

20000169

厚生科学研究補助金
長寿科学総合研究事業

骨粗鬆症における原因遺伝子の検索と遺伝疫学的解析

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 折茂 肇

平成13年3月31日

目次

I. 総括研究報告書	
骨粗鬆症における原因遺伝子の検索と遺伝子疫学的解析	1
折茂 肇	
II. 分担研究報告書	
1. 骨粗鬆症における原因遺伝子の検索と遺伝子疫学的解析	1
折茂 肇	
2. 骨粗鬆症における原因遺伝子の検索と遺伝子疫学的解析	7
江見 充	
3. 機能解析にむけた骨粗鬆症関連遺伝子の検討	13
小川純人	
4. 新規老化抑制遺伝子(klotho)欠損マウスにおける骨粗鬆化の解析	19
川口 浩	
5. 骨粗鬆症における原因遺伝子の検索と遺伝子疫学的解析	22
細井孝之	
6. 高齢者の大腿骨近位部骨密度の経年変化に関する要因の分析的研究	25
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	32

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

（総括）研究報告書

骨粗鬆症における原因遺伝子の検索と遺伝疫学的解析

（主任）研究者 折茂 肇（東京都老人医療センター 院長）

研究要旨

骨粗鬆症の遺伝要因を明らかにする目的で、骨代謝および内分泌に関わる種々の候補遺伝子座を対象に、高多形 CA リピートマーカートを単離するとともに、候補遺伝子の塩基配列解析を行い、多数の一塩基多型(SNP)マーカートを単離した。SNP マーカー単離にあたっては、degenerative HPLC などの新しい手法もとり入れた。これらマーカートをを用いて、骨密度を測定した患者・健常者集団の遺伝子タイピングを行い、各遺伝子座と骨密度との関係を相関解析の手法で検討した。これらの遺伝子には、骨代謝に関連するサイトカインやカルシウム調節因子として知られているもののみならず、老化のプロセスそのものに関与することが予測されている遺伝子(Klotho 遺伝子)も含まれている。さらに、同胞対検定法により、骨粗鬆症との間に遺伝的連鎖が見い出される遺伝子多型性も発見された。本年度の研究により、骨代謝関連細胞の発生分化・病態生理に関わる遺伝子のネットワークの解明にむけて大きなステップが得られ、cDNA マイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイル解析の可能性も高まった。また、高齢骨粗鬆症患者の合併症としてもっとも重要な骨折である大腿骨頸部骨折の発症要因における遺伝的素因の位置付けをすべく、同部位における骨密度の経年的変化に関する要因分析を行った。

A. 研究目的

骨粗鬆症とは骨量の減少により骨の脆弱性が進み、骨折の危険性が増す疾患である。急速に高齢化社会を迎える我が国においては、その成因解明、発症前診断、新しい治療法の開発は急務である。骨粗鬆症の発症には複数の遺伝子の関与が示唆されており、疾患関連遺伝子を同定するためには、近年、進歩の著しい遺伝子多型の体系的解析が有力な手段となる。本研究ではゲノム上の多型マーカートをを用いることにより、骨量の減少機序、骨粗鬆症の発症、進展に関与する遺伝子を探し、早期の予防、治療へ用いることを目的とした。

B. 研究方法

1. 骨代謝候補遺伝子座マイクロサテライトマーカートと SNP の同定、ならびにそれらを用いた解析：骨粗鬆症の遺伝素因を明らかにする目的で、内分泌および骨代謝に関わる種々の候補遺伝子に注目しその近傍の CA 反復配列多型マーカートをを用いて、遺伝子型とその頻度を検出した。遺伝子型とその頻度を検出したのち、骨密度と遺伝子型との相関を統計的に解析する相関研究を行った。疾患とマーカートとの相関は、患者集団と健常集団とでマーカート対立遺伝子の頻度を比較検討することにより検出される。次に連鎖解析の一つである「sib-pair (同胞対) 解析」を行い、連鎖を示す遺伝子座の同定を試みた。

圧迫骨折などが認められない女性において骨密度が若年成人平均値の70%未満が骨粗鬆症、70-80%を骨量減少とした。

2. 骨粗鬆症の病態形成に関与する遺伝子群を遺伝子

多型性を用いて解析してきたが、さらに検討する遺伝子群とその多型性を増やすとともに、効率よくタイピングする必要がある。新しいsingle nucleotide polymorphisms (SNPs)を検出しタイピングする方法としてdegenerative HPLC (dHPLC)法を導入し、骨粗鬆症に関連する遺伝子群を特定するためのシステムとしての有用性を検討した。

3. 核内受容体遺伝子の多型性に関する検討：閉経後骨粗鬆症の主因としてエストロゲンの低下、欠乏が挙げられる。エストロゲンの生理的作用は主にエストロゲン受容体(ER α 、ER β)を介して引き起こされると考えられている。我々はこれまでにER α 遺伝子多型と骨密度との相関を報告しているが、ER β 遺伝子多型との相関については報告がない。ER β が骨形成に及ぼす影響を調べるため、ER β の染色体位置と遺伝子多型を同定し、解析した。さらに、脂質代謝、糖尿病、高血圧、動脈硬化や免疫系で重要な役割を果たすことが知られているPPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ)、肥満、とりわけ内臓脂肪蓄積と関連し、糖尿病の発症に重要な役割を果たすことが知られている β 3-Adrenergic Receptor (β 3-AR)遺伝子と骨代謝との関連についても検討した。

4. 老化関連遺伝子に関する検討：老化関連遺伝子として注目されているヒトklotho遺伝子について、ゲノム解析を行って検討した。閉経後女性の末梢白血球からインフォームドコンセントに基づいて抽出したDNA、および個々の患者の重症度(骨粗鬆症では骨密度、変形性関節症ではKellgren grade)など具体

的な数値を含むデータベースを蓄積した。これらのサンプルを用いて、single nucleotide polymorphisms (SNPs) を検索した。また、同様の SNPs スクリーニングを英国在住の白人（においても行い、2 民族に共通の SNPs につき、各疾患群との間の association study を行った。さらに各疾患の患者内において、mutation と重症度や発症年齢との相関について解析を行った

5. 高齢者の骨密度変化における遺伝子的要因に関する検討：地域在宅高齢者を対象とした大腿骨近位部（3ヶ所：頸部、転子部、およびワード三角部）の骨密度を測定し、追跡調査によって縦断的に同部位での骨密度の変化を詳細に観察し、さらに同密度の変動に関連する要因として、生活習慣、運動能力および遺伝的要因を広汎に分析し、大腿骨頸部骨折との関連性について考察した。

C. 研究結果

1. 骨代謝候補遺伝子座マイクロサテライトマーカーと SNP の同定、ならびにそれらを用いた解析：7q21 のインターロイキン6 遺伝子、14q のエストロゲン受容体 β 遺伝子、6q25.1 のエストロゲン α 遺伝子、12p のマトリックス Gla タンパク遺伝子、11q15 のカルシトニン遺伝子、6q21.3 の TNF α 遺伝子、3q13 のカルシウム感受性受容体遺伝子、11q22 のプロゲステロン受容体遺伝子、1p21 のインターロイキン6 受容体遺伝子、4q23 の NFKB1 遺伝子座より各々、対立遺伝子数が6ヶ 18ヶ、%ヘテロザイゴシティが0.52 0.93 に分布する CA リピートマーカーを単離した。

骨粗鬆症の候補遺伝子の染色体遺伝子ゲノム構造および染色体マッピングを、SREBP-cleavage activating protein (SCAP), site-1 protease (Slp), HMG-CoA 還元酵素, EBAG9, ELKS, MAD2, アドレノメデュリン受容体の各遺伝子について決定した。さらに、日本人集団16 24名のゲノム・リシーケンシングにより、インターフェロン α 遺伝子、インテグリン β 4 遺伝子、CSF2 遺伝子、NFKB 遺伝子、IL6 遺伝子、アドレノメデュリン受容体遺伝子、カスパーゼ9 遺伝子において多数のアミノ酸置換を伴う SNP を同定し、その対立遺伝子頻度を確定した。

すべてのマーカーで各々の対立遺伝子に対し相関解析を行ったところ IL6・CASR・MGP のマーカーに相関が認められた。IL6 対立遺伝子 A134 を持つ群では平均 BMD は 0.294, 持たない群では平均 0.313 で対立遺伝子 A134 を持つ群で有意に骨密度が低く $P=0.022$ 。CASR 対立遺伝子 A228 を持つ群では平均 BMD は 0.303, 持たない群では平均 0.317 で対立遺伝子 A228 を持つ群で有意に骨密度が低く $P=0.031$ 。MGP 対立遺伝子 A212 を持つ群では平均 BMD は 0.315, 持たない群では

平均 0.302 で対立遺伝子 A212 を持たない群で有意に骨密度が低く $P=0.038$ であった。

候補遺伝子座における CA 反復配列多型に対する骨粗鬆症群とのノンパラメトリック連鎖解析において IL6 遺伝子座と TNFA 遺伝子座は強い連鎖を認めた。

さらに、骨代謝病態解明のための体系的遺伝子発現解析に向けた cDNA マイクロアレイ解析実験の条件を検討した。

2. 新しい single nucleotide polymorphisms (SNPs) を検出しタイピングする方法として degenerative HPLC (dHPLC) 法を導入し、骨粗鬆症に関連する遺伝子群を特定するためのシステムとしての有用性を確認した。

3. 核内受容体遺伝子の多型性に関する検討：Estrogen receptor β (ER β) 遺伝子多型 (ER β CA リピート多型) と腰椎骨骨密度との相関を解析したところ、特定の遺伝子型をもつ群において有意に高値を示した (Z score; 0.674 vs. 0.128; $p=0.027$)。PPAR γ exon 6 内に存在する C \rightarrow T 置換の遺伝子多型を決定し、骨量、骨代謝マーカーとの関連を検討した。C/C 群では C/T/T/T 群に比べ、有意に高値を示した (Z score 0.29 : 0.056; $p=0.044$)。PPAR γ Pro12Ala 置換の多型については、Pro/Pro ホモ接合体 (Pro/Pro) 192 名、Pro/Ala ヘテロ接合体 + Ala/Ala ホモ接合体 11 名 (Pro/Ala+Ala/Ala) の 2 群間において、腰椎骨密度との相関を解析した結果、Pro/Pro 群では Pro/Ala+Ala/Ala 群に比べ、有意に高値を示した (Z score 0.312 : -0.630; $p=0.031$)。

β 3-AR コドン 64 に存在する Trp 6 4 Arg 置換の遺伝子多型と骨量との関連を検討したところ、Trp/Trp ホモ接合体 178 名 + Trp/Arg ヘテロ接合体 89 名 (T/T+T/A)、Arg/Arg ホモ接合体 13 名 (A/A) の 2 群間において、全身骨骨密度との相関を解析した結果、T/T+T/A 群では A/A 群に比べ、有意に高値を示した (Z score 0.432 : -0.135; $p=0.033$)。

4. 老化関連遺伝子に関する検討：マウス cDNA をプローブとしてヒト cDNA ライブラリーよりヒト *klotho* 遺伝子を分離し全塩基配列を決定し、このヒト *klotho* 遺伝子座の最終 exon の下流に CA リピートによるマイクロサテライト多型が存在することを見出した。また、閉経後女性をマイクロサテライト多型によって解析したところ、*klotho* 遺伝子が高齢者における骨量の減少、若年者における変形性腰椎症の重症度に強く関与していることが明らかとなった。

さらにヒト *klotho* 遺伝子座においてその遺伝子の機能に直接関連のある領域 (全5つの exon とその近傍の intron、および promoter 領域) における SNPs のスクリーニングを行った。本研究は、民族による遺伝的背景の差を除外するために、日本人と英国在住白人女性より採取した末梢白血球 DNA サンプルを用い

て行った。その結果、日本人においては6カ所、英国人においては8カ所のSNPsが同定され、そのうちの3カ所は共通であった。この共通の3カ所のSNPsに関して、日本人閉経後女性364例、英国人女性1,187例においてそれぞれ骨密度(BMD)とのassociation studyを行った。日本人閉経後女性においては、-395G->Aおよび1818C->TがBMPと有意な相関を示した。一方、英国人においても同様の結果が見られ、1,187例全体では相関がなかったが、明らかな閉経後女性を対象を絞ると1818C->T SNPとBMDの間に有意な相関が見られた(p=0.029)。さらなる解析の結果、ヒト*klotho*遺伝子が人種差を超えて加齢に伴う骨密度の変化に直接関与している可能性を示唆するものと言える。

5. 高齢者の骨密度変化における遺伝子的要因に関する検討: 高齢骨粗鬆症患者の合併症としてもっとも重要な骨折である大腿骨頸部骨折の発症要因における遺伝的素因の位置付けをすべく、地域在宅の高齢女性172名(68-84歳; 平均73.1歳)における大腿骨近位部(大腿骨頸部、転子部、およびワード三角部)の骨密度の加齢に伴う変化とその要因を分析した。観察期間は4年間である。各部位とも加齢に伴い骨密度は減少したが、特に最も低骨密度領域であるワード三角部での減少率が最大であった。さらに各年齢階級で減少率を比較した場合、80歳以上の群で減少率は最大であった。またそれらの変動に対する要因分析からは、歩行速度をはじめとする身体運動能力と一部の遺伝的要因が有意に関連していたが、生活習慣は関連が認められなかった。

D.E. 考察・結論

本年度の研究により、骨代謝関連細胞の発生分化・病態生理に関わる遺伝子のネットワークの解明にむけて大きなステップが得られ、cDNAマイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイル解析の可能性も高まった。また、高齢骨粗鬆症患者の合併症としてもっとも重要な骨折である大腿骨頸部骨折の発症要因としても遺伝的素因が重要な位置を占めていることが確認された。

F. 健康危険情報: 今年度の研究において当該情報は得られなかった。

G. 論文発表

1. Kaneki, M., Hodges, S., Hosoi, T., et al. Japanese fermented bean as the major determinant for the large geographical differences in circulating levels of vitamin K2 and its possible implication in hip fracture incidence. Nutrition in press

2. Miyao M, Hosoi T, Emi M, Nakajima T, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, and Ouchi Y. Association of bone mineral density with a dinucleotide repeat polymorphism at the calcitonin (CT) locus. J Human Genetics in press

3. Ogawa, S., Emi, M., Shiraki, M., Hosoi, T., Ouchi, Y., Inoue, S Association of estrogen receptor beta (ERbeta) gene polymorphism with blood pressure. Genes and Immunity (brief communication) in press

4. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Miyao M, Hosoi T, Takahashi H, Fukuchi Y, Ouchi Y. Neither IL-1beta, IL-1 receptor antagonist, nor TNF-alpha polymorphisms are associated with susceptibility to COPD. Respir Med. 2000 Sep;94(9):847-851.

5. Ishii T, Matsuse T, Teramoto S, Matsui H, Hosoi T, Fukuchi Y, Ouchi Y. Association between alpha-1-antichymo-trypsin polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. Eur J Clin Invest. 2000 30(6):543-548.

6. Ota, N., Hunt, S.C., Nakajima, T., Suzuki, T., Hosoi, T., Orimo, H., Shirai, Y., Emi, M. Linkage of human tumor necrosis factor-alpha to human osteoporosis by sib-pair analysis. Genes and Immunity 2000;1: 261-265.

7. Shionoiri A, Horiuchi T, Onouchi T, Tsutsumi H, Ohta M, Hosoi T, Ito H, Orimo H. Related Articles Hypercalcemia induced with the plasma levels of parathyroid hormone-related peptide in multiple myeloma. Intern Med. 2000 Oct;39(10):810-813.

8. Ogawa, S., Saito, T., Matsuda, Y., Seki, N., Hayashi, A., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M., Hori, T., Inoue, S Chromosome mapping of human, mouse, and rat genes for testis RING finger protein (terf), a member of the RING finger family Cytogenet Cell Genet 2000;89: 56-57

9. 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. 2000 Mar 16;269(2):537-541.

10. Yamada, Y., Atsushi Harada, Hosoi, T., Akimitsu Miyauchi, Ikeda, K., Hiroaki Ohta, and Masataka Shiraki Prediction of the outcome of therapy with active vitamin D for postmenopausal osteoporosis by TGF-beta1 genotype *J Bone Miner Res* 2000;15: 415-420.
11. Orimo H, Hashimoto T, Sakata K, Yoshimura N, Suzuki T, Hosoi T. Trends in the incidence of hip fracture in Japan, 1987-1997: the third nationwide survey. *J Bone Miner Metab* 2000;18(3): 126-131.
12. Hoshino S, Hosoi T, Miyao M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S. Identification of a novel polymorphism of estrogen receptor-alpha gene that is associated with calcium excretion in urine. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(3):153-157.
13. Mariko Miyao, Hiroyuki Morita, Takayuki Hosoi, Hiroki Kurihara, Satoshi Inoue, Shinjiro Hoshino, Masataka Shiraki, Yoshio Yazaki, Yasuyoshi Ouchi Association of Methylene tetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphism and Osteoporosis in Japanese Postmenopausal Women *Calcified Tissue International* 2000;66: 190-194.
14. Tsukamoto, K., Orimo, H., Hosoi, T., Miyao, M., Ota, N., Yoshida, H., Watanabe, S., Suzuki, T., H., Emi, M. Association of bone mineral density with polymorphism of the human calcium-sensing receptor locus *Calcified Tissue International* 2000;66:181-183.
15. Tsukamoto Tsukamoto, K., Orimo, H., Hosoi, T., Miyao, M., Yoshida, H., Watanabe, S., Suzuki, T., Emi, M. Association of bone mineral density with polymorphism of the human human matrix Gla protein locus in elderly women *J Bone and Mineral Metabolism* 2000;18: 27 - 30
16. Iida, A., Emi, M., Matsuoka, R., Inazawa, J., Ohashi, H., Fukushima, Y., Nakamura, Y. : Disruption in the human UVRAG/DHTX gene at 11q13.5 associated with left-right axis malformations. *Hum. Genet.* 2000; 106: 277-87.
17. Nakajima, T., Iwaki, K., Kodama, T., Inazawa, J., Emi, M. : Genomic structure and chromosomal mapping of the human Site-1 protease (S1P) gene. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 212-217.
18. Wu, L., Hopkins, P., Xin, Y., Stephenson, S., Williams, R., Nobe, Y., Kajita, M., Nakajima, T., Emi, M.: Co-segregation of elevated LDL with a novel mutation (D92K) of the LDL receptor in a kindred with multiple lipoprotein abnormalities. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 154-158.
19. Yoshida, K., Ishigami, T., Nakazawa, I., Ohno, A., Tamura, K., Fukuoka, M., Mizushima, S., Umemura, S. (: Association of essential hypertension in elderly Japanese with I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene. *J. Hum. Genet.* 2000;45: 294-298.
20. Nakajima, T., Iwaki, K., Hamakubo, T., Kodama, T., Emi, M. : Genomic structure of the gene encoding human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: comparison of exon/intron organization of sterol-sensing domains among four related genes. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 284-289.
21. Ikeda, K., Sato, M., Tsutsumi, O., Tsuchiya, F., Tsuneizumi, M., Emi, M., Imoto, I., Inazawa, J., Muramatsu, M., Inoue, S. : Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG9 gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000; 273: 654-660.
22. Ogawa, S., Emi, M., Shiraki, M., Hosoi, T., Ouchi, Y., Inoue, S.: Association of estrogen receptor β (ESR β) gene polymorphism with blood pressure. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 327-330.
23. Orimo, H., Nakajima, E., Yamamoto, M.¹⁾, Ikejima, M., Emi, M., Shimada, T. : Association between single nucleotide polymorphisms in the hMSH3 gene and sporadic colon cancer with microsatellite instability. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 228-230.
24. Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, A., Chervoneva, I., Birk, D. : Differential Expression of Lumican and Fibromodulin Regulate Collagen Fibrillogenesis in Developing Mouse Tendons. *J. Cell Biol.* 2000; 151: 779-787
25. Yokota, T., Nakata, T., Minami, S., Inazawa, J., Emi, M. : Genomic organization and chromosomal mapping of ELKS, a gene rearranged in a papillary thyroid carcinoma. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 6-11.
26. Keicho, N., Ohashi, J., Tamiya, G., Nakata, K., Taguchi, Y., Azuma, A., Ohishi, N., Emi, M. Park,

- M., Inoko, H., Tokunaga, K., Kudoh, S. : Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66: 501-507.
27. Emi, M., Hirayama, T., Tsuji, M., Hata, A. : Novel mutations of the LDL Receptor Gene in Familial Hypercholesterolemia Pedigress in Hokkaido. *Lipoprot. Metab. Atherogen.* 2000;1: 48-50.
28. Iwasaki, H., Ota, N., Nakajima T., Shinohara, Y., Kodaira M., Kajita, M., Emi, M. : Five novel single-nucleotide polymorphisms of human interferon gamma identified by sequencing the entire gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46:32-34.
29. Hirano, A., Nagai, H., Harada, H., Terada, Y., Haga, S., Kajiwarra, T., Emi, M. : Nine novel single-nucleotide polymorphisms of the Intergrin beta4 gene in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 35-37.
30. Kajita, M., Iwasaki, H., Ota, N., Shinohara, Y., Kodaira, M., Nakajima, T., Emi, M.: Novel single nucleotide polymorphisms of the human Colony-stimulating factor 2 (CSF2) identified by sequencing entire gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 48-49
31. Shinohara, Y., Iwasaki, H., Ota, N., Nakajima, T., Kodaira, M., Kajita, M., Shiba, T., Emi, M. : Novel single nucleotide polymorphisms of human nuclear factor kappa-B 2 identified by sequencing the entire gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 50-52
32. Keicho, N., Emi, M., Kajita, M., Matsushita, I., Nakata, K., Azuma, A., Ohishi, N., Kudoh, S. : Overestimated frequency of a possible emphysema-susceptibility allele when microsomal epoxide hydrolase is genotyped by the conventional polymerase chain reaction-based method. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 96-98.
33. Harada, H., Nagai, H., Mine, N., Terada, Y., Fujiwara, H., Mikami, I., Tsuneizumi, M., Yabe, A., Miyazaki, K., Yokota, T., Imoto, I., Inazawa, J., Emi, M. : Molecular cloning, tissue expression, and chromosomal assignment of a novel gene encoding a subunit of the human signal-recognition particle. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 70-75.
34. Yokota, T., Nagai, H., Harada, H., Mine, N., Terada, Y., Fujiwara, H., Yabe, A., Miyazaki, K., Emi, M.: Identification, tissue expression, and chromosomal position of a novel gene encoding human ubiquitin-conjugating enzyme E2-230k. *Gene.* 2001; (in press)
35. Ota, N., Nakajima, T., Suzuki, T., Hosoi, T., Orimo, H., Inoue, S., Shirai, Y., Emi, M.: A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone-mineral density. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: (in press)
36. Nakazawa, I., Nakajima, T., Ishigami, T., Umemura, S., Emi, M.: Human calcitonin receptor-like receptor for Adrenomedullin: genomic structure, eight single nucleotide polymorphisms, and haplotype analysis. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: (in press)
37. Hirano, A., Nagai, H., Harada, H., Haga, S., Kajiwarra, T., Emi, M.: Two novel single-nucleotide polymorphisms of the Caspase-9 (CASP9) gene in the Japanese population. *Genes, Immunity.* 2001; (in press)
38. Ota, N., Nakajima, T., Suzuki, T., Hosoi, T., Orimo, H., Inoue, S., Shirai, Y., Emi, M.: Association of single nucleotide variant in human tumor necrosis factor alpha promoter region with decreased bone mineral density. *Genes, Immunity.* 2001; (in press)
39. Yoshida, S., Fukino, K., Harada, H., Nagai, H., Imoto, I., Inazawa, J., Takahashi, H., Teramoto, A., Emi, M. (: The c-Jun NH2-terminal kinase3 (JNK3) gene: genomic structure chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: (in press)
40. Nakazawa, I., Nakajima, T., Ishigami, T., Umemura, S., Emi, M.: Linkage disequilibrium and haplotype analysis among eight novel single nucleotide polymorphisms of human Tissue-type plasminogen activator gene. *J. Hum. Genet.* 2001; (in press)
41. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S: Association of estrogen receptor beta (ERbeta) gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 537-541, 2000
42. Urano T, Hosoi T, Shiraki M, Toyoshima H, Ouchi Y, Inoue S: Possible involvement of

p57Kip2 gene in the bone metabolism. Biochem Biophys Res Commun 266: 422-429, 2000

43. Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda S, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor a and b pathways. J Biol Chem 275: 21372-21379, 2000

44. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor b (ERb) gene polymorphism with blood pressure. J Hum Genet 45: 327-330, 2000

45. Inoue S, Ogawa S, Hoshino S, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y. An estrogen receptor b (ERb) isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERa and ERb pathways. Biochem. Biophys. Res. Commun. 279: 814-819, 2000

46. Kawaguchi H, Manabe N, Chikuda H, Nakamura K, and Kuro-o M: Cellular and molecular mechanism of low-turnover osteopenia in the *klotho*-deficient mouse. Cell Mol Life Sci 57: 731-737, 2000.

47. Kawaguchi H, Nakamura K, Ogata N, Manabe N, Chikuda H, Kawano K, and Makoto Kuro-o: Mutation in aging suppressor gene, *klotho*, causes decreases in bone formation and resorption in mice. Connect Tissue 32: 295-301, 2000.

48. Ishizaki, T., Watanabe, S., Suzuki, T. et al: Predictors for functional decline among nondisabled older Japanese living in a community during a 3-year follow-up. J Am Geriatr Soc, 48 : 1424-1429, 2000

49. Shinkai, S., Watanabe, S., Kumagai, S., Fujiwara, Y., Suzuki, T., Shibata, H. et al : Walking speed as a good predictor for the onset of functional dependence in a Japanese rural community population. Age and Ageing, 29: 441-446, 2000

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

（分担）研究報告書

骨粗鬆症における原因遺伝子の検索と遺伝疫学的解析

（分担）研究者 江見 充（日本医科大学老人病研究所 教授）

研究要旨

骨粗鬆症の遺伝要因を明らかにする目的で、骨代謝および内分泌に関わる種々の候補遺伝子座を対象に、10種の遺伝子座より高多形 CA リピートマーカーを単離するとともに、7種の遺伝子の塩基配列解析を行い、多数の一塩基多型(SNP)マーカーを単離した。これらマーカーを用いて、骨密度を測定した患者・健常者集団の遺伝子タイピングを行い、相関解析においては IL6・CASR・MGP の各遺伝子座と骨密度との間に相関を見出した。また、同朋対検定法により、IL6 座および TNFA 座と骨粗鬆症との間に遺伝的連鎖を見出した。さらに骨代謝関連細胞の発生分化・病態生理に関わる遺伝子のネットワークの解明を目指して、cDNA マイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイル解析を可能とした。

A. 研究目的

骨粗鬆症とは骨量の減少により骨の脆弱性が進み、骨折の危険性が増す疾患である。急速に高齢化社会を迎える我が国においては、その成因解明、発症前診断、新しい治療法の開発は急務である。骨粗鬆症の発症には複数の遺伝子の関与が示唆されており、疾患関連遺伝子を同定するためには、近年、進歩の著しい遺伝子多型の体系的解析が有力な手段となる。本研究ではゲノム上の多型マーカーを用いることにより、骨量の減少機序、骨粗鬆症の発症、進展に関与する遺伝子を探索し、早期の予防、治療へ用いることを目的とした。

B. 研究方法

骨粗鬆症の遺伝素因を明らかにする目的で、内分泌および骨代謝に関わる種々の候補遺伝子に注目しその近傍の CA 反復配列多型マーカーを用いて、遺伝子型とその頻度を検出した。遺伝子型とその頻度を検出したのち、骨密度と遺伝子型との相関を統計的に解析する相関研究を行った。疾患とマーカーとの相関は、患者集団と健常集団とでマーカー対立遺伝子の頻度を比較検討することにより検出される。次に連鎖解析の一つである「sib-pair（同胞対）解析」を行い、連鎖を示す遺伝子座の同定を試みた。姉妹対 192 組 297 人について、候補遺伝子座近傍の CA 反復配列は PCR によって増幅し、電気泳動によって各々の対立遺伝子の CA 反復配列多型マーカーの遺伝子型を決定した。各マーカーごとに 2 つの対立遺伝子の遺伝子型を決定し、その頻度を検出して骨密度との相関を行っている。女性姉妹対の集団ではそれぞれ、非患者対、非患者・患者対、患者対とに分類し、この遺伝子座における姉妹対の CA 反復配列多型マーカーの遺伝子型を利用して、ノンパラメトリック連鎖解析を program package

S.A.G.E. の SIBPAL にて解析を行った。骨粗鬆症患者どうしの姉妹対において共有している同じ遺伝子型のマーカー対立遺伝子数の増加(>0.5)、または非患者・患者の姉妹対における共有する同じ遺伝子型のマーカー対立遺伝子数の減少(<0.5)はその候補遺伝子近傍のマーカー遺伝子座と骨粗鬆症との連鎖を示す。骨密度は橈骨遠位端骨を DTX-200 にて DXA 法（2重エネルギー X 線吸収測定法）を用いて測定している。骨粗鬆症患者は日本骨代謝学会の診断基準に基づき、圧迫骨折などが認められない女性において骨密度が若年成人平均値の 70% 未満が骨粗鬆症、70-80% を骨量減少とした。

C. 研究結果

1. 骨代謝候補遺伝子座マイクロサテライトマーカーの同定

ヒト疾患に対する遺伝的感受性を規定している遺伝子多型解析を用いて骨粗鬆症の候補遺伝子について、大規模な人口の解析から各遺伝子座の遺伝的多様性と表現型間との関係を検討している。即ち、骨粗鬆症の発症には複数の遺伝子の関与が示唆されており、疾患関連遺伝子を同定するためには、近年進歩の著しい遺伝子多型のゲノムワイドな体系的解析が有力な手段である。我々は、ゲノム上の数万種類の多型マーカーを用いることにより、発症、進展および種々の薬剤感受性に関与する遺伝子を探索し、早期の予防、治療へ応用することを目指している。これまでにまず、これらの疾患遺伝子からの高多形 CA リピートマーカーの単離を試み、7q21 のインターロイキン 6 遺伝子、14q のエストロゲン受容体 β 遺伝子、6q25.1 のエストロゲン α 遺伝子、12p のマトリックス Gla タンパク遺伝子、11q15 のカルシトニン遺伝子、6q21.3 の TNF α 遺伝子、3q13 のカルシウム感受性受容体遺伝子、11q22 のプロゲス

テロン受容体遺伝子、1p21 のインターロキシン 6 受容体遺伝子、4q23 の NFkB1 遺伝子座より各々、対立遺伝子数が 6 ヶ～18 ヶ、%ヘテロザイゴシティが 0.52～0.93 に分布する CA リピートマーカーを単離した。

2. 遺伝子構造多型の検索による単一塩基多型 (SNP) の同定

骨粗鬆症の候補遺伝子の染色体遺伝子ゲノム構造および染色体マッピングを、SREBP-cleavage activating protein(SCAP), site-1 protease(S1p), HMG-COA 還元酵素, EBAG9, ELKS, MAD2, アドレノメデュリン受容体の各遺伝子について決定した。さらに、日本人集団 16～24 名のゲノム・リシーケンシングにより、インターフェロン α 遺伝子、インテグリン β 4 遺伝子、CSF2 遺伝子、NFkB 遺伝子、IL6 遺伝子、アドレノメデュリン受容体遺伝子、カスパーゼ 9 遺伝子において多数のアミノ酸置換を伴う SNP を同定し、その対立遺伝子頻度を確定した。

3. 骨密度との相関解析

すべてのマーカーで各々の対立遺伝子に対し相関解析を行ったところ IL6・CASR・MGP のマーカーに相関が認められた。IL6 対立遺伝子 A134 を持つ群では平均 BMD は 0.294、持たない群では平均 0.313 で対立遺伝子 A134 を持つ群で有意に骨密度が低く $P=0.022$ 。CASR 対立遺伝子 A228 を持つ群では平均 BMD は 0.303、持たない群では平均 0.317 で対立遺伝子 A228 を持つ群で有意に骨密度が低く $P=0.031$ 。MGP 対立遺伝子 A212 を持つ群では平均 BMD は 0.315、持たない群では平均 0.302 で対立遺伝子 A212 を持たない群で有意に骨密度が低く $P=0.038$ であった。

4. 骨密度との連鎖解析

候補遺伝子座における CA 反復配列多型に対する骨粗鬆症群とのノンパラメトリック連鎖解析において IL6 遺伝子座と TNFA 遺伝子座は強い連鎖を認めた。IL6 では患者を骨密度が若年成人平均値の 70% 未満の骨粗鬆症群及び 70～80% の骨量減少群とし status:1 で表される 65 組の患者・非患者対で共有する同じ CA 反復配列多型マーカーの対立遺伝子数の平均は 0.400 ± 0.21 ($p=0.0001$) であり平均対立遺伝子数の減少が認められたのに対して、status:2 で表される 66 組の患者対において共有する平均対立遺伝子数は 0.549 ± 0.23 ($p=0.045$) で平均対立遺伝子数の増加が認められた。

TNFA では患者を 70% 未満の骨粗鬆症群とした解析では 53 組の患者・非患者対では共有する平均対

立遺伝子数は 0.478 ± 0.305 ($p=0.297$) であるのに対して、36 組の患者対において共有する平均対立遺伝子数は 0.637 ± 0.238 ($p=0.001$) であった。骨粗鬆症及び骨量低下の両群を患者として解析を行っても 63 組の患者・非患者対では共有する平均対立遺伝子数は 0.501 ± 0.334 ($p=0.511$) であるのに対して、65 組の患者対において共有する平均対立遺伝子数は 0.568 ± 0.251 ($p=0.017$) であり、連鎖が認められた。

5. 骨代謝病態解明のための体系的遺伝子発現解析に向けた cDNA マイクロアレイ解析実験の条件検討
骨代謝系の種々幹細胞、分化細胞株より RNA を抽出し、T7 RNA ポリメラーゼによる RNA 増幅を種々の条件にて行い、2 回の RNA 増幅で約 100 倍のポリ (A) RNA の得られる条件を設定した。さらに、各々の RNA を異なる蛍光にて標識しつつ cDNA プローブを合成し、約 1 万種類の cDNA を高密度にスポットしたマイクロアレイ・スライドガラス上でハイブリダイゼーションを行った。スキャニング・データのコンピュータ解析を行い、約 1 万種の遺伝子を対象に、骨芽細胞系および破骨細胞系における発生分化と病態生理に関わる遺伝子ネットワークの発現プロファイル解析を行うことが可能となった。

D.E. 考察・結論

免疫系と骨吸収との関係は以前より指摘されており、IL-1、IL-6、TNFA については広く研究されている。IL6 は免疫反応、造血系や神経系細胞の増殖分化などに関与するサイトカインであり、TNFA はマクロファージなどから生産されるサイトカインであり、ある種の腫瘍に出血性の壊死を誘導する因子として発見された。近年エストロゲン減少時においてその産生が亢進し破骨細胞の分化を促進して骨吸収を増加させると報告されている。今回の結果より、IL6、TNFA 遺伝子内あるいは近傍の遺伝子の多型もしくは変異が骨代謝に影響し、結果として骨密度の変化をもたらすことが遺伝学的に実証され、骨粗鬆症の遺伝的因子の一つと考えられた。さらに、様々な人種、集団において検討と遺伝子内部の遺伝的変化とその調節因子に対する詳細な検討を行うことにより、遺伝子の骨粗鬆症発症への関与を明確にできる可能性が示唆された。

研究業績

(論文発表)

1) Iida, A., Emi, M., Matsuoka, R.¹⁾, Inazawa, J.²⁾, Ohashi, H.³⁾, Fukushima, Y.⁴⁾, Nakamura, Y.⁵⁾ (¹⁾ Tokyo Women's Med. Univ., ²⁾ Tokyo Med. Dent. Univ., ³⁾ Saitama Child. Med. Ctr., ⁴⁾ Shinshu Univ. ⁵⁾ Univ. Tokyo) : Disruption in the human UVRAG/DHTX gene at 11q13.5 associated with left-right axis

malformations. *Hum. Genet.* 2000; 106: 277-87.

2) Nakajima, T., Iwaki, K., Kodama, T.¹⁾, Inazawa, J.²⁾, Emi, M. (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Genomic structure and chromosomal mapping of the human Site-1 protease (S1P) gene. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 212-217.

3) Ogawa, S.¹⁾, Hosoi, T.^{1,2)}, Shiraki, M.³⁾, Orimo, H.²⁾, Emi, M., Muramatsu, M.⁴⁾, Ouchi, Y.¹⁾, Inoue, S.¹⁾ (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Metropol. Geriat. Hosp. ³⁾ Res. Inst. Prac. Involu. Dis., ⁴⁾ Saitama Med. Sch.) : Association of Estrogen Receptor β Gene Polymorphism with Bone Mineral Density. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000; 269: 537-541.

4) Wu, L.¹⁾, Hopkins, P.¹⁾, Xin, Y.¹⁾, Stephenson, S.¹⁾, Williams, R.¹⁾, Nobe, Y., Kajita, M., Nakajima, T., Emi, M. (¹⁾ Univ. Utah) : Co-segregation of elevated LDL with a novel mutation (D92K) of the LDL receptor in a kindred with multiple lipoprotein abnormalities. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 154-158.

5) Yoshida, K.¹⁾, Ishigami, T., Nakazawa, I., Ohno, A.¹⁾, Tamura, K.¹⁾, Fukuoka, M.¹⁾, Mizushima, S.¹⁾, Umemura, S.¹⁾ (¹⁾ Yokohama City Univ.) : Association of essential hypertension in elderly Japanese with I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme (ACE) gene. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 294-298.

6) Nakajima, T., Iwaki, K., Hamakubo, T.¹⁾, Kodama, T.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Univ. Tokyo) : Genomic structure of the gene encoding human 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: comparison of exon/intron organization of sterol-sensing domains among four related genes. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 284-289.

7) Ikeda, K.¹⁾, Sato, M.¹⁾, Tsutsumi, O.²⁾, Tsuchiya, F.¹⁾, Tsuneizumi, M., Emi, M., Imoto, I.³⁾, Inazawa, J.³⁾, Muramatsu, M.¹⁾, Inoue, S.¹⁾ (¹⁾ Saitama Med. School, ²⁾ Univ. Tokyo, ³⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Promoter analysis and chromosomal mapping of human EBAG9 gene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2000; 273: 654-660.

8) Ogawa, S.¹⁾, Emi, M., Shiraki, M.²⁾, Hosoi, T.³⁾, Ouchi, Y.¹⁾, Inoue, S.¹⁾ (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Res. Inst. Prac. Involu. Dis., ³⁾ Tokyo Metropol. Geriat. Hosp.) : Association of estrogen receptor β (ESR β) gene polymorphism with blood pressure. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 327-330.

9) Orimo, H.¹⁾, Nakajima, E.¹⁾, Yamamoto, M.¹⁾,

Ikejima, M.¹⁾, Emi, M., Shimada, T.¹⁾. (¹⁾Dept. Biochem. II) : Association between single nucleotide polymorphisms in the hMSH3 gene and sporadic colon cancer with microsatellite instability. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 228-230.

10) Ezura, Y., Chakravarti, S.²⁾, Oldberg, A.³⁾, Chervoneva, I.¹⁾, Birk, D.¹⁾ (¹⁾Thomas Jefferson Univ., ²⁾ Johns Hopkins Univ., ³⁾ Univ. Lund) : Differential Expression of Lumican and Fibromodulin Regulate Collagen Fibrillogenesis in Developing Mouse Tendons. *J. Cell Biol.* 2000; 151: 779-787

11) Tsukamoto, K., Yoshida, H.¹⁾, Watanabe, S.¹⁾, Suzuki, T.¹⁾, Miyao, M.²⁾, Hosoi, T.²⁾, Orimo, H.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol., ²⁾ Univ. Tokyo) : Association of Bone Mineral Density with Polymorphism of the Human Matrix Gla protein locus in elderly women. *J. Bone. Miner. Metab.* 2000 ; 18: 27-30.

12) Yokota, T., Nakata, T., Minami, S., Inazawa, J.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Genomic organization and chromosomal mapping of ELKS, a gene rearranged in a papillary thyroid carcinoma. *J. Hum. Genet.* 2000; 45: 6-11.

13) Keicho, N.¹⁾, Ohashi, J.¹⁾, Tamiya, G.²⁾, Nakata, K.³⁾, Taguchi, Y.⁴⁾, Azuma, A.⁵⁾, Ohishi, N.¹⁾, Emi, M., Park, M.⁶⁾, Inoko, H.²⁾, Tokunaga, K.¹⁾, Kudoh, S.⁵⁾ (¹⁾ Univ. Tokyo., ²⁾ Tokai Univ., ³⁾ Toranomon Hosp. ⁴⁾ Tenri Hosp., ⁵⁾ Dept. Intern. Med. IV., ⁶⁾ Seoul Nat. Univ.) : Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am. J. Hum. Genet.* 2000; 66: 501-507.

14) Tsukamoto, K., Orimo, H.¹⁾, Hoşoi, T.¹⁾, Miyao, M.¹⁾, Ota, N., Nakajima, T., Yoshida, H.²⁾, Watanabe, S.²⁾, Suzuki, T.²⁾, Emi, M. (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol.) : Association of Bone Mineral density with Polymorphism of the Human Calcium-Sensing Receptor Locus. *Calcif. Tissue Int.* 2000; 66: 181-183.

15) Ota, N., Hunt, S.²⁾, Nakajima, T., Suzuki, T.³⁾, Hosoi, T.³⁾, Orimo, H.³⁾, Shirai, Y.¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Dept. Orthoped. ²⁾ Univ. Utah, ³⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol.) : Linkage of human tumor necrosis factor-alpha to human osteoporosis by sib-pair analysis. *Genes, Immunity.* 2000; 1: 260-264.

16) Miyao, M.¹⁾, Hosoi, T.¹⁾, Emi, M., Nakajima, T., Inoue, S.¹⁾, Hoshino, S.¹⁾, Shiraki, M.³⁾, Orimo, H.^{1,2)}, Ouchi, Y.^{1,2)} (¹⁾ Univ. Tokyo, ²⁾ Tokyo Metropol. Geriat.

Hosp., ³⁾ Res. Inst. Prac. Involu. Dis.) : Association of bone mineral density with a dinucleotide repeat polymorphism at the calcitonin locus. *J. Hum. Genet.* 2000 ; 45 346-350.

17) Emi, M., Hirayama, T., Tsuji, M. ¹⁾, Hata, A. ²⁾ (¹⁾ Hokkaido Cent. Hosp., ²⁾ Asahikawa Med. Sch.) : Novel mutations of the LDL Receptor Gene in Familial Hypercholesterolemia Pedigress in Hokkaido. *Lipoprot. Metab. Atherogen.* 2000;1: 48-50.

18) Iwasaki, H. , Ota, N. , Nakajima T. , Shinohara, Y. , Kodaira M., Kajita, M. , Emi, M. : Five novel single-nucleotide polymorphisms of human interferon gamma identified by sequencing the entire gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46:32-34.

19) Hirano, A., Nagai, H., Harada, H., Terada, Y., Haga, S. ¹⁾, Kajiwara, T. ¹⁾, Emi, M. (¹⁾Tokyo Women's Med. Univ.) : Nine novel single-nucleotide polymorphisms of the Intergrin beta4 gene in the Japanese population. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 35-37.

20) Kajita, M., Iwasaki, H., Ota, N., Shinohara, Y., Kodaira, M., Nakajima, T., Emi, M.: Novel single nucleotide polymorphisms of the human Colony-stimulating factor 2 (CSF2) identified by sequencing entire gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 48-49

21) Shinohara, Y., Iwasaki, H., Ota, N., Nakajima, T., Kodaira, M., Kajita, M., Shiba, T. ¹⁾, Emi, M. (¹⁾Kitasato Univ.) : Novel single nucleotide polymorphisms of human nuclear factor kappa-B 2 identified by sequencing the entire gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 50-52

22) Keicho, N. ¹⁾, Emi, M., Kajita, M., Matsushita, I. ¹⁾, Nakata, K. ¹⁾, Azuma, A. ²⁾, Ohishi, N. ³⁾, Kudoh, S. ²⁾ (¹⁾Int. Med. Ctr. Jpn., ²⁾Dept. Intern. Med. IV., ³⁾Univ. Tokyo.) : Overestimated frequency of a possible emphysema-susceptibility allele when microsomal epoxide hydrolase is genotyped by the conventional polymerase chain reaction-based method. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 96-98.

23) Harada, H., Nagai, H., Mine, N., Terada, Y., Fujiwara, H., Mikami, I., Tsuneizumi, M. , Yabe, A. , Miyazaki, K. , Yokota, T. , Imoto, I. ¹⁾, Inazawa, J. ¹⁾ , Emi, M. (¹⁾ Tokyo Med. Dent. Univ.) : Molecular cloning, tissue expression, and chromosomal assignment of a novel gene encoding a subunit of the human signal-recognition particle. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 70-75.

24) Yokota, T., Nagai, H., Harada, H., Mine, N., Terada, Y., Fujiwara, H., Yabe, A., Miyazaki, K., Emi, M.: Identification, tissue expression, and chromosomal position of a novel gene encoding human ubiquitin-conjugating enzyme E2-230k. *Gene.* 2001; (in press)

25) Ota, N., Nakajima, T., Suzuki, T. ²⁾, Hosoi, T. ²⁾, Orimo, H. ²⁾, Inoue, S. ³⁾, Shirai, Y. ¹⁾, Emi, M. (¹⁾Dept. Orthoped., ²⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol., ³⁾ Univ. Tokyo) : A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone-mineral density. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: (in press)

26) Nakazawa, I., Nakajima, T., Ishigami, T. ¹⁾, Umemura, S. ¹⁾, Emi, M. (¹⁾Yokohama City Univ.): Human calcitonin receptor-like receptor for Adrenomedullin: genomic structure, eight single nucleotide polymorphisms, and haplotype analysis. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: (in press)

27) Hirano, A., Nagai, H., Harada, H., Haga, S. ¹⁾, Kajiwara, T. ¹⁾, Emi, M. (¹⁾ Tokyo Women's Med. Univ.): Two novel single-nucleotide polymorphisms of the Caspase-9 (CASP9) gene in the Japanese population. *Genes, Immunity.* 2001; (in press)

28) Ota, N., Nakajima, T., Suzuki, T. ²⁾, Hosoi, T. ²⁾, Orimo, H. ²⁾, Inoue, S. ³⁾, Shirai, Y. ¹⁾, Emi, M. (¹⁾Dept. Orthoped., ²⁾ Tokyo Metropol. Inst. Gerontol., ³⁾ Univ. Tokyo): Association of single nucleotide variant in human tumor necrosis factor alpha promoter region with decreased bone mineral density. *Genes, Immunity.* 2001; (in press)

29) Yoshida, S., Fukino, K., Harada, H., Nagai, H., Imoto, I. ²⁾, Inazawa, J. ²⁾, Takahashi, H. ¹⁾, Teramoto, A. ¹⁾, Emi, M. (¹⁾Dept. Neurosurg., ²⁾Tokyo Med. Dent. Univ.): The c-Jun NH2-terminal kinase3 (JNK3) gene: genomic structure chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: (in press)

30) Nakazawa, I., Nakajima, T., Ishigami, T., Umemura, S. ¹⁾, Emi, M. (¹⁾Yokohama City Univ.): Linkage disequilibrium and haplotype analysis among eight novel single nucleotide polymorphisms of human Tissue-type plasminogen activator gene. *J. Hum. Genet.* 2001; (in press)

〈総説〉

1) 中島敏晶、江見 充 : 高脂血症. (特集—ポストゲノム心血管病 I) 分子心血管病 2000; 1:67-74.

2) 永井尚生、原田晴仁、江見 充：遺伝的機構と遺伝医学。(特集—ゲノム時代の遺伝医学)Molecular Medicine 2000;37:1268-1279.

3) 三上 巖、永井尚生、原田晴仁、江見 充：単一塩基多型解析法と遺伝性腫瘍への応用。(特集—遺伝性腫瘍症(1))日本臨牀 2000;58:34-38.

4)中島敏晶、江見 充：ゲノム研究の現況。最新・分子動脈硬化学 2000;1:199-207 メディカルレビュー社

5) 江面陽一、江見 充：リウマチと骨粗鬆症—慢性関節リウマチに伴う骨粗鬆症における遺伝子マーカーの意義。CLINICAL CALCIUM 2001;(印刷中)

(学会発表)

1) 小川純人¹⁾、星野眞二郎¹⁾、細井孝之¹⁾²⁾、白木正孝³⁾、折茂肇²⁾、江見 充、井上聡¹⁾、大内尉義¹⁾(¹⁾東大・加齢医学、²⁾東京都老人医療セ、³⁾成人病診療研究所)：エストロゲン受容体 β (ER β)遺伝子多型の骨量に及ぼす影響。第18回日本骨代謝学会、2000.

2) 岩崎公典、太田信孝、篠原靖智、小平美奈、梶田満子、井上 聡¹⁾、細井孝之²⁾、鈴木隆雄²⁾、中島敏晶³⁾、井ノ上逸朗³⁾、江見 充(¹⁾東大老年科、²⁾東京都老人総合研、³⁾東大・医科研・ゲノム情報応用)：骨量規定候補遺伝子の SNP の解析。第10回メディカルジェネティクス研究会 2000.9.7-8. 東京

3) 梶田満子、岩崎公典、中島敏晶¹⁾、太田信孝、篠原靖智、小平美奈、井ノ上逸朗¹⁾、江見 充(¹⁾東大・医科研・ゲノム情報応用)：一塩基伸長による SNP タイピング法の検討。第10回メディカルジェネティクス研究会 2000.9.7-8. 東京

4) 太田信孝、中島敏晶¹⁾、鈴木隆雄²⁾、吉田英世²⁾、細井孝之³⁾、折茂 肇¹⁾、白井康正³⁾、江見 充(¹⁾東大・医科研・ゲノム情報応用、²⁾都老人研・疫学、³⁾都老人医療センター・内分泌内科、⁴⁾都老人研、⁵⁾整形外科)：骨粗鬆症の TNFA 遺伝子座における sib-pair 解析。第10回メディカルジェネティクス研究会 2000.9.7-8. 東京

5) 仲沢一郎、中島敏晶¹⁾、石上友章²⁾、原田晴仁、永井尚生、梅村 敏²⁾、江見 充(¹⁾東大・医科研・ゲノム情報応用、²⁾横浜市大・第二内科)：アドレノメデュリン受容体構成遺伝子群の SNPs 解析。第10回メディカルジェネティクス研究会 2000.9.7-8.

東京

6) 仲沢一郎、中島敏晶¹⁾、原田晴仁、永井尚生、梅村 敏²⁾、江見 充(¹⁾東大・医科研・ゲノム情報応用、²⁾横浜市大・第二内科)：Tissue-Type Plasminogen Activator (TPA)遺伝子上の SNPs と Alu 挿入欠失多型。第68回日本医科大学医学会総会 2000.9.9. 東京

7) 篠原靖智、岩崎公典、太田信孝、小平美奈、梶田満子、中島敏晶¹⁾、井ノ上逸朗¹⁾、江見 充(¹⁾東大・医科研・ゲノム情報応用)：ゲノムシーケンスによる骨粗鬆症候補遺伝子の SNP の検出。第68回日本医科大学医学会総会 2000.9.9. 東京

8) 阿竹智子、岩崎公典、梶田満子、篠原靖智、中島敏晶¹⁾、原田晴仁、永井尚生、江見 充(¹⁾東大・医科研・ゲノム情報応用)：Gene Scan を用いた SNP 解析の条件検討。第68回日本医科大学医学会総会 2000.9.9. 東京

9) 小平美奈、岩崎公典、篠原靖智、梶田満子、中島敏晶¹⁾、原田晴仁、永井尚生、江見 充(¹⁾東大・医科研・ゲノム情報応用)：新鮮および凍結した全血からの DNA 抽出における溶媒層分画法と疎水カラム法の比較。第68回日本医科大学医学会総会 2000.9.9. 東京

10) 野辺由紀子、梶田満子、江見 充、P. Hopkins¹⁾(¹⁾ユタ大学)：高脂血症大家系内の多様な表現型への修飾遺伝子の関与。第68回日本医科大学医学会総会 2000.9.9. 東京

11) 太田信孝、中島敏晶¹⁾、鈴木隆雄²⁾、吉田英世²⁾、細井孝之¹⁾、折茂 肇¹⁾、白井康正³⁾、江見 充(¹⁾東大・医科研・ゲノム情報応用、²⁾都老人研・疫学、³⁾都老人医療センター・内分泌内科、⁴⁾都老人研、⁵⁾整形外科)：sib-pair 解析による骨粗鬆症の原因遺伝子座の同定。第68回日本医科大学医学会総会 2000.9.9. 東京

12) 江見 充、島田 隆¹⁾(¹⁾第二生化学)：遺伝子解析研究の倫理対応—遺伝子診断と遺伝子研究の区別化。日本人類遺伝学会第45回大会 2000.10.25-27. 福岡

13) 岩崎公典、太田信孝、篠原靖智、小平美奈、梶田満子、井上 聡¹⁾、細井孝之²⁾、鈴木隆雄²⁾、中島敏晶³⁾、井ノ上逸朗³⁾、江見 充(¹⁾東大老年科、²⁾東京都老人総合研、³⁾東大・医科研・ゲノム情報応用)：

SNP 開発による骨粗鬆症候補遺伝子の解析. 日本人類遺伝学会第 45 回大会 2000. 10. 25-27. 福岡

14) 梶田満子、岩崎公典、中島敏晶¹⁾、太田信孝、篠原靖智、小平美奈、井ノ上逸朗¹⁾、江見 充⁽¹⁾ (東大・医科研・ゲノム情報応用) : 骨粗鬆症候補遺伝子の一塩基伸長法による SNP タイピングの検討. 日本人類遺伝学会第 45 回大会 2000. 10. 25-27. 福岡

15) 平野 明、永井尚生、原田晴仁、芳賀駿介¹⁾、梶原哲郎¹⁾、江見 充⁽¹⁾ (東京女子医大第二病院外科) : インテグリン β 4 遺伝子の一塩基多型 (SNPs) の同定. 日本人類遺伝学会第 45 回大会 2000. 10. 25-27. 福岡

16) 太田信孝、白井康正¹⁾、中島敏晶²⁾、鈴木隆雄³⁾、吉田英世³⁾、細井孝之¹⁾、折茂 肇³⁾、江見 充⁽¹⁾ (整形外科、²⁾ 東大・医科研・ゲノム情報応用、³⁾ 都老人研・疫学、¹⁾ 都老人医療センター・内分泌内科、²⁾ 都老人研) : 同胞対解析による骨粗鬆症と TNFA 座の連鎖. 日本人類遺伝学会第 45 回大会 2000. 10. 25-27. 福岡

17) 仲沢一郎、中島敏晶¹⁾、石上友章²⁾、原田晴仁、永井尚生、梅村 敏²⁾、江見 充⁽¹⁾ (東大・医科研・ゲノム情報応用、²⁾ 横浜市大・第二内科) : 血圧調節因子受容体 CRLR および RAMP2 の遺伝子構造と SNP 多型. 日本人類遺伝学会第 45 回大会 2000. 10. 25-27. 福岡

分担研究者 小川 純人 東京大学大学院医学系研究科
加齢医学講座

機能解析にむけた骨粗鬆症関連遺伝子の検討

研究要旨 骨粗鬆症の発症や予後を予想し、遺伝子診断に役立てるためには骨代謝に影響を及ぼす遺伝子マーカーを同定しその診断学的ならびに病態生理学的意義を知ることが必要である。今回は、日本人閉経後女性の集団を利用してEstrogen receptor β (ER β)、PPAR γ 、 β 3-AR (β 3-Adrenergic Receptor)の三つの遺伝子の多型において骨量との関連が認められることを示し、遺伝子マーカーとしての有用性を示唆した。

A. 研究目的

骨粗鬆症は多因子性疾患であり、その背景因子は複数の遺伝的因子と環境因子にわけることができる。骨粗鬆症における病態の根本である低骨密度については遺伝的因子の影響が大きいことが示唆されている。骨粗鬆症の発症や予後を予想し、遺伝子診断に役立てるためには骨代謝に影響を及ぼす遺伝子マーカーを同定しその診断学的ならびに病態生理学的意義を知ることが必要である。そのような遺伝子の候補として、今回骨代謝に影響を及ぼす遺伝子3種類を選定し解析を行った。(1)閉経後骨粗鬆症の主因としてエストロゲンの低下、欠乏が挙げられる。エストロゲン補充療法は基本的な治療法として用いられており、実際に骨量減少抑制作用、骨折予防効果が数多くの臨床成績から示されている。エストロゲンの生理的作用は主にエストロゲン受容体(ER α 、ER β)を介して引き起こされると考えられている。我々はこれまでにER α 遺伝子多型と骨密度との相関を報告

しているが、ER β 遺伝子多型との相関については報告がない。ER β が骨形成に及ぼす影響を調べるため、ER β の染色体位置と遺伝子多型を同定し、解析した。

(2) PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) はステロイド受容体スーパーファミリーに属し、脂質代謝、糖尿病、高血圧、動脈硬化や免疫系で重要な役割を果たすことが知られているが、骨代謝との関連については発現解析も含め不明な点が多かった。(3) β 3-AR (β 3-Adrenergic Receptor)は、これまでに肥満、とりわけ内臓脂肪蓄積と関連し、糖尿病の発症に重要な役割を果たすことが知られているが、骨代謝との関連については殆ど知られていなかった。

B. 研究方法

1. Estrogen receptor β (ER β) 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響

FISH (fluorescence in situ

hybridization)を用いて、ヒトER β の染色体位置の同定を行った。次に、ER β の遺伝子多型を同定し日本人閉経後女性204人を対象とし、末梢血DNAを用いてPCR法にて増幅後、骨量、骨代謝マーカーとの関連を検討した。また、同多型と血圧、総コレステロール値、中性脂肪値などとの関連を解析した。

2. PPAR γ 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響

PPAR γ がヒトの骨形成に及ぼす影響を調べるため、日本人閉経後女性404人を対象とし、PPAR γ exon 6内に存在するC \rightarrow T置換を含む領域をPCR法にて増幅後、pml Iにて制限酵素処理することにより、遺伝子多型を同定した。その多型と骨量、骨代謝マーカーとの関連を検討した。またラット初代培養骨芽細胞を用いて、RT-PCR法およびWestern blot法にてPPAR γ の発現を確認した。PPAR γ Pro12Ala置換の遺伝子多型と骨量との関連については、長野県在住の非血縁日本人閉経後女性203人(年齢 61-91歳, 平均年齢 \pm S.D.; 70.2 \pm 6.9歳)を対象とした。末梢血DNAを用いて、Pro12Ala置換を含む領域をPCR法にて増幅後、BstU-Iにて制限酵素処理することにより、遺伝子多型を同定した。

3. β 3-AR 遺伝子の遺伝子多型が骨量に与える影響

長野県在住の非血縁日本人閉経後女性280人を対象とした。末梢血DNAを用いて、Trp64Arg置換を含む領域をPCR法にて増幅後、BstNIにて制限酵素処理することにより、遺伝子多型を同定した。

C. 研究結果

1. Estrogen receptor β (ER β) 遺伝子多型の骨量、血圧に及ぼす影響

FISHの結果、ER β は14q23-24.1に位置し、ER α 染色体位置(6q25.1)とは異なり、かつ骨腫瘍などの骨疾患の一部との関連が示唆される座位と一致した。

遺伝子多型解析の結果では、ER β CAリピート多型を同定し、1群とそれ以外の2群間において、腰椎骨骨密度との相関を解析したところ、前者では有意に高値を示した(Z score; 0.674 vs. 0.128; p=0.027)。また、その2群間において血圧、総コレステロール値、中性脂肪値などとの相関を解析したところ、収縮期血圧に関し、前者では有意に高値を示した(Z score; 146.0 vs. 136.6; p=0.032)。

2. PPAR γ 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響

まず、ラット初代培養骨芽細胞を用いて、RT-PCR法およびWestern blot法にてPPAR γ の発現が確認された。日本人閉経後女性404人を対象とし、PPAR γ exon 6内に存在するC \rightarrow T置換の遺伝子多型を決定し、骨量、骨代謝マーカーとの関連を検討した。C/Cホモ接合体(C/C) 291名、C/Tヘテロ接合体106名+T/Tホモ接合体7名(C/T+T/T)の2群間において、全身骨骨密度との相関を解析した結果、C/C群ではC/T+T/T群に比べ、有意に高値を示した(Z score 0.29 : 0.056; p=0.044)。PPAR γ Pro12Ala置換の多型については、Pro/Proホモ接

合体 (Pro/Pro) 192名、Pro/Alaヘテロ接合体 + Ala/Alaホモ接合体 11名 (Pro/Ala+Ala/Ala)の2群間において、腰椎骨密度との相関を解析した結果、Pro/Pro群ではPro/Ala+Ala/Ala群に比べ、有意に高値を示した(Z score 0.312 : -0.630; p=0.031)。

3. $\beta 3$ -AR遺伝子多型の骨量に及ぼす影響

$\beta 3$ -ARコドン64に存在するTrp 6 4 Arg置換の遺伝子多型と骨量との関連を検討した。Trp/Trpホモ接合体 178名 + Trp/Argヘテロ接合体 89名 (T/T+T/A)、Arg/Argホモ接合体 13名 (A/A)の2群間において、全身骨密度との相関を解析した結果、T/T+T/A群ではA/A群に比べ、有意に高値を示した(Z score 0.432 : -0.135; p=0.033)。

D. 考察

骨粗鬆症の遺伝子診断に役立てるための、骨代謝に影響を及ぼす遺伝子マーカーを同定するために今回骨代謝に影響を及ぼす遺伝子3種類に関してSNP、ダイヌクレオチドリピートもしくはアミノ酸変異を伴う欠失ポリモルフィズムを利用して相関解析を行った。まず、骨粗鬆症の主因としてエストロゲンの低下があげられるが、その作用の一部はERを介していると考えられている。我々がこれまでに作製した、エストロゲン低応答性トランスジェニックラットの骨解析結果からも、ERの骨代謝への関与を支持する結果が得られている。今回の研究結果によって、ER α とならぶもうひとつの入り

口であるER β の骨代謝における関与の可能性を示すとともに、そのダイヌクレオチドリピートの骨量予測に用いる遺伝子マーカーとしての有用性も示唆された。次に、PPAR γ が骨が細胞に発現していることを示し、骨代謝に関与している可能性を示し、2種類のSNPがともに骨量予測に用いる遺伝子マーカーとしての有用性も示唆された。また、骨量予測マーカー以外にも、収縮期血圧との相関も認められ、血圧に対するマーカーとしての有用性も示唆された。 $\beta 3$ -ARについては、肥満、糖尿病の発症との関連が広く知られているが、骨量予測マーカーとしての有用性も初めて示唆され、今後肥満、糖尿病と骨代謝との関連を考える上で詳細に検討されるであろう。

今後、骨代謝に関する遺伝子をさらに同定し、骨粗鬆症の遺伝子診断に用いることができるマーカーを収集し、その近傍の詳細なマーカーを増やし、相関解析による臨床的データを蓄積するとともに、骨代謝における意義の解析を加えて骨粗鬆症発症と進展、その予防のメカニズムの解明を行っていく。

E. 結論

日本人閉経後女性の集団を利用してPPAR γ 、Estrogen receptor β (ER β)、 $\beta 3$ -ARの遺伝子多型と骨量との関連が認められることを示し、遺伝子マーカーとしての有用性を示唆した。

F. 研究発表

1.論文発表

1. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 243:122-126, 1998

2. Ogawa S, Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Cross-inhibition of both estrogen receptor alpha and beta pathways by each dominant negative mutant. *FEBS Lett* 423:129-132, 1998

3. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor (ER) beta cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 26:3505-3512, 1998

4. Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H, Emi M. Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J Hum Genet* 3: 73-74, 1998

5. Urano T, Yashiroda H, Muraoka M, Tanaka K, Hosoi T, Inoue S, Ouchi Y, Tanaka K, Toyoshima H: p57Kip2 is degraded through the proteosome

in osteoblasts stimulated to proliferation by transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem*. 274(18):12197-12200, 1999

6. Ogawa S, Urano T, Hosoi T, Miyao M, Hoshino S, Fujita M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 260(1):122-6, 1999

7. Inoue S, Urano T, Ogawa S, Saito T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M: Molecular cloning of rat efp: expression and regulation in primary osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 261(2):412-8, 1999

8. Orimo A, Inoue S, Minowa O, Tominaga N, Tomioka Y, Sato M, Kuno J, Hiroi H, Shimizu Y, Suzuki M, Noda T, Muramatsu M: Underdeveloped uterus and reduced estrogen responsiveness in mice with disruption of the estrogen-responsive finger protein gene, which is a direct target of estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(21):12027-32, 1999

9. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue

S: Association of estrogen receptor beta (ERbeta) gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 269: 537- 541, 2000

10. Urano T, Hosoi T, Shiraki M, Toyoshima H, Ouchi Y, Inoue S: Possible involvement of p57Kip2 gene in the bone metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 266: 422-429, 2000

11. Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda S, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor a and b pathways. *J Biol Chem* 275: 21372-21379, 2000

12. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor b (ERb) gene polymorphism with blood pressure. *J Hum Genet* 45: 327-330, 2000

13. Inoue S, Ogawa S, Hoshino S, Hosoi T, Muramatsu M, Ouchi Y. An estrogen receptor b (ERb) isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERa and ERb pathways.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 279: 814-819, 2000

2.学会発表

1. 井上聡、大内尉義、村松正実: [シンポジウム]ステロイドホルモン標的遺伝子 (1999.4.4)日本医学会総会 (東京)

2. 井上聡: [シンポジウム]エストロゲン作用の多様性(1999.11)日本ステロイドホルモン学会 (東京)

3.井上聡: [シンポジウム]エストロゲン受容体の骨代謝における役割(1999.11)分子細胞骨研究会 (京都)

4. 小川 純人, 井上 聡, 大内 尉義. エストロゲン受容体(ER)と相互作用するERIFの同定(1999.11)第22回日本分子生物学会 (福岡)

5. 小川 純人, 浦野 友彦, 細井 孝之, 白木 正孝, 折茂 肇, 井上 聡, 大内 尉義(2000.1) PPAR γ 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響. 第6回日本未病システム学会 (広島)

6. 小川 純人, 星野 眞二郎, 細井 孝之, 白木 正孝, 折茂 肇, 江見 充, 井上 聡, 大内 尉義(2000.7)エストロゲン受容体 β (ER β)遺伝子多型の骨量に及ぼす影響. 第18回日本骨代謝学会 (広島)

7. 井上 聡, 小川 純人, 村松 正實, 大内 尉義. [シンポジウム](2000.7)エストロゲンレセプターのドミナントネガティブ体と生体機能. 第73回日本生化学会 (横浜)

8. 小川 純人, 白木 正孝, 細井 孝之, 折茂 肇, 大内 尉義, 井上 聡 (2000.10) β 3 - Adrenergic Receptor (β 3 - AR)遺伝子多型の骨量に及ぼす影

響. 第2回日本骨粗鬆症学会 (秋田)

9. 星野 眞二郎, 小川 純人, 細井 孝之, 白木 正孝, 折茂 肇, 井上 聡, 大内 尉義(2001.1)PPAR γ Pro12Ala遺伝子多型の骨量に及ぼす影響. 第7回日本未病システム学会 (名古屋)

10. Inoue, S., Ogawa, S., Ishii, Y., Tsurukami, H., Hirabayashi, M., Ikeda, K., Orimo, A., Hosoi, T., Ueda, S., Nakamura, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor α and β pathways. 81th Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans (USA). 1999 June 24 - 27

11. Inoue, S., Ogawa, S., Hosoi, T., Muramatsu, M., and Ouchi, Y. Dominant negative mutant of estrogen receptor as a tool for gerontological research of estrogen action. 6th Asia/Oceania Regional Congress of Gerontology, Seoul (Korea). 1999 June 8-11

12. Ogawa, S., Muramatsu, M., Ouchi, Y., Inoue, S. Impaired estrogen sensitivity in ER α 1-535 transgenic rats inhibiting both ER α and β pathways. A Joint International Center for Biotechnology (CBT) and EUROSTERONE Symposium on Nuclear Receptors in Health and Disease, Huddinge (Sweden) 2000 September 24-27

13. Fujita, M., Ogawa, S., Fukuoka, H., Ouchi, Y., and Inoue, S. Identification and characterization of frpap in decidualization of rat pregnant uterus. 82th Annual Meeting of the Endocrine Society, Sydney (Australia) 2000 October 24-27