

心線距離では「+5.0cm 以上」が「+4.0cm 以下」に比べて、転倒リスク保有の相対危険度は、2.48 倍 (1.28~4.80) と有意であった($p<0.05$)。言い換えれば、身長が低く、前傾姿勢が強いほど転倒のリスクを保有しやすいことが示された。

一方、脊柱の X 線所見では、いずれの項目も相対危険度が有意ではなかった。

D. 考察

本研究より、転倒のリスクを高める要因として、身長が低いこと、前傾姿勢が強いことが挙げられた。高齢者の転倒は、屋内・屋外を問わず、一般に歩行中に生じることが多く、この老人性歩行の特徴として、歩行速度が低下し、小股歩行で、姿勢は前傾となり、ふらつきや揺れがみられる。今回の結果は、このような歩行状態が将来的に転倒を生じやすくすることへの実証的な根拠になるものと考えられる。

X 線所見からは、転倒リスクに関わる明らかな要因を見出すことはできなかったが、強いて言えば、椎間板腔狭小(目視)、椎体骨棘(目視)がある場合には、転倒リスクを高めている可能性があるかと推察される($p<0.2$)。今後、このような X 線所見が、身長が低いことや前傾姿勢が強いことにどのように関わっているのかを探索する必要がある。

E. 結論

身長が低いことや前傾姿勢が強いことは、将来的に転倒の発生の危険性を高めることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Suzuki T, Kim H, Yoshida H and Ishizaki T: Randomized controlled trial of exercise intervention for the prevention of falls in community-dwelling elderly Japanese women. J Bone Min. Metab. 2004, 22: 602-611.
2. 鈴木隆雄, 吉田英世, 成澤研一郎, 大西偉生, 中村利孝: 地域在宅高齢者における身体変化と椎体変形が生活機能および腰背部痛に及ぼす影響. Osteopor. Jpn. 12: 365-368, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

表 身体所見および脊椎X線所見と転倒のリスク保有の関係

測定項目	要因 (+)	要因 (-)	相対危険度	95%信頼区間		p値
身長	146 cm以上/	146 cm未満	0.47	0.24	~ 0.91	0.02
体重	52Kg以上 /	52Kg未満	0.79	0.42	~ 1.50	0.48
BMI(体格指数)	24以上 /	24未満	1.13	0.60	~ 2.12	0.71
重心線距離	5 cm以上 /	4 cm以下	2.48	1.28	~ 4.80	0.01
椎間板腔狭小(目視)	あり /	なし	1.57	0.80	~ 3.07	0.19
椎体終板(目視)	あり /	なし	0.98	0.51	~ 1.86	0.94
椎体骨棘(目視)	あり /	なし	2.59	0.63	~ 10.70	0.19
前縦靭帯骨(目視)	あり /	なし	1.38	0.46	~ 4.09	0.57
椎体変形(目視)	あり /	なし	1.13	0.57	~ 2.23	0.73
全脊椎指数合計	10点以上 /	9点以下	1.33	0.70	~ 2.51	0.39
椎間板腔狭小指数合計	2点以上 /	1点以下	1.04	0.55	~ 1.96	0.91
椎体終板指数合計	2点以上 /	1点以下	0.80	0.40	~ 1.64	0.55
骨棘指数合計	6点以上 /	5点以下	1.69	0.88	~ 3.25	0.12

#年齢調整済

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

痴呆・骨折臨床研究事業

分担 研究報告書

脊椎変性変形にと骨折の関係について

分担研究者 白木正孝 成人病診療研究所所長

脊椎変性変形症を三つの成分に分類し、その加齢変化および骨折に対する効果を検討した。椎間板狭小化、終板硬化、および骨棘形成のいずれもが、加齢に伴い直線的に頻度が高まった。既存骨折の存在および新規骨折の存在はともに骨棘形成を促進した。以上の観察結果は骨粗鬆症による骨折発生と変性変形との密接な関連を強く示唆するものであり、とくに骨棘形成の高度な例における骨密度の評価に関し、注意が必要であることを示しているものと思われた。

A. 研究目的

脊椎変性変形症は加齢とともにその発症頻度がまし、患者の ADL や QOL を障害する代表的疾患である。本症はその発症要因、病態の推移などが未だに不明であり、従って、その予防方法や保存的治療も存在しないのが現状である。本症は加齢とともにその頻度が増し、同様に加齢とともに発生頻度が増す骨粗鬆症との合併もまれではない。にもかかわらず本症と骨粗鬆症は一般には逆の病態とみなされ、変性変形の存在は骨密度を高め、骨折の発生には防御的に働くと想像されてきた。今回我々はこの問題に焦点をあ

てた。すなわち本当に変性変形が骨粗鬆症性骨折を予防するか否かという問題である。この点を明らかにする前に Nagano cohort 研究に参加した閉経後女性につき以下の諸点を検討した。

- 1) 脊椎変性変形症の実態調査。
この研究においては 1162 名の対象者について脊椎変性変形の出現頻度と加齢変化を横断研究手法により検討した。
- 2) 1162 例中、258 例において経年的に変性変形の程度の推移を同時に検討し、その進展の実態を調査した。
- 3) 536 例の無介入例において観

観察開始時変性変形と新規脊椎骨折発生との関連を検討した。ここでは図1に示すように骨折の継時的変化と変性変形の経時的変化の相互関係を検討した。なおここでは骨折発生の有無は同時に前後セットのレントゲン写真において検討したが、変性変形の評価は別々の機会に評価している。

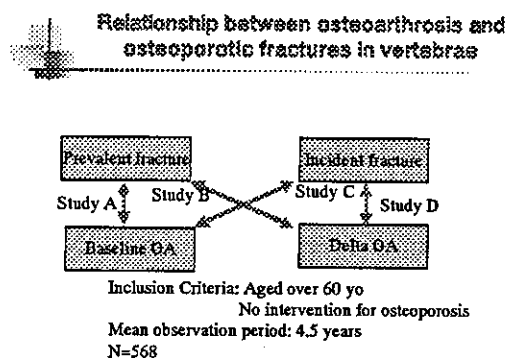
このような検討を行った背景として、最近二つの報告において膝変性変形や脊椎変性変形の存在がその後の骨折発生と関連したという海外における報告(1,2)があったことが研究の動機となっている。

B. 研究方法

対象：対象は研究計画を倫理委員会の承認を得た後、同意のもとに成人病診療研究所—骨粗鬆症長期介入研究に登録した3500名の婦人例のうち、閉経後婦人を1162名ランダムにサンプリングした。これらの例については、脊椎レントゲン撮影、腰椎骨密度(LBMD)測定、骨代謝マーカー測定、血液生化学検査を行った。脊椎レントゲン計測：デジタル化した脊椎レントゲン写真において、既報の方法に従い、変性変形の程度を三つの要素(椎間板狭小、終板硬化、骨棘形成)ごとに半定量法により評価した。ここで各要素の存在する椎体数をカウントし、その広

がりをもって重症度の指標とした。解析方針はまず当該対象群において変性変形の加齢変化を横断的研究手法により解析し、ついで変性変形の継時的変化を縦断的手法により検討した。さらに観察開始時の変性変形と骨折との関連および観察開始時の変性変形が将来の骨折に及ぼす影響、および新規骨折の発生と変性変形の推移の関連を検討した。これらお互いの相互作用に関する検討の概念図を図1に示した。

図1 検討概念図



倫理面への配慮：本研究は前述の成人病診療研究所骨粗鬆症骨折介入研究の一環として行われたものであり、本研究のプロトコルは当研究所倫理委員会にて承認済みである。また本研究への参加者からは文書でサンプルの研究目的使用同意を取得済みである。

C. 研究結果

1) 対象の背景。

表1には対象の背景を示す。対象は全て閉経後婦人である。

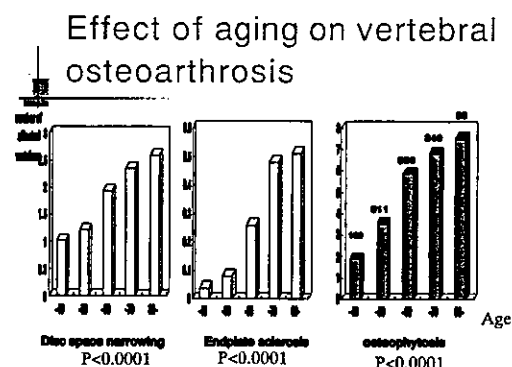
属性	Mean±SD または例数/全例
年齢(才)	63.8±10.4
体重(Kg)	50.8±7.9
身長(cm)	150.8±10.4
閉経後期間(年)	14.8±10.0
腰椎骨密度(g/cm ²)	0.897±0.192

2) 変性変形に加齢変化(横断研究)

1161例全例を用いて変性変形に加齢変化について検討した。ここで変性変形の評価は胸部および腰部脊椎レントゲン写真からの半定量法により評価した。ここでは個々の椎体における変性変形の程度およびそれが存在する部位を無視し、どのような程度であれそれが存在した椎体の数をカウントし、ある個人における椎体変性変形度とした。すなわち本研究で評価しうる変性変形度とは当該対象者の変性変形の広がりを意味する。図2に示すように変性変形はそれがどのような内容であれ、強い加齢変化を示し、加齢とともにその出現頻度は直線的に増加した。なお各年齢区分の症例数は40才代が100例、50才代が311例、60才代が350例、70才代が340例および80才代

が53例であり、推計学的にみてもほぼ満足すべき症例数が確保しえたものと考えている。

図2 変性変形の出現頻度に対する加齢の影響。



ここで各変性変形に加齢変化はANOVAにより検討し、各変性変形のひろがりに関して加齢変化が認められるか否かを年齢区分のtrendとして検定した。各変性変形の広がりを数の面でみても、最も高頻度にみられる変性変形は骨棘形成であり、ついで椎間板狭小が高頻度であった。一方終板硬化はこれら三つの変性変形中では最もその広がりが小さかった。

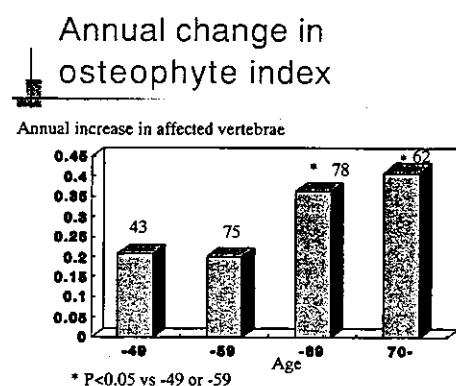
3) 変性変形の経時的変化—特に骨棘形成について(縦断研究)

変性変形は加齢とともにその広がりが増すことが判明したが、その変化は極めて小さく、例えば50才代から60才代にかけて約600例で検討した図2の結果からは10年間かけて約2椎体病変が進行するにすぎない。従って、限られた症例数でしかも限られた観察年数で行う縦断研究

にはその変化がとらえられない可能性が強いと予想された。そこで 258 例の縦断研究においては、まず骨棘形成という最も発現頻度の高い変性変形に着目すると同時にこの変性変形を病変の広がりばかりでなく病変の程度、すなわち骨棘の大きさも加味して評価し、加齢変化を検討した。すなわち骨棘の存在する椎体の数に各椎体における骨棘の面積を計測し、両指標を合算した骨棘指数を算出した。ここでレントゲンの読影は同一人のレントゲンを前後のセットとして行った。このことにより読影間のばらつきを排除した。図 3 には 258 名の対象における年当たりの骨棘指数の加齢変化をまとめた。平均観察期間 4.5 年における前後のレントゲン写真上の変化を観察年数で除して縦軸にとり、横軸には観察開始時年齢をプロットしている。各年代の症例数は 40 才代が 43 例、50 才代が 75 例、60 才代が 78 例および 80 才代が 62 例である。図より明らかなように、40-50 才代における骨棘指数の年あたりの増加は 0.2 ポイント/年程度であるのに対し、60 才代以後はそれが 0.4 ポイント/年に増加し、後者は前者に対し有意であった。すなわち骨棘形成は 40-50 才代でも進行するが、60 才代以後その進行は約倍のスピードに加速されると予想された。図には

しめさないが、骨棘が存在する椎体数のみで経時変化をみた場合にはこのような顕著な差は観察されなかった。この結果は侵される椎体の数というよりは骨棘の面積が増す現象として理解したほうがよいかもしれない。すなわち骨棘は一旦それが形成されると成長するものと推定される。図 2 および 3 において 40 才代の対象における変性変形の出現頻度が高く感じられる。これはこの研究が診療所で行われた故に起る selection bias の結果かもしれない。すなわち何らかの問題をもって診療が動機つけられた集団における解析結果である可能性がある。この点は今後一般住民を対象とした研究で確認しなければならない。

図 3 骨棘指数の経時変化に及ぼす観察開始時年齢の影響



4) 変性変形と脊椎骨折の関係
 ここでは症例数を確保するためまた Event 数を確保するため、ある観察期間中に二回のレントゲン撮影がなされており、それぞれ別個の機会に

読影がなされた症例も対象とした。さらに骨折に対する薬剤の影響を除外するため、無治療介入例のみを選択した。また結果に対する年齢の影響を最小限とするため 60 才以上の症例を対象として検討を行った。このような選択基準で選択された症例は 1161 例中 568 例であった。これらの例に対し前述したように研究 A-D を行った (図 1 参照)

A) 既存骨折と脊椎変性変形の関係 (Study A)

既存骨折の有無別に対象を分類し、それぞれの群における各変性変形の程度を比較したのが表 2 である。表からあきらかなように、既存骨折の有無は椎間板狭小化とは全く関連がなく、終板硬化は既存骨折有り群で高い傾向はあるものの有意な差ではなかった。明らかに既存骨折との関連を認めた変性変形は骨棘形成であり、既存骨折をもつ例はもたない例に比べ有意に骨棘形成を認める椎体数、およびその程度が高度であった。

B) 既存骨折の存在の有無と変性変形の継続的变化(study B)

既存骨折の存在と観察開始時変性変形との間には有意の association が存在した。この現象が過去におけるそれぞれ別個の現象がたまたま観察されたものであるのか、またはそれぞれの変化が連動しているのかを検討する為に、既存骨折を

表 2 既存骨折と観察開始時変性変形の程度

変性変形	既存骨折(+)	既存骨折(-)	p
N	57	500	
Narrowing	2.02±0.20	2.01±0.09	ns
Sclerosis	0.40±0.13	0.24±0.03	ns
Phytosis	6.33±0.42	4.98±0.16	0.0066
Phytosis Index	9.42±0.84	7.05±0.28	0.0077

もつものともたないものとして、その後の変性変形の進展に差がないか否かを検討した。ここで変性変形の進展は異なった二点間のレントゲン写真における椎体変性変形の程度の差を求めその差を観察年数で除して求めた。表 3 はその結果であり、骨棘形成は既存骨折のある群でより進展が高度であった。しかし、骨棘形成を示す椎体数には有意の差はなく、index のみが進展していたことから、既存骨折の存在は骨棘形成の数の進展ではなく、既存の骨棘の grade が進展するのではないかと考えられた。以上の検討から、骨折の存在が骨棘の程度を進行させることが明らかとなった。

表3 既存骨折存在の有無別にみた変性変形の進展度

変性変形	既存骨折(+)	既存骨折(-)	p
Narrowing	0.059 ± 0.030	0.082 ± 0.013	ns
Sclerosis	0.037 ± 0.037	0.009 ± 0.003	ns
Phytosis	0.141 ± 0.061	0.122 ± 0.015	ns
Phytosis Index	0.552 ± 0.145	0.284 ± 0.029	0.0266

C) 新規脊椎骨折の発生と観察開始時脊椎変性変形(Study C)

次に新規脊椎骨折発生例の観察開始時変性変形の程度につき検討を加えた。もしも新規骨折を起こした例の観察開始時変性変形の程度に差が認められれば、そのことはとりもなおさず、変性変形があると骨折しやすいということの証左である可能性がある。表4にはその結果をまとめた。表に示したように新規骨折発生の有無と観察開始時の椎間板狭小または終板硬化とは有意の関連は認められなかった。しかし骨棘形成を起こした椎体の数と程度(Index)はともに新規骨折例で

有意に高い値を示した。このことからただちに骨棘形成を起こした椎体は骨折しやすいと結論はできない。なぜならば、骨棘形成は既存骨折部位におこることもよく知られており、今回の観察事象は既存骨折の存在という新規骨折リスクを介しての association である可能性もあるからである。また新規骨折例は非新規骨折例に比べ高齢であるため、年齢という要因を介して骨折発生と骨棘形成を亢進させている可能性もある。従ってこの両者(骨棘および新規骨折)の関連の検討にはもう少し詳細な統計的論証が必要と考えられる。

表4 新規骨折有無別にみた観察開始時脊椎変性変形

変性変形	新規骨折(+)	新規骨折(-)	p
Narrowing	2.17± 0.19	2.04± 0.10	ns
Sclerosis	0.33± 0.09	0.25± 0.04	ns
Phytosis	6.28± 0.37	4.87± 0.17	0.0007
Index	9.31± 0.74	6.72± 0.29	0.0005

D) 新規脊椎骨折の発生と変性変形の進展(Study D)

新規脊椎骨折の発生に伴い脊椎変性変形が進展するか否かを検討した。前述し

たように観察開始時と観察終了時の二点においてレントゲン写真上変性変形の進展度を観察し、観察期間で除して変性変形の年あたりの進展度を計算した。新規骨折の発生により有意に進展した変性変形は骨棘形成の指標すなわち、骨棘の大きさが進展したのみであった。このことは新規骨折の発生にともない骨棘の大きさが増す可能性を示唆したものと考えられる。結果を表5に示した。

表5 新規骨折の発生の有無別にみた脊椎変性変形の進展度

変性変形	新規骨折(+)	新規骨折(-)	p
Narrowing	0.072 ± 0.021	0.082 ± 0.014	ns
Sclerosis	0.011 ± 0.004	0.011 ± 0.004	ns
Phytosis	0.186 ± 0.039	0.113 ± 0.015	ns
Index	0.574 ± 0.117	0.260 ± 0.028	0.0002

D. 考察

今回の検討から変性変形と骨粗鬆症性骨

折との間の新しい関係が示唆される結果が得られた。変性変形も骨粗鬆症も閉経後女性においては高頻度にとめられるため、この両者間の密接な関係はともすれば無視されるか、または正反対の現象であるかのごとき印象すらもたれていた。これは第一に変性変形の内容をよく吟味せず、すべての変性変形を同一の現象として捉えていたからに他ならない。例えば変性変形の分類方法として Laurence 法は有名な方法であるが、この方法では椎間板狭小、終板硬化および骨棘形成を一括してその程度を評価する方法である。この方法では当然のことながら、各変性変形のコンポーネントは無視され従って各コンポーネントの病的意義は全体のなかに埋没してしまう。今回の検討から、少なくとも骨粗鬆症性骨折にたいする変性変形の影響を観察したところ、椎間板狭小や終板硬化は全く骨折とは association がみられなかった。しかし骨棘形成はかなり強い骨折との association がみられ、骨棘形成の高度なものは既存にせよ新規にせよ骨折がみられることが判明した。また逆に骨折がおこると骨棘形成が高度になる、換言すれば骨折の発生は骨棘の成長を促している所見が得られた。これはおそらく骨折にともなう脊椎アラインメントの変化による応力変形の結果であり、またこのような合目的反応によっても骨脆弱性が保ち得ないとき骨折が発生するものと推定できるのかもしれない。

骨棘形成は結果として骨密度を増すので、将来の骨折予測因子としての骨密度の役割を減弱する方向に働く。従って骨棘形成をみる椎体の骨密度を過剰評価する恐れがある。OFELY 研究においては我々の観察とは異なり椎間板狭小化が骨折との association を認めたと報告している。しかし仔細にデータをみると骨棘形成でも同様の傾向が示されている。骨折発生に対する変性変形の影響に関する彼我の差が人種差によるものかまたは体格など変性変形に対する影響因子の差によるものかは明らかではないが、ともに変性変形の骨折に対する促進効果を観察し得たことでは共通した現象を観察している可能性が高い。今後、変性変形にみられる骨折の発生機序がどのような機序によるものであるのかを検証しなければならない。

参考文献

- 1) Sorney-Rendu E et al Disc space narrowing is associated with an increased vertebral fracture risk in postmenopausal women: The OFELY study. J Bone Miner Res 19: 1994-1999,

2004

- 2) Bergink AP et al Osteoarthritis the knee is associated with vertebral and nonvertebral fractures in the elderly The Rotterdam Study Arthritis Rheum 49 648-657 2003.

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

平成 17 年度の関連学会にて発表予定。

H. 知的財産権の出願・登録状況

現在その予定なし。

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
痴呆・骨折臨床研究事業
分担 研究報告書

脊柱変形をもたらす疾患の発症における遺伝的素因の検討

分担研究者 東京都老人医療センター 内分泌科 細井孝之

A. 研究目的

高齢者の脊柱変形は2つの主要な疾患、すなわち骨粗鬆症と変形性脊椎症によってもたらされる。これらの疾患の発症には遺伝的素因と環境因子(生活習慣因子)の両方がかかっていると考えられる(図1)。本研究はこれらの疾患における遺伝的素因を候補遺伝子の多型性と臨床的指標との連関解析をおこなうことによって明らかにしようとするものである。

遺伝子多型性にはいくつかの種類があるが、我々はとくに single nucleotide polymorphisms (SNPs)について検討している。図2は SNPs の種類を示すものであるがこのなかでも、regulatory SNP(rSNP)と codingSNP(cSNP)は臨床に直結する生物学的意義を持つ可能性がある。rSNP は遺伝子の転写調節領域にあるもので、この多型性は転写量の多様性を介して、発現される蛋白質量の差をもたらす可能性がある。また、遺伝子産物中のアミノ置換をもたらすcSNP は蛋白質の質の差を介してその機能における多様性を発揮する可能性を秘めている。遺伝子多型性をもちいた研究では

rSNP や cSNP を直接検討するか、これら以外の SNP を座位のマーカーとして、それと連鎖不平衡にある rSNP や cSNP を見出すことが主要な作業の一つとなる(図3)。

我々は高齢者における脊椎変形をきたす2つの重要な疾患である骨粗鬆症と変形性脊椎症の遺伝的素因を探求するために、 γ -glutamyl carboxylase(GGCX)遺伝子を候補遺伝子として取り上げ、そのcSNPを探索したのちに、それぞれの疾患と関連する臨床的指標との連関解析を行った。GGCXはビタミンKサイクルにおけるkey enzymeの一つであり、ビタミンKを補酵素として標的蛋白質(ビタミンK依存性蛋白質)のglu残基をgla残基に変換することによって、その蛋白質を活性化させる(図4)。骨代謝や軟骨代謝に関連するgla蛋白質としてはosteocalcin, matrix gla proteinなどがある。

B. 研究方法

- ① GGCX遺伝子内のSNP検索：表1に研究の全体像を示す。まず、変性HPLC

法などをもちいて GGCX 遺伝子におけるすべてのエクソン内について SNPs の検索を行った。次に見出された SNP について対象者の遺伝子型を決定した。

- ② 対象：東京都老人医療センター骨粗鬆症外来を骨粗鬆症に関する精査を希望して独歩で訪れた高齢女性とした。書面によるインフォームドコンセントを得たのち、DNA サンプルを目的とする採血を行った。
- ③ 骨量測定：骨量は dual energy X-ray absorptiometry (DXA) で大腿骨近位部を測定した。④ 脊椎変形の評価：胸腰椎のレントゲン写真(2方向)を用いて、3名の整形外科専門医が評価した。
- ④ 遺伝子産物の酵素活性測定：GGCX 遺伝子の多型性に対応する遺伝子産物を得るための発現ベクターを作成した。それぞれを COS7 細胞に遺伝子導入し、発現させた後にマイクロゾーム分画を得た。このマイクロゾームを用いて carboxylase 活性を測定した(図5)。

C. 研究結果

GGCX 遺伝子のエクソン内について SNP 検索を行った結果、エクソン8に1つ、エクソン9に2つの SNP が検出された。このうちエクソン8のものは325番目のアミノ酸である Arg が Gln に置換する non-synonymous SNP であった(表2)。これらの SNP 間の連鎖不平衡係数は高いことも明らかとなった。

Arg325Gln の多型性と大腿骨近位部(femoral total scan)の骨量との関連を検討したところ、Gln/Gln ホモの群において有

意に高値であることが判明した。脊椎変形スコアとの関連は、椎体終板硬化スコアについては、Gln/Gln ホモの群で有意に低値であった。一方、椎間板狭小化スコアや骨棘形成スコアには遺伝子型の有意な影響は認めなかった(図7)。このように、Gln/Gln ホモの遺伝子型は骨粗鬆症と一部の変形性脊椎症に対して防御的に働くことが示唆された。

Arg325Gln 多型性と酵素活性との関連を見たところ、325Gln の GGCX が 325Arg の GGCX に比して人工基質 FLEEI を用いた場合の Km 値が低く、Vmax が高かった(表3)。

また、反応系に加える vitamin K に対しても 325Gln の GGCX が 325Arg の GGCX に比して Km 値が低く、Vmax が高いことが判明した。

D. 考察 E. 結論

エクソン8の Arg325Gln 多型性はいわゆる機能的な SNP であり、骨粗鬆症と変形性脊椎症の発症に対して影響をおよぼしている可能性が示唆された。この部位は GGCX の catalytic domain の近くであることも今回の結果を支持する図8。Arg325が反応系における vitamin K に対して Km 値が低いことは、vitamin K 欠乏に対して相対的に防御的であることを、Vmax が高いことは vitamin K による治療効果がより有効であることを示唆する。さらに基質に対して Km 値が低いことや Vmax が高いことはビタミン K 依存性蛋白質の gla 化がより効率的に進むことを想像させる(図9)。

今回の研究は GGCX 遺伝子の機能的 SNP

を示し、その臨床的意義を初めて明らかにしたものである。今後ビタミン K 依存性蛋白質の骨粗鬆症ならびに変形性脊椎症の病態における役割を解明していく必要がある。

F. 健康危険情報

特になし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

謝辞

本研究のうち、特に GGCX の発現ならびに酵素活性測定は日本女子大学五関正江博士、神戸薬科大学岡野登志夫博士との共同研究によってなされた。

図 1

多因子遺伝疾患における 疾患発症のモデル

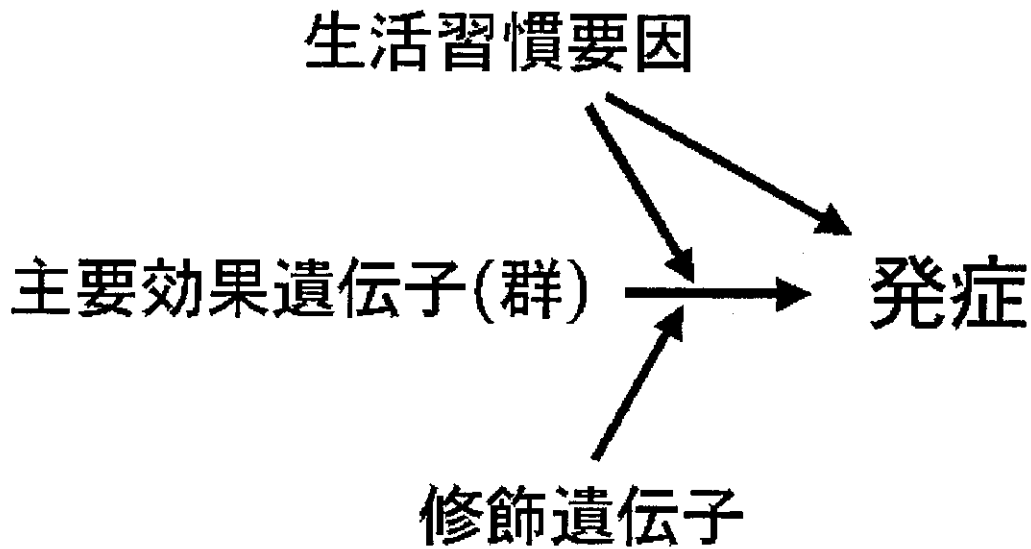
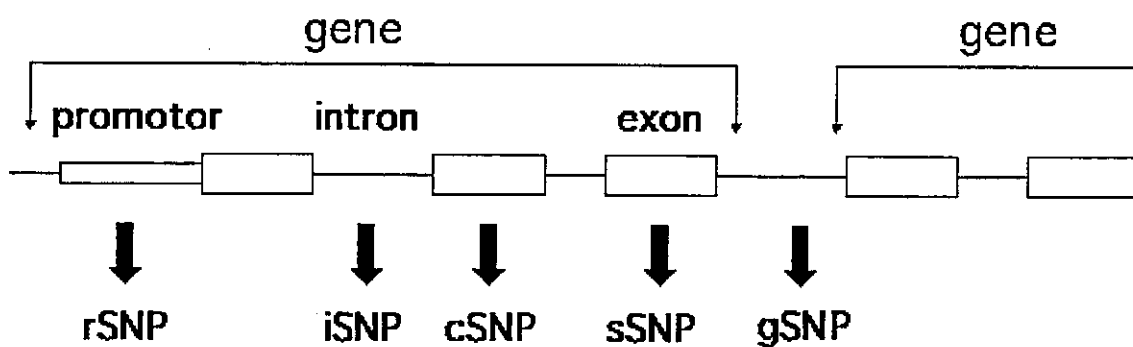


図 2

一塩基多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) の分類



rSNP: regulatory SNP ⇨ 転写量の差 ⇨ 蛋白質の量の差

iSNP: intronic SNP

cSNP: coding SNP ⇨ アミノ酸置換 ⇨ 蛋白質の質の差

sSNP: silent SNP

gSNP: genome SNP

図 3

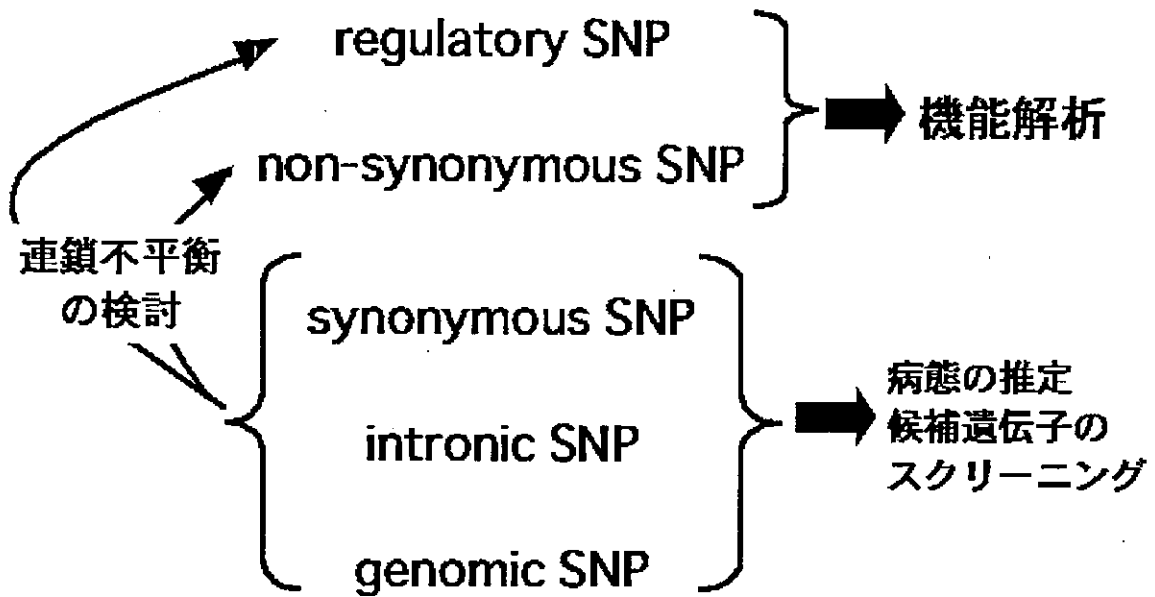
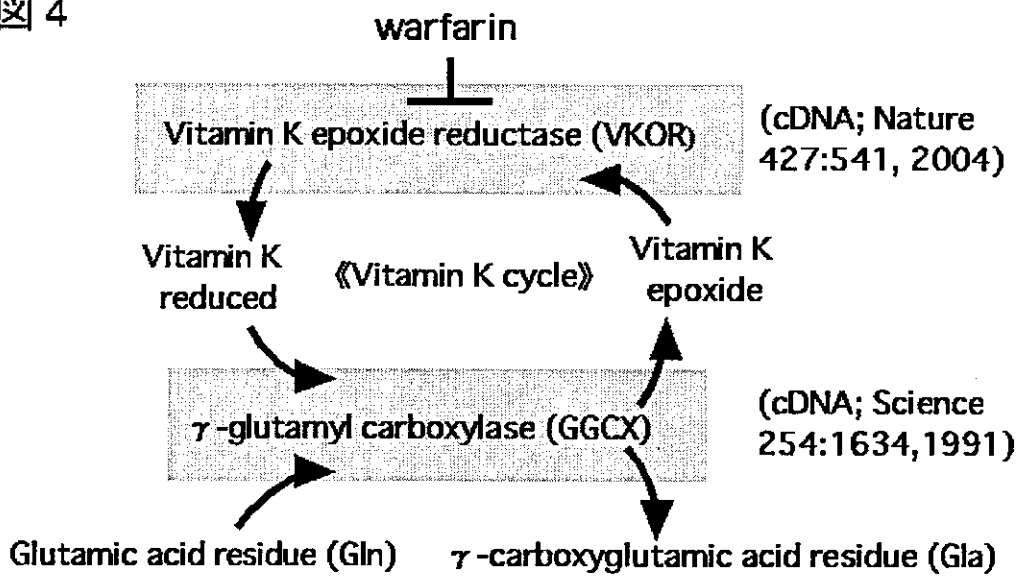


表 1

Experimental procedures

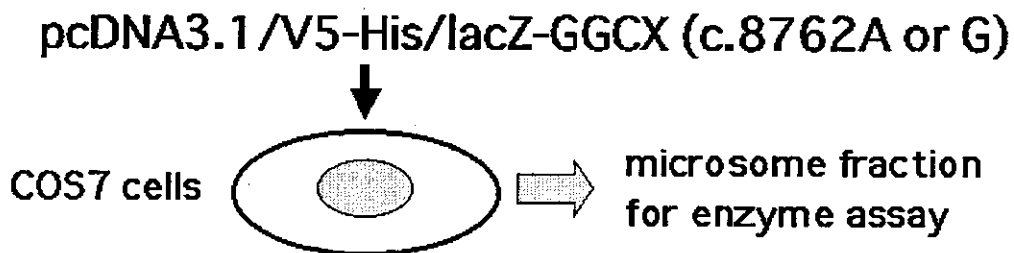
- SNP search in the exons; e.g. with degenerative HPLC
- genotyping and association study
- transfection of vectors to yield the translates from each genotype
- biochemical analyses; e.g. enzyme assay

図 4



《Vitamin K dependent proteins》
Coagulation factors (II, VII, IX, X)
Bone Gla Protein (BGP=Osteocalcin), Matrix Gla Protein (MGP)

図 5



Carboxylase assay mixture

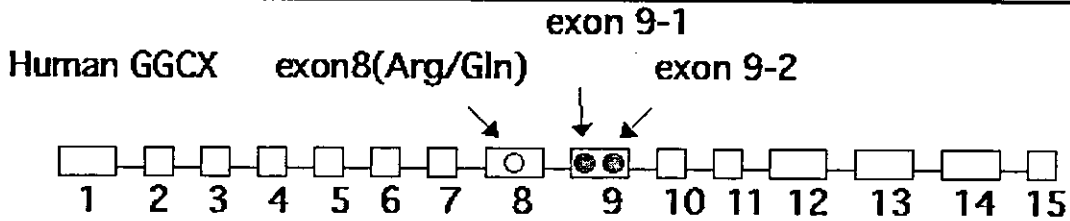
microsome fraction (enzyme sample)
reduced vitamin K₂ (vitamin KH₂)
FLEEL
NaH¹⁴CO₃
ProFIX19

表 2

GGCXのSNPと連鎖不平衡の検討

《遺伝子多型性》

SNP	塩基の位置	変化	頻度	アミノ酸変異	位置
exon8 (Arg/Gln)	8762	G/A	0.66: 0.34	Arg/Gln	325
exon 9-1	9167	C/T	0.66: 0.34	none	406
exon 9-2	9191	C/T	0.94: 0.06	none	414



《連鎖不平衡の検討》

SNP1	SNP2	D	D'	r2
exon 8	exon 9-1	0.2232	1	1
exon 8	exon 9-2	-0.0208	0.9991	0.00334
exon 9-1	exon 9-2	-0.0208	0.9991	0.00334

図 6

GGCXのSNP(Arg325Gln)と骨量の関連

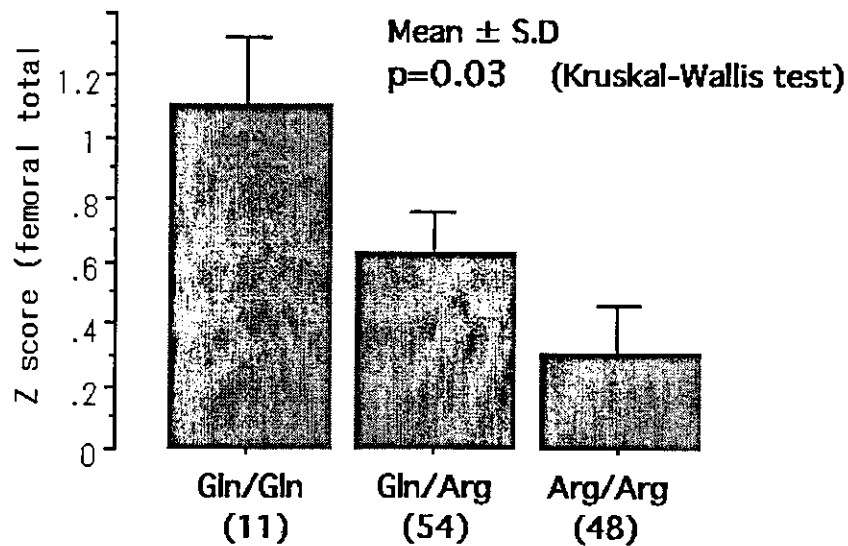


図 7

GGCXのSNP(Arg325Gln)と脊椎変形スコアの関連

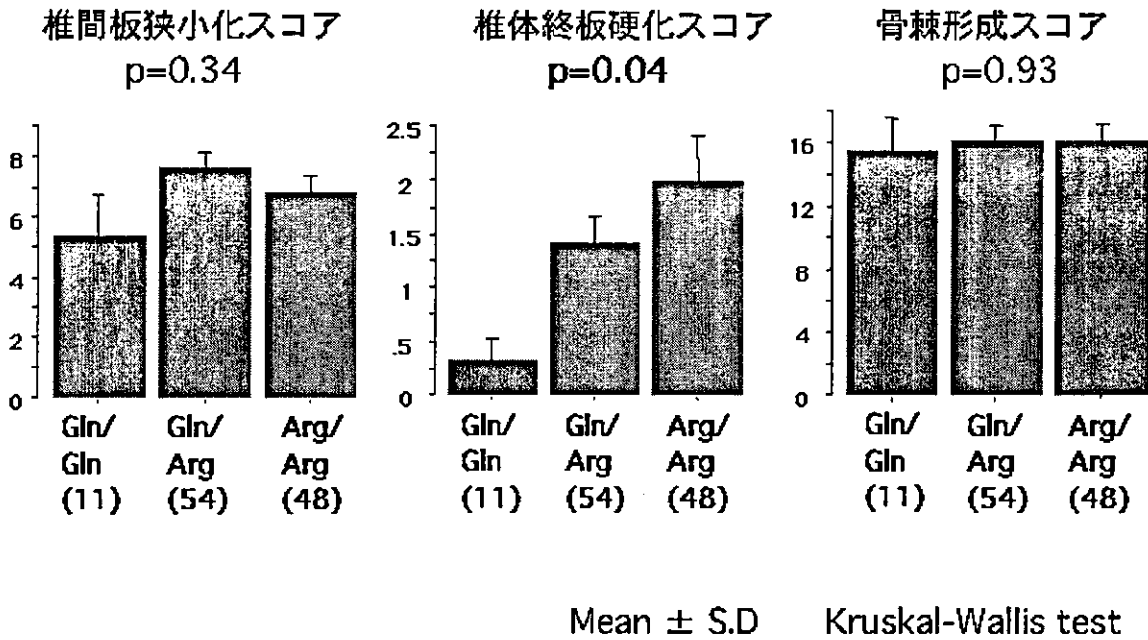


図 8

GGCXの構造モデルと多型性部位

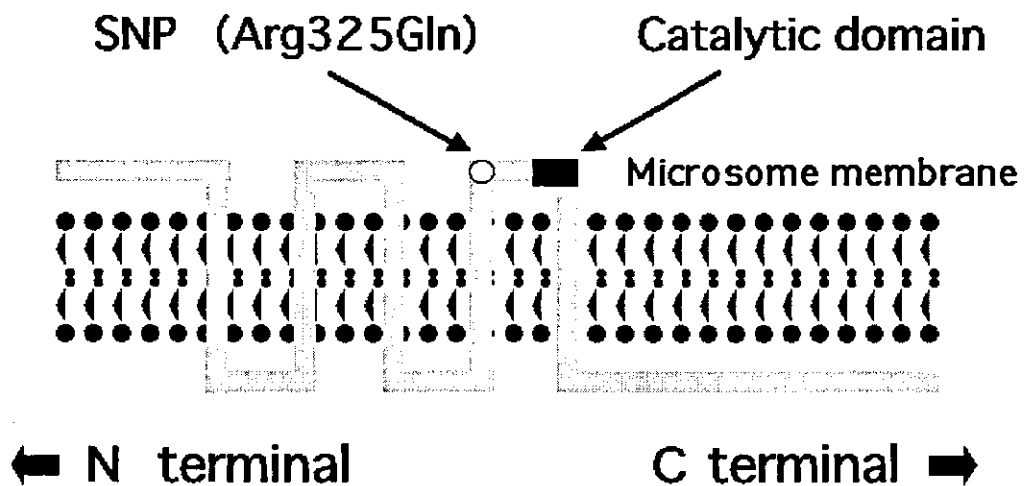


表 3 Comparison of the kinetic parameters of GGCX 325Gln and 325Arg

Substrate	Enzyme	K_m (μM)	V_{max} (pmol/30min/mg)	V_{max} / K_m (pmol/30min/mg/ μM)
Vitamin KH_2^{a}	325Gln	71.34 \pm 6.20	191 \pm 9.45	2.68 \pm 0.20
	325Arg	90.31 \pm 4.63	186 \pm 7.88	2.06 \pm 0.12
		p=0.03	p=0.03	p=0.03
Substrate	Enzyme	K_m (mM)	V_{max} (pmol/30min/mg)	V_{max} / K_m (pmol/30min/mg/mM)
FLEEL ^b	325Gln	0.27 \pm 0.02	255 \pm 6.33	944.4 \pm 9.21
	325Arg	0.32 \pm 0.03	215 \pm 5.28	671.9 \pm 10.79
		p=0.02	p=0.01	p=0.02

^a Determined at 3.6mM FLEEL.





^b Determined at 222 μM vitamin KH_2 .

Every assay was performed 4 times, numbers were mean \pm S.D.

p values were calculated by non-paired t-test (student's t-test).

☒ 9

Clinical implications of GGCX Arg325Gln

- lower K_m for vitamin K  protective against vitamin K deficiency ?
- higher V_{max} for vitamin K  higher response to vitamin K deficiency ?
- lower K_m for FLEEL  efficient conversion of glu into gla ?
- higher V_{max} for FLEEL  higher capacity of γ -carboxylation?

平成 16 年度厚生労働科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

痴呆・骨折臨床研究事業

分担 研究報告書

脊柱変形と遺伝子の関連：長野コホート

分担研究者 井上 聡 東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座講師

研究要旨 高齢者の脊柱変形発症に関与する遺伝的素因に関しては十分な理解がなされていない。そこで本研究では骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において主要な役割を果たしている Wnt- β カテニンシグナル伝達に関与する遺伝子群と変形性腰椎症ならびに骨量との関連に関して一塩基置換遺伝子多型(SNP)を用いた解析を行った。その結果 Wnt- β カテニンシグナル伝達における膜受容体である LDL Receptor-related Protein 5 (LRP5) 遺伝子の SNP は骨量のみならず脊柱変形のパラメーターの一つである椎間板狭小とも統計的有意差呈することを発見した。さらに Wnt- β カテニンシグナル伝達因子の一つである Secreted Frizzled Related Protein 4 (sFRP4) 遺伝子の SNP は骨量と相関することも見出した。今後 LRP5 や sFRP4 遺伝子をはじめとする Wnt- β カテニンシグナル伝達因子を標的とした骨粗鬆症ならびに変形性脊椎症治療薬が開発されることが期待される。

A. 研究目的

高齢者の脊柱変形とそれに伴う疼痛は高齢者の ADL ならびに QOL を大きく損なうことから、老人医療において重要な問題として知られている。しかしながら、これらの遺伝的素因に関しては十分な理解がなされていない。本研究では近年、骨芽細胞や軟骨細胞の増殖と分化において主要な役割を果たしていることが明らかにされた細胞内シグナルである Wnt- β カテニンシグナル伝達において中心的な役割を果たす LRP5 をはじめとする複数の遺伝子と変形性腰椎症ならびに骨量との関連に関して一塩基置換遺伝子多型(SNP)を用いた解析を

行った。

B. 研究方法

1. LRP5 遺伝子多型と変形性腰椎症、骨粗鬆症

閉経後女性 273 名(65.5 \pm 8.2 歳：平均年齢 \pm 標準偏差)を対象として LRP5 遺伝子のイントロン 5 における遺伝子多型 (IVS5-393C>T)に関して、SD-PCR 法を用いて genotype の分類を行った。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症の指標である椎間板狭小、骨棘形成、終板硬