

厚生労働省特定疾患対策研究事業

# 脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

平成12年度研究報告書

主任研究者 原 田 征 行

# 目 次

## 班員構成

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班 .....	1
------------------------	---

## 総括研究報告書

主任研究者 原田征行 .....	3
------------------	---

## 分担研究報告書

### I. 遺伝子解析

#### 脊椎後縦靱帯骨化症の相関解析

—マイクロサテライトマーカーによる原因遺伝子探索— .....	7
---------------------------------	---

東海大学分子生命科学2

山形 哲司, 猪子 英俊

信州大学法医学教室

太田 正穂

信州大学病院薬剤部

勝山 善彦

鹿児島大学ウイルス学

屋敷 伸治, 園田 俊郎

鹿児島大学整形外科

古賀 公明, 松永 俊二, 武富 栄二, 酒匂 崇

連鎖解析による後縦靱帯骨化症の候補遺伝子スクリーニング .....	11
-----------------------------------	----

弘前大学整形外科

古島 弘三, 猪狩 勝則, 田中 利弘, 原田 征行

鹿児島大学整形外科

前田 真吾, 下小野田一騎, 小宮 節郎

東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門

井ノ上逸朗

脊柱靱帯骨化症における TGF- $\beta$ 1 遺伝子多型の解析 .....	16
---	----

千葉大学整形外科

大河 昭彦, 山崎 正志, 相庭 温臣, 池田 義和, 後藤 澄雄, 守屋 秀繁

### II. 脊髄の可塑性と脊髄機能

リポフェクチン法を用いた圧迫損傷脊髄に対する神経栄養因子遺伝子の導入 .....	19
--	----

福井医科大学医学部整形外科

内田 研造, 馬場 久敏, 前沢 靖久, 小久保安朗, 久保田 力, 米 和徳

中原 真二

培養脊髄神経細胞, グリア細胞の機械的ストレスに対する生存活性に関する研究 .....	23
---	----

福井医科大学医学部整形外科

内田 研造, 馬場 久敏, 前沢 靖久, 小久保安朗, 久保田 力

圧迫性脊髄損傷後 apoptosis に対する BDNF の効果 .....	26
--	----

千葉大学医学部整形外科

国府田正雄, 山崎 正志, 池田 修, 橋本 将行, 村上 正純, 守屋 秀繁

脊椎疾患における髄液中NO濃度 後縦靭帯骨化症との比較検討	33
国立岡山病院整形外科	
弓手 康正, 中原進之介, 田中 雅人, 甲斐 信生	

### Ⅲ. 骨形成（骨吸収）因子

OPLLにおけるPPAR $\gamma$ の機能解析	35
久留米大学医学部整形外科	
津留美智代, 永田 見生, 佐藤 公昭, 安藤 則行	
腰椎変性における軟骨終板の組織学的変化とChM-1, HSP27の関係	37
九州大学大学院医学研究院整形外科	
高尾 恒彰*, 有菌 剛, 前田 健, 斎藤 太一, 神宮司誠也, 岩本 幸英	
九州大学大学院医学研究院脳研病理*	
岩城 徹	
後縦靭帯骨化症における血中骨形成マーカーの意義	44
富山医科薬科大学整形外科	
川口 善治, 杉森 一仁, 大森 一生, 金森 昌彦, 石原 裕和, 木村 友厚	
脊柱靭帯骨化（OPLL）の成因におけるethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonete (EHDP)の 影響とエストロゲンの関与（経過報告）	46
東邦大学整形外科	
香取 勲, 和田 明人, 武者 芳朗, 岡島 行一	
東邦大学免疫学	
岡田 弥生	
細胞内蛋白分解系を介する骨吸収調節のメカニズム	49
鹿児島大学整形外科学教室	
横内 雅博, 松永 俊二, 米 和徳, 小宮 節郎	
久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報部門	
吉村 昭彦	
ヒト黄色靭帯骨化組織におけるIndian hedgehog (Ihh), Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) の発現	52
大阪大学医学部整形外科	
有賀 健太, 中瀬 尚長, 孟 文翔, 吉川 秀樹, 米延 策雄	
大阪労災病院整形外科	
奥田 真也	
肥大軟骨細胞由来の成長因子CTGF/Hcs24の骨芽細胞の増殖と分化に与える影響	54
岡山大学歯学部・口腔生化学, 中央研究施設	
滝川 正春	
岡山大学歯学部・中央研究施設	
西田 崇	
岡山大学歯学部・口腔生化学	
中西 徹, 浅野 将宏, 志茂 剛	
骨の力学的刺激に対する応答のシグナリング	61
神奈川歯科大学口腔生化学教室	
高垣 裕子	
神奈川歯科大学歯科生体工学教室	
川瀬 俊夫	

後縦靭帯骨化症の骨化の発生・進展におけるメカニカルストレスの影響	64
弘前大学・整形外科 丹野 雅彦, 植山 和正, 原田 征行	
弘前大学・薬理学 古川 賢一, 元村 成	
Zucker Fatty Ratの脊柱靭帯骨化における免疫組織学的検討	69
東京医科大学整形外科 今給黎篤弘, 町田 英明, 中谷 知薫, 山本 謙吾, 正岡 利紀, 渡辺 健	
内軟骨骨化のモデルとしてのNHOS骨肉腫細胞株移植マウス : 内軟骨骨化に働く因子の解析	75
弘前大学医学部病理学第二 楠美 智巳, 佐藤 衛, 田中 正則, 土田 成紀, 工藤 一	
後縦靭帯骨化症患者由来の靭帯細胞においてCTGF/Hcs24により発現調節される遺伝子の解析	80
弘前大学整形外科 赤石 孝一, 植山 和正, 丹野 雅彦, 山本 祐司, 原田 征行	
弘前大学薬理学 古川 賢一	
Histone deacetylase inhibitorによるosteopontin発現の検討	86
和歌山県立医科大学整形外科教室 南 晋司, 坂田 亮介, 松崎 交作, 玉置 哲也	
Zucker Fatty Ratのアキレス腱異所性石灰化と骨形成関連因子	88
東京医科大学整形外科 今給黎篤弘, 中谷 知薫, 町田 英明, 山本 謙吾, 渡辺 健, 西野 誠一	
肥満NIDDMモデルラット (OLETF) における脊柱靭帯組織の解析	92
千葉大学医学部整形外科 山崎 正志, 萩原 義信, 相庭 温臣, 中島 新, 清水 純人, 大河 昭彦 守屋 秀繁	
頸椎黄色靭帯の光顕・電顕・免疫組織化学的検討	95
自治医科大学附属大宮医療センター整形外科 中間 季雄	
自治医科大学整形外科 星 野雄一, 税田 和夫, 大上 仁志, 吉川 一郎, 萩原 佳代, 二瓶 あき	
栃木臨床病理研究所 菅又 昌雄, 井原 智美	
Nucleotide pyrophosphatase (NPPS) 遺伝子多型とOPLLの発症およびその重症度との 相関	99
東京大学医学部整形外科 腰塚 裕, 川口 浩, 緒方 直史, 星地亜都司, 中村 耕三	
理化学研究所SNP解析センター 池川 志郎	
東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター 中村 祐輔	

インスリン受容体基質 (IRS) を介するシグナルの骨代謝調節機構における役割の解明 —IRS-2 ノックアウトマウスを用いた検討—	103
東京大学整形外科 阿久根 徹, 川口 浩, 緒方 直史, 竹下 克志, 星地亜都司, 大西五三男 中村 耕三	
BMPシグナルの多様性と協調	106
東京大学大学院医学系研究科 宮園 浩平	

#### IV. 軟骨基質

ヒト黄色靭帯プロテオグリカンの特性とエラスチンとの親和性	109
弘前大学整形外科 板橋 泰斗, 原田 征行, 植山 和正, 湯川 昌弘 弘前大学第一生化学 高垣 啓一, 遠藤 正彦	

#### V. QOL と機能評価

頸椎後縦靭帯骨化症の症状発現における発育性脊椎管狭窄の関与	113
北海道脳神経外科記念病院 小柳 泉 北海道大学大学院医学研究科脳科学専攻神経病態学講座脳神経外科 飛騨 一利, 岩崎 喜信, 今村 博幸, 藤本 真	
胸椎後縦靭帯骨化症の術後再悪化因子	117
慶應義塾大学医学部整形外科 藤村 祥一, 中村 雅也, 松本 守雄, 戸山 芳昭	
家族性痙性対麻痺を合併した黄色靭帯骨化症の一例	120
鹿児島大学医学部整形外科 神園 純一, 米 和徳, 古賀 公明, 松永 俊二, 小宮 節郎	
胸椎後縦靭帯骨化症患者の術後評価 —特にQOLに関して—	123
名古屋大学整形外科 松山 幸弘, 長谷川幸治, 岩田 久	
p53 <sup>-/-</sup> マウス由来軟骨細胞系の樹立とその特徴	126
京都大学医学部整形外科, 京都大学再生医科学研究所 仲俣 岳晴, 青山 朋樹, 岡本 健, 戸口田淳也 京都大学医学部整形外科 中村 孝志	
頸椎脊柱管拡大術における脊椎アライメントの影響	129
北海道大学大学院医学研究科機能回復医学講座運動器再建医学分野 須田 浩太, 鏝 邦芳	
頸椎後縦靭帯骨化症に対する骨化浮上術の長期成績 —術後10年以上経過例—	131
東京医科歯科大学大学院脊椎脊髄神経外科学 松岡 正, 四宮 謙一 九段坂病院整形外科 山浦伊斐吉, 進藤 重雄 佐久総合病院整形外科 黒佐 義郎	

頸椎後縦靱帯骨化症患者の脊髄症状出現に関する外傷の関与	138
鹿児島大学医学部整形外科	
松永 俊二, 神園 純一, 石堂 康弘, 山浦 一郎, 廣津 匡隆, 古賀 公明 小宮 節郎	
胸腰椎におよぶ後縦靱帯骨化症の特徴 —頸椎限局型との比較—	141
千葉大学医学部整形外科	
相庭 温臣, 山崎 正志, 大河 昭彦, 池田 義和, 国府田正雄, 米田みのり 天野 景治, 田村 晋, 守屋 秀繁	
鹿島労災病院整形外科 小林 健一	
胸椎後縦靱帯骨化症の術後成績不良因子の解析	145
千葉大学医学部整形外科	
山崎 正志, 米田みのり, 国府田正雄, 相庭 温臣, 天野 景治, 田村 晋 大河 昭彦, 村上 正純, 後藤 澄雄, 守屋 秀繁	
腰椎後縦靱帯骨化症に対する腰椎椎管拡大術について	150
山口大学整形外科	
豊田耕一郎, 田口 敏彦, 田中 浩, 脇阪 敦彦, 河合 伸也	
頸椎拡大術後頸部愁訴の危険因子	153
弘前大学整形外科	
横山 徹, 原田 征行, 植山 和正, 岡田 晶博, 越後谷直樹	

## VI. 疫学調査

後縦靱帯骨化症の疫学的研究：日常生活動作能力（ADL）と健康関連QOL尺度（SF-36） の関連および社会資源利用状況について —平成12年度実施の調査報告—	157
名古屋市立大学看護学部	藤原奈佳子
山口大学医学部整形外科	河合 伸也
弘前大学医学部整形外科	原田 征行, 植山和正
徳島大学医学部整形外科	井形 高明
東京医科大学整形外科	今給黎篤弘
名古屋大学医学部整形外科	岩田 久
東邦大学医学部整形外科	岡島 行一
北海道大学医学部整形外科	金田 清志
富山医科薬科大学整形外科	木村 友厚
東京医科歯科大学整形外科	四宮 謙一
九州大学医学部整形外科	神宮司誠也
和歌山県立医科大学整形外科	玉置 哲也
国立岡山病院整形外科	中原進之介
東京大学医学部整形外科	中村 耕三
京都大学医学部整形外科	中村 孝志
福井医科大学整形外科	馬場 久敏
北海道大学医学部脳神経外科	飛驒 一利
東京慈恵会医科大学整形外科	藤井 克之
慶応義塾大学医学部整形外科	藤村 祥一
鹿児島大学医学部整形外科	松永 俊二
千葉大学医学部整形外科	守屋 秀繁
大阪大学医学部整形外科	米延 策雄

研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 185

参考：平成12年度班会議プログラム ..... 191

# 班 員 構 成



## 脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	原田 征行	弘前大学医学部整形外科	教 授
分担研究者	猪子 英俊	東海大学医学部分子生命科学2	教 授
	今給黎篤弘	東京医科大学整形外科	"
	河合 伸也	山口大学医学部整形外科	"
	中村 耕三	東京大学医学部整形外科	"
	馬場 久敏	福井医科大学整形外科	"
	松永 俊二	鹿児島大学医学部整形外科	講 師
	宮園 浩平	東京大学大学院医学研究科分子病理学	教 授
	守屋 秀繁	千葉大学医学部整形外科	"
	米延 策雄	大阪大学医学部整形外科	助 教 授
	井ノ上逸朗	東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門	"
研究協力者	鏡 邦芳	北海道大学医学部整形外科	助 教 授
	岩田 久	名古屋大学医学部整形外科	教 授
	植山 和正	弘前大学医学部整形外科	講 師
	遠藤 正彦	弘前大学医学部生化学第一	教 授
	岡島 行一	東邦大学医学部整形外科	"
	木村 友厚	富山医科薬科大学整形外科	"
	四宮 謙一	東京医科歯科大学整形外科	"
	神宮司誠也	九州大学医学部整形外科	助 教 授
	高垣 裕子	神奈川歯科大学口腔生化学	講 師
	滝川 正春	岡山大学歯学部口腔生化学	教 授
	玉置 哲也	和歌山県立医科大学整形外科	"
	土田 成紀	弘前大学生化学第二	"
	中原進之介	国立岡山病院整形外科	部 長
	中村 孝志	京都大学医学部整形外科	教 授
	永田 見生	久留米大学医学部整形外科	"
	飛驒 利	北海道大学医学部脳神経外科	講 師
	藤村 祥一	慶應義塾大学医学部整形外科	助 教 授
	藤原奈佳子	名古屋市立大学看護学部	助 教 授
藤井 克之	東京慈恵会医科大学整形外科	教 授	
梶野 雄一	自治医科大学整形外科	"	
元村 成	弘前大学医学部薬理学	"	
経理事務連絡 担当責任者	原田 征行	弘前大学医学部整形外科 〒036-8562 青森県弘前市在府町5 TEL : 0172-39-5083 FAX : 0172-36-3826	教 授

# 総括研究報告書

# 総括研究報告書

主任研究者 原 田 征 行

## 研究目的：

脊柱靱帯骨化症の発症原因は不明である。原因追求のため遺伝子解析を行い、多因子遺伝形式であることが推測され、原因遺伝子の同定を行っている。骨形成の機序について、全身的要因、局所的要因についても明らかにしようとした。動物実験、靱帯細胞培養等の手法を用い、細胞生物学的、分子細胞学的に各種の骨形成因子及びサイトカインの発現、蛋白軟骨基質の分析、細胞とメカニカルストレスに関する骨形成と各遺伝子発現を検討した。臨床的研究では、患者へのアンケート調査を行い、ADL、QOLを含めた患者のアメニティの調査から、社会資源の活用を図ることを目的とした。

## 研究方法：

班員を、遺伝子解析、骨形成因子、軟骨基質、細胞とメカニカルストレス、脊髄の可塑性およびQOLならびにADL調査のグループに大きく分け、班員同士での資料・情報の提供等により共同研究を行ってきた。また各班員が班員以外との研究者とも情報交換を行い、サンプル等の融通によりそれぞれの研究を進めた。研究グループ以外で、個々の研究も行っており、その成果を研究班会議において発表した。

原因遺伝子解析は、井ノ上を中心に、これまで行ってきた手法を元に行ってきた。第6染色体上のコラーゲンA2と、その近傍のRetinoinn X Rceptor  $\beta$  (RXR- $\beta$ )を同定し、これを原因遺伝子の1つとしたが、さらに21q21.3領域にBMP4, TGF $\beta$ 3, IGF1, PTHR1, OPN (オステオポンチン), PRG1 (プロテオグリカン),  $\alpha$  B-Crystallinなどに強い連鎖を認め、更に詳細な分析を進めた。

骨形成因子については、全身的因子、局所的因子について、動物実験ないし靱帯細胞培養の手法を用いて、各種サイトカインの添加、あるいは遺伝子発現について検討した。全身的要因としては、インスリンの作用について検討し、レプチン、BMPファミリーについても検討を行った。これまで骨吸収因子については余り研究されていなかったが、蛋白質分解系による骨吸収調節のメカニズムについても検討した。

軟骨基質の研究については、プロテオグリカンの詳細な分析を続け、骨化過程において3つのデコリンを同定し、分子構造を分析した。

培養されたヒト靱帯骨化細胞は、メカニカルストレスに対して変質し、対象に皮枝骨形成に関わるサイトカインが出現することを明らかにした。

脊髄の可塑性については、慢性圧迫された脊髄の変形と脊髄機能について、動物実験免疫組織化学的検討を行った。

脊柱靱帯骨化症の治療方法ないし治療経過について、患者1,420名に対してアンケート調査を行い、1,200名余から回答を得た。この結果をもとに、患者のQOL、ADLを分析し、患者、家族に還元することにより、適切な治療法、アメニティについての分析を行っている。更に患者・家族の会を通じてアンケート調査の範囲を広げ、社会資源の活用状況を検討してきた。研究成果を患者・家族に還元し、協力を得ることを目的とした。

## 結果と考察：

### 1. 遺伝子解析

責任遺伝子同定に向けて検索中であるが、既にGenome Wide Screeningにより21番染色体に強い連鎖反応を認めており、21q21.3の領域を中心に解析を進めている。その検索中に、BMP4, TGF $\beta$ 3, IGF1, PTHR1, OPN (オステオポンチン), PRG1 (プロテオグリカン),  $\alpha$  B-Crystallinなどの遺伝子にp-value < 0.05の有意差を認めた。(東大井ノ上, 弘前大古島, 鹿児島大下小野田, 他)

また、Nucleotide pyrophosphatase (NPPS) geneの遺伝子多型のうちでイントロン15に見いだした多

型, IVS15-14T->C と OPLL の発症およびその重症度については, OPLL 症例ではコントロールに比べて minor allele である C allele を持つものが有意に多く, C allele を持つ OPLL 症例群は, 持たない症例群に比べて, 骨化椎体数が有意に多い。(東大川口)

ヒト間葉系幹細胞は, 骨髄間質に含まれる多分化能を持つ細胞で, 骨芽細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞などに分化する性質を持つ。ヒト骨髄液から分離した細胞から, 細胞分化に伴う hMSC の変化を検討した。OPLL における骨化形態としての内軟骨性骨化と, 膜性骨化の混在が考えられ, 骨化発症メカニズムを検討した。(鹿児島大下小野田, 東大井ノ上, 他)

OPLL 患者由来の靭帯細胞培養から, CTGF/Hcs24 により発現調節される遺伝子の解析を行い, 乳癌細胞と一致する細胞を同定することができた (弘前大赤石)。

## 2. 骨形成因子について

骨形成因子として認められている各種サイトカインについての研究を進めている。その中で, インスリン受容体基質 (IRS) を介するシグナルの骨代謝調節機構については, IRS-2 ノックアウトマウスを用い, in vitro での解析で骨芽細胞の増殖・分化能は低下していたが, 破骨細胞形成指示能は亢進しており, IRS-2 を介するシグナルは骨代謝基調節機構に及ぼす役割には IRS-1 と異なる作用があることが明らかとなった。(東大阿久根)

骨形成因子 (BMP) は 20 種類以上のファミリー蛋白からなり, いくつかのグループに分けられる。V2C12 細胞の骨芽細胞様分化誘導において, 異なったグループに属する BMP-4 と BMP-6 のシグナル経路を解析し, ALK-2 と ALK-3 は少なくとも部分的に異なったシグナル経路を介して C2C12 の骨芽細胞様分化を誘導し, 両者の活性化によってより強力な作用が得られることが示された。(東大大学院宮園)

これまで骨吸収についての研究は少なかったが, 細胞内蛋白質分解系によって骨吸収調節のメカニズムについて, c-Cbl が蛋白質分解系を介し新しいメカニズムで Src を調節していることを明らかにした。(鹿児島大横内)

## 3. 軟骨基質について

プロテオグリカンの一連の研究から, 黄色靭帯において分析した 3 つのプロテオグリカンを分離し, その中でデコリン-2 は主にデルマタン硫酸鎖で構成されており, 抑制的な作用が示唆された。Zn<sup>2+</sup> 存在下で, エラスチンとプロテオグリカンの親和性が上昇したことから, 組織構築について Zn<sup>2+</sup> が密接に関連していることが示唆された。(弘前大板橋, 高垣)

黄色靭帯骨化組織から Indian hedgehog (Ihh), Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) の存在が免疫組織化学的に確認された。靭帯骨化においても, 内軟骨性骨形成と同様に Ihh, PTHrP による細胞分化制御機構の存在が示唆された。(大阪大有賀, 他)

## 4. 細胞とメカニカルストレス

ストレスを与えるとコントロールに比べ OPLL 細胞では ALP, osteopontin, BMP-2 とその受容体の mRNA 発現量だけでなく, ALP 活性および BMP2/4 分泌のいずれも伸展刺激により増大する傾向にあった。細胞内への Ca<sup>2+</sup> の流入がそのシグナリングに重要であると示唆された。(弘前大丹野, 古川)

## 5. 脊髄の可塑性と脊髄機能

脊髄に対する機械的ストレスと脊髄グリア細胞についての検討を行った。培養細胞で, 機械的ストレスに対するアストロサイトが生存維持, 機能修復に密接に関係していることが示唆された。(福井医大内田)

また, リポフェクチン法を用いた圧迫損傷脊髄に対する神経栄養因子遺伝子導入, その脊髄内発現動態を免疫組織学的に検討した。その結果, 導入された遺伝子はそのほとんどが反応性アストロサイトに貪食され, BDNF 発現の増強効果に関与するものと考えられた。(福井医大内田, 鹿児島大)

## 6. QOLと機能評価

後縦靭帯骨化症患者1420名に対してアンケート調査を行い、1,200余名の回答から、患者、家族へ還元することが可能と考えられた。(名市大藤原) 頰椎 OPLL と症状発現に関する外傷については、脊椎管狭窄の基盤があり、頰椎 OPLL がある患者は、頰椎への軽微な外傷で重篤な脊髄損傷が発生することがあり、頰椎 OPLL と診断されいながら、無症状な患者に対する日常生活での注意事項を検討した。しかしこれらを元にして予防的な手術的治療に対してはまだまだお疑問が残ることが提示された。(北海道大小柳、鹿児島大松永) 前方侵襲による骨化浮上術の10年以上経過例については、満足できると報告された。(東京医歯大松岡)

## 7. 研究動態

本研究班は、原因究明、疫学調査、遺伝子治療、骨形成因子の解析、関連する遺伝子の発現、軟骨基質、脊髄の可塑性と基礎的研究、細胞とメカニカルストレスについての研究はそれぞれ成果を上げていることは確実である。本研究班は、弘前市において行った第1回班会議においてシンポジウム7題、第2回班会議では24題の口演と26題の紙上発表が行われ、約100人の参加者のもとに行われた。複数の施設、基礎と臨床の合同での研究が行われたのが特徴であり、今後、これらの研究の大きな進展が期待される所である。

## 結 論

研究グループの遺伝子解析については、多因子遺伝子を原因として発症するものと判明した。特に、21q21.3領域の中で、BMP4、TGF $\beta$ 3、IGF1、PTHr1、OPN、 $\alpha$  B-Crystallinなどの遺伝子に強い連鎖反応を認めていることから、これらの遺伝子を更に検索し、検討を進めている。

全身的要因として古くから言われている、糖尿病患者にOPLL患者が多いことから、全身的要因としてインスリン受容体、これまで判明している各種骨形成因子は局所的な骨形成に関わることが更に明らかになった。細胞基質の中で、プロテオグリカンの分析から、靭帯骨化とした基質の中で、3つのデコリンを分析した。

デコリン2は主にデルマタン硫酸鎖で構成されており、骨化に抑制的な作用があるものと示唆された。靭帯骨化については、内軟骨性骨化形態をとることが明らかとなった。

細胞へのメカニカルストレスにより、細胞は変質し、骨形成に関わる各種サイトカインが明らかに高値となることが判明した。脊髄機能回復機序と脊髄の可塑性については、分子生物学的、細胞生物学的研究が行われ、圧迫された脊髄グリア細胞は、アストロサイトが生存維持、機能回復に強く関連していることが判明した。疫学的検討は、全国1,420名にアンケート調査をし、1,200名余から回答を受け、QOL、ADLならびに社会資源について分析した。頰椎 OPLL 患者と症状発現については、脊椎管狭窄の基盤があれば、頰椎への軽微な外傷により重篤な脊髄損傷が発生することがあり得る。頰椎 OPLL であると診断されながら、無症状の患者に対する手術的治療を行うことについては、未だなお疑問が残ることも提示された。骨化浮上術の10年以上経過例については、満足できる結果である。QOL研究については、昨年までの研究で、脊髄の機能評価を5つの段階に分類し、Evidence Based Medicineに基づいた社会資源の効果的な再利用を図ることが可能である。患者家族の会と公開講座を開催し、研究成果を伝えると共に、協力を求めることが本研究班の更なる発展を助長するものであると考えられた。研究班内でのグループ研究は、異なった施設の班員同士の共同研究や、班員以外の研究者との共同研究が進められていることが大きな特徴の一つである。

# 分担研究報告書

I

遺伝子解析

# 脊椎後縦靭帯骨化症の相関解析

## —マイクロサテライトマーカーによる原因遺伝子探索—

山形 哲司 (東海大学分子生命科学2), 猪子 英俊 (東海大学分子生命科学2),  
太田 正穂 (信州大学法医学教室), 勝山 善彦 (信州大学病院薬剤部),  
屋敷 伸治 (鹿児島大学ウイルス学), 園田 俊郎 (鹿児島大学ウイルス学),  
古賀 公明 (鹿児島大学整形外科), 松永 俊二 (鹿児島大学整形外科),  
武富 栄二 (鹿児島大学整形外科), 酒匂 崇 (鹿児島大学整形外科)

### 【研究要旨】

OPLLは、その発症に複数の原因遺伝子が関与していると考えられるが、それら遺伝子数は明らかではない。我々は、多型性を示すマイクロサテライトマーカーを用いたHLA領域における高精度な相関解析をヒトゲノムの全域に拡張する計画を推進してきた。使用するマーカーの数は、約30,000個を目標としており、現時点で14,000個の日本人集団において多型性を示すマイクロサテライトマーカーが得られた。ゲノムの約21%については、目標である1マーカー/100kbの密度で設定が完了した。2001年度内に全域のマーカーを設定しOPLLについての相関解析が開始できる予定である。

### A. 研究目的

脊椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) では、既にコラーゲン11A2 (COL11A2) 遺伝子1やNpps遺伝子の関与2が報告されている。しかしながら、現在までに行われた解析の結果は、OPLLが複数の疾患に関連した遺伝子の作用によって発症することを示唆している。従って、疾患の機序を明らかにするためには、関係する全ての遺伝子を対象とした解析が必要である。現時点では、既知のヒト遺伝子群から、特定の生理機能に関連した全ての遺伝子を特定することは困難であるので、遺伝的マーカーの持つ多型性を利用した相関解析が、OPLLの等の多因子疾患をヒトゲノムの全体を対象として解析するための有効な手段である。

我々は、ゲノムワイドにOPLLの発症に関与する遺伝子(群)を同定するためにヒトゲノムを100kb単位で検索可能な約30,000個の多型マイクロサテライトマーカーの確立を目的とした。

### B. 研究方法

多型性を示すマーカーとしてマイクロサテライトをゲノムワイドに収集するため、GenBank/EMBL/DDBJ塩基配列データベースに公開されているヒトのゲノム塩基配列より、多型を示すことが期待される単純繰返し配列、すなわち2塩基～5塩基が繰返しマイクロサテライト配列を独自に設計したソフ

トウェア (nnmt) により抽出した。抽出の際には、反復回数の基準として2塩基のマイクロサテライトでは、10回以上、3～5塩基のマイクロサテライトでは、5回以上の繰返しが認められる配列を選択した。各マイクロサテライト配列には、PCRにより増幅した際に200bp～450bpのサイズとなるようにプライマーを設計した。これらのプライマーセットによって検出されるマイクロサテライト部位が、日本人の一般集団内において相関解析に十分な多型性を示すことは、以下の方法により確認した。使用したDNAは、当大学倫理委員会において承認を受けた後、インフォームドコンセントの上、同意を得た100名の日本人健常者の末梢血から抽出した。抽出したDNAを蛍光色素picogreenを用いて定量することで、100検体分のDNAを等しく混合したDNA溶液を調整してPCR反応の鋳型に使用した。PCRにより増幅した産物は、自動シーケンサーにより泳動し、設計したマイクロサテライトマーカーの多型性を検出した。

#### (倫理面への配慮)

多型性のマイクロサテライトを用いた相関解析では、健常人とOPLL患者の2群よりDNAを採取する必要があり、サンプル提供者の遺伝的個人情報を守ることに注意が為された。我々が用いる相関解析では、各サンプルDNAを個々のサンプルではなく集団として処理するため、結果がサンプル提供者の

本疾患以外の遺伝的素因に及ばない。我々が相関解析に用いた DNA は、インフォームドコンセントの上、同意を得た健常者と OPLL 患者から採取された。また、各サンプルは、実験者が提供者を特定することがないように記号によって識別した。よって本研究は、解析法と資料の取り扱い段階で倫理面に配慮した。

### C. 研究結果

相関解析には、日本人集団において多型性を示すマイクロサテライトマーカーの設定が、不可欠である。我々は、既知のマイクロサテライトマーカー 6,180 個と塩基配列データベースに登録されたヒトゲノム塩基配列より抽出した新規マイクロサテライトマーカー 13,751 個について、その多型性を検討した。通常のマイクロサテライトマーカーの検出は、1 回の PCR 反応につき 1 個体の DNA と 1 マイクロサテライトマーカーである。我々は、多数のマーカーについて解析するために、複数の検体をプールして PCR 反応を行う手法を開発した。現在までに 100 人の日本人健常者より抽出してプールした DNA を用いて、19,931 個のマイクロサテライトマーカーについて多型性の判定が終了した。多型性を示したマーカーは、既知と新規を合わせて 13,909 個であった。特に新規に設定した 8,219 個のマーカーは、全ヒトゲノムの 21 % に相当する領域から作製され、約 80 kb に 1 個の密度で存在する。この結果より、我々の手法によるマイクロサテライトマーカーの設定によって、ゲノムワイドな相関解析に必要な数のマーカーが得られることが判明した。

さらに、現在までに収集したこれらの多型マイクロサテライトを用いた解析のモデルとして、尋常性乾癬について相関解析によるゲノムワイドなマッピングを行った。我々が以前より注目していた HLA 領域の他に、いくつかのゲノム領域について疾患感受性候補領域がみいだされ、多型マイクロサテライトの有効性が確認された。

### D. 考察

我々が、HLA 領域に設定したマイクロサテライトマーカー 3 を用いた OPLL の相関解析では、HLA 領域内に明らかな有意差を示す遺伝子座を特定できなかった。また、COL11A2 遺伝子の周辺に作成したマーカーでも同様に相関が確認できなかった。同様に行った他の疾患の相関解析では、特定のマーカーとの相関が示されることから、これらの結果は、

OPLL の責任遺伝子座が、ゲノムの他の領域にあることを示唆していると考えられた。東大医科研の井上らによるゲノムワイドな連鎖解析では、この推測と一致する結果が示されている。現在、我々は、ヒトゲノムを 100kb の分解能で検索する 30,000 個のマイクロサテライトによる相関解析のシステムを構築しつつある。既に、日本人集団内での多型性が検証された約 140,000 個のマイクロサテライトが蓄積されており、目標の 30,000 個の多型マイクロサテライトの収集は、2001 年 8 月頃に完了する予定である。

さらに、多数マイクロサテライトマーカーによる解析を迅速に進めるためプール DNA の使用を検討した。DNA の濃度測定を定量性の高い蛍光色素で行った結果、対立遺伝子頻度に影響しない精度でプール DNA が調製できることが確認された。これらの結果から、多型マイクロサテライトの蓄積が完了すれば、この多型マイクロサテライトによる OPLL のゲノムワイドな相関解析が可能になる。我々の計画では、この第 1 段階の解析によって候補領域は、約 100 ~ 200kb 程度に限定されるので、それらの各領域については、第 2 段階として、より高密度な多型マーカーによる相関解析と発現遺伝子の同定を行う予定である。

### E. 結論

OPLL が多因子疾患であることから、ゲノムワイドな遺伝子の探索法として、多型マイクロサテライトを用いた相関解析を計画した。多型マイクロサテライトの収集を行った結果、現在までに約 14,000 個の多型マーカーの設定が終了し、それぞれのヒト染色体上での位置を決定された。また、ゲノムの約 21 % の領域については、マーカーの密度が予定した密度 (100kb/マーカー) を達成した。

#### [参考文献]

- 1) Koga H. et al. Genetic Mapping of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Am J. Hum. Genet.* 62: 1460-1467, 1998
- 2) Okawa A. et al. Mutation of nucleotide pyrophosphatase gene in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nature Genet.* 19: 271-273, 1998
- 3) Tamiya G. et al. Twenty-six new polymorphic microsatellite markers around



the HLA-B, -C and -E loci in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 51: 337-346, 1998

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Shiina T, Kikkawa E, Iwasaki H, Kaneko M, Narimatsu H, Sasaki K, Bahram S, Inoko H : The beta 1,3-galactosyltransferase-4 (B3GALT4) gene is located in the centromeric segment of the human MHC class II region. *Immunogenetics* 51 : 75-78, 2000.
2. Gao PS, Kawada H, Kasamatsu T, Mao XQ, Roberts MH, Miyamoto Y, Yoshimura M, Saitoh H, Yasue H, Nakao K, Adra CN, Kun JF, Moro-oka S, Inoko H, Ho LP, Shirakawa T, Hopkin JM : Variants of NOS1, NOS2 and NOS3 genes in Asthmatics. *Biochem Biophys Res Commun* 267 : 761-763, 2000.
3. Teraoka Y, Naruse TK, Oka A, Matsuzawa Y, Shiina T, Iizuka M, Iwashita K, Ozawa A, Inoko H : Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1 telomeric of the HLA-C gene and lack of association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* 55 : 206-211, 2000.
4. Dai KZ, Vergnaud G, Ando A, Inoko H, Spurkland : The SH2D2A gene encoding the T-cell-specific adapter protein (TSAd) is localized centromeric to the CD1 gene cluster on human chromosome 1. *Immunogenetics* 51 : 179-185, 2000.
5. Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park H, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S : Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet* 66 : 501-507, 2000.
6. Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, Sasazuki T, Inoko H, David CS, Tabira T : Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1\*1502) transgenic mice. *J Clinical Investigation* 105 : 977-984, 2000.
7. Ikewaki I, Tamauti H, Yamada A, Mori N, Yamao H, Inoue H, Inoko H : A unique monoclonal antibody mNI-11 rapidly enhances spread formation in human umbilical vein endothelial cells. *J Clinical Immunology* 20 : 317-324, 2000.
8. Yabuki K, Inoko H, Ohno S : HLA testing in patients with uveitis. *Int Ophthalmol Clin.* 40 : 19-35, 2000.
9. Kobayashi T, Yokoyama I, Inoko H, Naruse T, Hayashi S, Morozumi K, Uchida K, Nakao A : Significance of transporter associated with antigen processing 2 (TAP2) gene polymorphism in living-related renal transplantation. *Human Immunol* 61 : 670-674, 2000.
10. Watanabe Y, Tenzen T, Nagasaka Y, Inoko H, Ikemura T : Replication timing of the human X-inactivation center (XIC) region : correlation with chromosome bands. *Gene* 252 : 163-172, 2000.
11. Naruse TK, Mastuzawa Y, Ota M, Kastuyama Y, Matsumori A, Hara M, Nagai S, Morimoto S, Sasayama S, Inoko H : HLA-DQ1\*0601 is primarily associated with the susceptibility to cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 56 : 52-57, 2000.
12. Iwasaki M, Kobayashi K, Suzuki K, Anan S, Ohno S, Geneg GL, Inoko H : Polymorphism of the ABO blood group genes in Hans, Kazak and Uygur populations in the Silk Route of northwestern China. *Tissue Antigens* 56 : 136-142, 2000.
13. Niizeki H, Naruse T, Hashigucci K, Yokoyama M, Yamasaki Y, Akiya K, Tojo T, Urushibara T, Yamazaki Y, Inoko H, Nishikawa T : Polymorphisms in the TNFA promoter region is not associated with palmoplantar pustulosis. *Tissue Antigens* 56 : 162-165, 2000.

14. Ota M, Bahram S, Katsuyama Y, Saito S, Nose Y, Sada M, Ando H, Inoko H : On the MICA deleted-MICB null, HLA-B4801 haplotype. *Tissue Antigens* 56 : 268-27, 2000.
15. Kuwana M, Kaburaki J, Pandey JP, Murata Y, Kawakami Y, Inoko H, Ikeda Y : HLA class II alleles in Japanese patients with immune thrombocytopenic purpura. Associations with anti-platelet glycoprotein autoantibodies and responses to splenectomy. *Tissue Antigens* 56 : 337-343, 2000.
16. Kimura A, Ota M, Katsuyama Y, Ohbuchi N, Takahashi M, Kobayashi Y, Inoko H, Numano F : Mapping of the HLA-linked genes controlling the susceptibility to Takayasu's arteritis. *Int J Cardiology* 75 : S105-S110, 2000.
17. Mizuki N, Ota M, Yabuki K, Katsuyama Y, Ando H, Palimeris GD, Kaklamani E, Accorinti M, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H : Localization of the pathogenic gene of Behcet's disease by microsatellite analysis of three different populations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 3702-3708, 2000.
18. Matsuzaka Y, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Kimura M, Bahram S, Tamiya G, Inoko H : New polymorphic microsatellite markers in the human MHC class II region. *Tissue Antigens* 56 : 492-500, 2000.
19. Saito S, Ota S, Yamada E, Inoko H, Ota M : Allele frequencies and haplotypic associations defined by allelic DNA typing at HLA class I and class II loci in the Japanese population. *Tissue Antigens* 56 : 522-529, 2000.

## 2. 学会発表

1. 牧野悟士, 岡本浩一, 林 英樹, 徳保江里子, 渡辺裕美, 遠藤高帆, 今西 規, 五條堀孝, 田宮 元, 猪子英俊. ゲノムワイドな多型マイクロサテライトマーカーの設定. 第23回日本分子生物学会年会. 神戸. 2000.

2. 岡本浩一, 岡 晃, 富澤麻衣子, 牧野悟士, 林 英樹, 佐藤理恵, 徳保江里子, 渡辺裕美, 田宮 元, 猪子英俊. 尋常性乾癬感受性領域のゲノムワイドな遺伝的相関. 第23回日本分子生物学会年会. 神戸. 2000.

# 連鎖解析による後縦靭帯骨化症の候補遺伝子スクリーニング

古島 弘三 (弘前大学整形外科), 猪狩 勝則 (弘前大学整形外科),  
前田 真吾 (鹿児島大学整形外科), 田中 利弘 (弘前大学整形外科),  
下小野田一騎 (鹿児島大学整形外科), 小宮 節郎 (鹿児島大学整形外科),  
原田 征行 (弘前大学整形外科),  
井ノ上逸朗 (東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門)

## 【研究要旨】

すでに我々は, OPLL罹患同胞においてゲノム全域スクリーニングにより 21 番染色体で強い連鎖を認めており, 21q21.3 の領域を中心に解析を進めている。しかし, non-parametric linkage study においては約 10—20cM 領域でのスクリーニングとなるため, 遺伝的座位が決定されても原因遺伝子を同定するまでにはさらに労力を要する。そこで, 代表的な骨代謝関連遺伝子の部位を Web site から獲得し, 連鎖解析を行うことで原因遺伝子を突き止めることを試みた。候補遺伝子は骨形成に関与する遺伝子, およびマイクロアレイ解析により, ヒト間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する過程で発現量に差を認めた遺伝子計 90 個の遺伝子を選定した。連鎖解析は SAGE package の SIB PAL および GENEHUNTER を用いて行った。その結果 BMP4, TGFb3, IGF1, PTHR1, OPN, PRG1, CRYAB など 7 個の遺伝子にて p-value < 0.05 の有意差を認めた。今後, これらの遺伝子に関してはさらに遺伝子内 SNP タイピングを追加し, 関連解析を行い責任遺伝子を追究する。

## A. 研究目的

最近ゲノム領域の進歩が目覚ましく, ヒトのゲノム配列も解明された。ポストゲノム時代となり, 医学領域においては疾患遺伝子解析, 特に Common Disease 解析に注目が集まりつつあり, さまざまな疾患感受性遺伝子が同定されることが期待される。骨代謝関連疾患において後縦靭帯骨化症 (OPLL) は Common Disease として広く知られている。OPLL は高齢発症疾患にも関わらず遺伝背景が比較的強い。我々のグループではゲノム全域スクリーニングによる罹患同胞対連鎖解析により, 14・16・21 番染色体に連鎖を認めている。今回, 我々は候補遺伝子アプローチによる罹患同胞対連鎖解析を併用することにより, より精度の高い, OPLL 感受性遺伝子座の同定を目指した。ゲノム全域スクリーニングと候補遺伝子スクリーニングにより, より詳細な原因遺伝子座の検索が可能となる。

## B. 研究方法

候補遺伝子の選択は, ①疾患の発症機構に関係する, もしくは文献的に骨代謝に関連すると考えられている遺伝子<sup>(1)</sup>, ②ヒト間葉系幹細胞が骨芽細胞系に分化する過程で, 発現量に差を認められた遺伝子である。分化誘導後 24 時間で発現の変化する遺伝子をマイクロアレイ法により同定している (図 1)。

これらを選定した後, 候補遺伝子内, または 3cM 以内の有用な DNA 多型マーカー (マイクロサテライトマーカー) を用い, 罹患同胞対連鎖解析を施行した。マイクロサテライトマーカーはインターネット (The Whitehead Institute for Biomedical Research/MIT Center for Genome Research; <http://www.genome.wi.mit.edu/>) から検索した。サンプルは 140 組の同胞対, および約 200 人の non-OPLL 患者からインフォームドコンセントを得て収集された。遺伝子タイピングは GENESCAN および GENOTYPER (PE Biosystems) を用い, 連鎖の検定にはノンパラメトリック解析法である SIBPAL および GENEHUNTER プログラムを使用した。

## C. 研究結果

骨関連疾患, 骨代謝に関連する遺伝子 (計 66 個) ではマーカーとの距離が平均 1.4cM, Heterozygosity が 0.6 以上, 遺伝子内マーカー 9 つを含む候補遺伝子において, p-value が 0.05 以下の連鎖が認められた遺伝子は 6 個 (BMP4, PRG1, OPN, PTHR1, TGFb3, IGF1) であった (図 2)。また, マイクロアレイ解析により候補遺伝子は, 計 24 個 (増強した遺伝子 12 個, 減弱した遺伝子 12 個) 選別でき (図 3), そのうち発現量に最も差が見られた Crystallin  $\alpha$  B

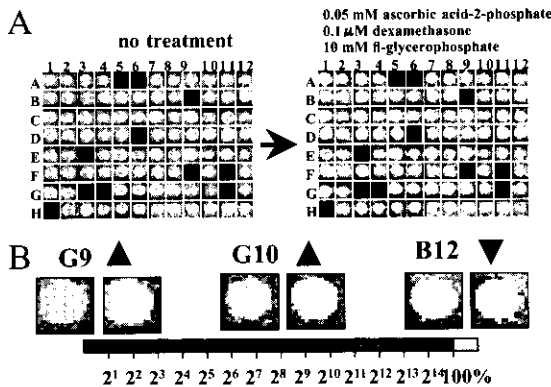


図1. A; 骨芽細胞への分化誘導後、24時間での遺伝子発現をマイクロアレイで解析したもの  
B; G9, G10は発現量が増えたもの。B12は減ったものをあらわしている。この発現量の比が3倍以上に増えたもの、もしくは1/3に減ったものを候補遺伝子とした。

ch *	Candidate Gene	Markers	Dist <sup>b</sup>	Het <sup>c</sup>	Mean <sup>d</sup>	P-values <sup>e</sup>
1	CSF1	D1S2726	2.7	0.72	0.500	0.505
1	COL11A1/VCAM1	D1S206	2.2/0.2	0.78	0.500	0.506
1	BGLAP	D1S498	5	0.73	0.438	0.969
1	IL6R	INT <sup>f</sup>	0	0.81	0.473	0.802
1	Smad	D1S2797	1.4	0.78	0.497	0.556
1	TGFb2	D1S490	1.8	0.80	0.502	0.477
2	IL1A,B	INT	0	0.74	0.459	0.955
2	ITGA4/ COL5A2	D2S364	1	0.78	0.455	0.940
2	PTH2	D2S325	0.8	0.79	0.472	0.837
3	CASR	D3S1267	2.5	0.65	0.529	0.121
3	FETU	D3S1262	0	0.72	0.529	0.109
3	PTH1	D3S1573	1.3	0.81	0.545	0.045*
3	ITGB5	D3S1267	0.5	0.67	0.529	0.121
4	OPN	D4S2964	2	0.70	0.541	0.044*
4	BMP3	D4S2947	0.5	0.65	0.509	0.366
4	EGF	D5S406	2.3	0.70	0.516	0.246
5	ANK	D5S1954	-	0.80	0.491	0.604
5	CSF2	D5S2115	1.3	0.74	0.518	0.228
5	FGF1	D5S436	4.6	0.75	0.533	0.097
5	IL4	INT	0	0.77	0.541	0.057
6	SFR	D6S1607	3.9	0.75	0.536	0.085
6	CTGF	D6S262	0.2	0.77	0.485	0.668
6	ESR1	D6S441	0.5	0.79	0.482	0.750
6	VEGF	D6S1604	0.1	0.78	0.501	0.481
7	COL1A2	INT	0	0.66	0.492	0.620
7	IGFBP1	D7S519	1.9	0.74	0.522	0.207
7	ITGBB	D7S507	3.2	0.82	0.512	0.353
7	IL6	INT	0	0.61	0.499	0.520
7	LEP	D7S530	2.3	0.72	0.484	0.711
7	CALCR	D7S657	2	0.77	0.469	0.834
8	BMP1	D8S1734	2.5	0.62	0.498	0.527
8	OPG	D8S514	1.5	0.77	0.499	0.519
9	IL11RA	D9S1817	2.1	0.86	0.518	0.289
9	INSL4	D9S268	3.1	0.81	0.523	0.225
10	FGF8	D10S192	2.1	0.84	0.535	0.084
10	PRG1	D10S1652	4.5	0.70	0.541	0.040*
11	MMP1	D11S1339	0.6	0.66	0.526	0.130
11	CALC	D11S902	0.4	0.84	0.504	0.453
11	PTH	D11S1307	0.3	0.78	0.500	0.498
12	COL2A1/VDR	D12S85	3	0.80	0.483	0.735
12	IGF1	INT	0	0.67	0.536	0.048*
12	MGP	INT	0	0.60	0.483	0.764
13	FGF9	D13S175	2	0.67	0.492	0.647
13	GA6	D13S285	2.3	0.85	0.538	0.073
14	BMP4	D14S276	1.3	0.77	0.549	0.035*
14	ESR2	D14S1026	0.1	0.78	0.524	0.177
14	TGFb3	D14S74	1.9	0.80	0.545	0.041*
15	IGF1R	INT	0	0.67	0.492	0.673
17	COL1A1	D17S787	2.7	0.83	0.478	0.788
17	SOX9	D17S949	1.1	0.80	0.485	0.710
17	ITGA3	D17S787	0	0.83	0.478	0.788
19	IL11	D19S210	0.6	0.67	0.492	0.637
19	TGFb1	D19S220	0.1	0.87	0.497	0.549
19	ICAM1	D19S221	1.8	0.81	0.495	0.573
20	BMP2	INT	0	0.79	0.525	0.182
20	BMP7	D20S100	1.5	0.71	0.481	0.767
21	ITGB4BP	D21S266	0.5	0.82	0.540	0.061
22	LIF	D22S280	1.7	0.79	0.530	0.117

\* Chromosome number  
<sup>b</sup> Distance (cM) of between gene and marker. Average distance is 1.4cM  
<sup>c</sup> Heterozygosity of the marker  
<sup>d</sup> Mean proportion and P-value were determined by SIBPAL  
<sup>e</sup> p<0.05  
<sup>f</sup> Intragenic microsatellite marker

図2. 骨代謝関連遺伝子と連鎖解析の結果

Rank	Log <sub>2</sub> expression	Candidate Gene	Mean <sup>d</sup>	Het <sup>c</sup>	Mean <sup>d</sup>	P-values <sup>e</sup>	NPL score <sup>f</sup>	
1	+5.3	Cryab, alpha B	D15S4111	3.8	0.80	0.553	0.016*	1.834
2	+5.3	Sorbin 1	D15S2726	2.7	0.72	0.500	0.505	-0.358
3	+4.9	RNA polymerase-related protein	D17S949	1.8	0.70	0.491	0.841	-0.368
4	+4.8	Collagen, type VIII, alpha 1	D3S1271	2	0.60	0.491	0.563	-0.088
5	+4.0	Lapin receptor	D15S230	3.8	0.61	0.502	0.474	0.269
6	+3.6	Adrenomedullin	D11S902	3.0	0.84	0.504	0.453	0.278
7	+3.8	Heat shock 105AD	D18S156	1.4	0.84	0.525	0.093	0.810
8	+3.8	Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase	D17S849	1.4	0.84	0.498	0.557	0.242
9	+3.3	Protein tyrosine kinase 2 beta	D6S508	2.9	0.84	0.522	0.179	0.846
10	+3.2	Mitrosarcomatosis, beta	D18S156	2.7	0.84	0.507	0.386	0.029
11	+3.2	Peptidoglycan specific to rod photoreceptor	D18S59	0.0	0.84	0.488	0.683	-0.806
12	-3.0	Integrin, alpha 5	D12S883	4.2	0.64	0.503	0.447	-0.080
1	-2.7	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	D2S335	0.1	0.84	0.539	0.052	0.903
2	-6.0	Stromal cell-derived factor 1	D10S196	4.8	0.70	0.507	0.396	0.029
3	-5.4	Methylene tetrahydrofolate dehydrogenase	D14S683	1.6	0.76	0.527	0.127	1.105
4	-4.0	A disintegrin and metalloprotease domain 12	D10S217	3.0	0.82	0.508	0.398	0.082
5	-3.8	Inulin-like growth factor binding protein 3	D7S519	1.6	0.74	0.522	0.207	0.525
6	-3.8	Human G52 protein gene	D15S425	3.3	0.81	0.478	0.812	-0.555
7	-3.5	Plasminogen activator inhibitor, type II	D18S61	1.9	0.82	0.520	0.214	0.806
8	-3.3	Plasminogen activator, urokinase	D10S537	3.1	0.82	0.484	0.873	-1.059
9	-3.2	Inulin-like growth factor binding protein 5	D2S164	2.2	0.85	0.520	0.214	-0.548
10	-3.0	P311 protein	D5S428	3.4	0.85	0.514	0.242	0.277
11	-3.0	Antigen, identified by monoclonal antibodies 4F2	D11S987	1.2	0.84	0.494	0.591	-0.102
12	-3.0	Solute carrier family 21 (organic anion transporter)	D12S1617	2.7	0.84	0.490	0.585	0.230

\* Distance (cM) of between gene and marker  
<sup>c</sup> Heterozygosity of the marker  
<sup>d</sup> Mean proportion and P-value were determined by SIBPAL  
<sup>e</sup> p<0.05  
<sup>f</sup> NPL score was calculated by GENEHUNTER

図3. マイクロアレイにより選定された遺伝子および連鎖解析の結果。発現量が上昇した遺伝子12個と、低下した遺伝子12個。

(CRYAB) 遺伝子において連鎖が認められた。連鎖の認められた遺伝子の中で CRYAB, BMP4 が有意に高い値を示した (図4)。CRYAB はヒト間葉系幹細胞に分化誘導をかけ、24時間後に骨芽細胞の発現量が6倍と、最も上昇していた。これは heat shock protein の遺伝子であるが、骨代謝関連の報告は、いまのところなく今後さらに検討を要する。(2,3)

また、BMP4 から 1.3Mb のところに位置しているマーカー D14S276 では、Non parametric Linkage score (NPL score) で 2.23 と、Lander の提唱する suggestive Linkage 2.2<sup>(4)</sup> を越えており、BMP4 が原因遺伝子の候補である可能性が強く示唆された。

#### D. 考察

Common Disease の責任遺伝子同定作業では、連鎖解析により遺伝子座を特定したあと、SNP を用いた関連解析により疾患感受性遺伝子の同定を目指すことになる。SNP による遺伝子マッピング法は、SNP そのものが直接の原因となっていればよいが、実際には疾患と関連する遺伝子変異と連鎖不平衡にあることが多い。つまり、変異と疾患に関連を認めた場合、次の3つが考えられる。①その変異が直接疾患の原因となる場合。②その変異と連鎖不平衡の関係にある他の変異が直接の原因であり、マーカーとしての役割である場合。③ False positive である場合などが想定される。この連鎖不平衡の強さを調べることで、疾患原因に関連する変異との距離の推定が可能となる。Common disease の連鎖解析によるマッピングから、原因遺伝子の同定に成功した例は、現在のところ糖尿病で報告されているのみである。ヒトのゲノムが解明された現在、遺伝解析は急速に進むと思われる。今後、我々は BMP4 を含め、