

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

分担研究者 川口 浩 (東京大学医学部整形外科講師)

研究要旨： ヒト *klotho* 遺伝子の骨軟骨異常疾患における関与についてゲノム解析を行って検討した。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。しかしながら、上記のマイクロサテライト多型は、最終 exon の更に下流に位置するものであり、*klotho* 遺伝子産物である KL 蛋白の産生や機能に直接結びつくものとは言えない。そこで我々は、このヒト *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 coding region における SNPs のスクリーニングを行った。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、promoter 領域 (-395G→A) および exon4 (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、加齢とともにその相関は強くなり、65 歳以上の高齢群では、1818C→T SNP ($p=0.014$) と -395 G→A SNP においても BMD との間に有意な相関が認められた ($p=0.002$)。以上の結果は、ヒト *klotho* 遺伝子の人種差を超えて加齢に伴う骨密度の変化に関与している可能性を示唆するものと言える。

A. 研究目的

平均寿命が伸びて高齢者の比率が急増している現在において、老化および老化関連疾患の細胞・分子機構の解明は医学、生物学研究における最大関心事のひとつといえる。骨軟骨領域における代表的な疾患である骨粗鬆症や変形性関節症は、その発症・進展に老化が重要な要素となっている疾患群であるが、そのメカニズムについてはほとんど解明されていない。新規老化抑制遺伝子 *klotho* 変異のホモ接合体 (*KL*^{-/-}マウス) は、骨粗鬆症、関節軟骨や軟部組織の石灰化をはじめ、ヒトの老化に極めて類似した多彩な表現型を呈する画期的な老化モデル動物と言える。*klotho* 遺伝子がコード

する蛋白 (KL 蛋白) は、野生型マウスにおいて、表現型を呈する組織とは関係なく多くの組織でその発現が認められることから、何らかの全身性のシグナルを介して個体の老化を抑制していると考えられている。本研究では、ヒト *klotho* 遺伝子の上記骨軟骨異常疾患における関与について、ゲノム解析を行って検討した。

B. 研究方法

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。まず PCR-SSCP, ダイレクトシーケンスのためのプライマー設計などのシステムの確立を行った。更に、これらの症例の内、115 例前後の症例について PCR-SSCP, direct sequence により、プロモーター領域および全 5 個の exon のスクリーニングを行い、変異/多型 (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 (英国 GEMINI 社との共同研究) 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。

C. 研究結果

① ヒト *klotho* 遺伝子座におけるマイクロサテライト多型を用いた骨軟骨疾患への関与: 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。

② ヒト *klotho* 遺伝子座における single nucleotide polymorphisms (SNPs) の検索: 上記のマイクロサテライト多型は、最終 exon の更に下流に位置するものであり、*klotho* 遺伝子産物である KL 蛋白の産生や機能に直接結びつくものとは言えない。そこで我々は、このヒト *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 (115 例) と英国在住白人女性 (288 例、英国 GEMINI 社との共同研究) 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 3 カ所の SNPs の内訳は、promoter 領域に 1 カ所 (-395G->A)、exon4 に 2 カ所 (1818C->T および 2298C->T) 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 ($p=0.029$)。この閉経後女性を更に年代別に検討すると、加齢とともにその相関は強くなり、65 歳以上の高齢群では、1818C->T SNP

($p=0.014$) と -395 G->A SNP においても BMD との間に有意な相関が認められた ($p=0.002$)。また、この promoter 領域における G->A 変異はヒト腎臓由来 293 細胞からの核抽出蛋白との結合を低下させることが明らかとなった。以上の結果は、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。

D. 考察

今回の検討で、*klotho* マイクロサテライト多型が関与している年齢層が骨粗鬆症と変形性腰椎症で異なって

いた。変形性腰椎症との相関が若年群で見られたのは、変形性腰椎症の発症・進展において重要な環境因子である慢性的・持続的な力学的負荷の蓄積の影響が若年群ではまだ少ないためと考えられる。

また、高齢者女性における骨量は大きく3つの要素によって決定される。壮年期における最大骨量 (peak bone mass)、閉経直後のエストロゲン欠乏による急速な骨粗鬆化、そしてその後の加齢に伴う緩やかな骨粗鬆化である。骨密度との相関がマイクロサテライト多型においてもSNPsにおいても、高齢群で強くなった事実は、*klotho* 遺伝子が主として3番目の加齢に伴う緩やかな骨粗鬆化を制御している可能性を示唆するものと言える。

E. 結論

ヒト *klotho* 遺伝子は骨粗鬆症や変形性腰椎症などの骨軟骨疾患に関与している可能性が示された。特に人種差を超えて加齢に伴う骨密度の減少に直接関与していると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

- 1) Kawaguchi H, Manabe N, Miyaura C, Chikuda H, Nakamura K, and Kuro-o M: Independent impairment of osteoblast and osteoclast differentiation in *klotho* mouse exhibiting low-turnover osteopenia. *J Clin Invest* 104: 229-237, 1999.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 川口浩, 筑田博隆: *klotho* 遺伝子と老人性骨粗鬆症. 臨床科学 34 (10) (特集: 骨粗鬆症「基礎から臨床へ」): 1373-1377, 1998.
- 5) 真鍋典世, 川口浩, 中村耕三, 宮浦千里, 尾上佳子, 鍋島陽一, 黒尾 誠: 新規老化モデル *klotho* マウスにおける骨芽細胞、破骨細胞の分化異常と骨髄造血異常のメカニズム. 日本骨代謝学会雑誌 16 (4): 152-154, 1999.
- 6) 川口浩: 老化関連遺伝子と骨代謝. CLINICAL CALCIUM 9 (4) (特集: 骨カルシウム研究の最近の進歩): 507-510, 1999.
- 7) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *Klotho* と骨代謝. 腎と骨代謝 12 (3) (特集: 骨の分子発生学): 279-284, 1999.
- 8) 川口浩: 老化抑制遺伝子 *klotho* と骨代謝異常 (ミニレビュー). 骨代謝学会誌 17 (3): 110-115, 2000.
- 9) 川口浩: *Klotho* 遺伝子変異マウスにおける骨代謝異常. 医学のあゆみ (特集: 遺伝子異常と骨): 702-707, 2000.
- 10) 川口浩: *klotho* 遺伝子の骨粗鬆症への関与. ホルモンと臨床 (増刊号)「骨粗鬆症のマネジメントのすべて」: 62-68, 2000.
- 11) 川口浩: 老化と *klotho* 遺伝子. 整形災害外科 43 (11) (連載: 分子レベルからみた整形外科疾患 - シリーズ II -): 1178-1179, 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 細井孝之 東京都老人医療センター医長

研究要旨 骨粗鬆症は複数の遺伝的素因と環境因子との相互作用の中で発症する多因子性疾患である。これらの遺伝的素因を候補遺伝子の多型性との関連を検討するためのひとつの方法として骨代謝関連遺伝子の多型性と骨量との関連を連関解析などで解析することが挙げられる。本年度の本研究では骨粗鬆症の原因遺伝子を検索するために必要な遺伝子多型性を見出すための方法として、degenerative HPLCを導入し、その特徴について検討するとともに、新規の single nucleotide polymorphisms (SNPs)を見出した。

研究目的

骨粗鬆症は複数の遺伝的素因と環境因子との相互作用の中で発症する多因子性疾患である。我々は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。本年度は新しい 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、脊柱変形に関連する遺伝子群を特定するためのシステムについて検討した。

研究方法

骨代謝関連遺伝子を候補遺伝子としてとりあげ、それらの転写調節領域ならびに各エクソンを特異的に増幅する polymerase chain reaction (PCR)を行なう。PCR断片を dHPLC法 (Transgenomics 社)にて解析し、SNPsの検出を試みる。SNPsの存在がうかがわれる断片については塩基配列を決定し、その意義を検討する。

現在までの成果

glucocorticoid receptor, estrogen responsive finger protein, estrogen receptor β cxに新たなSNPsが検出された。今後とも多型性リストを充実させるとともに、連関解析等に用いていく予定である。

考察

SNP は DNA の塩基配列を決定すれば検出されるので、サンプルを直接シーケンスしてしまえばタイピングできることはもちろんである。限られた候補遺伝子について、探索的に少数のサンプルについてシーケンスすることは確実な方法ではある。しかしながら、骨粗鬆症や変形性関節症のような多因子疾患の遺伝的要因を探るためには多くの遺伝子について、しかも数百以上という多くのサンプルの解析をする必要があり、時間やコストともに課題が生ずる。また、ゲノムワイドの SNP 検索ならびにタイピングをする際に適用することは現実的ではない。これらのことは PCR-RFLP 法、ASO 法、PCR-SSCP 法についても当てはまることである。

そこで、全ゲノムを視野に入れた SNP の

検出とそれを用いたタイピングを目的として、新しい方法が開発されてきた。これらの方法はサンプル DNA に対してなされる主な反応の種類によって大別することができる。その反応として、polymerase chain reaction (PCR) を用いるか否かで大きく 2 分される。PCR を用いない場合はアレル特異性オリゴを用いた反応、プライマー伸長法、rolling circle amplification (RCA) 法などが採用される。表にもしめしたように、それぞれの特徴がある。いずれにしても標的部位に特異的なプライマーが設計される必要があり、ゲノム情報の有効な活用が欠かせない。多くの遺伝子を解析対象とし、さらにはゲノムワイドに展開する際には、DNA の必要量、作業工程の数、コストなどいくつかの点がキーポイントになる。TaqManPCR、Invader 法、SniPer、SnapShot などが有力なものと考えられているがなお一長一短ある。DNA チップは、反応の標準化やコストの低減が望まれている。dHPLC) 法は heteroduplex HPLC 法とも呼ばれる方法である。新しい SNP を効率的にスクリーニングしたり、決定された SNP のタイピングに有効なユニークな方法であり、活用して行きたい。

発表論文

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. Related Association between alpha-1-antichymotrypsin polymorphism and susceptibility to chronic obstructive pulmonary disease. Eur J Clin Invest. 2000 Jun; 30(6):543-548.
6. Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda M, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor (ER) alpha and beta pathways. J Biol Chem. 2000 ; 275(28):21372-21379
7. 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.
8. 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.
9. Urano T, Hosoi T, Shiraki M, Toyoshima H, Ouchi Y, Inoue S. Related Articles Possible involvement of the p57(Kip2) gene in bone metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Mar 16;269(2):422-426.
10. 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
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Mariko Miyao, Hiroyuki Morita, Takayuki Hosoi, Hiroki Kurihara, Satoshi Inoue, Shinjiro Hoshino, Masataka Shiraki, Yoshio Yazaki, Yasuyoshi Ouchi Association of Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Polymorphism and Osteoporosis in Japanese Postmenopausal Women *Calcified Tissue International* 2000;66: 190-194.
16. 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.
17. 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 matrix Gla protein locus in elderly women *J Bone and Mineral Metabolism* 2000;18: 27 - 30

高齢者の大腿骨近位部骨密度の経年的変化 に関連する要因の分析的研究

鈴木隆雄（東京都老人総合研究所副所長）
吉田英世（東京都老人総合研究所疫学部門）
細井孝之（東京都老人医療センター内分泌科）
折茂 肇（東京都老人医療センター院長）

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。

A. 研究目的

大腿骨頸部骨折についての疫学調査はわが国においても各地域別や全国規模での調査が行われている。なかでも、全国の整形外科を標榜する施設を対象として、厚生省長寿科学研究班（班長・折茂肇）により行われた大腿骨頸部骨折の全国調査によれば、本症の年間発生件数は 1987 年調査で 5 万 3,200 人（男性 1 万 3,500 人、女性 3 万 9,700 人）と推計され、1992 年の調査では 7 万 7,000 人（男性 1 万 9,000 人、女性 5 万 8,000 人）と推計され、さらに 1997 年の調査では総数で 9 万 2,400 人（男性 2 万 800 人、女性 7 万 1,600 人）と推計されている。この推計によれば、本骨折は 10 年間に約 2 倍の急な増加ということになる。特に年齢階級別での発生を見た場合、男女とも 80 歳代および 90 歳代で発生率が著しく増加していることが明かとなった。

大腿骨頸部骨折の最も重要な原因は同部位

における骨密度の低下であることは明白である。このような骨密度の低下は加齢とともに進展するが、地域在宅高齢者における縦断的データこれまであまり知られていない。本研究報告では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。

B. 研究方法

東京都老人総合研究所では、地域高齢者を対象とし、骨密度の分布や経時的変化および転倒・骨折に関する分析的研究を含め、幅広く老化と老年病に関する縦断的研究（TMIG-LISA）を高い精度を維持しつつ継続してきて

いる。

本研究の対象者はこの TMIG-LISA の対象者であり、秋田県山間部農村に居住する在宅高齢者で、1995 年 8 月の時点で 68 歳から 84 歳までの高齢女性 465 名である。これら対象者のうち、インフォームド・コンセントを行い、さらに独歩可能でありかつ検査実施可能な身体能力を有するもののみについて、骨密度測定を行った。測定可能者は 287 名であった。さらに、その後 4 年間の追跡調査において脱落者や死亡者を除き、1999 年 8 月の時点で調査可能であった者 172 名が最終的な分析可能対象者となった。

初回調査および追跡調査の両方で大腿骨近位部の骨密度測定を行い得た者はいずれも検査を受諾し、独歩可能者であり、検査台に昇降可能な者であった。これら高齢女性対象者にあっては骨粗鬆症以外の骨密度に著しい影響を及ぼすような（全身性）骨代謝性疾患の認められていない者である。

カルシウム摂取状況や定期的な運動習慣については問診により調査し、身体運動能力（握力、歩行速度、開眼片足起立時間）については実測された。

大腿骨近位部での骨密度測定は DXA 法（QDR-1000/W；Hologic 社製；検診用バス搭載）によって行われた。測定部位は大腿骨頸部（以下 NK）、大腿骨転子部（TR）、およびワード三角部（WD）の 3 ケ所を測定した。これらバス搭載 DXA 法による骨密度測定についての In vivo における再現性（CV 値）や精度等現については先に報告されている。

なお、本研究の実施にあたっては、東京都老人総合研究所の倫理委員会の承認を受け（平成 5 年 4 月 15 日 受付番号 3）老人保健法に基づく住民検診の一環として行なわれたものである。

C. 研究結果

①1995 年の初回調査において実際に骨密度測定を行い得た者は 287 名（61.7%）であった。この調査完了者と非調査者の各年齢階級毎の人数と割合を表 1 に示す。

表に示されるように高齢者になるほど、非調査者の割合は増加したが、これは、高齢になるほど独歩可能者が減少し、かつまた検査実施可能者が減少したためである。

②1995 年の初回調査時と 1999 年の追跡調査時の 2 回の骨密度測定では 115 名の脱落・死亡者等により調査不能者が出現し、最終的に 172 名（60%）の分析を行っている。

表 2 は 1995 年の初回調査時および 1999 年追跡調査時の 2 回ともに測定されたデータ欠損のない 172 名について大腿骨頸部の 1995 年、1999 年の 2 回の測定値、差（'99 - '95）および変化率（'99 - '95 / '95 × 100；%）を示したものである。初回調査時での年齢階級、すなわち 68-69 歳（39 名）、70-74 歳（76 名）、75-79 歳（39 名）、80-84 歳（18 名）における変化率をみると、80-84 歳の年齢階級において極端に減少率が増加していた。

表 3 は調査された生活習慣のなかで、「牛乳・乳製品の摂取頻度」、「魚類、大豆製品、緑黄色野菜、海藻の摂取頻度」、「定期的な散歩や体操の有無」および「定期的運動の有無」の四項目、身体属性や運動能力からは、「握力」、「最大歩行速度」、「開眼片足立ち時間」の三項目、さらに遺伝子の分析から「IL-6 受容体」、「TNF- α 遺伝子」、「エストロゲン受容体」と「ビタミン D 受容体」の 4 遺伝子の多型のそれぞれについて骨密度の変化率を求め、各カテゴリー毎に分けた骨密度の検定（t-検定）を行なったものと示している。

表に示されたように、生活習慣の四項目ではいずれも有意差はなく、また運動能力から

は最大歩行速度に若干の傾向はみられるものの、やはり統計的な有意水準には至っていない。遺伝子の多型と骨密度の関連からは、II-6とER-Puv IIに骨密度への影響が見られ、II-6；134で切断されない多型とER-Puv IIのpp多型の者で骨密度の減少が抑制される傾向が示されていた。

表4はこれらの全ての分析項目のなかから、最大歩行速度の高値群と低値群に分け各々に対しII-6；134、ER-Puv IIの多型の有無をクロスして分析したものである。表に示されるように、II-6、134+で歩行速度の早い者はII-6、134+で遅い者よりも有意に骨密度の減少は少なく、またER-Puv II ppで歩行速度早い者は、ER-Puv II Pを有する多型で歩行速度の遅い者に比して有意に骨密度の減少は抑制されていた。このことは今後、生活習慣や運動能力そして遺伝子多型を組み合わせることによって将来の骨量減少を予知しうる可能性のあることを示す結果となっていた。

D. 考察

骨粗鬆症を基盤とする骨折は、高齢者における日常生活動作能力 (activities of daily living ; QOL) を著しく損なう可能性の大きい疾患である。特に大腿骨頸部骨折は、高齢者に発生する四肢骨折の代表的な骨折であると同時に、医学的・社会的・経済的に負担の大きい骨折であり、今後の増加傾向もあいまって、予防対策の急がれる疾病である。

Cooperらは世界各国の大腿骨頸部骨折の発生頻度を比較し、今後60年間で本骨折は特にアジアとラテン諸国で急増し、特にアジア地域での女性では約200万人が本骨折を受傷すると推定している。

前述のように日本における1987年、1992年、1997年の3回の大腿骨頸部骨折の全国調査からは次のような特徴が指摘されている。

- 1) 1997年で1年間9万2,400人の新発生患者
- 2) 新発生患者数は女性が男性の約3倍
- 3) 新発生患者数は10年前の約1.7倍、5年前の約1.2倍と増加していた。
- 4) 発生率では特に80歳以上で明らかな増加傾向が示された。

特に80歳以上の女性における大腿骨頸部骨折発生率は急増しており、人口1万対で見ると70-79歳(女性)では40.8なのに対し、80-89歳では147.8、90歳以上は281.0と急上昇している。

ほとんどの大腿骨頸部骨折の直接の原因は転倒であり、加齢とともに転倒は増加し、転倒による骨折もまた増加することは明らかである。しかし転倒頻度の増加とともに、今回の研究で示されたように80歳以上での大腿骨近位部骨密度の急激な減少もまた、同年齢群での骨折発生率の急増と直接に深く関係しているものと推定される。

ところで、今回の研究から地域在宅女性高齢者172名についての大腿骨頸部における5年間の骨密度の変化率(減少率)とそれに関連する要因が明らかにされた。その結果我が国高齢者における主要なカルシウム摂取源である「牛乳・乳製品の摂取頻度」、「魚類、大豆製品、緑黄色野菜、海藻の摂取頻度」は骨密度変動とは有意な関連がみられなかった。しかし、身体的老化の総合的な指標と考えられる「歩行速度」やこれまでの骨密度と遺伝子多型とで有意な関連の指摘されていた「II-6；134」や「ER-Puv II」と骨密度の変化率には関連性が認められ、特に「II-6；134で切断されずまたER-Puv IIでppの多型を有する者で歩行速度の早い者」はそうでない者よりも有意に骨密度の低下が抑制されていた。このような身体要因と遺伝的多型の組み合わせによって高齢期女性の大腿骨頸部骨密度の

低下（維持）が予測されることは、今後の大腿骨頸部骨折予防戦略に重要な手がかりを与えるものと期待される。

E. 結論

地域在宅の高齢女性（68-84 歳）172 名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。

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。それらの要因のなかでは生活習慣の寄与は少なかったが、身体機能（歩行速度）と遺伝的多型（特に II-6 ; 134、ER-Puv II）の影響が大きかった。

本研究から 80 歳以上の高齢者で特にワード三角部での著明な骨密度減少は、わが国の大腿骨頸部骨折の同年代を裏付けるデータであると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 鈴木隆雄：ライフスタイルと大腿骨頸部骨折。リハビリテーション医学, 37 : 591-593, 2000
- 2) 鈴木隆雄：高齢者の生活習慣と骨粗鬆症. Geriat. Med., 38 : 498-502, 2000
- 3) 鈴木隆雄：転倒予防の重要性と対策. Med. Pract, 17 : 443-447, 2000
- 4) 鈴木隆雄：骨粗鬆症の疫学. The Bone, 14 : 17-21, 2000
- 5) 鈴木隆雄：骨粗鬆症—わが国の現状と今

後. 臨床と薬物治療, 19 : 942-947, 2000

- 6) 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 Geriat Soc, 48 : 1424-1429, 2000
- 7) 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

2. 学会発表

- 1) 鈴木隆雄, 吉田英世, 細井孝之, 折茂肇 : 地域在宅高齢者の大腿骨近位部骨密度の経年的変化に関する疫学的研究. 日本骨代謝学会. 広島. 2000.7.19-22

表1 初回調査時（1995年）の大腿骨近位部骨密度測定
完了者と非受診者の各年齢階級別人数内訳

年 齢	受診者 (%)	非受診者 (%)
68-69	60 (75.0)	20 (25.0)
70-74	125 (69.1)	56 (30.9)
75-79	62 (51.7)	58 (48.3)
80-84	40 (47.6)	44 (52.4)
計	287 (61.7)	178 (38.3)

表2

年齢階級 (1995年)	N	'95_BMD	'99_BMD	変化率%
65-69歳	39	0.643	0.626	-2.66
70-74歳	76	0.607	0.591	-2.54
75-79歳	39	0.570	0.555	-2.73
80-84歳	18	0.527	0.508	-3.68
全体 (平均73.12歳)	172	0.598	0.582	-2.73

注) BMD ; 大腿骨頸部骨密度 (NK)

$$\text{変化率\%} = ('99_BMD - '95_BMD) / '95_BMD \times 100$$

表3

生活習慣

	N	'95_BMD	'99_BMD	変化率%	t検定
牛乳, 乳製品					
何れかを毎日摂取 (+)	129	0.602	0.585	-2.90	p=0.42
何れかを毎日摂取 (-)	43	0.587	0.574	-2.22	
魚類, 大豆製品, 緑黄色野菜, 海藻					
何れも2日に1回以上摂取 (+)	112	0.605	0.589	-2.64	p=0.73
何れも2日に1回以上摂取 (-)	60	0.585	0.568	-2.90	
定期的な散歩, 体操					
している	98	0.594	0.579	-2.58	p=0.64
していない	74	0.604	0.586	-2.93	
定期的な運動					
している	32	0.630	0.610	-3.20	p=0.54
していない	140	0.604	0.575	-2.62	

身体機能

	N	'95_BMD	'99_BMD	変化率%	t検定
握力					
高値群	88	0.602	0.585	-2.88	p=0.62
低値群	75	0.594	0.578	-2.50	
最大歩行速度					
高値群	84	0.604	0.591	-2.18	p=0.15
低値群	81	0.597	0.577	-3.27	
開眼片足立ち時間					
高値群	87	0.606	0.592	-2.43	p=0.41
低値群	85	0.590	0.572	-3.04	

注) 高値群/低値群: 中央値で区分 (年齢を調整)

遺伝子多型

	N	'95_BMD	'99_BMD	変化率%	t検定
IL6					
IL6_134 (+)	27	0.573	0.549	-4.17	p=0.09
IL6_134 (-)	145	0.603	0.588	-2.46	
TNF α					
TNF α _115 (+)	30	0.573	0.556	-3.21	p=0.55
TNF α _115 (-)	142	0.604	0.588	-2.63	
ER ; Puv II					
P (+); PP, Pp	119	0.599	0.580	-3.17	p=0.07
P (-); pp	53	0.597	0.587	-1.74	
VDR ; Fok I					
F (+); FF, Ff	148	0.596	0.579	-2.84	p=0.51
F (-); ff	21	0.624	0.611	-2.09	

表4 身体機能（最大歩行速度）と遺伝子多型の組み合わせによる分析

		N	'95_BMD	'99_BMD	変化率%	t検定
IL6 & 最大歩行速度						
IL6_134 (+)	高値群	15	0.567	0.551	-2.86	p=0.09
IL6_134 (+)	低値群	11	0.571	0.539	-5.75	} p=0.31
					*	
IL6_134 (-)	高値群	69	0.611	0.599	-2.03	} p=0.31
IL6_134 (-)	低値群	70	0.601	0.583	-2.88	
ER; Puv II & 最大歩行速度						
P (+)	高値群	56	0.606	0.590	-2.62	p=0.20
P (+)	低値群	58	0.595	0.573	-3.80	} p=0.62
					*	
P (-)	高値群	28	0.599	0.591	-1.30	} p=0.62
P (-)	低値群	23	0.600	0.588	-1.95	

III. 研究成果の刊行に関する一覧

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 nation-wide 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- α 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 Methylenetetra-hydrofolate 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-methyl-glutaryl 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., Kajiwar, 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., Kajiwara, 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 Geriat 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