覚症状及び使用率に違いは認められなかった。以上より、これらの遺伝子多型が更年期障害における治療薬選択に応用できる可能性が示唆された。

## 第2章 関節リウマチ患者における ER $\beta$ 遺伝子多型解析

### 序論

RA は、関節滑膜を病変の主座とする炎症性自己免疫疾患であり、関節滑膜にリンパ球浸潤、血管新生、滑膜増殖が見られる。増殖している滑膜組織からは種々の炎症性サイトカイン、中性プロテアーゼ等の炎症性メディエーターが産生され、軟骨細胞死、破骨細胞活性化等を介して関節組織破壊が起こる [70, 71]。我が国における RA の全国患者数は約 70~80 万人と推計されており [72]、RA の発症には遺伝的要因や環境要因等が複雑に関与している。遺伝的要因に関する研究として、RA の病態に関わる遺伝子の多型解析研究が盛んに行われており、これまでに主要組織適合遺伝子複合体 (human leukocyte antigen: HLA) を始め、タイプ 4 ペプチジルアルギニンデイミナーゼ (peptidyl arginine deiminase type 4: PADI4)、Fc receptor-like 3 (FCRL3) 等の遺伝子多型に関する報告が行われている [73]。一方、遺伝的要因のほか、喫煙等の環境要因や、性差の影響が議論されており [73]、女性の RA の罹患率は男性の約 3 倍と高く [74]、閉経期に RA 発症リスクが増加することが報告されている [75]。

RAの病態形成には骨代謝経路と免疫調節系が重要な役割を果たしており、エストロゲンの関与が知られている。エストロゲンはT細胞のTh1/Th2バランスに影響を及ぼし、妊娠期のように血中エストロゲン濃度が高い状態ではTh2へより多く分化し液性免疫が優位となり、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus、以下、SLE) や多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) 等の発症が亢進する。また、閉経期のように血中エストロゲン濃度が低下すると、Th1へ多く分化し細胞性免疫が優位となり、RAのような組織傷害T細胞の寄与が大きい疾患の発症が亢進する [76]。このように、RA患者では血中エストロゲン濃度が低いことが知られている一方で、RA患者の滑膜や滑液ではエストロゲン濃度がアンドロゲンに比べて高いことが明らかとなった。これは、マクロファージが豊富な滑膜組織において、炎症性サイトカイン (TNF、IL-1及びIL-6) が放出され、滑膜細胞のアロマターゼ活性が刺激され、アンドロゲンからエストロゲンへの変換が促進されるためと考えられている [77]。エストロゲンは滑液で16 $\alpha$ -ヒドロキシエストロンとして存在し、細胞分裂増殖作用をもたらすため、滑膜増殖が起こりRAの病態形成に関与する [78]。以上のように、エストロゲンはRAの発症や病態形成において複雑な免疫調節メカニズムを有することから、その機能を詳細に検討するためには、エストロゲンだけでなくERにも着目する必要があると考えられる。

ERは正常滑膜組織においてER $\alpha$ に比べER $\beta$ のタンパク発現及びmRNA発現が高いとの報告 [78]、及びRA患者由来滑膜組織では正常組織に比べてmRNA発現比率 (ER $\alpha$ /ER $\beta$ ) が有意に低下していることから $\beta$ の方が優位であるとの報告 [79] があり、RAの関節炎症に対してER $\beta$ を介したエストロゲン作用が関与している可能性が考えられる。

そこで本章では、RA の疫学的特徴や遺伝的素因について ER $\beta$  遺伝子多型の観点から検討することを目的とし研究を行った。まず第1節ではCA リピート多型解析、第2節ではRsa 多型解析を行い、RA 患者におけるこれらの遺伝子多型の頻度分布について検討した。

## 第1節 CA リピート多型解析

### 1. 方法

#### 対象患者

千葉大学医学部附属病院整形外科を受診した RA 患者 47 例及び変形性関節症 (Osteoarthritis、以下、OA) 患者 36 例を対象とした。なお、RA 患者の症状は、Ochi らによる分類 [80, 81] に従い LES (least erosive subset : 少関節破壊型)、MES (more erosive subset : 多関節破壊型)、MUD (mutilating disease : ムチランス型) と分類した。

#### CA リピート多型解析

ヒト DNA の抽出は第 1 章に従った。

抽出した DNA は PCR 反応を行った。反応液調製は 1 サンプルの全量を 75  $\mu$ L として行った。テンプレート DNA を 150 ng、Optimase<sup>®</sup> Polymerase (Transgenomic Inc.) を 2.5 U 使用し、また dNTP Mixture (TaKaRa) を最終濃度 0.2 mM、PCR 反応用の各プライマー (Forward primer: 5'-CAA TTC CCA ATT CTA AGC CT-3', Reverse primer: 5'-ATT CTT CTT TAG GCC AGG CA-3') を最終濃度 0.4  $\mu$ M となるよう加えた。さらに 10 $\times$ Reaction Buffer (15 mM MgSO<sub>4</sub> 含有、Transgenomic Inc.) を 7.5  $\mu$ L、滅菌超純水を適量加えた。PCR 反応は TaKaRa Thermal Cycler (TaKaRa) にて、PCR 条件 94 $^{\circ}$ C-30 秒、60 $^{\circ}$ C-30 秒、72 $^{\circ}$ C-30 秒を 35 サイクルで増幅した。PCR 反応後は、4%アガロースゲルにて確認泳動を行った。PCR 産物の解析は、CEQ<sup>™</sup>2000XL (Beckman Coulter) を用いたダイレクトシーケンス法 (ダイターミネーター法) 及び WAVE Maker<sup>™</sup>4.1 (Transgenomic) を用いた DNA フラグメント解析法を用いて行った。

ダイレクトシーケンスは、以下の方法とした。滅菌チューブに、QIAquick<sup>®</sup> PCR purification Kit を用いて精製を行った PCR 反応産物 100 fmol (約 300 bp で 20 ng)、Sequencing 反応用の 10  $\mu$ M Forward primer を 2  $\mu$ L、DTCS Quick Start Master Mix を 5.5  $\mu$ L、滅菌精製水を適量加え、全量 20  $\mu$ L とした。TaKaRa Thermal Cycler (TaKaRa) にて、Sequencing 反応を 96 $^{\circ}$ C-20 秒 50 $^{\circ}$ C-20 秒、60 $^{\circ}$ C-4 分を 30 サイクルの条件で行った。次に、新たに用意した滅菌チューブに Stop Solution 5  $\mu$ L (3M NaOAc 2  $\mu$ L, 100mM EDTA 2 $\mu$ L, 20 mg/mL Glycogen 1  $\mu$ L) を入れ、Sequencing 反応液を全量加え、よく攪拌した。冷却 99.5%エタノール 60  $\mu$ L を加えよく攪拌し、直ちに 17800 $\times$ g にて 15 分間遠心し、上清を残さないように注意深く吸い取った。次に、冷却 70%エタノール 200  $\mu$ L を加え、17800 $\times$ g にて 2 分間遠心し、上清を残さないように注意深く吸い取った。これを 2 度繰り返した後、約 25 分間減圧乾燥した。そしてキット中の Sample Loading Solution 30  $\mu$ L でサンプルを溶解し、ボルテックスにて混和後、4 $^{\circ}$ C で保存した。サンプルを 96-well サンプルプレートへ移し、各サンプルに Mineral Oil を 1 滴ずつ添加した。CEQ<sup>™</sup>2000XL へサンプルプレートをセットしてキャピラリーシーケンス解析を行った。

DNA フラグメント解析は、次のような方法で行った。DNA Sep<sup>®</sup> column (Transgenomic) を用い、カラム温度 50 $^{\circ}$ C、移動相 Buffer A (TEAA : 水=1 : 20)、Buffer B (TEAA : ACN : 水=1 : 5 : 14)、流速 0.9 mL/min とし、PCR 産物のサイズを保持時間の差により求めた。解析に用いた PCR 産物は精製せずに、injection 量は 15  $\mu$ L とした。解析の際のサイズマーカーとしては、10 倍希釈

した 20 bp DNA Ladder (TaKaRa) を用い、サンプル解析の前後に 15  $\mu$ L を 3 回ずつ injection し、保持時間の平均値を CA リピート数の計算に用いた。PCR 産物のサイズ (bp) と CA リピート数の関係はデータベース上で公表されている配列 (22 CA リピート= 248 bp) を基準とした。また、コントロールはダイレクトシーケンスにより明らかとなったサンプルを用いた。

### 統計解析

2 群において Student's *t* 検定、多群において one-way analysis of variance (1-way ANOVA) を行った。カテゴリーデータは Fisher's exact 検定又はカイ二乗検定を用いた。有意水準は危険率 5%未満とした。

## 2. 結果

ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型を含む DNA 配列の PCR 産物の電気泳動結果を Fig.2-1-1 に示した。PCR 産物のサイズにより異なるが、およそ 250 bp 付近にバンドが確認され、1 人の患者が持つ 2 つの allele で CA リピート数が同じである場合 (homozygous) は 1 本のバンドが、CA リピート数が異なる場合 (heterozygous) は 2 本のバンドが確認された。また、homozygous の PCR 産物を用い、ダイレクトシーケンス法により CA リピート配列が増幅されていることを確認した (Fig.2-1-2)。DNA フラグメント解析においても、homozygous サンプルは 1 本のピークが、heterozygous サンプルは 2 本のピークが検出された (Fig 2-1-3)。

RA 患者及び OA 患者の患者背景を Table 2-1-1 に示した。RA 患者及び OA 患者で男女の比率に違いは認められず ( $p=0.2017$ )、RA 患者及び OA 患者共に女性患者の割合が多かった。年齢範囲は RA 患者で 23~84 歳、OA 患者で 42~82 歳であり、OA 患者に比べ RA 患者では平均年齢が低かった。また、RA 患者の重症度分類は、83%の患者が MES であった。

RA 患者及び OA 患者の CA リピートの allele 分布を Fig.2-1-4 及び Fig.2-1-5 に示した。RA 患者では 15CA から 27CA の範囲で 10 種類確認され、23CA で最も頻度が高く、平均 CA リピート (標準偏差) は 21.3 (2.5) CA であった。一方 OA 患者では 14CA から 25CA の範囲で 9 種類確認され、19CA で最も頻度が高く、平均 CA リピート (標準偏差) は 20.4 (2.5) CA であった。RA 患者では OA 患者に比べ平均 CA リピートが長く、統計学に有意な差が認められた ( $p=0.025$ )。

次に、平均 CA リピートに基づき、CA リピートが 21CA 以下を short allele (S)、22CA 以上を long allele (L) と区分し genotype での検討を行った。RA 患者及び OA 患者の genotype の結果を Table 2-1-2 に示す。RA 患者における各 genotype の人数は SS genotype 12 例 (25.5%)、SL genotype 17 例 (36.2%)、LL genotype 18 例 (38.3%)、OA 患者における各 genotype の人数は SS genotype 11 例 (30.6%)、SL genotype 22 例 (61.1%)、LL genotype 3 例 (8.3%) であり、これらの genotype 頻度は両者とも Hardy-Weinberg 平衡に従っていることが確認された。RA 患者では OA 患者に比べて L allele の頻度が有意に高く (OR : 2.03, 95%CI : 1.09-3.80,  $p=0.029$ )。さらに、Table 2-1-3 及び Table 2-1-4 に示したとおり、RA 患者では OA 患者に比べて LL genotype の頻度が有意に高かった。

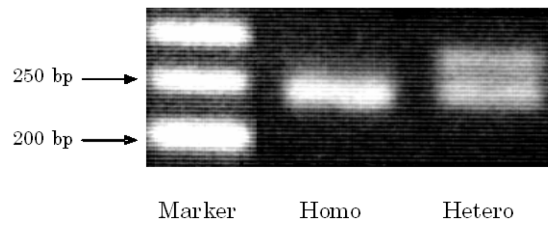


Fig. 2-1-1 PCR products of CA repeat polymorphism site in ER $\beta$  gene.

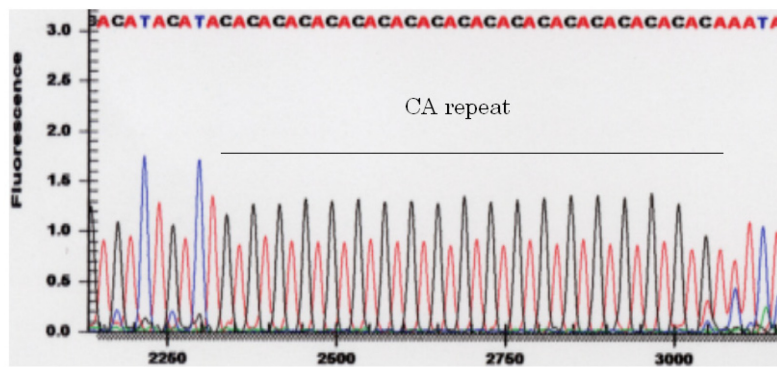


Fig. 2-1-2. Nucleotide sequences of CA repeat polymorphism on ER  $\beta$  gene, after direct sequencing of PCR products.

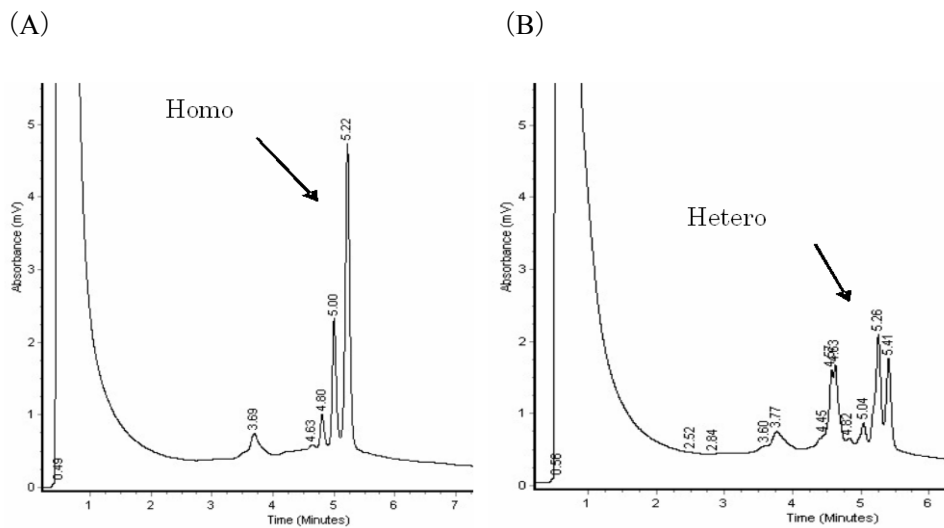


Fig. 2-1-3 DHPLC profiles for CA repeat polymorphism on ER  $\beta$  gene. (A) homozygous sample (B) heterozygous sample.

Table 2-1-1 Characteristics of RA and OA patients

Characteristic	Total	RA	OA	P-value
All patients (n)	83	47	36	—
Gender (n(%))				
Female	63 (75.9)	33 (70.2)	30 (83.3)	0.2017 <sup>a</sup>
Male	20 (24.1)	14 (29.8)	6 (16.7)	
Age(years)				
mean±SD	62.2±13.4	58.6±13.9	66.9±11.3	0.0045 <sup>*b</sup>
range	23-84	23-84	42-82	
Severity (n(%))				
LES	—	7(14.9)	—	—
MES	—	39(83.0)	—	
MUD	—	1(2.1)	—	

Age data are expressed as mean ± S.D.

P-values are shown as comparison between RA and OA by <sup>a</sup>Fisher's exact test, <sup>b</sup>student *t*-test.

Differences were considered significant at \**P* < 0.05.

LES (Least Erosive Subset), MES (More Erosive Subset), MUD (Mutilating Disease)

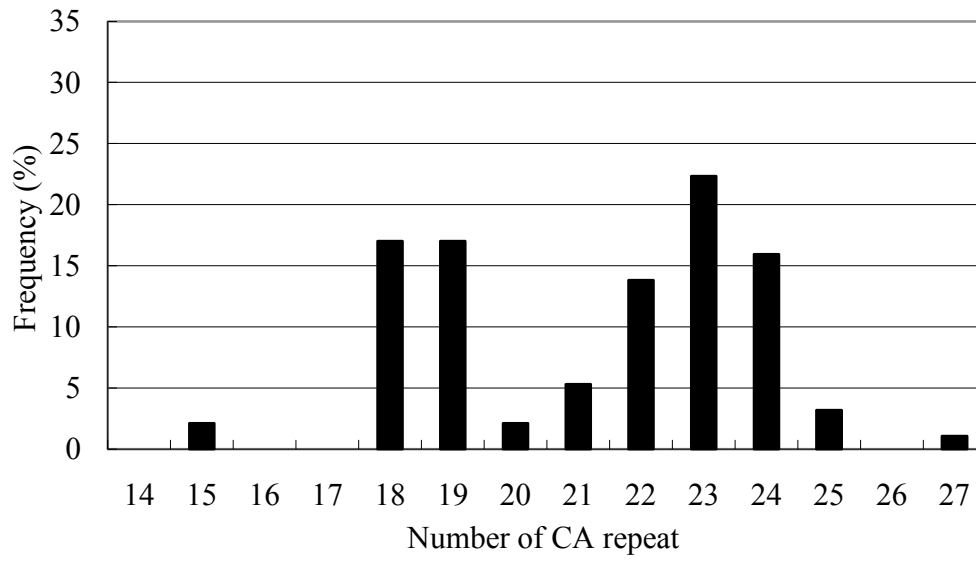


Fig.2-1-4 Frequency distribution of CA repeat polymorphism of estrogen receptor-β in RA patients

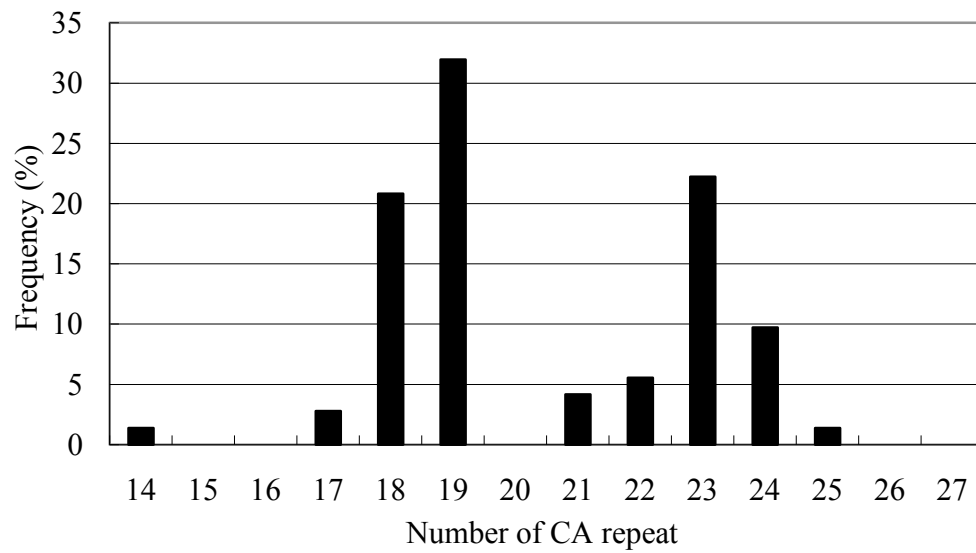


Fig.2-1-5 Frequency distribution of CA repeat polymorphism of estrogen receptor-β in OA patients

Table 2-1-2 Distribution of RA and OA patients with respect to genotype and L allele frequency

Genotype	RA		OA		<i>P</i> -value	Allele G vs Allele A		
	n	%	n	%		OR	95%CI	<i>P</i> -value
SS	12	25.5	11	30.6	0.006*	2.031	1.09-3.80	0.029*
SL	17	36.2	22	61.1				
LL	18	38.3	3	8.3				
Total	47	100	36	100				

Differences are considered significant at \**P* < 0.05 by Chi-square test and Fisher's exact test

OR:odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval

Table 2-1-3 Comparison of genotype frequencies for CA repeat polymorphism of ERβ gene in RA and OA patients

Genotype	RA		OA		OR vs SS	95% CI	<i>P</i> -value
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)			
SS	12 (25.5)	11 (30.6)	1 (referent)	—	—	—	
SL	17 (36.2)	22 (61.1)	0.71	0.25-1.99	0.602		
LL	18 (38.3)	3 (8.3)	5.50	1.26-23.94	0.025*		

Differences are considered significant at \**P* < 0.05 by Fisher's exact test

OR:odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval

Table 2-1-4 Comparison of genotype frequencies for CA repeat polymorphism of ERβ gene in RA and OA patients between two groups of genotypes

Genotype	RA		OA		OR	95%CI	<i>P</i> -value
	n	%	n	%			
SS	12	25.5	11	30.6	0.780	0.30—2.05	0.630
SL + LL	35	74.5	25	69.4			
Total	47	100	36	100			
LL	18	38.3	3	8.3	6.827	1.82—25.62	0.002*
SL + SS	29	61.7	33	91.7			
Total	47	100	36	100			

Differences are considered significant at \**P* < 0.05 by Fisher's exact test

OR:odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval



## 第2節 Rsa 多型解析

### 1. 方法

#### 対象患者

千葉大学医学部附属病院整形外科を受診したRA患者263例及びOA患者174例を対象とした。RA患者の症状は、第1節と同じくOchiらによる分類[80, 81]に従いLES (least erosive subset : 少関節破壊型)、MES (more erosive subset : 多関節破壊型)、MUD (mutilating disease : ムチランス型)と分類した。

#### Rsa 多型解析

DNA抽出は第2章 第1節に従った。

Rsa多型解析は、PCR-RFLP法にて実施した。抽出したDNA 100 ng、及び2種類のプライマー (Forward primer: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GTT CTC ACC GCC TCT TGC TTT CCC CAG -3' 及び Reverse primer: 5'-AAG GGA ACA AAA GCT GGA GAA ACA CAA TGT ATT TTT TCT CAC -3') を各0.2 µM、Ex Taq™のPremixを12 µL添加し、滅菌精製水を加え全量25 µLとした。Thermal Cycler Dice (TaKaRa)にて、PCR条件95°C-10分ののち、95°C-30秒、58°C-30秒、72°C-30秒を35サイクルで増幅した。PCR産物を精製したのち、3%アガロースゲルにて確認泳動を行った。精製後のPCR産物7.5 µL、Rsa I 5Uもしくは滅菌超純水0.5 µL、10×T buffer 1 µL、BSA 1 µLを加え全量10 µLとして反応液を調製し、37°C、5時間の制限酵素反応を行った。反応生成物を3%アガロースゲルにて電気泳動を行った。Rsa Iによる制限酵素処理では、酵素添加により223 bpのみバンドが検出されるものをG allele、150 bpと73 bpの2つのバンドが確認されるものをA alleleと判断した。

#### 統計解析

2群間の比較はStudent's t test (等分散でない場合はAspin-Welch t-test)を用い、カテゴリカルデータはFisher's exact probability testを用いた。

### 2. 結果

ERβ遺伝子内のRsa多型を含むDNA配列のPCR産物の確認泳動により、223 bpにバンドが確認された。Rsa多型領域を含むPCR産物を制限酵素Rsa Iで処理したところ、Major alleleであるG alleleを2本持つGG genotypeのサンプルでは223 bpの1本のバンドが (Fig.2-2-1A)、Rsa Iの認識配列が存在するMinor alleleであるA alleleを2本持つAA genotypeのサンプルでは150 bpと73 bpの2本のバンドが (Fig.2-2-1C)、そしてこれらのalleleを1本ずつ持つGA genotypeのサンプルでは223 bpと150 bpの2本のバンドが確認された (Fig.2-2-1B)。なお、過去の検討により、PCR-RFLP法の結果による結果とダイレクトシーケンス法による結果の一致が確認されている (Fig.2-2-2)。

RA患者及びOA患者の患者背景をTable2-2-1に示した。RA患者及びOA患者間で、性別の割合に違いがみられたものの、両群とも、男性患者に比べ女性患者の割合が多かった。また、年齢

に関しては、男性及び女性ともに OA 患者では RA 患者に比べ年齢が高かった。RA 患者の重症度分類について、約 70%の患者が MES であった。

RA 患者及び OA 患者の Rsa 多型の allele 頻度及び genotype 頻度を Table2-2-2 に示した。RA 患者における各 genotype の人数は GG genotype 149 例 (56.7%)、GA genotype 94 例 (35.7%)、AA genotype 20 例 (7.6%)、OA 患者で GG genotype 76 例 (43.7%)、GA genotype 78 例 (44.8%)、AA genotype 20 例 (11.5%) であり、観察された genotype 頻度は Hardy-Weinberg 平衡に従っていた。Table2-2-2 及び Table2-2-3 に示したとおり、RA 患者では OA 患者に比べて G allele の頻度が有意に高く、GG genotype 頻度も有意に高かった。さらに、RA 患者を重症度別に分類し、genotype 頻度との関連を検討した結果 (Table2-2-4)、GG genotype の頻度は重症 RA 患者 (MES+MUD) が最も高く、次いで軽症 RA 患者 (LES)、OA 患者の順となり、3 群間に統計学的な有意差が認められた ( $p=0.025$ )。また、男女別に検討した結果、女性では RA 患者の GG genotype 頻度が OA 患者に比べ有意に高かった一方、男性では有意差は認められなかった (Table2-2-5)。Table2-2-5 の結果について RA 患者の重症度別に分類した結果、重症 (MES+MUD) の女性 RA 患者で GG genotype 頻度が高かった (Table2-2-6)。

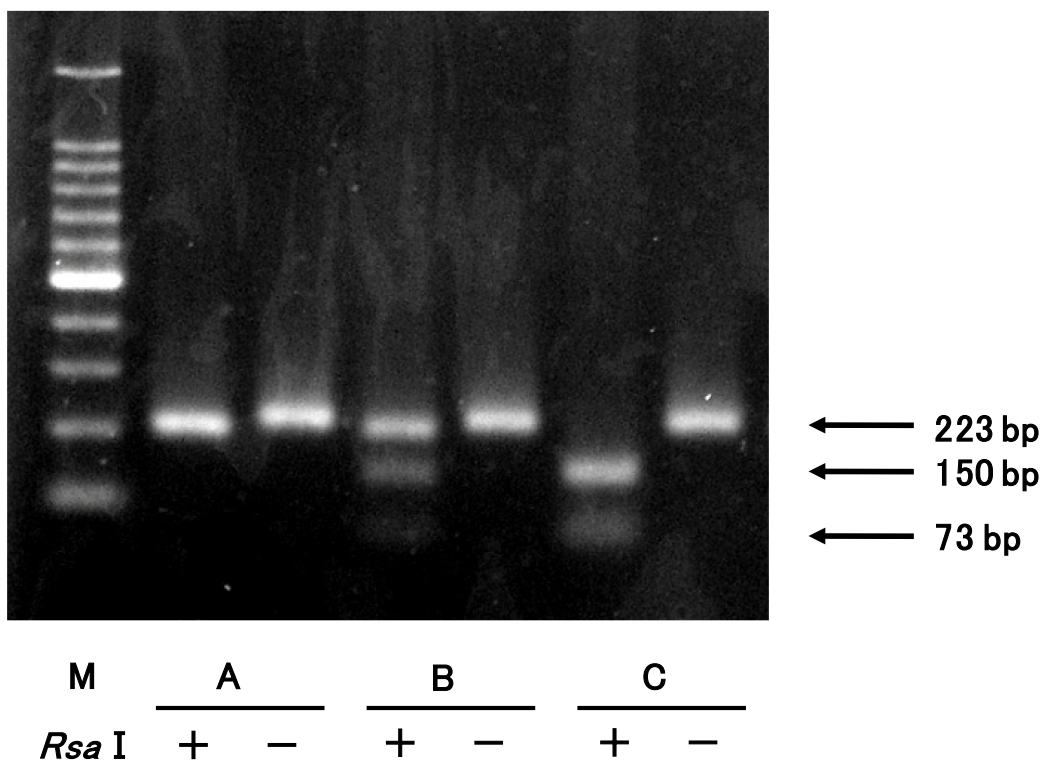
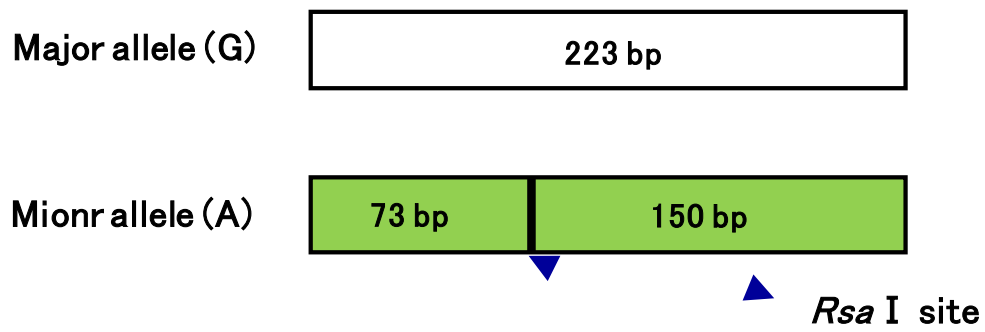


Fig.2-2-1 The electrophoretic profiles of rs1256049 (*Rsa* polymorphism) by PCR-RFLP. Identification of “A” by *Rsa* I. The panel shows the amplified PCR fragments that were digested with restriction enzyme (+) or (-).

M: DNA size marker (100 bp DNA ladder)

A: major allele + major allele (GG genotype)

B: major allele + minor allele (GA genotype)

C: minor allele + minor allele (AA genotype)

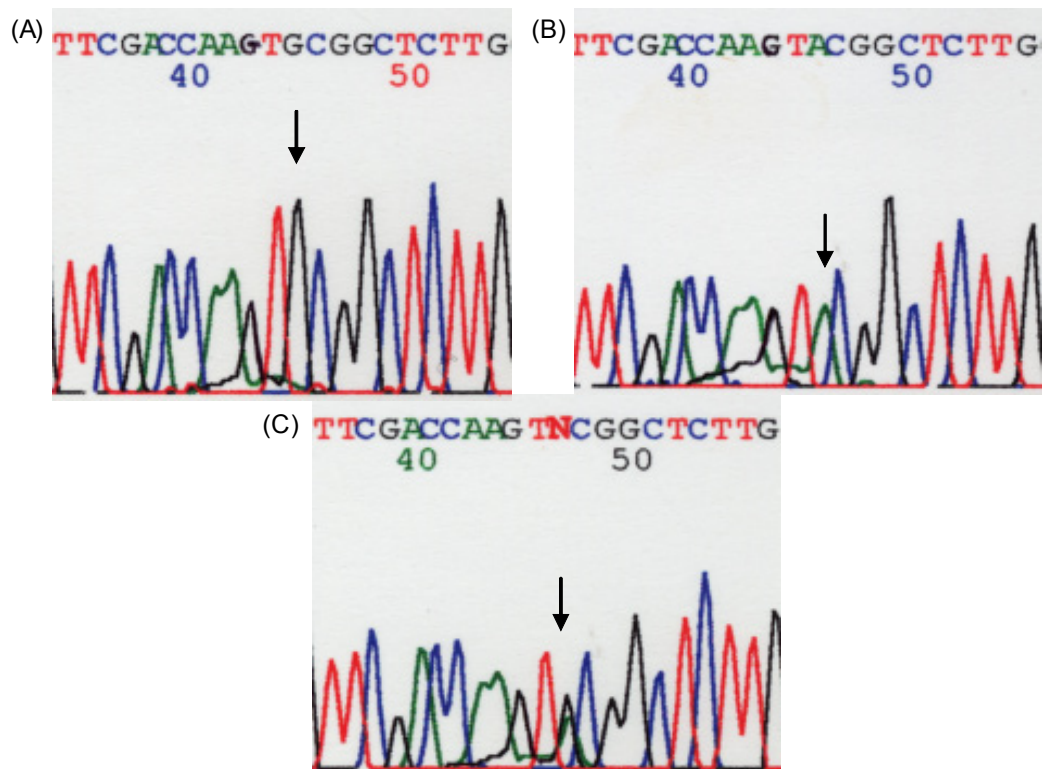


Fig.2-2-2 Nucleotide sequences from *Rsa* I site in exon 5 of ER $\beta$  gene, after direct sequencing of PCR products. (A) GG genotype, (B) AA genotype and (C) GA genotype.

Table 2-2-1 Characteristics of RA patients and OA patient

Characteristic	Total	RA	OA	P-value
All patients (n)	437	263	174	—
Gender (n(%))				
Female	365 (83.5)	210 (79.8)	155 (89.1)	0.012 <sup>*a</sup>
Male	72 (16.5)	53 (20.2)	19 (10.9)	
Age (years)				
Female	63.7±11.5	60.4±11.6	68.2±9.2	<0.001 <sup>***b</sup>
(range)	(18-94)	(18-86)	(37-94)	
Male	62.7 ±13.0	60.6 ±12.2	68.5±13.6	<0.05 <sup>*c</sup>
(range)	(23-84)	(23-83)	(37-84)	
Total	63.6±11.6	60.5±11.7	68.3±10.2	<0.001 <sup>***b</sup>
(range)	(18-94)	(18-86)	(34-94)	
Severity ( n(%))				
LES	—	69 (26.2)	—	—
MES	—	183 (69.6)	—	
MUD	—	11 (4.2)	—	

Age data are expressed as mean ± S.D.

P-values are shown as comparison between RA and OA by a: Fisher's exact test, b: Aspin-Welch *t* test, c: Student's *t*-test.

Differences were considered significant at <sup>\*</sup>*P* < 0.05, <sup>\*\*\*</sup>*P* < 0.001.

LES (Least Erosive Subset), MES (More Erosive Subset), MUD (Mutilating Disease)

Table 2-2-2 Comparison of genotype and allele frequencies for Rsa polymorphism of ER $\beta$  gene in RA and OA patients

Genotype	RA		OA		<i>P</i> -value	Allele G vs Allele A		
	n	%	n	%		OR	95%CI	<i>P</i> -value
GG	149	56.7	76	43.7	0.026	1.501	1.12 - 2.02	0.008*
GA	94	35.7	78	44.8				
AA	20	7.6	20	11.5				
Total	263	100	174	100				

OR: odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

Differences were considered significant at \* $P < 0.05$  by Fisher's exact test.

Table 2-2-3 Comparison of genotype frequencies for Rsa polymorphism of ER $\beta$  gene in RA and OA patients between two group of genotypes

Genotype	RA		OA		OR	95%CI	<i>P</i> -value
	n	%	n	%			
GG	149	56.7	76	43.7	1.685	1.15-2.48	0.008*
GA+ AA	114	43.6	98	56.3			
Total	263	100	174	100			
GG + GA	243	92.4	154	88.5	1.578	0.82-3.03	0.178
AA	20	7.6	20	11.5			
Total	263	100	174	100			

OR: odds ratio, 95% CI: 95% confidence interval.

Differences were considered significant at \* $P < 0.05$  by Fisher's exact test.

Table 2-2-4 Comparison of genotype frequencies for Rsa polymorphism of ERβ gene between OA patients, mild (LES) RA patients and severe (MUD+MES) RA patients

Genotype	OA		RA (LES)		RA (MES+MUD)		P-value
	n	%	n	%	n	%	
GG	76	43.7	37	53.6	112	57.7	
GA+ AA	98	56.3	32	46.4	82	42.3	0.025*
Total	174	100	69	100.0	194	100	

95% CI: 95% confidence interval.

Differences were considered significant at \* $P < 0.05$  by Fisher's exact test.

Table 2-2-5 Comparison of genotype frequencies for Rsa polymorphism of ERβ gene between OA and RA patients stratified gender

	Genotype	RA		OA		OR	95%CI	P-value
		n	%	n	%			
Female	GG	115	54.8	65	41.9			
	GA+ AA	95	45.2	90	58.1	1.676	1.06-2.01	0.020*
	Total	210	100	155	100			
Male	GG	34	64.2	11	57.9			
	GA+ AA	19	35.8	8	42.1	1.301	0.45-3.79	0.783
	Total	53	100	19	100			

OR: odds ratio, 95%CI: 95% confidence interval.

Differences were considered significant at \* $P < 0.05$  by Fisher's exact test

Table 2-2-6 Comparison of genotype frequencies for Rsa polymorphism of ERβ gene between OA patients, mild (LES) RA patients and severe (MUD + MES) RA patients stratified gender

	Genotype	OA		RA (LES)		RA (MES+MUD)		P-value
		n	%	n	%	n	%	
Female	GG	65	41.9	25	47.2	90	57.3	
	GA+ AA	90	58.1	28	52.8	67	42.7	0.022*
	Total	155	100	53	100	157	100	
Male	GG	11	57.9	12	75.0	22	59.5	
	GA+ AA	8	42.1	4	25.0	15	40.5	0.561
	Total	19	100	16	100.0	37	100	

95% CI: 95% confidence interval.

Differences were considered significant at \* $P < 0.05$  by Fisher's exact test.

## 考察

本章では、RA の疫学的特徴や遺伝的素因について ER $\beta$  遺伝子多型の観点から検討することを目的として、第1節で Rsa 多型解析を、第2節で ER $\beta$ CA リピート多型解析を行った。

RA の関節状態の評価として、本章では Ochi らによる分類 [80, 81] を用いた。この分類は、破壊関節数の度合いに基づき LES (少関節破壊型)、MES (多関節破壊型) 及び MUD (ムチランス型) の3つに分類される。LES は、罹病後約5年間は徐々に破壊関節数が増加するものの、10年以後の変化がほとんど認められない症例群である。MUD は罹病早期から破壊関節数は急速に増加し、10年以内にほとんどの関節が破壊され最上限で横ばいとなる。MES はやや緩徐に関節破壊が進み、罹病後25年も経つとほとんどの関節が破壊され MUD と区別されなくなる。また、対照群とされた OA は、関節構成体、特に関節軟骨の退行性変化と、これに伴う骨組織や線維組織等の増殖性変化により関節の変形を生じ、疼痛や運動制限等を起こす疾患と定義される。OA においても滑膜炎の炎症は起こるが、この炎症は二次的なものであり、自己免疫疾患である RA とは区別されるため、RA の対照疾患として OA を用いる検討が多く行われている。本章において RA 患者及び OA 患者は閉経期から老年期の年齢であり、男性に比べ女性患者の割合が多かった。この患者背景には、RA 患者の年齢層や罹患率の性差といった疫学的特徴が反映されているものとする。

第1節では、ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型解析を実施した結果、RA 患者では OA 患者に比べ平均 CA リピートが有意に長かった。そこで第1章と同様に 21CA 以下を short allele (S)、22CA 以上を long allele (L) と区分し検討を行った結果、RA 患者では OA 患者に比べ LL genotype の頻度が有意に高かった。現時点で、本研究以外に RA 患者の ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型解析の検討は報告されていないものの、Wang らは自己免疫疾患である SLE 患者を対象とした ER 遺伝子多型解析を実施し、S allele (23 リピート未満) が SLE の発症リスクに関与する可能性を報告した [82]。当該報告の結果は、本章の RA 患者における検討結果とは逆の相関を示している。しかしながら、両疾患の特徴には種々の差異が知られており [83]、RA は主に中高年女性に好発する一方、SLE は 20~40 歳代の女性に好発する。また、序論で述べたとおり、両疾患では免疫調節に対するエストロゲンの寄与が異なり、SLE は妊娠期に悪化するのに対し、RA は閉経期に悪化する [76]。したがって、CA リピート多型との相関の違いを考察するにあたって、両疾患背景の違いを考慮する必要があると考える。

第2節では、ER $\beta$  遺伝子 Rsa 多型解析を実施した結果、RA 患者では OA 患者に比べて G allele の頻度及び GG genotype の頻度が有意に高かった。一方、Dziedziejko らは、ポーランド人 RA 患者の ER $\alpha$  の SNP (Pvu II 多型及び Xba I 多型) 及び ER $\beta$  の SNP (rs4986938 及び Rsa 多型) を解析し、RA 患者の genotype 頻度や臨床検査値 (リウマトイド因子、抗 CCP 抗体等) との相関を検討したものの、ER $\beta$  の SNP ではいずれも有意な相関は認められなかった [84]。しかしながら、当該報告におけるポーランド人の Rsa 多型 A allele 頻度は約 5%であった一方、今回の日本人患者での A allele 頻度は RA 患者で 25%、OA 患者で 34%であり、両結果で大きく異なっていた。実際、Rsa 多型の A allele 頻度はアジア人で 34%、ヨーロッパ人で 3%、アメリカ人では 4%等と報告されていることから [85]、Dziedziejko らの報告及び本研究での allele 頻度分布は各民族を反映した結果といえる。このことを踏まえると、RA との相関に関する今回の結果が Dziedziejko らの報告と



異なった原因として、Rsa 多型の allele 頻度分布の民族差が考えられる。

RA において ER 遺伝子多型がどのような寄与をしているのかについては、現時点で明らかになっていない。RA の関節破壊では、滑膜組織に浸潤したリンパ球やマクロファージ等によって炎症性サイトカイン (IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  等) が産生されることが知られており、RA 患者の滑膜組織では、IL-6 及び IL-8 濃度と ER $\alpha$  発現細胞及び ER $\beta$  発現細胞数と正の相関を示すとの報告がある [86]。さらに IL-6 に関しては、ER $\beta$  遺伝子の 3'-非翻訳領域に存在する SNP (rs4986938) と IL-6 遺伝子の SNP が、IL-6 の高値が知られるパーキンソン病発症の感受性と関連があると報告されていることから [87]、ER $\beta$  遺伝子多型と炎症性サイトカインレベルとの間に何らかの関連がみられる可能性が考えられる。また、Jawaheer らは、診断後 2 年以下の RA に対する抗 TNF 療法の治療効果に性差が認められ、男性では女性に比べ治療効果が高かったと報告している [88]。第 2 節で検討した Rsa 多型頻度においても、女性 RA 患者、特に重症患者で OA 患者に比べ G allele の頻度及び GG genotype の頻度が有意に高かったことを踏まえると、今後様々な情報の集積が必要ではあるものの、RA の病態や治療効果の性差において ER 遺伝子多型が関連している可能性が考えられる。

なお、エストロゲンが RA の発症や病態形成において複雑な免疫調節メカニズムを有する旨序論で述べたが、その一方で、エストロゲンが RA を改善する可能性も検討されている。エストロゲンが IL-6 産生抑制作用を有するとの報告 [89] や、選択的 ER $\beta$  アゴニストを用いた非臨床試験において、当該化合物が TNF- $\alpha$  遺伝子のプロモーターに結合し TNF- $\alpha$  遺伝子の転写を抑制し RA を改善する可能性が示された報告がある [90]。しかしながら、当該化合物の臨床試験では RA 患者における有効性が示されなかったことから [91]、RA に対するエストロゲンの作用についてはさらに検討の余地があるものと考えられる。また、RA に対しては、エストロゲンの免疫調節機構のほか、骨代謝系が関与していることが知られており、CA リピート多型と閉経後の骨密度の低下や閉経後骨粗鬆症との関連が報告されている [49, 92]。以上を踏まえ、今後も、RA の免疫調節及び骨代謝系に対するエストロゲンの影響を検討するとともに、ER $\beta$  遺伝子多型の検討が望まれる。なお、第 1 節で示した CA リピート多型の検討は、特に少数例での初期検討であったことから、今後はさらに症例数を増やした上で検討を行う必要があると考える。現時点では、RA 患者を約 190 例、OA 患者を約 80 例にまで増やし第 1 節と同様の検討を行ったところ、今回示されたような傾向は認められなかったことから、症例数を増やすだけでなく、上記のように RA の病態形成にかかわる炎症性サイトカインや骨代謝系等と ER $\beta$  遺伝子多型との相関についても並行して検討を進めることが重要であると考えられる。

また、序論でも述べたとおり、RA 関連遺伝子の多型解析研究が盛んに行われており、Welcome Trust case Control Consortium(WTCCC)による Genome-Wide Assosiation (GWA) study においても HLA-DRB1 や PTPN22 (protein tyrosinephosphatase, non-receptor type 22)等の SNP と RA との相関が報告されている [93]。当該報告においては、さらに女性 RA 患者にのみ関与する SNP(rs11761231) も報告され、RA の性差との関連性が示唆されている。したがって、今後は ER 遺伝子多型単独での検討に留まらず、他の RA 関連遺伝子の多型解析も並行し、RA の病態や性差の解明の一助となるよう検討を行う必要があると考える。

## 小括

- ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型について、RA 患者では OA 患者に比べて平均 CA リピートが長く、L allele の頻度及び LL genotype の頻度が有意に高かった。
- ER $\beta$  遺伝子 Rsa 多型について、RA 患者では OA 患者に比べて G allele の頻度及び GG genotype の頻度が有意に高かった。また、女性では RA 患者の GG genotype 頻度が OA 患者に比べ有意に高く、特に重症 RA 患者での GG genotype 頻度が高かった。一方、男性では有意差はみられず、Rsa 多型の頻度に性差が認められた。

### 第3章 転写活性化作用に対する CA リピート多型の機能解析

#### 序論

2003年4月14日にヒトゲノム配列の解読完了が宣言され [94]、遺伝子多型と疾患との関連性に関する検討が盛んに行われているほか、疾患に対する各遺伝子多型の機能にも注目が集まっている。SNPは、遺伝子上で存在する位置等によって表現型に対する機能的な分類がなされており、翻訳領域に存在しアミノ酸が変化する coding SNP、翻訳領域に存在するがアミノ酸が変化しない silent SNP または synonymous SNP、プロモーター領域やイントロンに存在し遺伝子発現量に影響する可能性のある regulatory SNP や intron SNP、その他の領域に位置し機能に関係のない genome SNP という分類がなされている [23]。一般的に、タンパク質の構造や機能を障害する恐れのある coding SNP が最も影響力をもつと考えられるが、全 SNP に占める coding SNP の割合は1%にも満たないとの報告があり、これは自然淘汰による有害アミノ酸変換部分の排除の結果によるものと考えられている [95]。silent SNP は高頻度に存在するものの、機能に関しては不明であった。しかしながら、近年では大腸菌や酵母、ショウジョウバエ、さらにはヒトゲノムを用いた研究で、silent SNP が mRNA 発現量、構造及び安定性、さらにはコドン使用頻度の偏り等に影響を及ぼすこと等が報告され [96-100]、非翻訳領域に存在する micro RNA と同様に、転写レベルや翻訳レベルにおける silent SNP の機能的意義や臨床への応用が期待されている。

CA リピート多型のようなマイクロサテライト多型は、当初は遺伝学的解析上のマーカーとして認識されるに留まっていたが、近年ではその繰り返し配列数の違い自体が様々な生命現象において機能を有する可能性が報告されており、高い関心が寄せられている [23, 101, 102]。CA リピート多型に関しても転写制御、RNA スプライシングや翻訳等の遺伝子発現調節、染色体構造や DNA 構造、DNA 複製や遺伝子組み換え、細胞周期といった様々なプロセスに関与する可能性が考えられている [102-106]。特に CA リピートの長さの違いと転写制御に関しては、様々な遺伝子を用いて盛んに研究が進められているものの [107-111]、我々の知る限り ER $\beta$  遺伝子多型の機能に関して検討は未だ行われていない。そこで本章では、ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型の allele 頻度分布を考慮し、ルシフェラーゼアッセイを用いて CA リピート多型におけるリピート長さの違いと転写活性との関連性を検討した。

## 第1節 転写活性化作用に対する CA リピート多型の機能解析

### 1. 方法

#### 検体

同意の得られた健常人ボランティア 51 例（男性 11 例、女性 40 例）より採取した末梢血を用いた。

#### 使用細胞

HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）

#### CA リピート多型解析

ヒト DNA の抽出及び PCR 反応は、第 1 章に従った。

また、PCR 産物の CA リピート多型解析は、第 2 章第 1 節に示したダイレクトシーケンス法を用いて行った。

#### CA リピート多型領域を含むレポーター遺伝子プラスミドの構築

##### <インサート DNA 作製>

CA リピート多型解析の結果から、15、18、24、及び 27 リピートを有するゲノム DNA をそれぞれテンプレートとし、CA リピート多型領域を含む配列を PCR 反応にて増幅した。PCR 反応においては、5'末端に制限酵素 *Kpn* I (TaKaRa) のサイトを付加したプライマー (Forward primer: 5'-ACTGGGTACCCAATTCCCAATTCTAAGCCT -3'、Reverse primer: 5'-TCAGGGTACCTGCCTGGCCTAAAGAAGAAT -3) を用い、上記の CA リピート多型解析と同様の反応条件で行った。

各 PCR 産物約 500  $\mu$ L をエタノール沈殿により濃縮・精製した。まず反応液に対して 1/25 容量の 5 M 塩化ナトリウム溶液及び 2.5 容量の冷却 99.5%エタノールを加え混和し、 $-20^{\circ}\text{C}$  で 30 分間冷却した後、 $13000\times g$ 、 $4^{\circ}\text{C}$  にて 10 分間の遠心を行った。上清を除去後、70%エタノールを 1000  $\mu$ L 加え  $13000\times g$  でさらに 5 分間遠心して再び上清を除去した後、約 20 分間の減圧乾燥を行った。そして乾燥したペレットに滅菌超純水を 352  $\mu$ L 加え DNA を溶解させた。この DNA 溶液に対し、制限酵素 *Kpn* I を 80 U 及び  $10\times L$  buffer を 40  $\mu$ L 添加し、全量 400  $\mu$ L にて制限酵素反応を行った。反応は  $37^{\circ}\text{C}$  で一晩行った。

*Kpn* I 処理後の反応液を前述のエタノール沈殿の方法で濃縮・精製し 40  $\mu$ L の溶液とした。そして  $6\times$  Loading buffer を 8  $\mu$ L 加え、3%アガロースゲルにて TAE buffer 中で 50 V、約 70 分間の電気泳動を行い、目的の CA リピートを有する DNA 断片を分離した。泳動したゲルは、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  エチジウムブロマイド溶液中で約 30 分間染色した後、数回水洗いし紫外線 (254 nm) 照射下で DNA 断片を観察した。

GeneRuler™ 50 bp Ladder (Fermentas) にて DNA 断片のサイズを確認後、エチジウムブロマイド染色像より目的断片のある部分のゲルを切り出した。切り出したゲルからの DNA 抽出には QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて、当該キットのプロトコル通り行った。得られ

た DNA 溶液はエタノール沈殿により濃縮して 21  $\mu$ L の溶液とし、インサート DNA 溶液としてライゲーションに使用した。

#### <プラスミド DNA の調製>

レポーター遺伝子プラスミドの構築用に用いる pGL3-promoter vector (Promega)、及び内標準ベクターの pRL-SV40 vector (Promega) を保持した大腸菌を、それぞれ適量の LB/Amp 液体培地に植菌し、37°C、約 200 回/分で約 12 時間振盪培養した。集菌後、Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用い、プラスミド DNA を単離・精製した。得られたプラスミド DNA 溶液 2  $\mu$ L に対し、*Kpn* I 0.5  $\mu$ L、10 $\times$ L buffer 1  $\mu$ L、滅菌超純水 6.5  $\mu$ L を加え全量 10  $\mu$ L にて 37°C、2 時間の制限酵素反応を行った。そしてこの反応液を全量使用し、DNA Mass Ladder (TOYOBO) を用いた 1.2%アガロースゲル電気泳動により、エチジウムブロマイド染色像からプラスミド DNA の収量を推定した。

以上より得られた pGL3-promoter vector のプラスミド DNA 溶液 250  $\mu$ L に対し、制限酵素 *Kpn* I 50  $\mu$ L、10 $\times$ L buffer 100  $\mu$ L 及び滅菌超純水 600  $\mu$ L を加え制限酵素反応を 37°C にて一晩行い、プラスミド上の *Kpn* I サイトを切断した。反応の進行状況は 1.2%アガロースゲル電気泳動により適宜確認し、消化が不完全な場合は酵素量の追加や反応系のスケールアップ等を行った。

プラスミド DNA が完全に切断されたことを確認した後、エタノール沈殿により濃縮・精製し 177  $\mu$ L の溶液とした。この DNA 溶液に Phosphatase, alkaline (Roche) を 9 U 及び 10 $\times$ buffer (Roche) を 20  $\mu$ L 添加し、37°C でまず 30 分間反応を行った後、Phosphatase, alkaline を 9 U 追加し、さらに 37°C にて 30 分間反応を継続した。その後 65°C で 15 分間加熱して酵素を失活させ、QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて溶液を濃縮・精製した。さらにエタノール沈殿により最終的に 21  $\mu$ L のプラスミド DNA 溶液としてライゲーションに使用した。

#### <ライゲーション及びトランスフォーメーション>

ライゲーションは Ligation-Convenience Kit (ニッポンジーン) を用いて行った。プラスミド DNA 約 150 ng 及びインサート DNA 約 70 ng (プラスミド DNA 対インサート DNA のモル比として約 1 : 10) を混和し、滅菌超純水を適量加え 10  $\mu$ L の DNA 溶液を調製し、65-70°C で 5 分間加熱した後、2 $\times$ Ligation mix を 10  $\mu$ L 加え、16°C、30 分間のライゲーション反応を行った。

トランスフォーメーションは DH-5 $\alpha$  COMPETENT high (TOYOBO) を用い、以下のように行った。100  $\mu$ L のコンピテントセルを氷上で融解した後、ライゲーションした DNA 溶液を加え、氷中に 30 分間放置した。次いで 42°C のヒートショックを 30 秒間行い、即座に氷中で 2 分間冷却した。そして SOC 培地を 900  $\mu$ L 加え、37°C で 1 時間振盪培養した後、培養液を LB/Amp 寒天培地に播種し、37°C で一晩培養した。

#### <レポーター遺伝子プラスミドの単離・精製>

一晩培養して得られたコロニーをピックアップして、各クローンにつき LB/Amp 液体培地 2 mL に植菌し、37°C、約 200 回/分で約 12 時間振盪培養した。集菌後、Wizard<sup>®</sup> Plus SV Minipreps DNA Purification System を用いプラスミド DNA を単離・精製した。得られたプラスミド DNA 溶液を 2

μL 使用し、*Kpn* I 0.5 μL、10×L buffer 1 μL、滅菌超純水 6.5 μL を加え全量 10 μL にて 37°C、2 時間の制限酵素反応を行った後、1.2%アガロースゲル電気泳動を行い、各クローンにおけるインサートの挿入の有無を確認した。インサートが挿入されていたクローンについては、さらにダイレクトシーケンスを行い、目的の CA リピートを有することを確認した。その後、各 CA リピートを有するレポーター遺伝子プラスミド、インサートの挿入されていない pGL3-promoter vector、さらに pRL-SV40 vector について、PureYield™ Plasmid Midiprep System (Promega) を用い、プロトコルに従って大量単離・精製した。これらの溶液に対してエタノール沈殿を行い、約 1 μg/μL となるようクリーンベンチ内にて滅菌 PBS(-)に溶解し、以降の実験に用いた。

#### トランスフェクション及びルシフェラーゼアッセイ

以下の実験を独立して 4 回、1 回につき triplicate または quadruplicate にて行った。

##### <トランスフェクション>

方法は HeLa 細胞における Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) のプロトコルに従った。まず 12 穴プレートに HeLa 細胞を  $1.6 \times 10^5$  cells/well ずつ播種し、トランスフェクション時に 90-95% confluent に達するよう、penicillin-streptomycin を含まない 5%FBS 加 DMEM 750 μL/well、37°C、5%CO<sub>2</sub> にて培養した。培養 24 時間後、培地を吸引除去し PBS(-)で洗浄した後 OPTI®-MEM (Invitrogen) 750 μL/well に交換した。Lipofectamine™ 2000 3 μL、レポーター遺伝子プラスミド又はインサートの挿入されていない pGL3-promoter vector 1.57 μg、pRL-SV40 vector 0.03 μg、OPTI®-MEM 100 μL を混和し、室温にて 20 分間インキュベートした。各反応液を HeLa 細胞に直接添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub> にて 4 時間インキュベートした。その後、penicillin-streptomycin を含む通常の 5%FBS 加 DMEM 750 μL/well に交換し、37°C、5%CO<sub>2</sub> にて 24 時間培養した。

##### <ルシフェラーゼアッセイ>

細胞ライセートの回収及びルシフェラーゼアッセイは Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) を用いて行った。トランスフェクション後 24 時間培養した細胞を、PBS(-)で洗浄し、Passive Lysis Buffer (1×) を 500 μL/well 添加し、旋回型シェーカー上で室温にて 15 分間インキュベートし細胞を溶解した。各ライセートを 1.5 mL チューブに回収し、室温、13,000×g にて 15 分間遠心を行い、細胞残渣と上清を分離した。ライセートの上清を新しい 1.5 mL チューブに移し、アッセイサンプルとした。

ルシフェラーゼアッセイでは、TD-20/20 Luminometer Version 1.12 (Turner Designs) を用いて行った。まず、Luciferase Assay Buffer II 及び Luciferase Assay Substrate を混合して調製した Luciferase Assay Reagent II を予めルミノメーター用チューブに 50 μL/tube 分注した。次に、アッセイサンプルを 10 μL/tube 加えて 10 回ピペッティングした後ルミノメーターにセットし、サンプルベクターである pGL3-promoter vector 由来のホタルルシフェラーゼ活性を測定した。続いて、直ちに Stop & Glo® Reagent を 50 μL/tube 加えて 10 回ピペッティングした後、ルミノメーターにセットし、内標準ベクターである pRL-SV40 vector 由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した。

以上の操作を全サンプルについて行い、pGL3-promoter vector 由来のホタルルシフェラーゼ活性値を、pRL-SV40 vector 由来のウミシイタケルシフェラーゼ活性値で除し、相対ルシフェラーゼ活

性値とした。

#### 統計解析

Dunnnett 検定による多重比較検定を行った。

## 2. 結果

第1章及び第2章の ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型 allele 頻度分布を参考にし、15、18、24、及び 27CA を含むレポーター遺伝子プラスミドをそれぞれ構築した (Fig.3A)。そしてルシフェラーゼアッセイを行い、CA リピートの長さの増加あるいは減少に伴って転写活性に影響が見られるか検討した結果、4 種類のリピートにおける相対ルシフェラーゼ活性値は、インサートの挿入されていないベクターに比べていずれも有意な差が見られなかった。さらに CA リピートの長さの違いがこれらの活性に影響を及ぼすことはなく、いずれも同程度の活性であった (Fig.3B)。

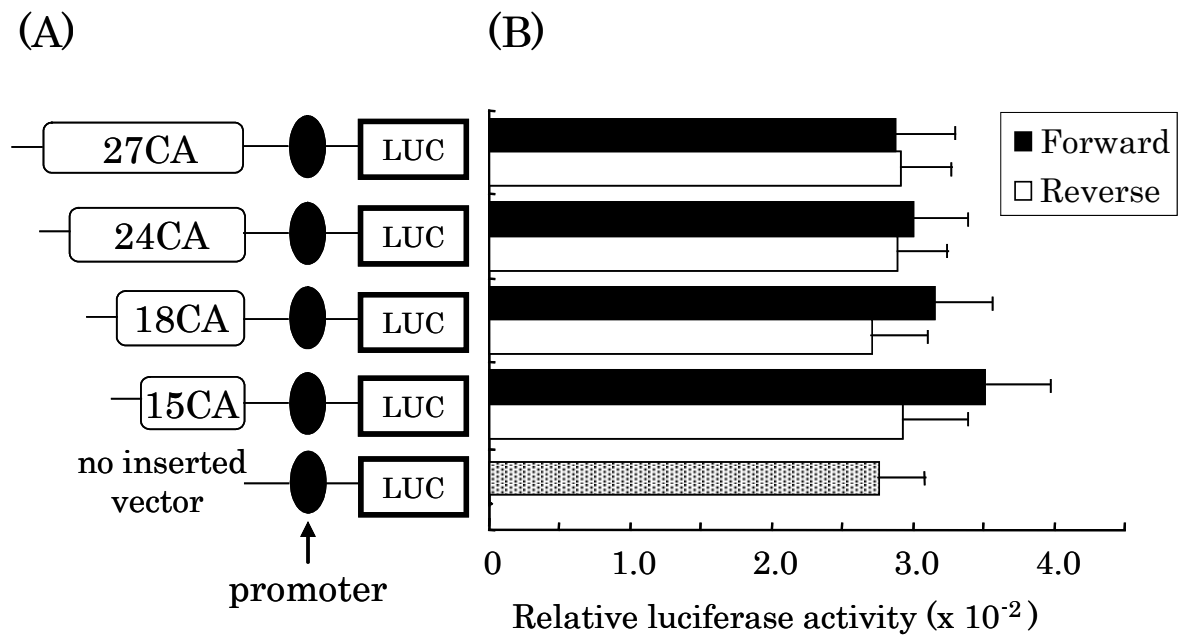


Fig.3 Relative luciferase activities for each construct in transient transfectants.

(A) Scheme of the various constructs containing CA repeats. (B) Relative luciferase activity of each construct is shown as mean $\pm$ S.E. of four independent experiments, each in triplicate or quadruplicate.



## 考察

本章では、ルシフェラーゼアッセイを用いて CA リピートの長さの違いと転写活性との関連性を検討した。

転写活性化能に関する検討にあたっては、一般的に目的遺伝子由来のプロモーター領域を含むプラスミドを構築して検討を行う。しかしながら、我々の知る限り今回が ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型に関する初の機能解析であること、さらに ER $\beta$  遺伝子プロモーター領域には複数の SNP が存在し、中でも rs35036378 が存在するベクターでは wild type のベクターに比べ相対ルシフェラーゼ活性値が約 50%に減少したとの報告[112]があることを考慮すると、初期検討である今回は、ER $\beta$  遺伝子プロモーター領域を用いた検討に優先して、SV40 プロモーターを有する pGL-3 promoter vector による検討を行った。

今回の検討では、第1章及び第2章で認められた CA リピート多型 allele 頻度分布を考慮し、15、18、24、27CA を含むプラスミドをそれぞれ構築し、CA リピートの長さの増加あるいは減少に伴って転写活性に影響が見られるか検討した。Tadokoro らによるニューロトロフィン-3 (neurotrophin-3: NTF-3) 遺伝子 CA リピート多型での報告では、今回と同様に pGL-3 promoter vector 及び HeLa 細胞を用いており、相対ルシフェラーゼ活性値が 21CA と 23CA との間で有意差はなかったものの、CA リピート多型領域の挿入により活性が有意に上昇した [111]。今回の我々の検討では、21CA 及び 23CA のサンプルが得られず当該リピートの転写活性を検討できなかったため、今回仮定したような CA リピートの長さの増減ではなく、特定のリピートの長さが転写活性に影響を与える可能性も残る。しかしながら、特定の CA リピートよりも、CA リピートの長さの増減が遺伝子発現に関与するとの報告があること [101]、及び実際に CA リピートの長さの増減に基づいた機能解析が複数報告されていること [102, 104] を踏まえると、今回の特定のリピートのみに依存して転写活性に影響が生じる可能性はあまり高くないと考えられる。

今回の検討では、CA リピートを含むレポーター遺伝子プラスミドにおける相対ルシフェラーゼ活性値は、インサートの挿入されていないベクターに比べていずれも有意な差が見られず、さらに CA リピートの長さの違いもルシフェラーゼ活性に影響を及ぼさなかった。しかしながら、Press らは、今回検討した CA リピート多型ではないものの、ER $\beta$  遺伝子の 3'-領域に存在する CA リピート多型と大腸癌の相関を検討し、CA リピートが 22CA 未満の女性患者では 22CA 以上の女性患者に比べて生存期間が短いこと、さらに ER $\beta$  のアイソフォームの1つである ER $\beta$ 1 の腫瘍内 mRNA 発現量が高かったことを報告している [113]。また、Zhao らは、アフリカ人の ER $\beta$  遺伝子 exon 5 において、バリンからグリシンへのアミノ酸変異を伴う T1057G (V320G) と呼ばれる SNP が同定し、この変異により AF-2 の転写活性化因子である TIF-2 と受容体との結合が弱まり、転写活性化能が低下すると報告している [114]。今回我々が検討した CA リピート多型はこの SNP の近傍に存在することから、CA リピート多型が T1057G と連鎖不平衡の関係にあるとすれば転写過程に間接的な関与を示す可能性も考えられる。以上を踏まえ、今後、ER $\beta$  プロモーターを用いた検討も含め、ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型の転写活性に及ぼす影響をさらに検討する必要があると考える。

また、CA リピート多型は、転写制御以外のプロセスに関与する可能性が考えられ、その一つと

してスプライシング過程が挙げられる。近年、ヒト性ステロイドホルモン受容体において様々なスプライシング isoform が発見され、これら受容体遺伝子の転写機構が当初考えられていたものより複雑であることが明らかとなった。ER $\beta$  についても研究が進み、乳癌におけるホルモン療法の反応性や骨代謝等に関与する種々の isoform が報告されている [115]。また isoform の一つである ER $\beta\Delta 5$  は exon 5 欠損 variant で、リガンド結合領域の大部分を失った isoform として知られている。この isoform は wild-type の ER $\beta$  または ER $\alpha$  と共発現し、ERE を介したエストロゲン依存的な標的遺伝子の転写活性化を阻害することが報告されている [19]。CA リピート多型はこの欠損部位の近傍に存在することから、両多型がスプライシングの制御に関わることにより、標的遺伝子の発現制御を介し、各種疾患に影響を及ぼす可能性が考えられる。

本研究では、CA リピート多型に着目し検討を行ったが、第 1 章及び第 2 章で解析した SNP に関しても機能解析を行い、今後 ER 遺伝子多型の機能解明に関する幅広い観点からの研究が望まれる。

## 小括

- CA リpeat多型におけるリpeatの長さの違いと転写活性との関連性を検討した結果、CA リpeatの長さの違いによるルシフェラーゼ活性への影響は認められなかった。このことから、転写活性に対する CA リpeat多型の影響は小さいことが示唆された。

## 総括

本研究では、女性に特徴的な疾患について遺伝子多型という切り口からエビデンスを構築し臨床応用することを目的とし、ER 遺伝子多型解析を行った。

第1章では、更年期障害について、ER $\alpha$  及び ER $\beta$  遺伝子多型と HRT 実施状況との関連を解析した結果、1年を超える HRT を実施した患者では ER $\beta$  遺伝子の CA リピート多型 (18CA リピート)、Rsa 多型 (A allele) を有する頻度が高く、さらに処方薬剤実態調査の結果、CA リピート多型 SS genotype 及び Rsa 多型 AA genotype において血管運動神経症状の自覚症状が有意に強く、1年超のホルモン製剤の使用率も有意に高かった。一方、漢方製剤及び中枢神経系用剤については genotype 間で使用率に違いは認められなかった。以上より、これらの遺伝子多型が更年期障害の治療薬選択に応用できる可能性が示唆されたことから、更年期障害における薬物療法のエビデンスを遺伝子多型解析という新たな切り口から確立できた。

第2章では、RA 患者における ER $\beta$  遺伝子 CA リピート多型及び Rsa 多型の頻度分布を OA 患者と比較した結果、RA 患者では OA 患者に比べ CA リピート多型の平均 CA リピートが長く、L allele の頻度及び LL genotype の頻度が有意に高かった。また、女性の RA 患者では OA 患者に比べて Rsa 多型の G allele の頻度及び GG genotype 頻度が有意に高く、特に重症 RA 患者での GG genotype 頻度が高かった。以上より、両遺伝子多型が RA の病態や性差等に関連している可能性が示唆された。

第3章では、今後の ER 遺伝子多型解析研究の一助となるよう、ER $\beta$  遺伝子多型の機能に関する検討を行った。CA リピート多型におけるリピートの長さの違いと転写活性との関連性を検討した結果、転写活性化能に対する CA リピート多型の影響は小さいことが示唆された。

以上より、更年期障害や RA のような女性に特徴的な疾患における、重症度、治療薬選択、性差等に対して、ER 遺伝子多型が関与する可能性が示唆された。本研究における ER 遺伝子多型の観点が、性差医療の発展及びテーラーメイド医療の樹立に向けて一助となると考えられる。今後は、対象患者を増やした検討や遺伝子多型に関する詳細な機能解析を通じ、ER 遺伝子多型という切り口からの更なるエビデンス構築や臨床応用が望まれる。

## 参考文献

1. 内閣府 平成 24 年度版高齢社会白書（全体版）  
[http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2012/zenbun/s1\\_1\\_1\\_01.html](http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2012/zenbun/s1_1_1_01.html)
2. 平成 24 年版男女共同参画白書  
[http://www.gender.go.jp/whitepaper/h24/zentai/pdf/h24\\_002-009.pdf](http://www.gender.go.jp/whitepaper/h24/zentai/pdf/h24_002-009.pdf)
3. 天野恵子, 松田昌子, 藤井美穂, 片井みゆき: 女性診療外来マニュアル (2006)
4. 上野光一: 性差医療 *日薬理誌* 130, 430-2 (2007)
5. 天野恵子: 性差医療の現状と今後 10 年への期待 *性差と医療* 3, 1245-7
6. FDA Guidance for Industry. Gender Guideline 1993. Study and Evaluation of Gender Differences in the Clinical Trials  
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM072044.pdf>
7. ICH E8 ガイドライン「臨床試験の一般指針」 [http://www.pmda.go.jp/ich/e/e8\\_98\\_4\\_21.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/e/e8_98_4_21.pdf)
8. ICH M4 ガイドライン [http://www.pmda.go.jp/ich/m/m4\\_ctd\\_betsu5\\_m4e\\_03\\_7\\_1.pdf](http://www.pmda.go.jp/ich/m/m4_ctd_betsu5_m4e_03_7_1.pdf)
9. 性差医療ネットワーク NAHW HP <http://www.nahw.org/>
10. 宮尾益理子: 性差医学領域 女性医学 *Geriatr. Med.* 45, 33-40 (2007)
11. Heldring N., Pike A., Andersson S., Matthews J., Cheng G., Hartman J., Tujague M., Ström A., Treuter E., Warner M., Gustafsson J.A.: Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol. Rev.* 87, 905-31 (2007)
12. Mosselman S., Polman J., Dijkema R.: ER $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392, 49-53 (1996)
13. 東浩太郎, 井上聡: ホルモン補充療法の作用メカニズムと薬理作用 *Pharma Medica* 22, 15-31 (2004)
14. 加藤茂明: エストロゲン受容体の組織特異的作用のメカニズム *治療学* 39, 247-50 (2005)
15. Hall J.M., Couse J.F., Korach K.S.: Minireview: The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J. Biol. Chem.* 276, 36869-72 (2001)
16. Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Häggblad J., Nilsson S., Gustafsson J.A.: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 138, 863-70 (1997)
17. Enmark E., Peltö-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjöld M., Gustafsson J.A.: Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82, 4258-65 (1997)
18. 井上聡: エストロゲンの生理作用とその病態における役割 *ホルモンと臨床* 51 増刊号, 51-5 (2003)
19. Matthews J., Gustafsson J.A.: Estrogen signaling: a subtle balance between ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *Mol. Interv.* 3, 281-92 (2003)
20. Hewitt S.C., Korach K.S.: Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in

- reproductive tissues. *Reproduction* 125, 143-9 (2003)
21. Gustafsson J.A.: What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signaling. *TRENDS in pharmacological Science* 24, 479-85 (2004)
  22. Lund T.D., Rovis T., Chung W.C., Handa R.J.: Novel action of estrogen receptor- $\beta$  on anxiety related behaviors. *Endocrinology* 146, 797-807 (2005)
  23. 中村 祐輔: SNP 遺伝子多型の戦略 ゲノムの多様性と 21 世紀のオーダーメイド医療 中山書店 (2000)
  24. Gennari L., Becherini L., Falchetti A., Masi L., Massart F., Brandi M.L.: Genetics of osteoporosis: role of steroid hormone receptor gene polymorphisms. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 81, 1-24 (2002)
  25. Stavrou I., Zois C., Chatzikiyriakidou A., Georgiou I., Tsatsoulis A.: Combined estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  genotypes influence the age of menarche. *Hum. Reprod.* 21, 554-7 (2006)
  26. Shearman A.M., Karasik D., Gruenthal K.M., Demissie S., Cupples L.A., Housman D.E., Kiel D.P.: Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham Study. *J. Bone Miner. Res.* 19, 773-81 (2004)
  27. Honma N., Mori S., Zhou H., Ikeda S., Mieno M.N., Tanaka N., Takubo K., Arai T., Sawabe M., Muramatsu M., Ito H.; Association between estrogen receptor- $\beta$  dinucleotide repeat polymorphism and incidence of femoral fracture. *J. Bone Miner. Metab.* 2012 Sep 5.
  28. Fytily P., Giannatou E., Papanikolaou V., Stripeli F., Karachalios T., Malizos K., Tsezou A.: Association of repeat polymorphisms in the estrogen receptors  $\alpha$ ,  $\beta$ , and androgen receptor genes with knee osteoarthritis. *Clinical Genetics* 68, 268-77 (2005)
  29. Almeida S., Franken N., Zandoná M.R., Osório-Wender M.C., Hutz M.H.: Estrogen receptor 2 and progesterone receptor gene polymorphisms and lipid levels in women with different hormonal status. *Pharmacogenomics J.* 5, 30-4 (2005)
  30. Ashworth J.J., Smyth J.V., Pendleton N., Horan M., Payton A., Worthington J., Ollier W.E., Ashcroft G.S.: The dinucleotide (CA) repeat polymorphism of estrogen receptor beta but not the dinucleotide (TA) repeat polymorphism of estrogen receptor alpha is associated with venous ulceration. *J Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 266-70 (2005)
  31. Tiemeier H., Schuit S.C., den Heijer T., van Meurs J.B., van Tuijl H.R., Hofman A., Breteler M.M., Pols H.A., Uitterlinden A.G.: Estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphisms and anxiety disorder in an elderly population. *Mol. Psychiatry.* 10, 806-7 (2005)
  32. Forsell C., Enmark E., Axelman K., Blomberg M., Wahlund L.O., Gustafsson J.A., Lannfelt L.: Investigation of a CA repeat in the oestrogen receptor  $\beta$  gene in patients with Alzheimer's disease. *Eur. J. Hum. Genet.* 9, 802-4 (2001)
  33. Westberg L., Håkansson A., Melke J., Shahabi H.N., Nilsson S., Buervenich S., Carmine A., Ahlberg J., Grundell M.B., Schulhof B., Klingborg K., Holmberg B., Sydow O., Olson L., Johnels E.B., Eriksson E., Nissbrandt H.: Association between the estrogen receptor beta gene and age of onset of Parkinson's disease. *Psychoneuroendocrinology* 29, 993-8 (2004)
  34. Henningson S., Westberg L., Nilsson S., Lundström B., Ekselius L., Bodlund O., Lindström E.,

- Hellstrand M., Rosmond R., Eriksson E., Landén M.: Sex steroid-related genes and male-to-female transsexualism. *Psychoneuroendocrinology* 30, 657-64 (2005)
35. Fischer C., Juhasz-Boess I., Lattrich C., Ortmann O., Treeck O.: Estrogen receptor beta gene polymorphisms and susceptibility to uterine fibroids. *Gynecol. Endocrinol.* 26, 4-9 (2010)
  36. MARIE-GENICA Consortium on Genetic Susceptibility for Menopausal Hormone Therapy Related Breast Cancer Risk.: Polymorphisms in genes of the steroid receptor superfamily modify postmenopausal breast cancer risk associated with menopausal hormone therapy. *Int. J. Cancer.* 126, 2935-46 (2010)
  37. Malacara J.M., Pérez-Luque E.L., Martínez-Garza S., Sánchez-Marín F.J.: The relationship of estrogen receptor- $\alpha$  polymorphism with symptoms and other characteristics in post-menopausal women. *Maturitas* 49, 163-9 (2004)
  38. 日本産科婦人科学会 産科婦人科用語集・用語解説集（改訂新版） 金原出版株式会社 2005年
  39. 大久保智治, 本状英雄: 更年期障害とその治療 *産婦人科治療* 93, 21-6 (2006)
  40. Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L., LaCroix A.Z., Kooperberg C., Stefanick M.L., Jackson R.D., Beresford S.A., Howard B.V., Johnson K.C., Kotchen J.M., Ockene J.; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321-33 (2002)
  41. 日本産科婦人科学会・日本女性医学会 ホルモン補充療法ガイドライン 2012年度版
  42. Shen C., Chen J., Fan S., Li Z., Hu Y., Zhong Q.; Association between the polymorphism of estrogen receptor  $\alpha$  and coronary artery disease in a Chinese population. *Eur. J. Intern. Med.* 23, 175-8 (2012)
  43. Ryan J., Scali J., Carrière I., Peres K., Rouaud O., Scarabin P.Y., Ritchie K., Ancelin M.L.: Estrogen receptor alpha gene variants and major depressive episodes. *Affect Disord.* 136, 1222-6 (2012)
  44. Zhao L.J., Liu P.Y., Long J.R., Lu Y., Xu F.H., Zhang Y.Y., Shen H., Xiao P., Elze L., Recker R.R., Deng H.W.: Test of linkage and/or association between the estrogen receptor alpha gene with bone mineral density in Caucasian nuclear families. *Bone* 35, 395-402 (2004)
  45. Wang K.J., Shi D.Q., Sun L.S., Jiang X., Lü Y.Y., Dai J., Chen D.Y., Xu Z.H., Jiang Q.; Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density: a meta-analysis. *Chin. Med. J.* 125, 2589-97 (2012)
  46. Ryan J., Scali J., Carrière I., Peres K., Rouaud O., Scarabin P.Y., Ritchie K., Ancelin M.L.: Oestrogen receptor polymorphisms and late-life depression. *Br. J. Psychiatry.* 199, 126-31 (2011)
  47. Sundarajan C., Liao W.X., Roy A.C., Ng S.C.: Association between estrogen receptor-beta gene polymorphisms and ovulatory dysfunctions in patients with menstrual disorders. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 135-9 (2001)
  48. Shearman A.M., Karasik D., Gruenthal K.M., Demissie S., Cupples L.A., Housman D.E., Kiel D.P.: Estrogen receptor beta polymorphisms are associated with bone mass in women and men: the Framingham Study. *J. Bone Miner. Res.* 19, 773-81 (2004)

49. Lai B.M, Cheung C.L, Luk K.D, Kung A.W.; Estrogen receptor alpha CA dinucleotide repeat polymorphism is associated with rate of bone loss in perimenopausal women and bone mineral density and risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *Osteoporos. Int.* 19, 571-9. (2008)
50. 竹尾愛理ほか: 千葉県立東金病院女性専用外来の需要と意義について *全国自治体病院協議会雑誌* 41, 803-11 (2002)
51. 日本産科婦人科学会生殖委員会: 平成 10 年度専門委員会報告
52. [http://asia.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation](http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation)
53. Ogawa S., Hosoi T., Shiraki M., Orimo H., Emi M., Muramatsu M., Ouchi Y., Inoue S.: Association of estrogen receptor  $\beta$  gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269, 537-41 (2000)
54. Lau H.H., Ho A.Y., Luk K.D., Kung A.W.: Estrogen receptor  $\beta$  Gene polymorphisms are associated with higher bone mineral density in premenopausal, but not postmenopausal southern chinese women. *Bone* 31, 276-81 (2002)
55. Woods N.F., Mitchell E.S., Tao Y., Viernes H.M., Stapleton P.L., Farin F.M.: Polymorphisms in the estrogen synthesis and metabolism pathways and symptoms during the menopausal transition: observations from the Seattle Midlife Women's Health Study. *Menopause* 13, 902-10 (2006)
56. Bechlioulis A., Kalantaridou S.N., Naka K.K., Chatzikiyiakidou A., Calis K.A., Makrigiannakis A., Papanikolaou O., Kaponis A., Katsouras C., Georgiou I., Chrousos G.P., Michalis L.K.: Endothelial function, but not carotid intima-media thickness, is affected early in menopause and is associated with severity of hot flushes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 95, 1199-206 (2010)
57. Grady D., Sawaya G.F., Johnson K.C., Koltun W., Hess R., Vittinghoff E., Kristof M., Tagliaferri M., Cohen I., Ensrud K.E.: MF101, a selective estrogen receptor beta modulator for the treatment of menopausal hot flushes: a phase II clinical trial. *Menopause* 16, 458-65 (2009)
58. Curcio J.J., Kim L.S., Wollner D., Pockaj B.A.: The potential of 5-hydroxytryptophan for hot flash reduction: a hypothesis. *Altern. Med. Rev.* 10, 216-21 (2005)
59. Burger H.G., Dudley E.C., Cui J., Dennerstein L., Hopper J.L.: A prospective longitudinal study of serum testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and sex hormone-binding globulin levels through the menopause transition. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 2832-8 (2000)
60. Westberg L., Baghaei F., Rosmond R., Hellstrand M., Landén M., Jansson M., Holm G., Björntorp P., Eriksson E.: Polymorphisms of the androgen receptor gene and the estrogen receptor beta gene are associated with androgen levels in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 2562-8 (2001)
61. 甲村弘子: 更年期の疾患と甲状腺ホルモン *臨床検査*, 48, 8, 847-54 (2004)
62. Huang T.L., Wu S.C., Chiang Y.S., Chen J.F.: Correlation between serum lipid, lipoprotein concentrations and anxious state, depressive state or major depressive disorder. *Psychiatry. Res.* 118, 147-53 (2003)
63. Thurston R.C., Sowers M.R., Chang Y., Sternfeld B., Gold E.B., Johnston J.M., Matthews K.A.: Adiposity and reporting of vasomotor symptoms among midlife women: the study of women's health across the nation. *Am. J. Epidemiol.* 167, 78-85. (2008)



64. 阿部亜紀子, 大田剛, 倉智博久: 中高年とホルモン補充療法 産婦人科治療 93, 53-9 (2006)
65. 長谷川弥人ら: 漢方製剤 活用の手引き —証の把握と処方鑑別のために— 臨床情報センター (2004)
66. Noguchi M., Ikarashi Y., Yuzurihara M., Kase Y., Watanabe K., Plotnikoff G.A., Takeda S., Aburada M.: Skin temperature rise induced by calcitonin gene-related peptide in gonadotropin-releasing hormone analogue-treated female rats and alleviation by Keishi-bukuryo-gan, a Japanese herbal medicine. *Life Sci.* 76, 2079-90 (2005)
67. Noguchi M., Ikarashi Y., Yuzurihara M., Kase Y., Chen J.T., Takeda S., Aburada M., Ishige A.: Effects of the Japanese herbal medicine Keishi-bukuryo-gan and 17 $\beta$ -estradiol on calcitonin gene-related peptide-induced elevation of skin temperature in ovariectomized rats. *J. Endocrinol.* 176, 359-66 (2003)
68. Shiizaki K., Goto K., Ishige A., Komatsu Y.: Bioassay of phytoestrogen in herbal medicine used for postmenopausal disorder using transformed MCF-7 cells. *Phytother. Res.* 13, 498-503 (1999)
69. Juang K.D., Wang S.J., Lu S.R., Lee S.J., Fuh J.L.: Hot flushes are associated with psychological symptoms of anxiety and depression in peri- and post- but not premenopausal women. *Maturitas.* 52, 119-26 (2005)
70. 宮坂信之, 小池隆夫, 住田孝之, 山本一彦, 羅智靖, 渡辺守, 石井裕正: わかりやすい免疫疾患 日本医師会雑誌 第134巻特別号 S166-71 (2005)
71. Härle P., Bongartz T., Schölmerich J., Müller-Ladner U., Straub R.H.: Predictive and potentially predictive factors in early arthritis: a multidisciplinary approach. *Rheumatology (Oxford)* 44, 426-433 (2005)
72. 厚生科学審議会疾病対策部会リウマチ・アレルギー対策委員会 リウマチ・アレルギー対策委員会報告書 平成23年8月
73. Klareskog L., Catrina AI., Paget S.: Rheumatoid arthritis. *Lancet* 373, 659-672 (2009)
74. Whitacre C.C.: Sex differences in autoimmune disease. *Nat. Immunol.* 2, 777-80 (2001)
75. Kuiper S., van Gestel A.M., Swinkels H.L., de Boo T.M., da Silva J.A., van Riel P.L.: Influence of Sex, Age, and Menopausal State on the Course of Early Rheumatoid Arthritis. *J. Rheumatol.* 28, 1809-1816 (2001)
76. 山口優美, 山本一彦: 免疫疾患における性差 医学のあゆみ 219, 379-385 (2006)
77. Cutolo M., Straub R.H., Bijlsma JW: Neuroendocrine-immune interactions in synovitis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3, 627-634 (2007)
78. Dietrich W., Haitel A., Holzer G., Huber J.C., Kolbus A., Tschugguel W.: Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in normal human synovia. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 13, 512-7 (2006)
79. Ishizuka M., Hatori M., Suzuki T., Miki Y., Darnel A.D., Tazawa C., Sawai T., Uzuki M., Tanaka Y., Kokubun S., Sasano H.: Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis. *Clin. Sci. (Lond)* 106, 293-300 (2004)
80. Ochi T., Iwase R., Yonemasu K., Matsukawa M., Yoneda M., Yukioka M., Ono K.: Natural course of joint destruction and fluctuation of serum C1q levels in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*

- 31:37–43 (1988)
81. 越智隆弘ほか: 最新整形外科学大系 関節リウマチと類縁疾患 中山書店 (2007)
  82. Wang J., Nuite M., McAlindon T.E.: Association of estrogen and aromatase gene polymorphisms with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 19:734–740 (2010)
  83. Oliver J.E., Silman A.J.: Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? *Arthritis Res. Ther.* 11, 252 (2009)
  84. Dziezdziejko V., Kurzawski M., Safranow K., Drozdziak M., Chlubek D., Pawlik A.: Oestrogen receptor polymorphisms in female patients with rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 40, 329–333 (2011)
  85. [http://asia.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:64723551-64724551;v=rs1256049;vdb=variation;vf=966631](http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=14:64723551-64724551;v=rs1256049;vdb=variation;vf=966631)
  86. Capellino S., Riepl B., Rauch L., Angele P., Cutolo M., Straub R.H.: Quantitative determination of steroid hormone receptor positive cells in the synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis: is there a link to inflammation? *Ann. Rheum. Dis.* 66, 53-8 (2007)
  87. Håkansson A., Westberg L., Nilsson S., Buervenich S., Carmine A., Holmberg B., Sydow O., Olson L., Johnels B., Eriksson E., Nissbrandt H.: Interaction of polymorphisms in the genes encoding interleukin-6 and estrogen receptor beta on the susceptibility to Parkinson's disease. *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 133, 88-92 (2005)
  88. Jawaheer D, Olsen J, Hetland ML.: Sex differences in response to anti-tumor necrosis factor therapy in early and established rheumatoid arthritis -- results from the DANBIO registry. *J. Rheumatol.* 39, 46-53 (2012)
  89. Ray P., Ghosh S.K., Zhang D.H., Ray A.: Repression of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol: inhibition of the DNA-binding activity of the transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B by the estrogen receptor. *FEBS Lett.* 409, 79-85 (1997)
  90. Cvoro A., Tatomer D., Tee M.K., Zogovic T., Harris H.A. Leitman D.C.: Selective Estrogen Receptor-Beta Agonists Repress Transcription of Proinflammatory Genes. *J. Immunol.* 180, 630-636. (2008)
  91. Engdahl C., Jochems C., Windahl S.H., Börjesson A.E., Ohlsson C., Carlsten H., Lagerquist M.K.: Amelioration of collagen-induced arthritis and immune-associated bone loss through signaling via estrogen receptor, and not estrogen receptor or G protein-coupled receptor 30. *Arthritis Rheum.* 62, 524–533 (2010)
  92. Geng L., Yao Z., Yang H., Luo J., Han L., Lu Q.: Association of CA Repeat Polymorphism in Estrogen Receptor Beta Gene with Postmenopausal Osteoporosis in Chinese. *J Genet Genomics.* 34, 868-876.(2007)
  93. Wellcome Trust Case Control Consortium: Genome-Wide Association Study of 336 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-78 (2007)
  94. International Human Genome Sequencing Consortium: Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-45 (2004)
  95. Venter J.C. et al.: The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-51 (2001)
  96. Larsen U.L., Hyldahl Olesen L., Guldborg Nyvold C., Eriksen J., Jakobsen P., Østergaard M., Autrup

- H., Andersen V.: Human intestinal P-glycoprotein activity estimated by the model substrate digoxin. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 67, 123-34 (2007)
97. Duan J., Wainwright M.S., Comeron J.M., Saitou N., Sanders A.R., Gelernter J., Gejman P.V.: Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (DRD2) affect mRNA stability and synthesis of the receptor. *Hum. Mol. Genet.* 12, 205-16 (2003)
  98. Akashi H.: Gene expression and molecular evolution. *Curr. Opin. Genet.* 11, 660-6 (2001)
  99. Kimchi-Sarfaty C., Oh J.M., Kim I.W., Sauna Z.E., Calcagno A.M., Ambudkar S.V., Gottesman M.M.: A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315, 525-8 (2007)
  100. Shen L.X., Basilion J.P., Stanton V.P. Jr.: Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96, 7871-6 (1999)
  101. Comings D.E.: Polygenic inheritance and micro/minisatellites. *Mol. Psychiatry.* 3, 21-31 (1998)
  102. Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E.: Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453-65 (2002)
  103. Hui J., Hung L.H., Heiner M., Schreiner S., Neumüller N., Reither G., Haas S.A., Bindereif A.: Intronic CA-repeat and CA-rich elements: a new class of regulators of mammalian alternative splicing. *EMBO J.* 24, 1988-98 (2005)
  104. Hui J., Stangl K., Lane W.S., Bindereif A.: HnRNP L stimulates splicing of the eNOS gene by binding to variable-length CA repeats. *Nat. Struct. Biol.* 10, 33-7 (2003)
  105. Lorenz M., Hewing B., Hui J., Zepp A., Baumann G., Bindereif A., Stangl V., Stangl K.: Alternative splicing in intron 13 of the human eNOS gene: a potential mechanism for regulating eNOS activity. *FASEB J.* 21, 1556-64 (2007)
  106. González A.A., Carvajal C.A., Riquelme E., Krall P.M., Muñoz C.R., Mosso L.M., Kalergis A.M., Fardella C.E.: A polymorphic GT short tandem repeat affecting beta-ENaC mRNA expression is associated with low renin essential hypertension. *Am. J. Hypertens.* 20, 800-6 (2007)
  107. Agarwal A.K., Giacchetti G., Lavery G., Nikkila H., Palermo M., Ricketts M., McTernan C., Bianchi G., Manunta P., Strazzullo P., Mantero F., White P.C., Stewart P.M.: CA-repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2 : effects on gene expression and salt sensitivity. *Hypertension* 36, 187-94 (2000)
  108. Buerger H., Packeisen J., Boecker A., Tidow N., Kersting C., Bielawski K., Isola J., Yatabe Y., Nakachi K., Boecker W., Brandt B.: Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence--first results of an inter-ethnic breast cancer study. *J. Pathol.* 203, 545-50 (2004)
  109. Gebhardt F., Zänker K.S., Brandt B.: Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *J. Biol. Chem.* 274, 13176-80 (1999)
  110. Saha A., Dhir A., Ranjan A., Gupta V., Bairwa N., Bamezai R.: Functional IFNG polymorphism in intron 1 in association with an increased risk to promote sporadic breast cancer. *Immunogenetics* 57, 165-71 (2005)
  111. Tadokoro K., Hashimoto R., Tatsumi M., Kamijima K., Kunugi H.: Analysis of enhancer activity of a dinucleotide repeat polymorphism in the neurotrophin-3 gene and its association with bipolar disorder.

*Neuropsychobiology* 50, 206-10 (2005)

112. Philips S., Richter A., Oesterreich S., Rae J.M., Flockhart D.A., Perumal N.B., Skaar T.C.: Functional characterization of a genetic polymorphism in the promoter of the ESR2 gene. *Horm Cancer*. 3, 37-43. (2012)
113. Press O.A., Zhang W., Gordon M.A., Yang D., Haiman C.A., Azuma M., Iqbal S., Lenz H.J.; Gender-related survival differences associated with polymorphic variants of estrogen receptor- $\beta$  (ER $\beta$ ) in patients with metastatic colon cancer. *Pharmacogenomics J.* 11, 375-82 (2011)
114. Zhao C., Xu L., Otsuki M., Toresson G., Koehler K., Pan-Hammarström Q., Hammarström L., Nilsson S., Gustafsson J.A., Dahlman-Wright K.: Identification of a functional variant of estrogen receptor beta in an African population. *Carcinogenesis* 25, 2067-73 (2004)
115. 正田朋子, 平田修司, 加藤順三, 星和彦: ヒト女性ステロイドホルモン受容体の isoform および variant mRNA について —エストロゲン受容体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), エストロゲン受容体  $\beta$  (ER $\beta$ ), プログステロン受容体 (PR) — 日本生殖内分泌学会雑誌 10, 9-14 (2005)

## 主論文目録

1. Ugai K., Nishimura K., Fukino K., Nakamura T., Ueno K.; Functional analysis of transcriptional activity of cytosine and adenine (CA) repeats polymorphism in the estrogen receptor  $\beta$  gene. *J. Toxicol. Sci.* 33, 237-40 (2008)
2. Takeo C., Ugai K., Araki J., Zhang L., Baba M., Ohashi W., Ueno K., Suzuki Y., Amano K., Hirai A., Muramatsu M.: Pharmacogenetics of hormone replacement therapy for climacteric symptoms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 604-8 (2008)
3. 菅井波名, 鵜飼加奈子, 竹尾愛理, 平井愛山, 天野恵子, 並木隆雄, 佐藤洋美, 山浦克典, 村松正明, 上野光一: 更年期障害における ER $\beta$  遺伝子多型解析と臨床応用. *漢方と最新治療* 19, 341-348 (2010)
4. González-Canga A., Ugai K., Suzuki M., Okuzawa H., Negishi E., Ueno K.: Association of cytosine-adenine repeat polymorphism of the estrogen receptor- $\beta$  gene with rheumatoid arthritis symptoms. *Rheumatol. Int.* 30, 1259-62 (2010)
5. Sato H., Ito A., González-Canga A., Okuzawa H., Ugai K., Suzuki M., Namiki T., Ueno K.: Association of Rsa polymorphism of the estrogen receptor- $\beta$  gene with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 32, 2143-8 (2012)
6. Watanabe K., Sato H., Ito A., Sato T., González-Canga A., Sugai H., Suzuki M., Namiki T., Ueno K. : Association of a cytosine-adenine repeat polymorphism in the estrogen receptor  $\beta$  gene with occurrence and severity of rheumatoid arthritis. *Open Journal of International Medicine* 3, 3-7 (2013)

## 謝辞

本研究の遂行並びに本論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 高齢者薬剤学研究室 上野光一教授に謹んで深謝致します。本研究を通じ、多大なる御指導と御助言を賜りました千葉大学大学院薬学研究院 高齢者薬剤学研究室 山浦克典准教授並びに佐藤洋美助教に心より御礼申し上げます。

本研究に際し、多大なる御指導、御助力を頂きました千葉県立東金病院院長 平井愛山博士、竹尾愛理博士、千葉県衛生研究所元所長 天野恵子博士、千葉大学フロンティアメディカル研究センター 鈴木昌彦教授、千葉大学大学院医学研究院 並木隆雄臨床教授、慶応義塾大学大学院薬学研究科 中村智徳教授、千葉大学大学院薬学研究院 西村和洋准教授並びに五十嵐一衛千葉大学名誉教授に心より御礼申し上げます。

本研究の意義をご理解いただき、貴重なサンプルを提供して下さいました患者様、並びに健常人ボランティアの方々に心より感謝致します。

さらに、本研究を通じ、多大なる御協力と御助言をいただきました中村悦子博士、スペイン レオン大学 獣医学 A. González-Canga 博士、並びに高齢者薬剤学研究室の修了生、在校生の皆様 に厚く御礼申し上げます。

最後に、様々な面で常に支え続けて頂きました家族に心より感謝を述べて、私の謝辞にかえさせていただきます。

本学位論文の審査は千葉大学大学院薬学研究院で指名された下記の審査委員により行われた。

主査 千葉大学教授 (大学院薬学研究院) 薬学博士 上野光一

副査 千葉大学教授 (大学院薬学研究院) 薬学博士 村山俊彦

副査 千葉大学教授 (大学院薬学研究院) 薬学博士 佐藤信範

副査 千葉大学教授 (大学院薬学研究院) 薬学博士 石井伊都子

副査 千葉大学教授 (大学院薬学研究院) 薬学博士 伊藤晃成