

200/0/83

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 折茂 肇

平成14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. 遺伝子多型性を利用した骨粗鬆症関連遺伝子の探索	7
細井孝之	
2. 新規老化抑制遺伝子 (<i>klotho</i>) 欠損マウスにおける骨粗鬆化の解析	10
川口 浩	
3. 地域高齢者における遺伝的多型と骨折発生に関する追跡研究	14
鈴木隆雄	
4. 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	19
江見 充	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	24

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

骨粗鬆症の予防と治療の体系をゲノム情報基盤において構築するために、本症の原因遺伝子を検索し、遺伝疫学的解析を行った。老化や骨代謝に関連する遺伝子の多型性と骨量との関連解析、骨量との関連が認められた遺伝子多型性の生物学的意義の *in vitro* における検討、さらには全ゲノムをカバーする single nucleotide polymorphisms (SNPs) を用いた体系的アプローチを行うためのシステム構築を行った。また、骨折発症に関する 8 年間の前向き調査の結果を骨代謝関連遺伝子の多型性データとつきあわせることによって、骨折予知因子としての遺伝子解析の意義について検討した。

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

1. 骨粗鬆症関連遺伝子多型性の生物学的意義に関する検討：インフォームドコンセントを得た高齢女性の大腿骨人工骨頭置換手術時に得られる骨髓血から Koshihara らの方法に従って、骨髓ストローマ細胞を得た。この細胞培養系にインターロイキン 1 を添加し、上清中の IL 6 を EISA 法で定量した。IL 6 遺伝子の多型性 (5' UTR, -571G/C) は骨髓細胞から抽出した DNA を用いて polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) 法によって決定した。
2. 新規老化抑制遺伝子 (*klotho*) 遺伝子と骨粗鬆症との関連：*klotho* 遺伝子の -395G→A SNP が *Klotho* 蛋白の機能に及ぼす影響について検討した。G-395A サイトを含む oligonucleotide probe と *klotho* 遺伝子の発現を確認しているヒト腎臓由来 293 細胞からの核抽出蛋白との結合能をゲルシフト法で解析した。
3. 核内受容体遺伝子の多型性に関する検討：脂肪細胞への分化誘導因子である PPAR- α の骨粗鬆化への関与を検討する目的で、PPAR- α 欠損マウスの

骨組織の解析を行った。PPAR- α 欠損マウスの骨組織の解析：PPAR- α ホモ欠損マウスは胎生致死であったが、ヘテロ欠損マウス (+/-) は脂肪分化障害を呈しつつ正常に発育した。このヘテロ欠損マウス (+/-) と野生型 (+/+) の骨組織の *in vivo* および *in vitro* の解析を行った。

4. 地域高齢者における遺伝的多型と骨折発症に関する追跡研究：対象者は東京都老人総合研究所 (TMIG) が縦断的に行なっている地域高齢者集団 (コホート) の 1 つである秋田県山間部農村に在住する 65 歳以上のおよそ健康な高齢女性 525 名である。調査方法は面接聞き取り (インタビュー) による質問調査と会場に招待してのさまざまな身体属性や機能を調査する医学調査からなっている (TMIG-LISA)。

医学検診では身長、体重、皮厚、握力、開眼片足時間、最大歩行速度などを測定し、さらに健康度自己評価、主要疾患の既応、通院・入院の状況、基本的 ADL、手段的 ADL (老研式活動能力指標)、定期的運動や毎日の散歩などの身体活動量、食事に関する頻度調査などをおよそ 1 時間にわたる面接聞き取り調査によってデータを収集した。骨密度測定は高齢者の場合、腰椎正面像 (L2/4) では変形性脊椎症や大動脈石灰化などによる見かけ上の骨量増加が生ずるため⁴⁾、前腕骨 (橈尺骨遠位 1/3) の骨密度を DXA 法で測定した (Osteometer 社製 DTX-200)。

遺伝子に関する分析は医学検診時に随時、肘静脈から採血を行い、一般的な血算および血液生化学的分析に加え以下の骨粗鬆症関連遺伝子を分析した。すなわち IL-6, IL-6R, CASR, PGR, TNFA, SRC, MGP, (以上 microsatellite polymorphism 法), ER-Pvu, ER-Xba, PTH, ApoE, VDR, IL-1 β (以上 RFLP 法)。

骨粗鬆症性骨折の発生については毎年の聞き取り調査による受診者本人からの情報を基に可能な限り病院での確認調査を行った。

5. 系統的大規模スクリーニングによる骨粗鬆症原因遺伝子の探索：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た。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. 骨粗鬆症関連遺伝子多型性の生物学的意義に関する検討：本研究の対象者におけるIL6プロモーター領域の遺伝子型分布はGG:GC:CC=2:20:25とGG型は極端に少なく、今回の統計学的解析はGC型CC型について行なった。GC型とC型ではIL1を添加しない、ベースラインでのin vitro IL6産生量には差異が認められなかった。一方、IL1によるIL6産生誘導はCCにおいてGCよりも高い傾向がみとめられた。また、この集団においては本

遺伝子多型性と大腿骨頸部、橈骨、脊椎の骨量(dual energy X-ray absorptiometry, DXAで測定)との関連は認められなかった。また、CC群ではIL6産生量とこれらの骨量との間に有意な負の相関が認められた。一方、GC群ではIL6産生量と橈骨の骨量との間に負の相関傾向が認められたが、統計学的に有意なものではなかった。

2. 新規老化抑制遺伝子(klotho)遺伝子と骨粗鬆症との関連：Klotho遺伝子のG-395Aサイトを含むoligo-nucleotide probeと核抽出蛋白との結合能をゲルシフト法で解析したところ、G→A置換は核蛋白との結合を著明に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。

3. 核内受容体遺伝子の多型性に関する検討：PPAR- α 欠損マウス解析においては、骨密度測定および3D-CT像において、+/-では+/+に比べて皮質骨・海綿骨とも骨量が有意に増加していた。骨形態計測でも+/-では骨量の増加が認められ(BV/TVが38%増)、特に骨芽細胞の数の指標が大幅に上昇していた(Ob. S/BSが92%、OS/BSが114%、MS/BSが98%増)。しかしながら個々の骨芽細胞の機能の指標であるMAR(12%増)、および骨吸収の指標(N. Oc/B. Pmが12%、ES/BSが7%増)は+/+と有意な差はなかった。+/-由来の骨髄細胞培養系では、+/+と比較して骨芽細胞への分化(ALP染色によるCFU-F/ALP⁺、Alizarin redおよびvon Kossa染色によるCFU-OB)がすべて促進されていた。PPAR- α のリガンドであるTroglitazoneを加えると、脂肪細胞への分化(oil red染色によるCFU-AD)は+/+で著明に促進されたが+/-では軽度であった。その一方で骨芽細胞への分化は+/+では著明に抑制されたが、この抑制効果も+/-では軽度であった。この培養系において+/-のPPAR- α mRNAレベルは+/+と比べて低値であり、逆に骨芽細胞分化誘導因子であるCbfa-1レベルは高値を示した。しかしながら、頭蓋骨由来骨芽細胞(POB)培養系における増殖能および基質合成能、骨髄由来M-CSF依存性骨髄マクロファージ(B-MM ϕ)培養系におけるRANKL存在下での破骨細胞(OCL)・象牙片上吸収窩形成能、POBと骨髄細胞の共存培養系におけるOCL形成能、および単離OCLの生存率、のどれもが+/-と+/+の間で差がなかったことより、PPAR- γ シグナルは分化した骨芽細胞や破骨細胞系細胞には重要ではないと考えられた。

4. 地域高齢者における遺伝的多型と骨折発生に関する追跡研究：対象者525名のうち、骨密度測定、遺伝子を含む血液測定、医学検診および面接聞き

取り調査等の全ての調査を完了し8年間の追跡を受け、最終的分析対象者となった者は245名であった。8年間の追跡期間中、すべての検査項目に欠損のない245名の女性対象者なかで骨折を確認できたのは24名(9.8%)であった。いずれの遺伝的多型においても骨折群と非骨折群に統計的有意差は認められなかった(いずれも X^2 検定による)。さらに以前報告した同一対象群における遺伝的多型と年齢および体格指数を調整した前腕骨密度の多寡との関連についての分析では、一定の関連性は認められなかった。

5. 系統的大規模スクリーニングによる骨粗鬆症原因遺伝子の探索：種々の候補遺伝子に注目しその多型マーカーを用いて、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。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)を用いて測定した。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、80%以上を正常群とした。都会部(2集団)および農村部(2集団)でそれぞれインフォームドコンセントの取れた者から血液DNAを収集した(合計2千例)。これらの4群の対象DNAについて遺伝子多型の解析を行い、被検者骨密度との関連解析を4群で個別に行うことにより感受性遺伝子の候補遺伝子群のスクリーニングを行っている。検討される遺伝子多型は、日本人24人を対象としてゲノムワイドに同定された1塩基多型のうち、アミノ酸置換を伴う遺伝子翻訳領域中のSNPおよび遺伝子転写調節領域にあるSNPを主体としたすべてのSNPであり、最終的には数万種類を目標にしている。こうして選出された遺伝子の中から、骨粗鬆症の発症に関わる感受性遺伝子を同定するため、患者および対照群を用いた関連解析を行った。このため、共通した診断基準と設備を有する6つの施設から骨粗鬆症患者の血液DNAと骨密度を含めた臨床データの収集を、政府3省庁の遺伝子研究ガイドラインに従い収集した。現在、384例の対象DNAについてSNP解析を進めている。高速SNP解析法として、ダイレクト・リシークエンシング法、蛍光ラベル塩基伸長法、DNAチップ法、インベーターアッセイ法、DNAチップ形式のアレルハイブリダイズ法などについて効率・正確性を中心に多型解析の検討を行った。現在までに終えたSNPのスクリーニングの結果、多型マーカーを用いた骨密度を測定した患者・健常者集団の遺伝子タ

イピングと相関解析によるスクリーニングの結果、20個の遺伝子上のアミノ酸置換を伴うSNPについて、候補骨密度規定遺伝子多型として、2群の集団DNA解析において遺伝子座と骨密度との間に相関を見い出していた。

D.E. 考察・結論

IL6のプロモーター領域の多型性が、IL1誘導性のIL6産生量との関連をもつことが示唆された。閉経後女性における骨量減少をきたす要因のうち、骨吸収性サイトカインの産生上昇は大きな位置をしめると考えられている。IL6はその中でも重要なサイトカインであり、多段階による産生調節を受けていると思われる。今回の検討結果は調節機構に個人差が存在することを示しており、骨粗鬆症罹患性の遺伝的背景の一部が説明されたと考えられる。

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。今回の検討から、klotho遺伝子が骨の代謝に直接関与している可能性が示された。

また、PPAR- α の抑制は生体内において骨髄前駆細胞からの骨芽細胞の分化を促進することによって骨量を増加させることが明らかとなった。退行性骨粗鬆症患者が脂肪髄を合併している事実は、臨床症例においてもPPAR- α シグナルの骨量減少メカニズムへの関与を示唆するものと言える。ヒトPPAR- α 遺伝子多型と閉経後女性の骨密度との相関については今後の課題であり、現在、ヒトPPAR- α 遺伝子におけるSNP検索を行っている。

今回の行なった東北地方山間部農村に居住する一般健康高齢女性の前腕骨密度測定に対する12個の骨粗鬆症関連遺伝子多型と骨折発生に関連する先行研究として我々は、身体属性値、さらには栄養や運動を含むライフスタイルを中心とした環境要因などから多面的・総合的に分析した⁹⁾。その結果、骨量に対しては年齢は負の体格指数は正のそれぞれ有意かつ大きな寄与を示し、今回の研究で選択された遺伝子(多型)の寄与は年齢や体格指数に比べるとかならずしも大きな割合を示さず、また環境要因に関する変数項目もその寄与は小さなものであることを明らかにしている。

今回はこれらのすでに骨量との間に有意な関連性の確認されている遺伝的多型性と8年間の追跡期間中における骨折受傷者との間での関連性について分析したが、統計学的には有意な関連性は得られなかった。この理由として初回調査時からの完全なデータの揃っている高齢女性245名での新規骨折発生人数は24名であり、その割合はわずか9.8%にとどまっているために分析のための統計的パワーが少なかったこと。さらにより重要な理由として、高齢期の骨折には単に遺伝的多型に支配された低骨密度というひとつの要因だけでなく、長年にわたる骨密度に影響を及ぼす多種多様な生活習慣の蓄積が関与していること。さらには高齢者に多発する転倒という現象をもたらす実にさまざまに複雑に絡む要因もまた骨折をもたらす危険因子となっていることなどから、おそらく高齢者での骨粗鬆症性骨折の要因としていずれもが少しずつ寄与している可能性の方が大きいのではないかと推定されるのである。

今後これらの対象者の追跡を継続し、骨密度の推移とも骨折受傷者の増加をもって生活習慣も加味したうえで再度遺伝的多型からの検討を加える予定である。

今後検討を進め、最終的に数十個の感受性候補遺伝子が同定されれば、臨床診断に応用される遺伝子多型のセットが確立され得ると予測される。これらのSNPのうち4群に共通して関連・相関・連鎖の示されるSNPを有する遺伝子が、最も重要な骨密度規定遺伝子と推定される。また、同朋対検定法も平行して進めており、骨粗鬆症との間に遺伝的連鎖を見出ししている。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。さらに骨粗鬆症発症の分子メカニズムが明らかにされることにより有効な治療戦略が検討されるものと考えられる。

骨粗鬆症にかぎらず生活習慣病はその発症に複数の遺伝的素因と生活習慣的要因が関与する多因子遺伝子病である。これらの疾患の遺伝的素因をゲノム情報によって解明することができれば、より効果的な予防と治療の手段が講じられるものと期待されている。現在までに多数の候補遺伝子について多型性と骨量との関連が検討されてきた。それらの結果は必ずしも一定したものではなかった。この種の研究では、人種差や他の交絡因子の影響や対象集団の小ささなど、多くの問題点が指摘されている。これらの課題を克服

する研究デザインを設定することとともに、検討する遺伝子多型の生物学的意義を常に確かめる必要がある。本研究はそのような立場で行なわれたものであり、今後ゲノムワイドの検索によって得られた情報についてもこのような観点からの検討を加えたい。

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. Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga M, Sone T, Fujiwara S, Shiraki M, Kushida K, Miyamoto S, Soen S, Nishimura J, Oh-Hashi Y, Hosoi T, Gorai I, Tanaka H, Igai T, Kishimoto H. Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2000 revision. *J Bone Miner Metab.* 2001;19(6):331-7.
2. Nishizawa Y, Nakamura T, Ohata H, Kushida K, Gorai I, Shiraki M, Fukunaga M, Hosoi T, Miki T, Nakatsuka K, Miura M. Guidelines on the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis (2001). *J Bone Miner Metab* 2001;19(6):338-44.
3. Hosoi T. Perspectives of post-genomic medical care in osteoporosis *Nippon Rinsho.* 2001 Jan;59(1):175-9.
4. Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Koshizuka Y, Nakamura K, Kawaguchi H. A polymorphic variant at the Werner helicase (WRN) gene is associated with bone density, but not spondylosis, in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2001;19(5):296-301.
5. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, 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(5):267-72.
6. Ota N, Hunt SC, 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 Immun.* 2000;1(4):260-4.
7. Ezura Y, Iwasaki H, Ishida R, Shiraki M, Inoue S, Hosoi T, Yoshida H, Suzuki T, Orimo H, Emi M. Genome-wide SNP scanning for

identification of susceptibility genes of osteoporosis J Nippon Med Sch. 2001 Oct;68(5):426-9. Japanese.

8. Uenishi K, Ishida H, Kamei A, Shiraki M, Ezawa I, Goto S, Fukuoka H, Hosoi T, Orimo H. Calcium requirement estimated by balance study in elderly Japanese people. *Osteoporos Int.* 2001;12(10):858-63.

9. Kaneki M, Hedges SJ, Hosoi T, Fujiwara S, Lyons A, Crean SJ, Ishida N, Nakagawa M, Takechi M, Sano Y, Mizuno Y, Hoshino S, Miyao M, Inoue S, Horiki K, Shiraki M, Ouchi Y, Orimo H. Japanese fermented soybean food as the major determinant of the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk. *Nutrition.* 2001 Apr;17(4):315-21.

10. Kim H, Yoshida H, Suzuki T, Ishizaki T, Hosoi T, Yamamoto S, Orimo H. The relationship between fall-related activity restriction and functional fitness in elderly women. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 2001 Nov;38(6):805-11.

11. 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; 46: 367-371.

12. Iwasaki, H., Shinohara, Y., Ezura, Y., Kodaira, M., Kajita, M., Nakajima, T., Shiba, T., Emi, M. Thirteen single nucleotide polymorphisms of human osteopontin identified by sequencing of the entire gene in Japanese. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 544-546.

13. Shinohara, Y., Ezura, Y., Iwasaki, H., Nakazawa, I., Ishida, R., Kodaira, M., Kajita, M., Shiba, T., Emi, M. Linkage disequilibrium and haplotype analysis among ten single nucleotide polymorphisms of interleukin 11 identified by sequencing of the gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 494-497.

14. Tsuneizumi, M., Nagai, H., Harada, H., Kazui, T., Emi, M. A highly polymorphic CA repeat marker at the EBAG9/RCAS1 locus on 8q23 that detected frequent amplification in breast cancer. *Annals Hum. Bio.* 2001; (in press)

15. Ishida, R., Ezura, Y., Iwasaki, H., Nakazawa, I., Kajita, M., Kodaira, M., Ito, H., Emi, M.

Linkage disequilibrium and haplotype analysis among novel four single nucleotide polymorphisms in human Leukemia inhibitory factor (LIF) gene. *J. Hum. Genet.* 2001; 46: 557-559.

16. Kohro, T., Nakajima, T., Wada, Y., Sugiyama, A., Ishii, M., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Imoto, I., Inazawa, J., Hamakubo, T., Kodama, T., Emi, M. Genomic Structure and Mapping of Human Orphan Receptor LXR Alpha: Upregulation of LXR α mRNA During Monocyte to Macrophage Differentiation. *J. Atheroscler. Thromb.* 2001; 7: 145-151.

17. Shinohara, Y., Ezura, Y., Iwasaki, H., Nakazawa, I., Ishida, R., Nakajima, T., Kodaira, M., Kajita, M., Shiba, T., Emi, M. Human Tumor necrosis factor A gene: three single nucleotide polymorphisms among Japanese and ethnic difference of their allele frequencies. *Annals Hum. Bio.* 2002; (in press)

18. Ota, N., Nakajima, T., Ezura, Y., Iwasaki, H., Suzuki, T., Hosoi, T., Orimo, H., Inoue, S., Ito, H., Emi, M. Association of a single nucleotide variant in the human tumor necrosis factor alpha promoter region with decreased bone mineral density. *Annals Hum. Bio.* 2002; (in press)

19. Hirano, A., Nagai, H., Harada, H., Terada, Y., Haga, S., Kajiwara, T., Emi, M. 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.

22. 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.

23. 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: 132-136.
24. 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; 2: 117-118.
25. Hattori, H., Hirayama, T., Nobe, Y., Nagano, M., Kujiraoka, T., Egashira, T., Ishii, J., Tsuji, M., Emi, M. Eight Novel Mutations and Functional Impairments of the LDL Receptor in Familial Hypercholesterolemia in the North of Japan. *J. Hum. Genet.* 2002; 47: 80-87.
26. Harada, H., Yoshida, S., Nobe, Y., Ezura, Y., Atake, T., Koguchi, T., Emi, M.: Genomic Structure of the Human NLK (nemo-like kinase) Gene and Analysis of its Promoter Region. *Gene* 2002; (in press)
27. Nakajima, T., Jorde, BL., Ishigami, T., Umemura, S., Emi, M., Lalouel, JM., Inoue, I. Molecular variants, haplotypes, and linkage disequilibrium within the human angiotensinogen gene. *Am. J. Hum. Genet.* 2002; 70: 108-123.
28. Sugiyama, H., Ogawa, S., Emi, M., Shiraki, M., Hosoi, T., Orimo, H., Ouchi, Y., Inoue, S. Ethnic difference in contribution of alleles of the Interleukin-1 Receptor Antagonist (IL-1RA) gene to predisposition to osteoporosis. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2002; (in press)
29. Iwasaki, H., Ezura, Y., Ishida, R., Kodaira, M., Kajita, M., Knight, J., Daniel, S., Shi, M., Emi, M. Accuracy of Genotyping for Single Nucleotide Polymorphism Typing Method Involving hybridization of Short Allele-Specific Oligonucleotides. *DNA Reserch.* 2002; (in press)
30. Ogawa, S., Emi, M., Shiraki, M., Hosoi, T., Orimo, H., Ouchi, Y., Inoue, S. Association of amino acid variation (Yrp64Arg) in the beta3-adrenergic Receptor Gene with Bone Mineral Density. *An. Hum. Biol.* 2002; (in press)
31. Harada, H., Kimura, A., Fukino, K., Yasunaga, S., Nishi, H., Emi, M. Genomic structure and eight novel exonic polymorphisms of human N-cadherin gene. *J. Hum. Genet.* 2002; (in press)
32. Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, and Kuro-o M: Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol* 167: 2625-2631, 2001.
33. Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: *Klotho* gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res* (in press).
34. 湯川晴美, 鈴木隆雄, 吉田英世, 熊谷修, 岩間範子, 柴田博: 都市部在住の健康高齢者におけるエネルギー充足率に及ぼす社会・心理・生活身体状態の影響. *栄養学雑誌*, 59: 117-125, 2001
35. Suzuki, T.: Risk factors for osteoporosis in Asia. *J Bone Miner Metab*, 19: 133-141, 2001
36. 鈴木隆雄: 地域高齢者の余命に規定要因—学際的縦断研究 TMIG-LISA から—. *日老医誌*, 38: 338-340, 2001

遺伝子多型性を利用した骨粗鬆症関連遺伝子の探索

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。我々は骨粗鬆症の病態形成に関与する遺伝子群の遺伝子多型性と骨量との関連を解析してきた。本年度さらに検討する遺伝子群とその多型性を増やして骨量との関連を検討するとともに、優位な関連を持つ多型性の生物学的な意義を検討した。

A. 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り、予防と治療の方策を立てるためには遺伝的素因の解明が欠かせない。我々は骨粗鬆症の病態形成に関与する遺伝子群の遺伝子多型性と骨量との関連を解析してきた。本年度さらに検討する遺伝子群とその多型性を増やして骨量との関連を検討するとともに、優位な関連を持つ多型性の生物学的な意義を検討した。我々は、骨吸収性サイトカインとして知られるインターロイキン6 (IL6) 遺伝子の転写調節領域の多型性 (5' UTR -571G/C) が骨量と関連することを報告した (Ota N, *et al.* 2001) が、本年度はこの多型性を持つ生物学的意義を *in vitro* の培養系での検討を行なった。

B. 研究方法

高齢女性の大腿骨人工骨頭置換手術時に得られる骨髓血からKoshiharaらの方法に従って、骨髓ストローマ細胞を得た。この細胞培養系にインターロイキン1を添加し、

上清中のIL6をEISA法で定量した。L6遺伝子の多型性 (5' UTR、-571G/C) は骨髓細胞から抽出したDNAを用いてpolymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)法によって決定した。なお、本研究の対象者からは十分な説明のもと、インフォームドコンセントを得て協力をいただいた。なおこの研究は東京都老人医療センター整形外科山本精三医長、同石橋英明医長東京都老人総合研究所腰原康子博士、日本医科大学老人病研究所江見充教授らとの共同研究である。

C. 研究結果

本研究の対象者におけるIL6プロモーター領域の遺伝子型分布はGG:GC:CC=2:20:25とGG型は極端に少なく、今回の統計学的解析はGC型CC型について行なった。GC型とC型ではIL1を添加しない、ベースラインでの*in vitro* IL6産生量には差異が認められなかった。一方、IL1によるIL6産生誘導はCCにおいてGCよりも高い傾向がみとめられた。また、この集団においては本遺伝子多型性と大腿骨頸部、橈骨、脊椎の骨

量 (dual energy X-ray absorptiometry, DXA で測定) との関連は認められなかった。また、CC群ではIL6 産生量とこれらの骨量との間に有意な負の相関が認められた。一方、GC群ではIL6 産生量と橈骨の骨量との間に負の相関傾向が認められたが、統計学的に有意なものではなかった。

D. 考察

IL6のプロモーター領域の多型性が、IL1誘導性のIL6 産生量との関連をもつことが示唆された。閉経後女性における骨量減少をきたす要因のうち、骨吸収性サイトカインの産生上昇は大きな位置をしめると考えられている。IL6はその中でも重要なサイトカインであり、多段階による産生調節をうけていると思われる。今回の検討結果は調節機構に個人差が存在することを示しており、骨粗鬆症罹患性の遺伝的背景の一部が説明されたと考えられる。

骨粗鬆症にかぎらず生活習慣病はその発症に複数の遺伝的素因と生活習慣的要因が関与する多因子遺伝子病である。これらの疾患の遺伝的素因をゲノム情報によって解明することができれば、より効果的な予防と治療の手段が講じられるものと期待されている。現在までに多数の候補遺伝子について多型性と骨量との関連が検討されてきた。それらの結果は必ずしも一定したものではなかった。この種の研究では、人種差や他の交絡因子の影響や対象集団の小ささなど、多くの問題点が指摘されている。これらの課題を克服する研究デザインを設定することとともに、検討する遺伝子多型性の生物学的意義を常に確かめる必要がある。本研究はそのような立場で行なわれ

たものであり、今後ゲノムワイドの検索によって得られた情報についてもこのような観点からの検討を加えたい。

E. 結論

骨量と関連のあるIL6 遺伝子のプロモーター領域の多型性が、IL1によって誘導されるIL6 産生量と関連があることが示唆された。

F. 健康危険情報

今年度の研究においては健康危険情報は得られなかった。

G. 研究発表

論文発表

1. Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga M, Sone T, Fujiwara S, Shiraki M, Kushida K, Miyamoto S, Soen S, Nishimura J, Oh-Hashi Y, Hosoi T, Gorai I, Tanaka H, Igai T, Kishimoto H. Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2000 revision. *J Bone Miner Metab.* 2001;19(6):331-7.
2. Nishizawa Y, Nakamura T, Ohata H, Kushida K, Gorai I, Shiraki M, Fukunaga M, Hosoi T, Miki T, Nakatsuka K, Miura M. Guidelines on the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis (2001). *J Bone Miner Metab* 2001;19(6): 338-44.
3. Hosoi T. Perspectives of post-genomic medical care in osteoporosis *Nippon Rinsho.* 2001 Jan;59(1):175-9.
4. Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Koshizuka Y, Nakamura K, Kawaguchi H.

A polymorphic variant at the Werner helicase (WRN) gene is associated with bone density, but not spondylosis, in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab.* 2001;19(5):296-301.

5. Ota N, Nakajima T, Nakazawa I, 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(5):267-72.

6. Ota N, Hunt SC, 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 Immun.* 2000;1(4):260-4.

7. Ezura Y, Iwasaki H, Ishida R, Shiraki M, Inoue S, Hosoi T, Yoshida H, Suzuki T, Orimo H, Emi M. Genome-wide SNP scanning for identification of susceptibility genes of osteoporosis *J Nippon Med Sch.* 2001 Oct;68(5):426-9. Japanese.

8. Uenishi K, Ishida H, Kamei A, Shiraki M, Ezawa I, Goto S, Fukuoka H, Hosoi T, Orimo H. Calcium requirement estimated by balance study in elderly Japanese people. *Osteoporos Int.* 2001;12(10):858-63.

9. Kaneki M, Hedges SJ, Hosoi T, Fujiwara S, Lyons A, Crean SJ, Ishida N, Nakagawa M, Takechi M, Sano Y, Mizuno Y, Hoshino S, Miyao M, Inoue S, Horiki K, Shiraki M, Ouchi Y, Orimo H. Japanese fermented soybean food as the major determinant of

the large geographic difference in circulating levels of vitamin K2: possible implications for hip-fracture risk.

Nutrition. 2001 Apr;17(4):315-21.

10. Kim H, Yoshida H, Suzuki T, Ishizaki T, Hosoi T, Yamamoto S, Orimo H. The relationship between fall-related activity restriction and functional fitness in elderly women. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi.* 2001 Nov;38(6):805-11.

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 老化抑制遺伝子 *klotho* がコードする蛋白 (KL 蛋白) が何らかの全身性のシグナルを介して骨粗鬆化などの老化関連骨軟骨疾患群の発症に関与していることは、その遺伝子変異マウス (*klotho* マウス) の解析から推察される。昨年までのヒト *klotho* 遺伝子のゲノム解析によって、そのプロモーター領域の SNP である -395G→A が老年女性における骨密度と有意に相関していることを示した。本年度は、この変異が Klotho 蛋白の機能に及ぼす影響について検討した。G-395A サイトを含む oligonucleotide probe と *klotho* 遺伝子の発現を確認しているヒト腎臓由来 293 細胞からの核抽出蛋白との結合能をゲルシフト法で解析したところ、G→A 置換は核蛋白との結合を著明に低下させることが明らかとなった。以上の結果から、全身性因子のひとつと考えられている *klotho* 遺伝子産物が、老化に伴う骨粗鬆化に関与している可能性が示された。

一方、老化による骨粗鬆化に伴って骨髄内に脂肪髄が増えていく事実、および骨芽細胞と脂肪細胞がともに骨髄未分化間葉系細胞から分化する事実は、骨髄における骨芽細胞と脂肪細胞の分化のスイッチングが老化に伴う骨粗鬆化に関与している可能性を強く示唆するものといえる。我々は、脂肪細胞への分化誘導因子である PPAR- γ の骨粗鬆化への関与を検討する目的で、PPAR- γ 欠損マウスの骨組織の解析を行った。PPAR- γ ホモ欠損マウスは胎生致死であったが、ヘテロ欠損マウスは脂肪分化障害を呈しつつ正常に発育した。ヘテロ欠損マウスでは野生型に比べて皮質骨・海綿骨とも骨量が有意に増加していた。これは骨髄細胞からの骨芽細胞への分化能が亢進しているためで、成熟骨芽細胞および破骨細胞系細胞の機能には何の異常もなかった。以上より、PPAR- γ の抑制は生体内において骨髄前駆細胞からの骨芽細胞の分化を促進することによって骨量を増加させることが明らかとなった。

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。昨年までのヒト *klotho* 遺伝子のゲノム解析によって、そのプロモーター領域の SNP である -395G→A が老年女性における骨密度と有意に相関していることを示した。本年度は、この変異が *Klotho* 蛋白の機能に及ぼす影響について検討した。

また、老化による骨粗鬆化に伴って骨髄内に脂肪髄が増えていく事実、および骨芽細胞と脂肪細胞がともに骨髄未分化間葉系細胞から分化する事実は、骨髄における骨芽細胞と脂肪細胞の分化のスイッチングが老化に伴う骨粗鬆化に関与している可能性を強く示唆するものといえる。我々は、脂肪細胞への分化誘導因子である PPAR- γ の骨粗鬆化への関与を検討する目的で、PPAR- γ 欠損マウスの骨組織の解析を行った。

B. 研究方法

Promoter 領域の SNP と機能との関係：-395G→A SNP が *Klotho* 蛋白の機能に及ぼす影響について検討した。G-395A サイトを含む oligonucleotide probe と *klotho* 遺伝子の発現を確認しているヒト腎臓由来 293 細胞からの核抽出蛋白との結合能をゲルシフト法で解析した。PPAR- γ 欠損マウスの骨組織の解析：PPAR- γ ホモ欠損マウスは胎生致死であったが、ヘテロ欠損マウス (+/-) は脂肪分化障害を呈しつつ正常に発育した。このヘテロ欠損マウス (+/-) と野生型 (+/+) の骨組織の *in vivo* および *in vitro* の解析を行った。

C. 研究結果

Klotho 遺伝子の G-395A サイトを含む oligo-nucleotide probe と核抽出蛋白との結合能をゲルシフト法で解析したところ、G→A 置換は核蛋白との結合を著明に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。

PPAR- γ 欠損マウス解析においては、骨密度測定および 3D-CT 像において、+/- では +/+ に比べて皮質骨・海綿骨とも骨量が有意に増加していた。骨形態計測でも +/- では骨量の増加が認められ (BV/TV が 38% 増)、特に骨芽細胞の数の指標が大幅に上昇していた (Ob. S/BS が 92%、OS/BS が 114%、MS/BS が 98% 増)。しかしながら個々の骨芽細胞の機能の指標である MAR (12% 増)、および骨吸収の指標 (N. Oc/B. Pm が 12%、ES/BS が 7% 増) は +/+ と有意な差はなかった。+/- 由来の骨髄細胞培養系では、+/- と比較して骨芽細胞への分化 (ALP 染色による CFU-F/ALP⁺、Alizarin red および von Kossa 染色による CFU-OB) がすべて促進されていた。PPAR- γ のリガンドである Troglitazone を加えると、脂肪細胞への分化 (oil red 染色による CFU-AD) は +/+ で著明に促進されたが +/- では軽度であった。その一方で骨芽細胞への分化は +/+ では著明に抑制されたが、この抑制効果も +/- では軽度であった。この培養系において +/- の PPAR- γ mRNA レベルは +/+ と比べて低値であり、逆に骨芽細胞分化誘導因子である *Cbfa-1* レベルは高値を示した。しかしながら、頭蓋骨由来骨芽細胞 (POB) 培養系における増殖能および基質合成能、骨髄由来 M-CSF 依存性骨髄マクロファージ (B-MM ϕ) 培養系における RANKL 存在下での破骨細胞 (OCL) ・象牙片上吸収窩形成能、POB と骨髄細胞の共存培養系における OCL 形成能、および単離 OCL の生存率、のどれもが +/- と +/+ の間で差がなかったことより、PPAR- γ シグナルは分化した骨芽細胞や破骨細胞系細胞には重要ではないと考えられた。

D. 考察

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

閉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。今回の検討から、*klotho* 遺伝子が骨の代謝に直接関与している可能性が示された。

また、PPAR- γ の抑制は生体内において骨髄前駆細胞からの骨芽細胞の分化を促進することによって骨量を増加させることが明らかとなった。退行性骨粗鬆症患者が脂肪髄を合併している事実は、臨床症例においてもPPAR- γ シグナルの骨量減少メカニズムへの関与を示唆するものと言える。ヒトPPAR- γ 遺伝子多型と閉経後女性の骨密度との相関については今後の課題であり、現在、ヒトPPAR- γ 遺伝子におけるSNP検索を行っている。

E. 結論

*klotho*遺伝子とPPAR- γ 遺伝子が加齢に伴う骨密度の減少に関与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

今年度の研究においては健康危険情報は得られなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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 Kuro-o M: Mutation in aging suppressor gene, *klotho*, causes decreases in bone formation and resorption in mice. *Connect Tissue* 32: 295-301, 2000.
- 4) Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, Nabeshima Y, Nakamura K, Sinclair AM, Scheuermann RH, and Kuro-o M: Connection between B-lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol* 167: 2625-2631, 2001.
- 5) Kawano K, Ogata N, Chiano M, Molloy H, Kleyn P, Spector TD, Uchida M, Hosoi T, Suzuki T, Orimo H, Inoue S, Nabeshima Y, Nakamura K, Kuro-o M, and Kawaguchi H: *Klotho* gene polymorphisms associated with bone density of aged postmenopausal women. *J Bone Miner Res* (in press).
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.

- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 川口浩: 加齢に伴う骨粗鬆症の病態. 骨・関節・靭帯 13 (7) (特集: 骨粗鬆症のトータルケア): 585-589, 2000.
- 15) 川口浩: 骨粗鬆症の発症機構 - Reverse genetics と forward genetics からの解明 -. 組織培養工学 26 (14) (特集: 骨粗鬆症研究の最近の進歩): 553-556, 2000.
- 16) 川口浩: 骨粗鬆症と老化. 医学のあゆみ (特集: 骨粗鬆症の基礎と臨床) 198 (9): 559-562, 2001.
- 17) 川口浩: 加齢と骨. 単行本「新臨床医のための分子医学シリーズ: 骨・軟骨代謝と注目の骨疾患 - 骨新生から骨疾患の病態解明・治療まで -」 (松本俊夫編) (羊土社): 96-104, 2002.

地域高齢者における遺伝的多型と骨折発生に 関する追跡研究 —8年間の追跡調査から—

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）
江見 充（日本医科大学老人病研分子生物）
折茂 肇（東京都老人医療センター院長）

A. 研究目的

最大骨量を決定する因子として遺伝性や家族歴が重要な役割を担っていることが、双生児や親子を対象とした研究から明らかにされている¹⁾。特に最近ヒトゲノム DNA を用いた遺伝子の多型性と骨量の関連性について、ビタミン D 受容体（多型性）を用いた分析が解明され以来、骨粗鬆症の遺伝子多型を用いた解析が急速な進展をみせている²⁾。

以前より我々は地域の一般健常高齢女性における前腕骨密度を測定し、骨量に及ぼす遺伝的要因や、運動や栄養などの生活習慣から導かれる環境的要因との関連性について分析してきた。今回、我々は同一対象について8年間の追跡データを基に骨粗鬆症性骨折と遺伝子との関連について分析したので報告する。

B. 研究方式

対象者は東京都老人総合研究所（TMIG）が縦断的に行なっている地域高齢者集団（コホート）の1つである秋田県山間部農

村に在住する 65 歳以上のおよそ健常な高齢女性 525 名である。調査方法は面接聞き取り（インタビュー）による質問調査と会場に招待してのさまざまな身体属性や機能を調査する医学調査からなっている（TMIG-LISA）³⁾。

医学検診では身長、体重、皮厚、握力、開眼片足時間、最大歩行速度などを測定し、さらに健康度自己評価、主要疾患の既応、通院・入院の状況、基本的 ADL、手段的 ADL（老研式活動能力指標）、定期的運動や毎日の散歩などの身体活動量、食事に関する頻度調査（魚類、肉類、卵類、牛乳・乳製品、大豆製品、緑黄色野菜等）などをおよそ1時間にわたる面接聞き取り調査によってデータを収集した。骨密度測定は高齢者の場合、腰椎正面像（L2/4）では変形性脊椎症や大動脈石灰化などによる見かけ上の骨量増加が生ずるため⁴⁾、前腕骨（橈尺骨遠位 1/3）の骨密度を DXA 法で測定した（Osteometer 社製 DTX-200）。

遺伝子に関する分析は医学検診時に随時、肘静脈から採血を行い、一般的な血算およ

び血液生化学的分析に加え以下の骨粗鬆症関連遺伝子を分析した。すなわち IL-6, IL-6R, CASR, PGR, TNFA, SRC, MGP, (以上 microsatellite polymorphism 法), ER-Pvu, ER-Xba, PTH, ApoE, VDR, IL-1 β (以上 RFLP 法)。分析の詳細な方法は他にすでに記述されているので参照されたい^{5,6,7)}。

microsatellite polymorphism による geno-type については、PCR による生成された fragment の長さ(bp)をもってその遺伝子型を命名した (例 IL-6-124, IL-6-134 etc)。

骨粗鬆症性骨折の発生については毎年の聞き取り調査による受診者本人からの情報を基に可能な限り病院での確認調査を行った。

C. 研究結果

対象者 525 名のうち、骨密度測定、遺伝子を含む血液測定、医学検診および面接聞き取り調査等の全ての調査を完了し 8 年間の追跡を受け、最終的分析対象者となった者は 245 名であった。これら対象者の年齢階級毎の身体属性および骨密度平均値 (±標準偏差) を表 1 に示す。

遺伝子分析の結果、すなわち各遺伝子で多型を示すアレルの数とその多型の組み合わせの数は (アレルの数、それらの組み合わせの数)。IL-6 (7, 22), IL-6R (12, 48), CASR (9, 17), PGR (10, 30), TNFA (11, 37), SRC (13, 29), MGP (6, 14), ER-Pvu (2, 3), ER-Xba (2, 3), PTH (2, 3), ApoE (3, 5), VDR (2, 3), IL-1 β (2, 3)。これらのアレルと骨密度との関連についてはすでに報告してある⁸⁾。

8 年間の追跡期間中、すべての検査項目に欠損のない 245 名の女性対象者なかで骨折を確認できたのは 24 名 (9.8%) であった。初回調査時の年齢分布からみると 65-69 歳で 10 名 (41.7%)、70-74 歳 11 名 (45.8%)、75-79 歳 2 名 (8.3%)、80-89 歳 1 名 (4.2%) であった。骨折群と非骨折群における、今回分析した遺伝的多型の割合を表 1 に示す。いずれの遺伝的多型においても骨折群と非骨折群に統計的有意差は認められなかった (いずれも X²検定による)。さらに以前報告した同一対象群における遺伝的多型と年齢および体格指数を調整した前腕骨密度の多寡との関連についての分析は、IL-6 (124), CASR (224), MGP (212) では骨密度の高値を示す遺伝子多型の群からの骨折発生割合は少なかったものの IL-6 (134), CASR (228), TNF α (115) では逆の関連性が示されるなど、一定の関連性は認められなかった。

表 1 各遺伝子多型における骨折・非骨折の出現頻度 (%)

1)	ERP-Puv	非骨折	骨折
	PP	36(16.3)	3(12.5)
	Pp	111(50.2)	15(62.5)
	pp	74(33.5)	6(25.0)
	計	221(100.0)	24(100.0)
2)	ERP-Xba	非骨折	骨折
	XX	6(2.7)	0(0.0)
	Xx	52(23.5)	5(20.8)
	xx	163(73.8)	19(79.2)
	計	221(100.0)	24(100.0)

3)	PTH	非骨折	骨折
	BB	176(79.6)	21(87.5)
	Bb	43(19.5)	3(12.5)
	bb	2(0.9)	0(0.0)
	計	221(100.0)	24(100.0)

4)	APO-E	非骨折	骨折
	3/2	22(10.0)	2(8.3)
	3/3	155(70.1)	18(75.0)
	4/2	5(2.3)	0(0.0)
	4/3	36(16.3)	4(16.7)
	4/4	3(1.4)	0(0.0)
	計	221(100.0)	24(100.0)

5)	IL-1 β	非骨折	骨折
	AA	40(18.1)	5(20.8)
	Aa	108(48.9)	15(62.5)
	aa	73(33.0)	4(16.7)
	計	221(100.0)	24(100.0)

6)	VDR	非骨折	骨折
	FF	83(38.1)	11(45.8)
	Ff	101(46.3)	9(37.5)
	ff	34(15.6)	4(16.7)
	計	218(100.0)	24(100.0)

7)	IL-6(124)	非骨折	骨折
	+	52(23.5)	5(20.8)
	-	169(76.5)	19(79.2)
	計	221(100.0)	24(100.0)

8)	IL-6(134)	非骨折	骨折
	+	36(16.3)	2(8.3)
	-	185(83.7)	22(91.7)
	計	221(100.0)	24(100.0)

9)	CASR(224)	非骨折	骨折
	+	6(2.9)	0(0.0)
	-	204(97.1)	23(100)
	計	210(100.0)	23(100.0)

10)	CASR(228)	非骨折	骨折
	+	119(56.7)	10(43.5)
	-	91(43.3)	13(56.5)
	計	210(100.0)	23(100.0)

11)	TNF α (115)	非骨折	骨折
	+	42(19.5)	2(8.3)
	-	173(80.5)	22(91.7)
	計	215(100.0)	24(100.0)

12)	MGP(212)	非骨折	骨折
	+	121(55.3)	11(52.4)
	-	98(44.7)	10(47.6)
	計	219(100.0)	21(100.0)

D. 考察

今回の行なった東北地方山間部農村に居住する一般健康高齢女性の前腕骨密度測定に対する 12 個の骨粗鬆症関連遺伝子多型と骨折発生に関連する先行研究として我々は、身体属性値、さらには栄養や運動を含むライフスタイルを中心とした環境要因な

どから多面的・総合的に分析した⁸⁾。その結果、骨量に対しては年齢は負の体格指数は正のそれぞれ有意かつ大きな寄与を示し、今回の研究で選択された遺伝子（多型）の寄与は年齢や体格指数に比べるとかならずしも大きな割合を示さず、また環境要因に関する変数項目もその寄与は小さなものであることを明らかにしている。

今回はこれらのすでに骨量との間に有意な関連性の確認されている遺伝的多型性と8年間の追跡期間中における骨折受傷者との間での関連性について分析したが、統計学的には有意な関連性は得られなかった。この理由として初回調査時からの完全なデータの揃っている高齢女性245名での新規骨折発生人数は24名であり、その割合はわずか9.8%にとどまっているために分析のための統計的パワーが少なかったこと。さらにより重要な理由として、高齢期の骨折には単に遺伝的多型に支配された低骨密度というひとつの要因だけでなく、長年にわたる骨密度に影響を及ぼす多種多様な生活習慣の蓄積が関与していること。さらには高齢者に多発する転倒という現象をもたらす実にさまざまに複雑に絡む要因もまた骨折をもたらす危険因子となっていることなどから、おそらく高齢者での骨粗鬆症性骨折の要因としていずれもが少しずつ寄与している可能性の方が大きいのではないかと推定されるのである。

今後これらの対象者の追跡を継続し、骨密度の推移とも骨折受傷者の増加をもって生活習慣も加味したうえで再度遺伝的多型からの検討を加える予定である。

E. 結論

従来より骨粗鬆症あるいは骨量変動については遺伝的背景が関与すると推定されていた。今回の研究で地域に在住する女性高齢者の前腕骨密度を測定し、骨密度に関連する12の骨粗鬆症関連遺伝子の分析と8年間の追跡期間中の骨折発生の関連を調査した。その結果、症例数の少ないことや、転倒という必ずしも遺伝的要因に基づかない事象が含まれていることから、有意な関連性を認めるには至らなかった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. Suzuki T : Significance of the prevention of falls in osteoporosis. In; Sato K (ed.); Basic and Clinical Aspects of Osteoporosis, PP10-18, Life Science Pub. Tokyo, Japan, 2001
2. 鈴木隆雄：骨粗鬆症の疫学. *Clinical Calcium*, 11 : 8-14, 2001
3. 鈴木隆雄：整形外科的問題. *総合リハビリテーション*, 29 (2) : 123-128, 2001
4. 鈴木隆雄：高齢者の転倒事故. *Clinical Rehabilitation*, 10 (11) : 955-960, 2001
5. 湯川晴美, 鈴木隆雄, 吉田英世, 熊谷修, 岩間範子, 柴田博：都市部在住の健康高齢者におけるエネルギー充足率に及ぼす社会・心理・生活身体状態の影響. *栄養学雑誌*, 59 : 117-125, 2001
6. Suzuki, T.: Risk factors for osteoporosis in Asia. *J Bone Miner*

Metab, 19: 133-141, 2001

7. 鈴木隆雄：地域高齢者の余命に規定要因—学際的縦断研究 TMIG-LISA から—
一. 日老医誌, 38 : 338-340, 2001
8. 金 憲経, 吉田英世, 鈴木隆雄他：高齢者の転倒関連恐怖感と身体機能について, 日本老年医誌, 38 : 805-811, 2001

2. 学会発表

1. Suzuki T.: Osteoporotic fractures and QOL in the community elderly in Japan. 17th International Congress of Gerontology, Vancouver, Canada, 1-6 July, 2001
2. 鈴木隆雄, 細井孝之, 折茂 肇他：地域在宅高齢者の大腿骨頸部骨折近位骨密度の経年的変化に関する遺伝的・環境的要因の分析. 第19回日本骨代謝学会, 名古屋, 8.8-11, 2001