

Table 2

Gene	control	OPLL	Ratio	up比	down比	Genebank
BMP1 ; procollagen C proteinase 2 (PCP2)	1259	1098	0.87		1.1	M22488 ; U50330
BMP2A	344	462	1.34	1.3		M22489
BMP5	123	173	1.41	weak		M60314
BMP7 ; osteogenic protein 1 (OP1)	57	66	1.15	ND		M60316
BMP8 ; OP2	572	482	0.84		1.2	M97016
VEGFB	42	64	1.52	ND		U48801
FGF3	48	64	1.33	ND		X14445
FGF6	88	101	1.15	ND		X63454
FGF9	238	195	0.82		weak	D14838
bone-derived growth factor 1 (BPGF1)	176	87	0.5		weak	L42379
PDGFB	196	178	0.91		weak	X02811
CSF2 ; GMCSF	56	44	0.77		ND	M11220
CSF3 ; GCSF	194	320	1.64	UP		X03438
platelet-activating factor receptor (PAFR)	562	434	0.77		1.3	M54995 ; M38441
B-cell growth factor 1 (BCGF1)	73	68	0.93		ND	M15530
TGF-alpha	530	485	0.92		1.1	K03222
TGF-beta	83	122	1.47	ND		X02812 ; J05114
TGF-beta 2	171	203	1.18	weak		M19154 ; M22045
TGF-beta receptor type 1 ; ALK5	2872	2960	1.03	1.0		L11695
TGF beta receptor III	590	633	1.07	1.1		L07594
serine/threonine-protein kinase receptor R3 (SKR3);TGF-beta superfamily receptor type 1 (TSR1)	44	35	0.78		ND	L17075
breast cancer type 2 susceptibility protein (BRCA2)	172	118	0.69		weak	U43746
BRCA1-associated ring domain protein 1 (BARD1)	183	124	0.68		weak	U76638
sonic hedgehog (SHH)	533	468	0.88		1.1	L38518
estrogen regulated protein	750	599	0.80		1.3	X54079

Table 2には、これまで骨形成関連因子として報告されているBMP-2, TGF-beta, FGF, Shhなどの遺伝子の結果を示した。これらでは顕著な発現差を認めなかった。

本研究は、手術検体を用いたものであり、サンプルの品質の問題があったのかもしれないが、これまでの研究を裏付けるようなデータは得られなかった。今後は、本研究で発現差が顕著に得られた遺伝子の特徴をさらに調べることで、できるだけ多くの検体を集め、既存の骨形成関連遺伝子や今回発現差が認められた遺伝子についてDNAアレイによる研究をすすめたいと考えている。

## E. 結論

OPLL手術検体を用いてDNAアレイによる遺伝子の検出、および正常靭帯との比較による発現遺伝子解析を行ったが、骨形成に関連する遺伝子をはっきりと特定できることは出来なかった。

## F. 研究発表

とくに無し

## G. 知的所有権の取得状況

とくに無し

# 脊柱靱帯骨化症におけるプロテオーム解析

永田 見生 (久留米大学医学部整形外科), 津留美智代 (久留米大学医学部整形外科),  
安藤 則行 (久留米大学医学部整形外科), 佐藤 公昭 (久留米大学医学部整形外科)

## 【研究要旨】

ヒトゲノムの全塩基配列の解読が完了し, “遺伝子の一次構造の解析” の時代から “遺伝子の機能解析をめざす” ポストゲノムの時代へ移行しようとしている。我々は, プロテオーム解析による, 後縦靱帯骨化症の *In silico* の研究を目指している。21 世紀の医療は, 病態に「何が起ころうか」の可能性の予測から, 「何が実際に起こっているか」の研究とその特異性を「集団から個」(パーソナライズド・メディスン) 及び, 個人差の解析ファーマコジェネティクスの研究が必須となることが予想される。我々が実際に行っているプロテオーム解析による後縦靱帯骨化症のディファレンシャル・ディスプレイの研究について述べる。また, プロテオーム研究は創薬に結びつく, 非常に価値ある研究であるが, 反面サンプルの取り扱いが重要になる。現段階では久留米大学医学部倫理委員会の承認を得, インフォームドコンセント後, 組織を頂き, 研究を行っているが, いずれ FDA に対応できるシステムを構築中である。

後縦靱帯骨化組織と正常組織 (病理解剖例) の収集をし, 二次元電気泳動法 (2-DE) を行った。まず等電点 (pI) により分離し, 次にドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分子量 (mass) でわけた。パターンと比較からの特異的スポットを切出し, ペプチド・マッピング法を行った。LC/MS/MS によりペプチドの配列と質量数を決め, 同定を行った。現在, このタンパク質のバリデーションを, 後縦靱帯骨化症のシグナル伝達上のアイソフォームを特定中である。プロテオミクスからゲノミクスのこの過程で治療のパスウェイや, 後縦靱帯骨化症のプロセスでこのタンパク質がどう変わったかを知ることができる。プロテオーム解析は, 疾病の発現に関わるタンパク質群の体系的な解析を可能とし, 創薬ターゲットの同定, バリデーションから薬物の作用モード解析, さらに急性・慢性期毒性のマーカーの同定など適用範囲が広がりつつある。我々は, これらの技術から, 患者・社会にとって『価値』ある薬・医薬を提供できるような研究を行う必要があると考える。

## Proteome Analysis of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament (OPLL).

Kensei Nagata ,Michiyo Tsuru ,Noriyuki Ando and Kimiaki Sato.

Department of Orthopaedic Surgery, Kurume University School of Medicine.

Email: [michiyo@med.kurume-u.ac.jp](mailto:michiyo@med.kurume-u.ac.jp)

Department of Orthopaedic Surgery, Kurume University School of Medicine, 67 Asahi-machi, Kurume 830-0011, JAPAN

### *Introduction*

In 1960, Tsukimoto reported an autopsy case with cervical myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL). Since his report, OPLL has been widely recognized in recent years. In particular, OPLL is frequently observed among Asians. However, the pathogenesis of ossification of spinal ligaments is not yet well known. Therefore, the Investigation committee on OPLL was organized in 1975 by the Japanese Ministry of Health and Welfare<sup>1)</sup>, to clarify the etiology,

epidemiology, and pathogenesis of OPLL. We have studied the etiology of OPLL using proteome analysis as the member of Research Committee. Proteome analysis facilitates systemic analysis of proteins involved in the development of diseases, and may be useful for galenical research. Proteomics has undergone a dramatic shift from an essentially 2D gel electrophoresis based technique to a broad field concerned with assigning function to large number of proteins<sup>2)</sup>. In proteome analysis, it is necessary to separate proteins as a first step prior to characterization. Thus, the overall performance of the analysis strongly depends on the performance of the separation tool, usually two-dimensional electrophoresis (2-DE). While IPGs have considerably improved IEF as described above, there are still some drawbacks. It was noted quite quickly that the resolution of some hydrophobic proteins (membrane proteins) was poor and others were lost when separated by IPGs. It is thought that this is because of hydrophobic interactions between the proteins and the basic acrylamide derivatives of the IPG matrix. More recently the protein patterns of some membrane preparations were compared on CA-IEF or IPG-IEF 2-D. These experiments clearly showed that the abundance of some proteins in the second dimension was significantly diminished when IPGs were used. Conversely, a wider study by Marc Wilkins and Keith L. Williams<sup>3)</sup> indicated that poor protein solubility could be a contributing factor accounting for the absence of hydrophobic proteins on 2-D gels. These authors examined proteins identified on 2-D gels and matched them to the proteins predicted by genome sequencing. Proteins whose overall amino acid composition displayed a hydrophobic bias were almost completely absent from the 2-D gels. Interestingly, the mode of IEF (CA or IPG) did not appear to affect this result, suggesting that the initial sample solubilization was the primary point where hydrophobic proteins were lost. In recent years, a greater understanding of the biological and pharmacological importance of membranes has prompted significant efforts to improve the separation of these less soluble proteins using the high-resolution method of 2-DE. The solubilization and separation of membrane proteins has proved more complex than that of soluble proteins, especially in IPGs for IEF because of their chemical character and membrane compartmentalization. However, with the benefits of IPGs outweighing most drawbacks, improved techniques and strategies for membrane protein separation have slowly evolved over the past two decades.

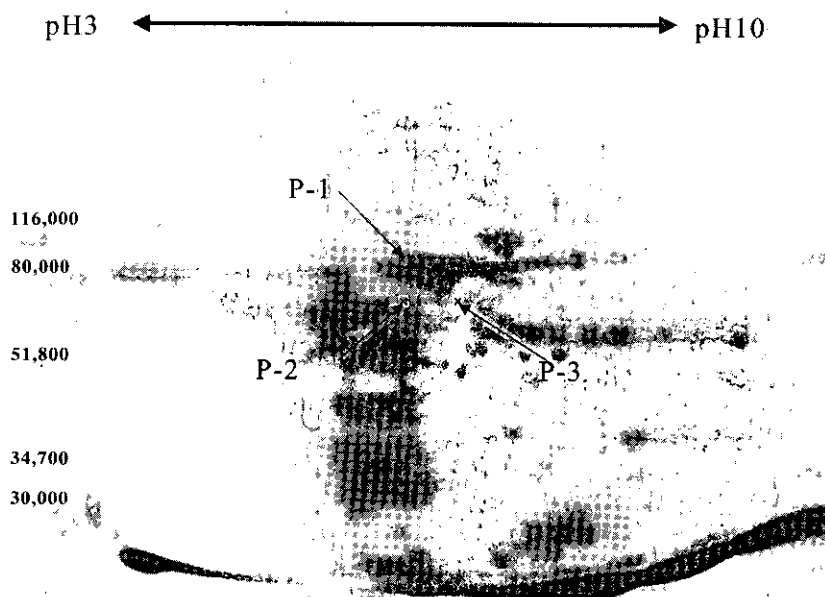
## **METHODS**

### **Samples Preparation for 2D SDS-PAGE.**

Patients with OPLL and ossification of the yellow ligament were obtained during surgery from 39 patients (ranging from 23 to 78 years old) with cervical, thoracic, or lumbar vertebrae. After informed consent was obtained from patients, ossified regions were surgically excised with ossification of the posterior longitudinal ligament, yellow ligament, and both ligaments. Normal ligament and bone were also excised for comparison. After excision, specimens were separated and the central regions of the ossified regions were frozen in liquid nitrogen and crushed using a frozen sample crusher.

### **Staining and image analysis**

Protein spots on the gel slab used for the differential protein display analysis were visualized by staining with an old version of the Wako silver-staining reagent kit because it had the highest dynamic range of staining among commercially available reagents tested. Two-DE gel images were acquired by scanning with a GS-710 Densitometer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Noise reduction, background subtraction, spot detection, quantification, gel-to-gel matching, and differential analysis were carried out using PDQuest software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Gels for Edman degradation microsequencing and MS analysis



**Figure 1** Two-dimensional gels of various amounts of total protein extracted from OPLL. OPLL was homogenized in the homogenization buffer and subjected to protein assay. After quantification, various amounts of proteins were loaded in the first-dimension IEF gels, followed by the second-dimension SDS-PAGE. Differential protein display by 2-DE we found that 3 protein spots were increased and these spots (P-1, P-2, P-3) were specifically detected in OPLL and OYL

were stained with CBB 4-250 using Quick CBB staining reagent kit.

#### LC/MS/MS analysis

Protein spots were excised from the gel and in gel digested with trypsin according to published procedures as modified by us. In contrast to the protocol described for Coomassiestained gels, all prewashing steps were omitted. Protein for microsequencing was digested overnight with 0.2  $\mu$ g of lysyl endopeptidase in 100  $\mu$ l of 8% v/v acetonitrile, 20mM Tris-HCl, pH8.5, at 35°C. After removing acetonitrile by blowing with nitrogen gas, peptides in the samples solution were trapped on disposable C<sub>18</sub> resin packed in a Zip Tip c18 (Millipore, Bedford, MA, USA), and eluted in a small volume of 75% v/v methanol, 1% v/v formic acid<sup>(1)</sup>. LC-MS/MS<sup>(2,13)</sup> (MAGIC 2002, Michrom BioResources, Inc, USA) for peptide sequencing were performed using a Q-ToF 2 system equipped with a Nanoflow-LC ESI

(Micromass UK, Manchester, UK). The peptide solution was charged into a borosilicate capillary tip and subjected to ESI at a flow rate of 2kV. For microsequencing, digested peptides were purified by HPLC with a Magic C18 (0.1  $\times$  50nm, Michrom BioResources, Inc, USA). Sequence homology was analyzed using the MASCOT (Matrix Science Ltd. <http://www.matrixscience.com/>) program.

#### RESULTS

In this study we have developed procedure of OPLL proteins profiling using subproteomix enhanced with sequential extracted fractionation. Examining among 157 spots on a reference map, we identified 12 proteins. Comparing between OPLL and OYL, we found that 3 protein spots were increased and these spots (P-1, P-2, P-3) were specifically detected in OPLL and OYL. Mass spectrometric analysis was performed at three points in OPLL and yellow ligament, and lumican<sup>(4,5)</sup> (P-1), chainA,

P-1

**MASCOT** Mascot Search Results  
**SCIENCE**

Peptide View

MS/MS Fragmentation of ILGPLSYSK  
Found in [gi|4505047](#). lumican [Homo sapiens]

Match to Query 18 (489.35.2+)  
From data file [Wuc255\aproscience.pro\010913P2.pkl](#)

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point  
Or, Plot from 0 to 1900 Da

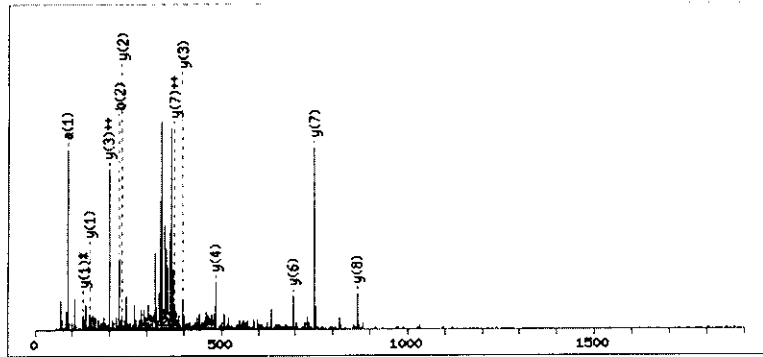


Figure 2 LC-MS/MS spectra of the tryptic digests generated from spot P-1.

P-2

**MASCOT** Mascot Search Results  
**SCIENCE**

Peptide View

MS/MS Fragmentation of TFYEPGEETYSCK  
Found in [gi|8573481](#). Chain A. Crystal Structure Of Human Beta-2-Glycoprotein-1 (Apolipoprotein-H)

Match to Query 38 (862.50.2+)  
From data file [Wuc255\aproscience.pro\010913P5.pkl](#)

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point  
Or, Plot from 0 to 1900 Da

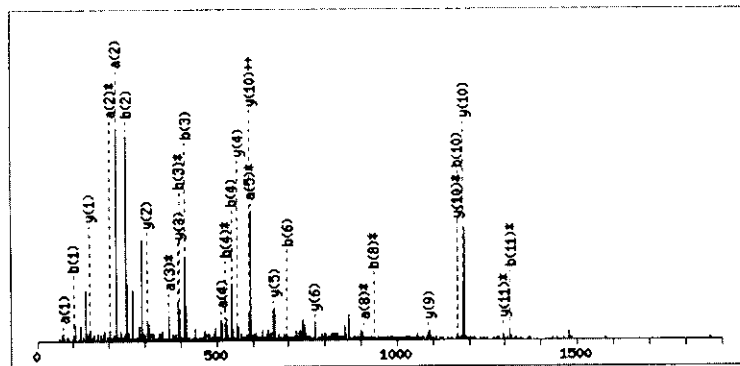


Figure 3 LC-MS/MS spectra of the tryptic digests generated from spot P-2.

crystal structure of human beta-2glycoprotein-1<sup>6)</sup> (apolipoprotein-H) (P-2), and proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein<sup>7,8)</sup> (P-3) were obtained.

## DISCUSSION

Functional involvement of the collagen 11A2 gene in ossification of the posterior longitudinal ligament has been noted<sup>9)</sup>. Type XI collagen is present in a structure in which

P-3 **{MATRIX} Mascot Search Results**  
**{SCIENCE}**

Peptide View

MS/MS Fragmentation of LPQLVFLYMEK  
Found in *g|4506041, proline arginine-rich and leucine-rich repeat protein [Homo sapiens]*

Match to Query 31 (863.44.2+)  
From data file *Wuc255\aprosciencs.pro\010913P4.pk1*

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, Plot from 0 to 1500 Da

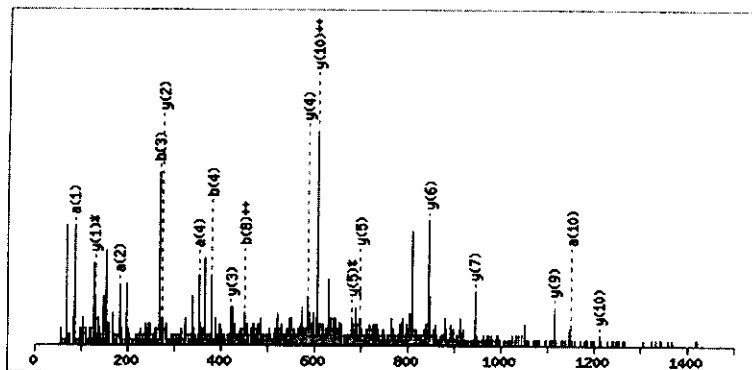


Figure 4 LC-MS/MS spectra of the tryptic digests generated from spot P-3.

the triple helix region is braided deep in type II collagen fibers, and type XI collagen plays an important role in determining the diameter of type II collagen fibers<sup>10</sup>. Since the region of type XI collagen molecules encoded by the variable region of exons 6-8 is considered to be exposed on the surface and this region is very basic, this region may be a domain that interacts with acidic proteins such as proteoglycan. Thus, proteins such as lumican, chainA, crystal structure of human beta-2glycoprotein-1, and proline arginine-rich end leucine-rich repeat protein tend to ossify. The results of this study may provide insight in characterizing ossification of spinal ligament in the future. Proteome analysis may advance health care by contributing to the elucidation of clinical diseases and development of drugs.

### Summary and Conclusion

We performed proteome analysis of specimens which were obtained from patients with OPLL and/or ossification of the yellow ligament during decompression surgery, and investigated proteins by LC/MS/MS. After

two-dimensional electrophoresis using specimens from patients with OPLL or ossification of the yellow ligament, differential display was performed in each specimen. The common spot was detected, and analysis was performed by LC/MS/MS. The results will lead to clarify the etiology and to development of treatment on OPLL.

### ACKNOWLEDGMENTS

We thanks Prof. H Matsumoto (The University of Oklahoma Health Sciences Center) for discussions. This work was supported by Y Ishii (Department of Orthopaedic Surgery, Nishitaga National Hospital) and S Shindou (Department of Orthopaedic Surgery, Kudanzaka Hospitail).

### REFERENCES

1. Tsukimoto H. (1960) A case report-autopsy of syndrome of compression of the spinal cord owing to ossification within the spinal canal. *Nihon-geka-hokan*, 29, 1003-1007.
2. Pandey, A. & Mann, M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405, 405,

837-846.

3. Kahn P. (1995) From genome to proteome: Looking at a cell's proteins. *Science*. 270. 369-370.
4. Grover J., Chen X., Korenberg J R and Roughley P. J. (1995) The human lumican gene. *J. Biol. Chem.* 270. 21942-21949.
5. Chakravarti S. et al. (1995) Primary structure of human lumican (Keratan sulfate proteoglycan) and localization of the gene (LUM) to chromosome 12q21. 3-q22. *Genomics*. 27. 481-488.
6. Schwarzenbacher R. et al. (1999) Crystal structure of human  $\beta$  2-glycoprotein 1 : implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO*. 18. 6228-6239.
7. Bengtsson E., Neame P J., Heinegard D and Sommarin Y. (1995) The primary structure of a basic leucine-rich repeat protein, PRELP, found in connective tissues. *J. Biol. Chem.* 270. 25639-25644.
8. Grover J., Chen X, Korenberg J R., Recklies A D and Roughley P J. (1996) The gene organization, chromosome location, and expression of a 55-kDa matrix protein (PRELP) of human articular cartilage. *Genomics*. 38. 109-117.
9. Maeda,S. et al. (2001) Functional Impact of human collagen  $\alpha$  2 (XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res.* 16. 948-957.
10. Inoue, I. et al. (1997) A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest.* 99. 1786-1797.
11. Toda, T, et al. (2000) Proteomic analysis of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines before and after immortalization. *Electrophoresis*. 21. 1814-1822.
12. Wilm, M. et al. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry.

*Nature*. 379. 466-469.

13. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68. 850-858.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M. T.

(e-mail:michiyo@med.kurume-u.ac.jp) or K. N. (e-mail:spine@med.kurume-u.ac.jp).

研究発表

第16回 日本整形外科学会シンポジウム  
後縦靭帯骨化症とゲノム解析 プロテオーム解析を中心として

Ossification of the posterior longitudinal ligament and genome analysis : Proteome analysis for evaluation of gene functions  
津留美智代 (M. Tsuru)\*·\*\*·\*\*\*, 永田 見生 (K. Nagata)\*·\*\*, 佐藤 公昭 (K. Sato)\*, 松本 博行 (H. Matsumoto)\*\*\*

\*久留米大整形, \*\*久留米大先端癌治療センター分子外科, \*\*\*オクラホマ大生化学分子生物学  
広島 平成13年10月

# 脊椎後縦靭帯骨化症の感受性遺伝子解析

田中 利弘 (弘前大学整形外科), 古島 弘三 (弘前大学整形外科),  
藤 哲 (弘前大学整形外科), 下小野田一騎 (鹿児島大学整形外科),  
前田 真吾 (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 (青森県立中央病院), 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】

後縦靭帯骨化症 (以下, OPLL) はこれまでの遺伝子解析により, コラーゲン 11A2 遺伝子の関与が報告されている<sup>1)</sup>。またゲノム全域での候補遺伝子スクリーニングにより, BMP4 を含めたいくつかの骨代謝に関連する候補遺伝子の関与も示唆されている<sup>2)</sup>。しかしながら, OPLL のような多因子疾患では, 当然, 他にも関与する遺伝子の存在が予想される。そこで我々は, 感受性遺伝子の網羅的同定を目指し, ゲノム全域連鎖解析を完了した。最も強い連鎖を認めた 21q21.3 の領域であり, LOD Score 3.6 を得ている。しかしながら, ノンパラメトリック連鎖解析においては約 10—20 cM (センチモルガン) 領域にしか領域を絞ることができないので, なお膨大なスクリーニングとなる。次に, その領域に存在する既知の遺伝子について SNPs (一塩基置換) をデータベースもしくはダイレクトシーケンスによるスクリーニングから遺伝子あたり数個もしくは十数個獲得し, 患者・対照関連解析を行った。さらに SNPs を組み合わせハプロタイプを構築し, 連鎖不平衡を利用し, 疾患と関連する遺伝子多型の同定を目指している。これにより SNP そのものが直接疾患の原因になっていなくても, これと連鎖不平衡にある多型の検出により, 感受性遺伝子同定の戦略として有用な手段となりうる。これらの方法により, 我々は有意差 ( $p < 0.05$ ) を認める遺伝子をいくつか見出している。

## A. 研究目的

近年, ヒトのゲノムドラフト配列の解明や 140 万個のヒト遺伝子多型 (SNP) の報告など, 一気にゲノムサイエンスが加速し, ポストシーケンスへ向かっている<sup>3-5)</sup>。医学領域においては疾患感受性遺伝子解析, 特に多因子疾患解析に注目が集まりつつある。Common Disease, いわゆるありふれた疾患は, 高血圧や糖尿病などに代表されるように, 比較的強い遺伝的背景にさまざまな環境要因が複雑に絡み合って発症する多因子疾患である。OPLL は整形外科領域における Common Disease のひとつであり, 原因究明においてこれまで数多くの報告がなされているものの未解決な問題が多い。これまでに行ったゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析にて, 21q21.3 の領域に最も強い連鎖を認め, この領域の疾患への関与は示唆されているが, 原因遺伝子の同定にはさらに労力を要する。そこで我々は, 近年進歩の目覚ましいゲノム情報を有効に活用し, OPLL の疾患感受性遺伝子の同定を目指している。

## B. 研究方法

解析に用いた SNPs は, ウェブサイトで公開されたデータベースに登録されている SNPs の中でも, NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)

及び IMS-JST JSNP DATABASE (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>) から選出した。選出の際に考慮する点として, SNP 間距離はなるべく 3~10 kb で均等に保つようにし, またコーディング領域の SNP を優先した。8 人の OPLL 患者を用いたスクリーニングによりアレル頻度 1/16 以上の SNP を選定し, そこからさらに, アレル頻度や SNP 間の連鎖不平衡を考慮しタイピングすべき SNP を決定した。タイピングは, ケース及びコントロールサンプルそれぞれ 96 例で行い, 関連解析により P-value  $< 0.05$  もしくはアレル頻度差 5% 以上の SNP に対し, さらにケースで 192 例, コントロールで 96 例のサンプルを追加して解析を行った。タイピングには Pyrosequencing 社製 PSQ96 及び ABI PRISM 377 DNA Sequencer を使用した。

## C. 研究結果

21q21.3 の領域を中心にした 112 遺伝子, 412 SNPs のスクリーニング (図参照) にて, 現在まで表 1 に示す 5 genes, 9 SNPs で P-value  $< 0.05$  の有意差を認めている。なかでも, 連鎖解析にてピークを示した D21S263 マーカーから約 2.3 Mb 離れた位置にある SNP (rs762178) は, 関連解析にて約 8% のアレル頻度差があり,  $\chi^2$  検定では最も強い有意差



表 1

SNP ID	contig	contig position	variation	OPLL <sup>a</sup>	CONTROL <sup>a</sup>	$\chi^2$	P-value
INT01 (19028) <sup>b</sup>	NT_01151	18842194	delC	0.347	0.282	4.0028	0.0454
	2						
rs2070371	NT_01151	18945106	C/T	0.323	0.386	3.9289	0.0474
	2						
EX11 (285) <sup>b</sup>	NT_01151	18948041	C/T	0.426	0.344	6.1018	0.0135
	2						
rs2009130	NT_01151	19975096	C/G	0.403	0.489	5.0219	0.0250
	2						
rs762178	NT_01151	19976319	G/A	0.184	0.103	11.0853	0.0009
	2						
JST056070	NT_01151	20479445	T/G	0.233	0.305	4.0530	0.0440
	2						
JST016805	NT_01151	2243419	A/G	0.329	0.432	9.5675	0.0020
	5						
JST022079	NT_01151	3327022	G/A	0.419	0.325	6.7106	0.0096
	5						

a Allele frequency

b screened SNPs by direct sequencing

を認め、OPLL への関与が示唆された。

#### D. 考察

SNP はゲノム上に 300 ~ 1000 塩基に 1 つと高頻度に存在する遺伝子多型であり、情報度の高いマーカーとなりうる。SNP による疾患感受性遺伝子同定は一般的に関連解析 (ケース・コントロールスタディ) が行われている。これは「ありふれた病気に対する感受性 (かかりやすさ) は集団内でのある共通の遺伝子多型 (SNP) が一因である可能性が高い」という Common Disease-Common variant 仮説に基づき、疾患群と非疾患群でアレル頻度差を統計学的に検定することにより行われる。アレル頻度の違いは通常  $\chi$  (カイ) 検定で検討される。SNP そのものが直接原因変異となっていればよいが、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。SNP は進化上安定であるので数十世代以上にわたって受け継がれてきた多型であり、それゆえ組換えの影響を受けやすく、物理的に近い SNP でないと連鎖不平衡が成立しない。一般的には、その強さは距離、そして発生した時期に相関する。すなわちアレル間の距離が短いほど、また新しいアレルであるほど連鎖不平衡が強いといえる。概して連鎖不平衡の強さは距離に反比例するので、未知の原因変異と連鎖不平衡にある SNP を検出することにより遺伝子座の絞り込みが可能となる。我々はこれまでに、原因変異に関与する可能性を示唆する変異を 9 つ見出し、今後は連鎖不平衡解析を含めたさらなる遺伝解析により、より原因変異に近い領域へとアプローチしていくつもりである。

#### E. 結論

連鎖解析にて最も強い有意差を認めた 21q21.3 領域を中心に、SNPs を用いた関連解析を行い、5genes, 9SNPs で OPLL への関与が示唆された。

今後はこれらの変異を中心に、さらにまだスクリーニングを行っていない遺伝子に関しても遺伝解析をすすめていく必要がある。

#### [参考文献]

- 1) Maeda S, Ishidou Y, Koga H, et al : Functional impact of human collagen  $\alpha$  2 (XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. J Bone Miner Res 16 : 948-957, 2001
- 2) Furushima K, Shimo-onoda K, Maeda S, et al : Large-scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. J Bone Miner Res 17 : 128-137, 2002
- 3) International Human Genome Sequencing Consortium : Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 409 : 860-921, 2001
- 4) Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al : The sequence of the human genome. Science 291 : 1304-1351, 2001
- 5) The International SNP Map Working Group : A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 409 : 928-933, 2001

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Furushima, K., Shimo-onoda, K., Maeda, S., Nobukuni, T., Ikari, K., Koga, H., Komiya, S., Nakajima, T., Harata, S., Inoue, I. 2001. Large scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Miner. Res.* 17, 128-137.

Maeda, S., Ishidou, Y., Koga, H., Taketomi, E., Ikari, K., Komiya, S., Takeda, J., Sakou, T., and Inoue, I. 2001. Functional impact of human collagen  $\alpha 2$  (XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone. Miner. Res.* 16, 948-957.

Havelka, S., Vesela, M., Pavelkova, A., Halman, L., Ruzickova, S., Koga, H., Maeda, S., Inoue, I., 2001. Are diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL) genetically related? *Annal. Rheum. Dis.* ARD : 118.

Maeda, S., Koga, H., Matsunaga, S., Numasawa, T., Takeda, J., Harata, S., Sakou, T., Inoue, I. 2001. Gender-specific haplotype association of collagen  $\alpha 2$  (XI) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Hum. Genet.* 46, 1-4.

### 2. 学会発表

23rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research  
【Phoenix, Arizona, USA】 October 12-16, 2001

Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell could be regulated by  $\beta$ -catenin pathway.

S. Maeda<sup>1,2</sup>, K. Shimo-Onoda<sup>1,2</sup>, T. Nobukuni<sup>1</sup>, K. Hayashi<sup>2</sup>, H. Koga<sup>2</sup>, S. Matsunaga<sup>2</sup>, K. Yone<sup>2</sup>, S. Komiya<sup>2</sup>, I. Ituro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Division of Genetic Diagnosis, The Institute

for Medical Science, The University of Tokyo.

<sup>2</sup>Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, Kagoshima University.

第19回日本骨代謝学会

【名古屋市】名古屋国際会議場 8月10, 11日  
ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化における  $\beta$ -cateninの関与

<sup>1</sup>鹿児島大学医学部整形外科学教室

<sup>2</sup>東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断

前田真吾<sup>1,2</sup>, 下小野田一騎<sup>1,2</sup>, 信国宇洋<sup>2</sup>, 古賀公明<sup>1</sup>, 林 協司<sup>1</sup>, 松永俊二<sup>1</sup>, 米 和徳<sup>1</sup>, 小宮節郎<sup>1</sup>, 井ノ上逸朗<sup>2</sup>

第16回日本整形外科学会基礎学術集会

【広島市】広島国際会議場 10月18, 19日 (広島大学医学部整形外科)

ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化と  $\beta$ -cateninの機能的関連

<sup>1</sup>鹿児島大学医学部整形外科学教室

<sup>2</sup>東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断

前田真吾<sup>1,2</sup>, 下小野田一騎<sup>1,2</sup>, 信国宇洋<sup>2</sup>, 古賀公明<sup>1</sup>, 林 協司<sup>1</sup>, 松永俊二<sup>1</sup>, 米 和徳<sup>1</sup>, 小宮節郎<sup>1</sup>, 井ノ上逸朗<sup>2</sup>

# 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】

我々は、OPLLの発症に関与する遺伝的要因を全ゲノムを対象とした多型マイクロサテライトマーカーによる相関解析によって明らかにする計画を推進してきた。約3,000Mbの全ゲノムを高精度に解析するために必要となるマーカーの数は、約30,000個である。この数量のマーカーを設定するために、45,417個の単純繰返し配列を公的塩基配列データベースより抽出して多型性を評価した。既知マーカーから9,099個、新規マーカーとして19,311個の多型性を示すマイクロサテライトマーカーが得られた。これらの結果、目標である1マーカー/100kbの密度でゲノム全域に対応するマーカーが設定できたことからOPLLの相関解析が開始できる状況に到達した。

## A. 研究目的

脊椎後縦靭帯骨化症（OPLL）の発症に関係する遺伝因子としては、コラーゲン11A2（COL11A2）遺伝子<sup>1)</sup>やNPPS遺伝子やTGFB1遺伝子の関与<sup>2,3)</sup>が報告されている。しかしながら、OPLLの発症に関与する全ての遺伝子が、明らかになったわけではない。OPLLの発症が複数の関連遺伝子によるのであれば、ゲノム全域を対象とした解析は、原因遺伝子特定するための有効な手段である。しかしながら、ヒトゲノムの塩基配列がほぼ決定された現時点においても、個々の患者のゲノムを精査することは現実的ではない。したがって、一塩基の置換やマイクロサテライトのような遺伝的多型マーカーの開発が急がれている。

本研究では、OPLL原因遺伝子を同定するためのゲノムワイドな疾患遺伝子（群）のスクリーニングを可能にする約28,000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塩基の繰返し配列であるマイクロサテライト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により、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pico green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。

## C. 研究結果

相関解析に用いる遺伝的マーカーとして、現在1塩基多型（SNP）とマイクロサテライトが利用されている。マイクロサテライトは、SNPと比べて対立遺伝子数が多く高いヘテロ接合度を持つ点で、遺伝的マーカーとしてより効率的である。ただし、日本人の患者群を対象とした解析には、日本人集団における多型性を検討したマイクロサテライトマーカー

の設定が不可欠であった。そのため我々は、昨年度までに既知のマーカー 6,180 個と新規のマーカー 13,751 個より、13,909 個の多型マイクロサテライトマーカーを確立した。マイクロサテライトマーカーの連鎖不平衡距離は約 100 kb であるので、約 30,000 個のマーカーによってヒト全ゲノムをカバーできる。本年度は、引き続き塩基配列データベースに登録されたヒトゲノムのドラフト塩基配列より抽出した新規のマーカーについて、その多型性を検討した。本研究では、処理速度の向上のため1回のPCR反応によって100検体のマイクロサテライトマーカーを増幅して検出する手法を用いた。現在までに、100人の日本人健常者をコントロールDNAとして、45,417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28,410個に達した。

#### D. 考察

ヒトゲノムを 30,000 個のマイクロサテライトによって 100 kb の分解能で検索する相関解析のシステムを目標として多型マーカーを整備してきた。ヒトゲノムの塩基配列が厳密には、全領域をカバーしていないことを考慮すれば、これまでの結果により、ほぼ予定した密度の多型マーカーが設定され解析可能な状態に整備された。得られた約 28,400 個の多型マイクロサテライトマーカーセットは、日本人集団内での多型性が検証されており、日本人集団に特徴的な他の疾患の解析にも有効であると考えられる。既に多数の検体を効率的に処理する手法も開発しているが、なお考慮すべき点があると思われる。相関解析を困難にする一つの要因は、解析する検体がヘテロな集団で点である。OPLL病態が一樣ではなく、COL11A2 遺伝子で示された多型に性差がある<sup>9)</sup>ことから、解析時には可能であれば詳細に分類するべきであろう。今後は、多型マイクロサテライトマーカーによる相関解析によってOPLLの原因遺伝子を約100～200 kb 程度の範囲に限定し、各候補領域については、発現遺伝子の同定やSNPマーカーを併用した、より高精度な相関解析を行う予定である。

#### E. 結論

OPLLは多様な病態を示し、その原因を遺伝子レベルでは説明できていないことから、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。この解析には、必要

な日本人集団に合わせた多型マイクロサテライトが不可欠であり、その収集を行った結果、現在までに28,410個の多型マーカーの設定し、予定した密度(100 kb/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) Kamiya M, Harada A, Mizuno M, Iwata H, Yamada Y. Association between a polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene and genetic susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament in Japanese patients. *Spine Jun 1 ; 26(11) : 1264-7, 2001*
- 4) Maeda S, Koga H, Matsunaga S, Numasawa T, Ikari K, Furushima K, Harata S, Takeda J, Sakou T, Komiya S, Inoue I. Gender-specific haplotype association of collagen alpha2 (XI) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Hum Genet.* 46(1) : 1-4, 2001

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 松坂恭成, 猪子英俊:DNA解析と機能的ゲノム学が生む技術,医療機器センター15周年記念誌,財団法人医療機器センター,東京,2001;p.32-35.
2. 岡本浩一, 田宮本元, 猪子英俊:ポストゲノム時代の遺伝統計学(鎌谷直之編,ゲノムワイド相関解析による乾癬感受性遺伝子の検索,羊土社,東京,2001;p.47-68.
3. Ikewaki I, Tamauti H, Yamada A, Aoki M, Yamamoto R, Sawada A, Inoko H: A microfilament formation inhibitor, cytochalasin strongly enhances the low-affinity Fc receptor II (CD23) expression on the human monocyte-like

- cell line, U937. *J Clinical Immunology* 20 : 424-433, 2001.
4. Deguchi R, Takagi A, Kawata H, Inoko H, Miwa T : Association between CabA + Helicobacter pylori infection and p.53, BAX and TGFb-RII gene mutations in gastric cancer patients. *International J Cancer* 91 : 481-485, 2001.
  5. Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Mizuki N, Seki S, Honma T, Inoko H, Asakura H : A close relationship of triplet polymorphism in MHC class I chain-related gene A (MICA) to the disease susceptibility and behavior in ulcerative colitis. *Tissue Antigens* 57 : 9-14, 2001.
  6. Ota M, Katsuyama Y, Kimura A, Tsuchiya K, Kondo M, Naruse T, Mizuki N, Sasazuki T, Inoko H : A second susceptibility gene for developing rheumatoid arthritis in the human MHC is localized within a 70 kb interval telomeric of the TNF genes in the HLA class III region. *Genomics* 71 : 263-270, 2001.
  7. Mizuki N, Yabuki K, Ota M, Verity D, Katsuyama Y, Ando H, Onari K, Goto K, Imagawa Y, Mandnat W, Fayyad F, Stanford M, Ohno S, Inoko H : Microsatellite mapping of a susceptible locus within the HLA region for Behcet's disease using Jordanian patients. *Hum Immunol* 62 : 186-190, 2001.
  8. Shiina T, Ando A, Suto Y, Kasai, Shigenari A, Takishima N, Kikkawa E, Iwata K, Kuwano Y, Kitamura Y, Matsuzawa Y, Sano K, Nogami M, Kawata H, Li S, Fukuzumi Y, Yamazaki M, Tashiro H, Tamiya G, Kohda A, Okumura K, Ikemura T, Soeda E, Mizuki N, Kimura M, Bahram S, Inoko H : Genomic anatomy of a premier Major Histocompatibility Complex paralogous region on chromosome 1q21-22. *Genome Research* 11 : 789-802, 2001.
  9. Matsuzaka K, Makino S, Nakajima K, Tomizawa M, Oka A, Bahram S, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H : New microsatellite markers in the human MHC class III region. *Tissue Antigens* 57 : 397-404, 2001.
  10. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Yoshida M, Katsuhiko O, Nikbin B, Davatchi F, Chams H, Ghaderi AA, Ohno S, Inoko H : HLA class I genotyping including HLA-B\*51 allele typing in the Iranian patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 57 : 457-462, 2001.
  11. Gasper JA, Shiina T, Inoko H, Edwards SV : Songbirds genomics : Analysis of 45 kb upstream of a polymorphic Mhc class II gene in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Genomics* 75 : 26-34, 2001.
  12. Ando A, Kawata H, Murakami T, Shigenari A, Shiina T, Sada M, Tsuji T, Toriu A, Nakanishi Y, Mitsuhashi T, Sekikawa K, Inoko H : cDNA cloning and genetic polymorphism of the swine major histocompatibility complex (SLA) class II DMA gene. *Anim Genet*. 32 : 73-77, 2001.
  13. Holland LZ, Rached LA, Tamme R, Holland ND, Inoko H, Shiina T, Burgdorf C, Lardelli M : Characterization and developmental expression of the amphioxus homolog of Notch (Amphi-Notch) : evolutionary conservation of multiple expression domains in amphioxus and vertebrates. *Dev Biol*. 232 : 493-507, 2001.
  14. Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A : Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4. *Tissue Antigens* 57 : 520-535, 2001.
  15. Arai T, Yoshida K, Kaburaki J, Inoko H, Ikeda Y, Kawakami Y, Kuwana M :

- Autoreactive CD4(+) T-cell clones to beta (2)-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome : preferential recognition of the major phospholipid-binding site. *Blood*. 98 : 1889-1896., 2001.
16. Kulski JK, Martinez P, Longman-Jacobsen N, Wang W, Williamson J, Dawkins RL, Shiina T, Naruse T, Inoko H : The association between HLA-A alleles and an Alu dimorphism near HLA-G. *J Mol Evol*. 53 : 114-123, 2001.
  17. Tsuda TT, Tsuda M, Naruse T, kaata H, Ando A, Shiina T, Fukuda M, Kurita M, KeMaho I, Kuliski JK, Inoko H : Phylogenetic analysis of penguin (Spheniscidae) species based on sequence variation in MHC class II gene. *Immunogenetics* 53 : 712-716, 2001.
  18. Taniguchi Y, Sato M, Tanaka O, Sekiguchi M, Inoko H, Kimura M : HOXD3 regulates expression of JAGGED1, a ligand for Notch receptors. *Nuclei Acids Reserach Supplement No. 1* : 43-44, 2001.
  19. Taniuchi Y, Suzuki H, Ohtsuka M, Kikuchi N, Kimura M, Inoko H : Isolation and characteriation of three gemnes paralogus to mouse Ring3. *Nuclei Acids Reserach Supplement No. 1* : 247-248, 2001.
  20. Seki SS, Sugimura K, Ota M, Matsuzawa J, Katsuyama Y, Ishizuka K, Mochizuki T, Suzuki K, Yomeyama Y, Mizuki N, Honma T, Inoko H, Asakura H : A stratification analysis of MICA triplet repeat polymorphisms and HLA-antigens associated with ulcertive colitis. *Tissue Antigens* 58 : 71-76, 2001.
  21. Sano K, Yabuki Y, Imagawa Y, Shiina T, Mizuku N, Ohno S, Kulski JK, Inoko H : The absence of disease-specific polymorphisms within the HLA-B51 gene that is the susceptible locus for Behcet's disease. *Tissue Antigens* 58 : 77-82, 2001.
  22. Romphruk, AV, Naruse TK, Romphruk A, Kawata T, Pauapairoj, Kulski JK, Leelayuwat, Inoko H : Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. *Tissue Antigens* 58 : 83-89.
  23. Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Yabuki K, Ando H, Shiina T, Nomura E, Onari K, Ohno S, Inoko H. HLA-B\*51 allele analysis by the PCR-SBT method and a strong association of HLA-B\*5101 with Japanese patients with Behcet's disease. *Tissue Antigens* 58 : 181-184, 2001.
  24. Kulski JK, Dunn DS, Gaudieri S, Shiina T, Inoko H : Genomic and phylogenic analysis of the human CD1 and HLA class I multicopy genes. *J Mol Evol*. 53 : 642-650, 2001.
  25. Ishikawa Y, Kashiwase K, Okai M, Ogawa A, Akaza T, Morishima Y, Inoko H, Sasazuki T, Kodera Y, Juji T. Polymorphisms in the coding region of mtDNA and effects on clinical outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 28 : 603-607, 2001.
  26. Niizeki H, Naruse T, Hecker KH, Taylor JR, Kurimoto I, Shimizu T, Yamasaki Y, Inoko H, Streilein JW : Polymorphisms in the tumor necrosis factor (TNF) genes are associated with suseptibility to effects of ultraviolet-B radiation on induction of contact hypersensitivity. *Tissue Antigens* 58 : 369-378, 2001.
  27. Suemizi H, Radosavljevic M, Kimura M, Sadahiro S, Yoshimura S, Bahrama S, Inoko H : A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 2971-2976, 2002.
  28. Kulski JK, Dunn DS, Hui J, Martinez P, Romphruk AV, Leelayuwat C, Tay GK, Oka A, Inoko H. Alu polymorphism within the MICB gene and association with HLA-B alleles. *Immunogenetics* 53 : 975-979, 2002.
  29. Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Verity D, Goto K, Kimura T, Nomura E, Madanat W, Katsuyama Y, Kimura M, Stanford M, Inoko H : A Ohno S : A strong association

between MICA gene and Behcet's disease in Jordanin. *J. Ophthalmology* in press

30. Ando A, Kawata T, Murakami T, Shigenari A, Shiina T, Sada M, Tsuji T, Toriu A, Nakanishi Y, Mitsuhashi T, Sekikawa K, Inoko H : cDNA clone and genetic polymorphisms of the swine major histocompatibility complex (SLA) class II DMA gene. *Animal Genetic* in press

31. Kulski JK, Martinez P, Longman-Jacobsen N, Wang W, Williamson J, Dawkins RL, Shiina T, Naruse T, Inoko H : The association between HLA-A alleles and an Alu dimorphisms near HLA-G. *J Mol Evol* in press

32. Kuwana M, Arai T, Yoshida K, kaburaki J, Inoko H, Ikeda Y, Kawakami Y : Autoreactive CD4 + T cell clones to b2-glycoprotein I in patients with antiphospholipid syndrome : Preferential recognition of the major phospholipid-binding site. *Blood* in press

33. L. Abi-Rached, A Gilles, T Shiina, P Pontarotti, H Inoko : Large scale duplications in vertebrate evolution : insights from amphioxus. *Nature Genetics* in press

## 2. 学会発表

1. Inoko H : Genomewide scan of disease genes through microsatellites, Special Lecture, The 1st Indian Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2001.

2. Naruse TK, kawata H, Nakashima M, Inoko H : Simple and rapid HLA-A and DRB1 SSP genotyping using the 2 color dyes fluorescence detection system. The 1st Indian Society for Histocompatibility and Immunogenetics, 2001.

3. Inoko H : Strategy for genome wide disease mapping using microsatellites : EXTRA SEMINAR in Department of Immunohematology and Blood Transfusion Leiden University, 2001.

4. Inoko H : Strategy for genome wide disease mapping using microsatellites by association study. Seminar in Max-Planck-Institute for Molecular Genetic, 2001.

5. Inoko H : Comparative MHC Genomics, 5th Chromosome Workshop, 2001

6. Inoko H : Genome-wide scan of disease genes through microsatellites. The Korean Society for Immunology, 2001.

7. Inoko H : HLA to human genome diversities : Genomewide scan of disease genes by association analysis using microsatellites, Plenary session in the 16th European Histocompatibility Conference EFI Meeting

8. Inoko H : PSORS1 and genome-wide mapping by microsatellite-based association analysis. The 6th International Psoriasis Genetics Committee Meeting.

9. Inoko H : From HLA to human genome diversities : Disease gene mapping by association analysis using microsatellites, Keynote addresses in the 13th International Congress of Histocompatibility and Immunogenetics. Japan French Immunology meeting

10. Inoko H : Strategy for genome-wide mapping of common diseases using association analysis with microsatellites. *Genome Science in the 1st Century ; Information of the Higher-Order Structure beyond the Primary Sequence*, 2001.

11. H Inoko, T Anzai, Y Fukuzumi, M Yamazaki, H Tashiro, JK Kulski, T Shiina : Genome sequencing and comparative genome analysis on the chimpanzee MHC class I region. GEMINI Workshop on Ape Genomics, 2001.

12. H Inoko : Comparative genomics on the MHCs by genome sequencing. Symposium on Evolution Genomics, 2001

13. Inoko H : Genome-wide scan of disease genes by association analysis using microsatellites. The 1st Hakone-yama Symposium, "Genetic analysis of

- Multifactorial Diseases” 2001
14. Inoko H : Genome-wide scanning of disease-susceptible loci by microsatellite markers. *Genomics and Phenomics of Vsculitis and Atherosclerosis*, 2001.
  15. 猪子英俊：マイクロサテライトを用いた疾患遺伝子のマッピングの戦略，ゲノムシンポジウム，2001.
  16. 猪子英俊：HLAは何故多くの疾患発症に関わるのか？，第100回日本皮膚科学会総会教育講演，2001.
  17. 猪子英俊：ゲノムワイドな疾患のマッピング戦略—マイクロサテライトを用いて，第197回DNA研究会，2001.
  18. 猪子英俊：マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな疾患遺伝子マッピングの戦略：HLAモデル領域として，第1回G1 (gastrointestinal) リサーチフォーラム，2001.
  19. 猪子英俊：疾患関連遺伝子同定のストラテジー—HLA領域をモデルとして—，第8回日本遺伝子診療学会大会 シンポジウム「ゲノムの個性と疾患」，2001.
  20. 猪子英俊：疾患関連遺伝子同定のストラテジー—HLA領域をモデルとして—，山之内製薬セミナー，2001.
  21. 猪子英俊：疾患関連遺伝子同定のストラテジー—HLA領域をモデルとして—，湧永製薬セミナー，2001.
  22. 猪子英俊：HLAと相関する疾患の感受性遺伝子の探索，臨床HLA研究会セミナー，2001.
  23. 猪子英俊：MICとCD1遺伝子領域のゲノム構造，第10回日本組織適合性学会 シンポジウム「Non-classical MHC」，2001.
  24. 猪子英俊：マイクロサテライト多型を用いたHLAと相関する疾患の遺伝子マッピングと同定，第10回日本組織適合性学会 シンポジウム「多因子疾患の遺伝的要因としてのHLA」，2001.
  25. 猪子英俊：ポストゲノムシーケンシング解析のモデル領域としてのMHC—ゲノム多様性解析と比較ゲノム解析—，第10回日本組織適合性学会 シンポジウム「MHC—総合ゲノム科学の視点から」，2001.
  26. 猪子英俊：箱根山シンポジウム“多因子疾患の遺伝子解析：遺伝子同定から臨床応用へ”，2001.
  27. 猪子英俊：複合疾患関連遺伝子のマイクロサテライトを用いたゲノムワイドなマッピングの戦略，第9回難病治療研究会，2001.
  28. 猪子英俊：マイクロサテライトを用いたゲノムワイドな相関解析による疾患遺伝子のマッピング，第40回長崎大学大学院特別セミナー，2001.
- G. 知的所有権の取得状況**
- 無し



# 老化促進モデルマウスを用いた第11骨量制御遺伝子座の解析 及び後縦靭帯骨化の検索

清水 基行 (京都大学大学院医学研究科筋・骨格系病態学分野),  
松下 睦 (京都大学大学院医学研究科筋・骨格系病態学分野),  
松村 拓郎 (京都大学大学院医学研究科筋・骨格系病態学分野),  
奥平 修三 (京都大学大学院医学研究科筋・骨格系病態学分野),  
細川 昌則 (京都大学再生医科学研究所再生統御学部門),  
中村 孝志 (京都大学大学院医学研究科筋・骨格系病態学分野)

## 【研究要旨】

我々は以前、低骨量マウス系統であるSAMP6と高骨量系のSAMP2を用いた交配実験による連鎖解析の結果、peak bone massはpolygene系の遺伝形式であり、そのQTL (quantitative trait loci) つまり、原因となる遺伝子座は第11, 13染色体に存在することを示した。今回、第11染色体にQTLを含むintervalを持つコンジェニックマウスを2系統作製し、peak bone massを測定した。両系統とも各々のバックグラウンド系統に比し、骨量に有意な差を認め、第11染色体に連鎖解析で得られたQTLが存在することが証明された。また、高骨量系のSAMP2老齢マウスの脊椎には、X線写真、組織標本にてもOPLLは確認されず、SAM系統の高骨量はOPLLとは直接的には関係がないと考えられた。

## A. 研究目的

SAM (Senescence-Accelerated Mouse : 老化促進モデルマウス)は一連の関連近交系マウスであり、10数系統存在する<sup>1,2)</sup>。その一つであるSAMP6 (以下P6)は、SAMの中では最も低いpeak bone massを呈し、老年性骨粗鬆症のモデル動物とされている。また、SAMP6の対照であるSAMP2 (以下P2)は、SAMの中では最も高いpeak bone massを示す系統の一つである。上記2系統の交配実験を用いた連鎖解析の結果、peak bone massはヒトと同じくpolygene系の遺伝形式であり、そのQTLは第11, 13染色体に存在することがこれまでに示唆されている。また、P6のalleleは低骨量に、P2のalleleは高骨量に関係している<sup>3)</sup>。この原因遺伝子を同定するための第一歩としては、polygene系からsingle gene系のモデル動物に変換することが必要である。今回、第11染色体にQTLを含むintervalを持つコンジェニックマウスを、P6バックグラウンドの系統及びP2バックグラウンドの系統の2系統を作製し、その骨量を測定することでQTLの存在を確認することを目的とした。さらに、donor strain由来のintervalを決定することで、骨量と連鎖する染色体上の領域を詳細に検討することを試みた。また、OPLLの患者が高骨密度を示す報告<sup>4,5)</sup>が散見されることから、高骨量系のP2にOPLLが存在するかどうかX線写真、組織標本を用いて確認した。

## B. 研究方法

はじめに、バックグラウンドがP6で、第11染色体のQTL上の領域のみがP2であるコンジェニックマウスの作製法を説明する。まず、低骨量系のP6に高骨量系のP2を交配しF1を作製し、以降、P6に6回連続戻し交配してN7を作った。交配の際、26cMのQTLの領域に渡る3つのマイクロサテライトマーカー (D11Mit242, D11Mit90, D11Mit59) において、全てP2のalleleを持つ個体を選抜した。これにより計算上は99%のバックグラウンドがP6となるが、念のため他の染色体のマーカーを43個用いて、全てP6のalleleであることを確認した。最後に、第11染色体のQTLの領域がヘテロであるN7同士を交配してホモの個体を作製し、以後、兄妹交配にて維持を行った。骨量測定は、peak bone massを呈する4ヶ月齢雄マウスの大腿骨骨量をMD法にて測定した。また、この遺伝子座をPbd1 (Peak bone density 1) とし、このコンジェニック系統をP6.P2-Pbd1bと名付けた。これとは逆にF1作製後、P2に連続戻し交配することで、バックグラウンドがP2で、第11染色体のQTL (Pbd1) 上の領域のみがP6であるコンジェニックマウス P2.P6-Pbd1a も作製した。SAMP系統の平均寿命は8—10ヶ月と報告されており (P2は9.2ヶ月, P6は8.1ヶ月)、短命であるため8ヶ月齢でも十分老齢であると思われる。したがって、8ヶ月齢雄の高骨量系のP2を5匹、低

骨量系のP6を3匹屠殺し、大腿骨骨量をMD法にて測定し、全脊椎を正側面にて軟部 X 腺撮影を行った。同一のサンプルを用い、5%ギ酸ホルマリンを用いて脱灰標本作製し、hematoxylin eosin 染色及び elastica van Gieson 染色にて全脊椎での後縦靭帯の骨化の存在を検索した。

### C. 研究結果

1) コンジェニックマウスの第 11 染色体における dense map P6.P2-Pbd1b では、32cM は P2 のホモの領域になっており、double recombination は認められなかった。また、最遠位部の 16cM は N7F1 の段階でヘテロになっていた。また、P2.P6-Pbd1a では、最遠位部の 16cM がパッセンジャー DNA の領域となり、48cM と長い距離が P6 のホモの領域になっており、やはり double recombination は認められなかった。

2) コンジェニックマウスの peak bone mass 4 ヶ月齢の雄のマウスの大腿骨骨量を測定すると、P6.P2-Pbd1b の骨量は、バックグラウンド系統である P6 と比較すると有意に高く ( $P < 0.0001$ )、その差は P6 と P2 の骨量差の 26.8% に相当した。また逆に、P2.P6-Pbd1a の骨量は、バックグラウンド系統である P2 と比較すると有意に低く ( $P < 0.0001$ )、その差は P6 と P2 の骨量差の 56.3% に相当していた。更に、ここでは示さないが、MD 法のもう一つのパラメーターである  $\Sigma GS/D2$  も同様の結果を呈し、DXA、pQCT と骨量測定方法を変えてもほぼ同様の結果が得られた。

3) 老齢 SAM マウスの骨量と OPLL の存在

8 ヶ月齢でも P2 は P6 と比較すると有意に骨量は高かった ( $P < 0.0001$ )。また、両系統とも X 線像、標本とも全脊椎での後縦靭帯の骨化の存在を認めなかった。

### D. 考察

コンジェニックマウスの結果からは、第 11 染色体にある P2 の interval が、P6 と P2 の骨量差の 26.8% に相当する骨量を引き上げ、P6 の interval が 56.3% に相当する骨量を引き下げたと考えられ、連鎖解析で計算されていた QTL が Pbd1 の領域に存在することが証明された。この領域は、Klein らが C57BL/6 と DBA/2 を用い<sup>6)</sup>、Benes らが SAMP6 と AKR/J<sup>7)</sup> を用いて、DXA によるマウス全身骨密度をパラメーターとした連鎖解析から得られた QTL とほぼ一致する。更に、腰椎骨密度との association

study の報告<sup>8)</sup>がある type I collagen  $\alpha 1$  等、candidate gene の数多く存在するヒト第 17 染色体長腕と synteny を持つ領域でもある。

最終的には peak bone mass を制御する遺伝子そのものを単離することが目標であるが、このようなポリジーン系の形質に対する strategy として、2 種類が考えられる。一つは更に交配実験を続けて、現在あるコンジェニックマウスの持つ領域を更に狭めた subcongenic strain を数系統作ることで congenic mapping を行い、最終的に 1cM まで遺伝的距離を縮めて、物理的地図の作製を行う従来からの positional cloning の応用である<sup>9)</sup>。もう一つは、マイクロアレイ等の方法を用い、コンジェニックマウス系統とバックグラウンド系統間で、当該組織での発現量の異なる遺伝子を同定する方法である<sup>10)</sup>。我々は現在この 2 つの方法によるアプローチを開始している。OPLL のモデルとしては ttw マウスがあり<sup>11)</sup>、positional candidate gene approach にて原因遺伝子が同定されているが、ヒトでは未だ完全には同定されていない。SAMP2 マウス系統が高骨量系統であることは既知であったので、OPLL の新たな動物モデルとなる可能性を調査したが、後縦靭帯の骨化を認めなかった。

### E. 結論

コンジェニックマウスの骨量測定の結果から、peak bone mass を制御していると思われる第 11 染色体 QTL の存在が証明された。また、SAMP2 老齢マウスの高骨量は OPLL とは直接的には関係がないと考えられた。

#### [参考文献]

- 1) Takeda T. The SAM model of senescence. Amsterdam, London, New York, Tokyo, Excerpta Medica, 1994
- 2) Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM) : a novel murine model of senescence. Exp Gerontol, 32 : 105-109, 1997
- 3) Shimizu M, Higuchi K, Bennett B, et al. Identification of peak bone mass QTL in a spontaneously osteoporotic mouse strain. Mamm Genome, 10 : 81-87, 1999
- 4) Hirai N, Ikata T, Murase M, et al. Bone mineral density of the lumbar spine in patients with ossification of the posterior longitudinal

ligament of the cervical spine. *J Spinal Discord*, 8(5) : 337-41, 1995

- 5) Yamauchi T, Taketomi E, Matsunaga S, et al. Bone mineral density in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine. *J Bone Miner Metab*, 17(4) : 296-300, 1999
- 6) Klein RF, Mitchell SR, Phillips TJ, et al. Quantitative trait loci affecting peak bone mineral density in mice. *J Bone Miner Res*, 13(11) : 1648-56, 1998
- 7) Benes H, Weinstein RS, Zheng W, et al. Chromosomal mapping of osteopenia-associated quantitative trait loci using closely related mouse strains. *J Bone Miner Res*, 15(4) : 626-33, 2000
- 8) Grant SF, Reid DM, Blake G, et al. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nat. Genet.* 14(2) : 203-5, 1996
- 9) Lyons PA, Armitage N, Argentina F, et al. Congenic mapping of the type 1 diabetes locus, *idd3*, to a 780-kb region of mouse chromosome 3 : identification of a candidate segment of ancestral DNA by haplotype mapping. *Genome Res*, 10(4) : 446-53, 2000
- 10) Aitman TJ, Glazier AM, Wallace CA, et al. Identification of *Cd36* (Fat) as an insulin-resistance gene causing defective fatty acid and glucose metabolism in hypertensive rats. *Nat Genet.* 21(1) : 76-83, 1999
- 11) Okawa A, Nakamura I, Goto S, et al. Mutation in *Npps* in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet.* 19(3) : 271-273, 1998

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Nishihara H, Nakagawa Y, Ishikawa H, Ohba M, Shimizu K, Nakamura T. Matrix vesicle and Media vesicles as Nonclassical Pathways for the Secretion of m-Calpain from MC3T3-E1 Cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 285 : 845-853, 2001
2. Nishiguchi S, Kato H, Fujita H, Oka M,

Kim H-M, Kokubo T, Nakamura T. Titanium metals from direct bonding to bone after alkale and heat treatments. *Biomaterials*, 22 : 2525-2533, 2001

3. Shimizu M, Higuchi K, Kasai S, Tsuboyama T, Matsushita M, Mori M, Shimizu Y, Nakamura T, Hosokawa M. Chromosome 13 locus, *Pbd2*, regulates bone density in mice. *J Bone and Miner Res*, 16 : 1972-1982, 2001
4. Ito H, Akiyama H, Iguchi H, Iyama K, Miyamoto M, Ohsawa K, Nakamura T. Molecular Cloning and Biological Activity of a Novel Lysyl Oxidase-related Gene Expressed in Catilage. *J Biol Chem*, 276(26) : 24023-24029, 2001
5. Miyazaki T, Kim H-M, Kokubo T, Ohtsuki C, Kato H, Nakamura T. Mechanism of bonelike apatite formation on bioactive tantalum metal in a simulated body fluid. *Biomaterials*, 23 : 827-832, 2002

### 2. 学会発表

1. 安田 義, 中村孝志 : フィブロンネクチンフラグメントはヒト培養関節軟骨における MMP 産生を亢進させる. 第45回日本リウマチ学会総会・学術集会. 平成13年5月14日—16日
2. 長谷隆夫, 中村孝志, 川口三郎 : 新生ラットにおける脊髄損傷の修復 : 神経結合再生と機能回復の相関. 第74回日本整形外科学会学術集会. 平成13年4月19日—22日
3. K. Yoshida, T. Kobayashi, T. Tsuboyama, M. Matsushita, T. Nakamura, S. Narumiya. PGE2 Stimulates bone formation via EP4 subtype of prostaglandin E receptor. 23rd annual meeting of the American society for bone and mineral research, Phoenix, Arizona, U.S.A., October 12-16, 2001
4. 清水基行, 坪山直生, 松下 睦, 笠井宗一郎, 松村拓郎, 奥平修三, 樋口京一, 細川昌則, 中村孝志 : SAM を用いた骨量制御遺伝子座の解析. 第19回骨・カルシウム代謝研究会. 平成13年9月21日

5. 笠井宗一郎, 清水基行, 松下 睦, 松村拓郎, 坪山直生, 細川昌則, 中村孝志: Peak Bone Mass を規定する遺伝子 QTL を持つ Congenic Mice の全身骨密度. 第16回日本整形外科学会基礎学術集会. 平成13年10月18日—19日
6. 戸口田淳也, 長山 聡, 中村祐輔, 中山富貴, 坪山直生, 中村孝志: 骨軟部腫瘍とゲノム解析. 第16回日本整形外科学会基礎学術集会. 平成13年10月18日—19日
7. 中村孝志: バイオマテリアル研究と人工股関節の性能向上. 第28回日本股関節学会学術集会. 平成13年11月9日