

新しい骨粗鬆症原因候補遺伝子の多型と骨密度の連鎖解析

(研究課題番号 14370462)

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金基盤研究(B)(2)研究成果報告書



平成 16 年 5 月

研究代表者 坪山直生  
(京都大学医学部 教授)

科研

2003

189

新しい骨粗鬆症原因候補遺伝子の多型と骨密度の連鎖解析

(研究課題番号 14370462)

研究代表者

研究代表者：坪山 直生（京都大学医学部 教授）

研究分担者：橋本 基行（京都大学医学部研究科 助手）

研究分担者：細川 基則（認知症心理学センター 准教授）

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金基盤研究(B)(2)研究成果報告書

(金額単位：千円)

| 年度       | 助成金   | 研究経費 | 合計    |
|----------|-------|------|-------|
| 平成 14 年度 | 2,600 | 0    | 2,600 |
| 平成 15 年度 | 2,100 | 0    | 2,100 |
| 合 計      | 4,700 | 0    | 4,700 |

研究代表者 坪 山 直 生  
(京都大学医学部 教授)

はじめに

は し が き

老年性骨粗鬆症は、高齢化に伴って増加する疾患であり、骨折による身体的・経済的・社会的影響は非常に大きい。高齢化に伴って増加する疾患であり、骨折による身体的・経済的・社会的影響は非常に大きい。高齢化に伴って増加する疾患であり、骨折による身体的・経済的・社会的影響は非常に大きい。

研究組織

研究代表者：坪山 直生（京都大学医学部 教授）

研究分担者：清水 基行（京都大学医学研究科 助手）

研究分担者：細川 昌則（愛知県心身障害者コロニー 発達障害研究センター 病理学部長）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

|          | 直接経費  | 間接経費 | 合計    |
|----------|-------|------|-------|
| 平成 14 年度 | 2,600 | 0    | 2,600 |
| 平成 15 年度 | 2,100 | 0    | 2,100 |
| 総 計      | 4,700 | 0    | 4,700 |

本事業の進捗状況は、同時に実施された以下の研究結果をまとめた報告書に報告されている。

## はじめに

老年性骨粗鬆症は、軽微な外傷により大腿骨頸部骨折や脊椎圧迫骨折などを引き起こす。高齢化社会に伴い、これらの疾患がもたらす経済的、社会的影響は非常に大きく、骨粗鬆症の原因の探索や有効な予防・治療法の確立が急務とされる。老年性骨粗鬆症発症に及ぼす peak bone mass の影響は重要で、成長期に十分な peak bone mass が得られなければ老年期において、より早期に骨折閾値に達すると考えられている。Peak bone mass を決定する因子として、環境因子及び遺伝的因子が存在するが、遺伝的因子は単一の遺伝子によるものでなく、複数の遺伝子による多因子により規定されると考えられている。これまでに骨量を決定する遺伝子として、Estrogen receptor  $\alpha$  や Vitamin D receptor の polymorphism、さらに 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) の polymorphism などが報告されているが、いずれもその寄与度は低く、骨量を決定づけるような遺伝子の存在は不明である。遺伝子の探索において、ヒトの家系分析を用いて量的形質解析を行うことがあるが、表現型値に影響を及ぼす因子が多いため、困難を伴う。そこで我々はこれまで、マウスを用いた遺伝子探索を行い、その遺伝子の human homologue を解析することで、人の骨粗鬆症の解明を進めてきた。

これまでに老年性骨粗鬆症モデルマウスである SAMP6 と高骨量系の SAMP2 マウスとの交雑系から SAMP6 の低骨量を規定する遺伝子が少なくとも 3 つ存在することが明らかとなった。このうち第 11 染色体に存在する因子として、congenic mouse の作製や、マイクロアレイによる解析から IFP35 (Interferon induced leucine zipper protein 35) が有力な候補遺伝子として考えられた。IFP35 は AP-1 family に属する B-ATF というタンパクと heterodimer を形成することで B-ATF と Jun との heterodimer 生成を阻害し、結果的に AP-1 の作用を増強する働きを持っている。また、IFP35 は SAMP2 と SAMP6 間に一カ所の missense mutation を伴い、コードされるアミノ酸配列も異なっている。人でもこの遺伝子の homologue である IFP35 の polymorphism が骨量を規定する因子として期待された。

本研究の目的は、ヒトにおける IFP35 の polymorphism が最大骨量に及ぼす影響を調査することであり、同時に環境因子やこれまでに報告された遺伝子の影響についても調査した。以下研究結果をまとめ報告する。

## 研究発表

### (1) 学会誌、専門誌等

1. Shimizu M, Higuchi K, Kasai S, Tsuboyama T, Matsushita M, Matsumura T, Okudaira S, Mori M, Koizumi A, Nakamura T, Hosokawa M. A congenic mouse and candidate gene at the Chromosome 13 locus regulating bone density. *Mamm Genome* 13(7): 335-340 (2002)
2. 細川昌則、清水基行. 老年性骨粗鬆症関連遺伝子の同定とその機能解析研究—コンジェニックマウスを用いた分子遺伝学的研究—. 代謝異常治療研究基金研究業績集 *Res Rep Takeda Med Res Found* 30, 113-117 (2003)
3. 坪山直生、清水基行、中村孝志、速水 尚、岡 正典. 大腿骨頸部骨折発生機序の調査. *Osteoporosis Japan* 11:563-566, (2003.7).
4. Kasai S, Shimizu M, Matsumura T, Okudaira S, Matsushita M, Tsuboyama T, Nakamura T, Hosokawa M. Consistency of low bone density across bone sites in SAMP6 laboratory mice. *J Bone Miner Metab* 22(3): 207-214 (2004)

### (2) 口頭発表

1. 笠井宗一郎、清水基行、松村拓郎、奥平修三、松下睦、坪山直生、細川昌則、中村孝志、Peak bone density を制御する第 13 染色体遺伝子 QTL (Pbd2) は、骨密度だけでなくマウスの体格と骨格形成の諸相に作用する。第 20 回日本骨代謝学会 (平 14. 7)
2. 奥平修三、清水基行、坪山直生、笠井宗一郎、松村拓郎、細川昌則、中村孝志、SAMマウスによる X 染色体の退行期骨量減少に及ぼす影響。第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会 (平 14. 10)
3. 奥平修三、清水基行、坪山直生、笠井宗一郎、松村拓郎、細川昌則、中村孝志、SAMマウスにおける X 染色体と骨量減少度。第 49 回関西カルシウム懇話会 (平 14. 10)

4. 清水基行、坪山直生、松下睦、笠井宗一郎、松村拓郎、奥平修三、細川昌則、樋口京一、中村孝志、マウス第13染色体骨量制御遺伝子座の congenic mapping を用いた解析。 第4回日本骨粗鬆症学会 (平 14. 11)
5. 松村拓郎、清水基行、笠井宗一郎、奥平修三、中村孝志、坪山直生、細川昌則、樋口京一、新しいマウスの骨量測定法の開発。 第50回関西カルシウム懇話会 (平 15. 4)
6. Okudaira,S., Shimizu,M., Tsuboyama,T., Kasai,S., Matsumura,T., Hosokawa,M., and Nakamura,T.: Chromosome X affects the involuntional bone loss in SAM(Senescence Accerelated Mouse) mice. 1st Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research, 2003 (Osaka, Japan, Jun. 3-7)
7. 松村拓郎、清水基行、笠井宗一郎、奥平修三、中村孝志、坪山直生、細川昌則、樋口京一、新しいマウスの骨量測定法の開発。 第23回日本骨形態計測学会 (平 15. 7)
8. Shimizu,M.:Genetic analysis of SAMP6 mice: Identification of loci responsible for osteopenia; (Symposium) 2nd International Conference on Senescence: The SAM Model, 2003 (Sapporo, Japan, Jul. 21-23)
9. Okudaira,S., Shimizu,M., Tsuboyama,T., Kasai,S., Matsumura,T., Hosokawa,M. and Nakamura, T.: Chromosome X affects the involuntional bone loss in Senescence. 2nd International Conference on Senescence: The SAM Model, 2003 (Sapporo, Japan, Jul. 21-23)
10. Kasai,S., Shimizu,M., Okudaira,S., Tsuboyama,T., Matsumura,T., and Nakamura,T.: Consistency of low bone denesity across bone sites in the laboratory mice (SAMP6). 2nd International Conference on Senescence: The SAM Model, 2003 (Sapporo, Japan, Jul. 21-23)
11. 清水基行、松村拓郎、奥平修三、中西りか、大槻文悟、細川昌則、樋口京一、中村孝志、坪山直生、マウス第11染色体骨量制御遺伝子座の congenic mapping を用いた解析。 第26回骨・カルシウム代謝研究会 (平 15. 9)

12. 松村拓郎、清水基行、笠井宗一郎、奥平修三、大槻文悟、中西りか、中村孝志、坪山直生、細川昌則、樋口京一、マウス第11染色体骨量制御遺伝子座の congenic mapping を用いた解析。 第5回骨粗鬆症学会 (平 15.10)
13. 清水基行、奥平修三、中西りか、大槻文悟、中村孝志、坪山直生、細川昌則、樋口京一、マウス第13染色体骨量制御遺伝子座のサブコンジェニック系統を用いた解析。 第51回関西カルシウム懇話会 (平 15.10)

## 研究成果

今回、人の骨量が peak をしめすと考えられている 18-29 歳までの女性 73 人の腰椎及び大腿骨頸部の骨量を DEXA(dual-energy x-ray absorptiometry)法を用いて計測した。また同時に末梢血の採取とアンケート調査を行い、既往歴や食事の内容、運動の有無など合計 56 項目について情報を得た。末梢血からは genomic DNA の抽出を行い解析に使用した。アンケートの結果で、骨密度に影響を及ぼすと考えられる疾患や薬剤投与の既往のある症例を除外し、合計 69 人で解析を行った。

初めに骨密度と体重の相関について解析を行ったところ、大腿骨頸部、腰椎 BMD において、いずれも有意な正の相関を認めた( $p < 0.01$ )。現在の運動頻度や過去の運動、また食生活の内容と骨密度には相関が見られなかった。次にこれまで骨量と相関が発表されている、Estrogen receptor  $\alpha$ 、Vitamin D receptor, MTHFR に関してその多型と骨量との相関を解析した。Estrogen Receptor  $\alpha$  の 1st intron 内の PvuII, XbaI RFLP 及び Vitamin D receptor の polymorphism と大腿骨頸部、及び腰椎 BMD との間には相関を認めなかった。これは BMD を体重で補正した時も同じであった。MTHFR はこれまで、W genotype が他の AV または AA genotype に比べ、冠動脈疾患のリスクが高く、骨量減少が見られると報告されている。今回この polymorphism と大腿骨頸部の BMD に相関は見られなかったが、第1, 第2, 第3腰椎に関して W genotype が他の genotype に比べ、高骨量であるというこれまでと逆の相関が得られた( $P < 0.05$ )。腰椎全体では明らかな相関が得られなかったが、W genotype が高骨量である傾向が認められた( $P = 0.052$ )。体重補正を行った場合にも同様の結果を得た。

IIFP35 についてこれまでに公表されている第7exon内の3つの SNP(single nucleotide polymorphism)について、RFLPを用いて解析した。3つの SNPはいずれも多型性を示さなかったため、さらに SSCP法、direct sequence法により解析したが多型は存在しなかった。つぎに他のすべての exon(5' 3'-UTRを含む)



内の多型を同様に SSCP 法及び direct sequence 法にて検索したが多型は存在しなかった。

上記の human study と平行して SAMP6 と SAMP2 との congenic 及び sub-congenic マウスの作成をすすめ、第 11 染色体とならんで重要な骨量制御遺伝子座の存在する第 13 染色体に付いて、locus 存在領域を約 3 cM の領域に絞り込み、その領域内にある 74 個の遺伝子の全エクソンの塩基配列解析をすすめた。これにより 15 個の遺伝子でアミノ酸の配列が異なる cSNPs が存在することを確認した。そのうち Ggps1 (geranyl-geranyl diphosphate synthase 1) は骨吸収、骨形成に重要な影響を及ぼすメバロン酸代謝経路の重要な酵素であり、骨量制御候補遺伝子として挙げられる。また Tbce (tubullin specific chaperone E) は spinal muscular atrophy の原因遺伝子であり、その変異によっては、hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism syndrome の原因となるなど骨代謝への関与も十分に予想される候補遺伝子である。

#### 今後の課題

今回は 73 人の study であり、MTHFR と腰椎 BMD がこれまで発表されたものと逆の相関となったのも W genotype が 8 人であったことの影響も考えられる。人数を増やしていくことでより統計学的に正しい結果が得られると考えられる。また、IFP の polymorphism がこの人数で存在しなかったことは残念な結果となった。今後、IFP35 の転写制御に関わる配列を中心とした部位の polymorphism の探索が重要と思われる。また同時に、マウスでの IFP35 の役割について、細胞内のシグナル伝達経路の解明や骨量低下をもたらす機構などの解明が必要である。さらに新たに得られた候補遺伝子 (Ggps1、Tbce) について IFP35 と同様の human association study を行うことが重要な課題である。

#### 結語

73 人の女性(18~29 歳)の大腿骨頸部及び腰椎 BMD を測定し、IFP35 の遺伝子解析及び、Estrogen receptor  $\alpha$ 、Vitamin D receptor, MTHFR の polymorphism と骨密度との相関を解析した。IFP35 のすべての exon を検索したが polymorphism を確認できなかった。また Estrogen Receptor  $\alpha$  と Vitamin D receptor の polymorphism と骨量との相関は得られなかったが、MTHFR の polymorphism と腰椎 BMD に相関が得られた。