

表2 身長の変化（5年間）と生活機能変化との関係

1. 身長変化（5年間）	（1=-1.6cm未満 / 0=-1.6cm以上）	2000年	2002年	1=-1.6cm未満	0=-1.6cm以上	オッズ比	95%信頼区間	有意確率
Q1-1	バスなどを使って一人で外出	（できる）	→ できない	9.3%	4.4%	1.881	（ 0.508 ~ 6.965）	n. s.
Q1-2	日用品の買い物	（できる）	→ できない	0.0%	0.0%	-	（ - ~ -）	n. s.
Q3-1	普段の背中や腰の痛み	（なし）	→ あり	12.2%	9.2%	1.371	（ 0.493 ~ 3.813）	n. s.
Q3-2	安静時の背中や腰の痛み	（なし）	→ あり	8.5%	4.3%	2.071	（ 0.572 ~ 7.497）	n. s.
Q3-3	動作時の背中や腰の痛み	（なし）	→ あり	10.2%	4.5%	2.413	（ 0.541 ~ 10.754）	n. s.
Q3-4	トイレの種類（和式・洋式）	（和洋式可）	→ 洋式のみ可	21.4%	18.4%	1.125	（ 0.503 ~ 2.516）	n. s.
Q3-5	頭上の棚から物をとる	（容易にできる）	→ 容易にできない	69.9%	41.2%	2.900	（ 1.474 ~ 5.704）	**
Q3-6	イスから立ち上がる	（容易にできる）	→ 容易にできない	18.3%	15.1%	1.040	（ 0.431 ~ 2.506）	n. s.
Q3-7	現在の健康状態	（良い）	→ 良くない	24.0%	11.4%	2.826	（ 1.179 ~ 6.772）	*
Q3-8	健康状態（1年前との比較）	（良い、同じ）	→ 悪い	26.9%	24.2%	1.055	（ 0.451 ~ 2.463）	n. s.
Q3-9	生活満足（1年前との比較）	（良い、同じ）	→ 悪い	15.8%	10.2%	1.629	（ 0.640 ~ 4.148）	n. s.
Q3-10	背中の変形への不満	（なし）	→ あり	38.2%	26.1%	1.598	（ 0.789 ~ 3.236）	n. s.

注) **:p<0.01, *:p<0.05, +:p<0.1

表3 身体計測およびX線所見のベースライン時(2000年)所見ならびに身長の変化(5年間)と生活機能変化との関係:オッズ比

	01-1 バスなどを 使って外出 一人	01-2 日用品の 買い物	03-1 首段の 背中や腰の 痛み	03-2 安寝時の 背中や腰の 痛み	03-3 動作時の 背中や腰の 痛み	03-4 トイレの 種類 (和式・洋 式)	03-5 頭上の棚から 物をとる	03-6 イスから 立ち上がる	03-7 現在の 健康状態	03-8 健康状態(1 年前との比 較)	03-9 生活満足(1 年前との比 較)	03-10 背中の変形へ の不満
	2000年 ↓ 2005年	できる ↓ できない	なし ↓ あり	なし ↓ あり	なし ↓ あり	和洋式可 ↓ 洋式のみ可	容易に できる ↓ できない	容易に できる ↓ できない	良い ↓ 良くない	良い, 同じ ↓ 悪い	良い, 同じ ↓ 悪い	なし ↓ あり
1. 身長	1=146cm未満/0=146cm以上	2.197 +	-	-	-	-	2.560 **	-	-	-	-	-
2. 体重	1=52kg以上/0=52kg未満	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3. BMI	1=24以上/0=24未満	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4. 重心線距離	1=5cm以上/0=4cm以下	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5. APRL_SPAN	1=150cm以下/0=151cm以上	-	2.172 *	-	-	-	2.267 **	-	-	-	-	-
6. 閉眼片脚	1=7秒以下/0=8秒以上	2.555 +	-	-	-	-	-	2.051 +	1.997 *	-	-	-
7. 閉眼片脚	1=2秒以下/0=3秒以上	-	-	-	-	1.776 +	-	-	-	-	-	-
8. 椎間板変狭小化(目視)	1=あり/0=なし	2.414 +	-	-	-	1.860 +	-	2.568 *	-	2.188 *	2.201 *	-
9. 椎体終板硬化(目視)	1=あり/0=なし	-	-	0.366 *	-	-	-	-	-	-	-	-
10. 椎体の骨棘(目視)	1=あり/0=なし	-	-	-	-	-	3.398 +	-	-	-	-	-
11. 前縦韧带骨化(目視)	1=あり/0=なし	-	3.695 +	-	-	-	-	-	-	-	-	0.248 *
12. 椎体変形(目視)	1=あり/0=なし	2.380 *	-	-	-	1.689 +	-	-	-	-	-	-
13. 変性すべり(目視)	1=あり/0=なし	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14. 側弯(目視)	1=あり/0=なし	-	-	-	-	-	-	-	2.293 +	2.477 +	-	-
15. 全脊椎指数合計	1=10点以上/0=9点以下	-	-	-	-	2.286 *	-	-	-	-	-	-
16. 椎間板変狭小化指数合計	1=2点以上/0=1点以下	-	-	-	-	1.668 +	-	1.963 *	-	-	2.304 *	-
17. 椎体終板硬化指数合計	1=2点以上/0=1点以下	2.074 +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18. 骨棘指数合計	1=2点以上/0=1点以下	-	-	-	-	-	2.263 +	-	-	-	-	-
19. 椎体変形(最大変形)	1=0.6未満/0=0.6以上	7.747 **	-	-	-	-	-	-	2.708 *	-	4.558 *	3.548 **
20. 骨棘面積(平均)	1=4cm2以上/0=4cm2未満	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1. 身長変化(5年間)	1=-1.6cm未満/0=-1.6cm以上	-	-	-	-	-	2.900 **	-	2.826 *	-	-	-
--------------	-----------------------	---	---	---	---	---	----------	---	---------	---	---	---

注) **:p<0.01, *:p<0.05, +:p<0.1

身長短縮に寄与する因子と QOL に及ぼす影響

分担研究者 白木正孝 成人病診療研究所 所長

高齢女性の骨粗鬆症は骨折の発生を介して患者の QOL を障害する疾患であることが知られている。しかし QOL の障害が骨折そのものの効果によるものか、または骨折により発生した二次的な身体状況によるものであるのかについてはよくわかっていない。骨粗鬆症骨折中でも脊椎骨折については特にその QOL に対する効果について調査された報告は少ない。本研究においては老年女性にみられる身長短縮に着目し、その発生に寄与する因子を抽出するとともに、身長短縮が QOL に与える影響について検討した。老年女性において、身長短縮は加齢とともに高度に進行し、その進展には新規脊椎骨折の発生数と椎間板狭小化が関与していた。また対象の QOL を SF-36 にて評価した場合、この QOL 指標に影響を及ぼす因子は年齢、身長短縮、脊椎骨折発生数および椎間板狭小化であった。以上の結果は身長短縮が老年女性の QOL 障害の大きな要因となっていることを示していると同時に QOL を障害する原因として未知の要因考慮してゆく必要性を示したものと考えられる。

A. 研究目的

骨粗鬆症に伴う骨折は骨粗鬆症の合併症であり、このものが発生すると、完全な意味での治癒は期待しがたく、骨折後に各種の後遺症を残し、結果的に患者の ADL や QOL が障害される。しかし、この QOL 障害が骨粗鬆症の骨折によりもたらされるか否かについては従来、大腿骨頸部骨折については調査されていたものの、脊椎骨折については十分な調査がなかった。我々はすでに Nagano cohort を設定し、この集団における新規骨折、とりわけ脊椎骨折の発生頻度調査、ならびに脊椎骨折発生にかかわる危険因子調査

を行ってきた。今回の検討においては、新規脊椎骨折発生が身体状況、とくに身長短縮にどのような効果をもつかにつき、他の要因も加味して検討を加えた。また身長短縮が QOL に及ぼす影響を検討した。

B. 研究対象および方法

研究対象は成人病診療研究所骨粗鬆症長期介入試験(に登録した 3024 例の女性集団(Nagano cohort)より、身長短縮を観察し、かつ脊椎新規骨折の有無および脊椎変性変形の程度を評価しえ

た例を採用した。ここで二次性骨萎縮を来すと考えられる副甲状腺機能亢進症例、副腎腺腫例、ステロイド使用例、などを除外した。骨折は非外傷性骨折と考えられる例のみを採択した。また一年以上の経過観察例を選択した。ただし、骨折が観察開始から一年以内に生じた例は採用した。今回の検討では骨粗鬆症治療の有無は問わなかった。結局 486 例の閉経後女性例から 105 例の新規大腿骨頸部脊椎骨折例が 1993 年から 2005 年 12 月までの間に観察された。脊椎骨折発生の診断は全例レントゲン撮影にて確認し、Genant らによる SQ 法(1)にて骨折の有無を判断した。これらの例については同意を得た登録時に採血、採尿し、カルシウム代謝調節ホルモン、骨代謝マーカー、血清 25-OHD、および腎機能、総蛋白などを測定した。腰椎、大腿骨頸部および全身骨密度を DXA 法にて測定し、脊椎レントゲン読影結果とあわせて骨粗鬆症の診断を決定した(2000 年度改訂日本骨代謝学会診断基準)(2)。一部の症例では SF-36 または JOQOL にて QOL を評価した。

C. 結果

1) 対象症例の身長短縮に寄与する因子

対象の身長短縮に寄与する因子を抽出することを目的に身長短縮量を観察年数で除し、年間身長短縮率を計算した。つぎに四分位法により身長短縮率を四分割し、この四分割と関連して変動する要因を一元配置分散分析にて検討した。結果を表 1 に示した。身長短縮率が大きいほど (Q1→Q4) 年齢が高く、腰椎骨密度が低く、DPD

が高く、脊椎新規骨折数が多く、脊椎変性変形の程度が高かった。

2) 身長短縮率のリスク解析 : Logistic 回帰モデル

以上の検討から身長短縮率を高めるリスク要因の候補が判明したので、次にこれら要因がそれぞれ独立した危険因子であるか否かを Logistic 回帰モデルにあてはめて検討した。Q1-Q4 の各階層間におけるリスク解析を行った結果を表 2 に示す。当然のことながら階層の幅が狭くなると抽出されるリスクは少なくなり各階層間で共通してみられるリスクは年齢のみであった。しかし椎体骨折数、および椎間板狭小化を認める椎体数は各階層に比較的共通してみられる要因であった。これに対し腰椎骨密度や骨棘形成を認める椎体数などの意義は不安定であった。全体としてのリスク要因の意義を尤度比検定を用いて検討した結果、年齢、椎体骨折数および椎間板狭小化椎体数の三つが有意な独立したリスクとして取り上げられた。図 1-3 にはこれら独立したリスク要因と身長短縮度との間の単相関回帰直線を示した。

2) 身長短縮度と QOL の関係

QOL を SF-36 または JOQOL にて測定した 288 例において身長短縮度と QOL 指標との間の関連をステップワイズ多変量解析にて検討した。結果を表 3 に示した。ここで QOL に対し独立した関連を取り上げるためのカットオフ値は $p < 0.25$ と設定した。表 3 に示すように身長短縮度そのものや身長短縮を規定する要因はいくつかのサブドメインの評価点と有意に相関した。身長短縮度およびその関連因子で説明されるドメインとしては身体活動能力との関連が最も強く

($R^2=0.279$)、社会的役割は身長短縮関連指標との相関はみられなかった。JOQOL 総合評点は年齢と身長短縮との相関が強く認められた。以上から身長短縮度は患者の病態（年齢、骨折数、椎間板狭小）によりもたらされ、これが進行すると QOL を低下せしめることが明らかになった。

D. 考案

骨粗鬆症が骨折の発生を介して患者の QOL を低下させることはよく知られた事実ではある。しかしこの QOL の低下が骨折によりもたらされたものであるか否か、換言すると合併する他の要因によりもたらされたものであるのか否か、骨折種により QOL への影響がことなるか否かなど未解決の問題は多い。また本邦においてこのような視点からの検討は少ない。MORE 研究のサブ解析において新規脊椎骨折の数が増すほど QOL が低下したとする報告はあるものの(3)、この報告においても QOL の効果変数としては脊椎骨折のみをとりだして解析している。しかし現実には患者の脊椎レントゲン像においては脊椎骨折ばかりでなく変性変形の存在や脊椎のアラインメントの変化など QOL に影響を及ぼすと推定できる種々の変化が同時に発生していることが通常である。したがってこれらの要因を調整した検討から脊椎骨折の QOL に対する効果はじめて明らかになるものと推定される。さらに脊椎骨折がもしも QOL に影響を及ぼすとしても、脊椎骨折による疼痛が QOL を障害しているのか、または脊椎骨折により発生した身長の低下が QOL を低下させているのかも明らかではない。

身長低下度は臨床の現場において比較的簡便に測定できる身体指標であり、もしもこの評価値が患者の骨折や変性変形の程度や QOL のよい指標となるのであればその意義は大きい。そこで今回の検討においてはまず身長短縮にどのような臨床指標が関連するかを検討し、ついで身長短縮度が他の併存した要因と独立して QOL 障害に関連しているかを検討した。

結果的に身長短縮は年齢、新規脊椎骨折数、および椎間板狭小化との関連が明らかであった。この結果はきわめて妥当な結論であると考えられる。しかし、身長短縮に対する強い年齢効果を考慮すれば、脊椎骨折や変性ばかりでなく、他の要因によっても身長短縮が惹起されるであろうことは想像に難くない。今後は例えば脊椎アラインメントや筋力などとの関連をさらに検討していく必要があると思われた。身長短縮そのものおよび身長短縮のリスクはそれぞれ独立した QOL の障害因子であった。しかしここでもこれら要因を用いて説明可能な QOL 低下度は高々30%程度であり、残りの70%の QOL の低下要因は依然として不明なままのこされている。このことは骨粗鬆症の治療により脊椎骨折の発生を予防しえたとしても QOL の維持を完全にはなし得ないことを示している。従って少なくとも身長短縮を介して発生する QOL 障害を予防しようとするれば、現段階で考えられることは椎間板狭小化の予防手段の開発であろう。将来的に身長短縮機序がもっと詳細に検討できるようになれば、その要因のうちいくつかは予防可能性がでてくる可能性がある。今回の検討ではこの点で将来への目標が明らかになった点が意義深いと考えられる。

E. 結論

身長短縮は老年女性の QOL 障害を来す独立した要因であり、その基盤として脊椎骨折、脊椎変性変形の存在および加齢が関与していると推定された。今後これら各要因に対する総合的な取り組みが期待される。

19:331-337, 2001.

3) Silverman SL, Minshall ME, Shen W, et al. The relationship of health-related quality of life to prevalent and incident vertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *Arthritis Rheum* 44; 2611-2619, 2001

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

次年度各種学会にて発表予定。

H. 知的財産権の出頭・登録状況

特になし。

G. 文献

1) Genant HK, Wu CY, van Kuijk C, Nevitt MC. Vertebral fracture assessment using a semiquantitative technique. *J Bone Miner Res* 8: 1137-1148, 1993.

2) Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga M, Sone T, Fujiwara S, Shiraki M, Kushida K, Miyamoto S, Soen S, Nishimura J, Oh-hashii Y, Hosoi T, Gorai I, Tanaka H, Igai T, Kishimoto H. Diagnostic criteria for primary osteoporosis: year 2000 revision. *J Bone Miner Metab*

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 細井孝之 国立長寿医療センター先端医療部 部長

高齢者の脊柱変形の原因としては、骨粗鬆症と変形性脊椎症の2つが主要なものである。これらの疾患には遺伝的素因と環境因子(生活習慣因子)の療法が関わっていると考えられている。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によって明らかにしようとするおのである。遺伝子多型性にはいくつかの種類があるが、とくに single nucleotide polymorphisms (SNPs)が注目されている。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。今回我々は骨代謝において基幹的な役割を果たすと考えられる tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)遺伝子を取りあげ日本人集団における cSNP の探索、骨量との連関解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。

A. 研究目的

骨粗鬆症の発症には遺伝的素因と環境因子(生活習慣因子)の両方がかかわっている。我々は本疾患の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してきた。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。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。今回我々は骨代謝関連遺伝子のうち、tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)遺伝子を取りあげた。TNSALP は骨芽細胞の表面に存在し、石灰化部位へのリン酸の供給においてなくてはならない酵素である。本遺伝子について、日本人集団における cSNP の探索、骨量との連関解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。

B. 方法

- ① TNSALP 遺伝子内の SNP 検索：変性 HPLC 法をもちいて TNSALP 遺伝子の 12 エクソンすべてについて SNPs の検索を行った。
- ② 対象：日本国内のある地域において、検診を目的に独歩で集合した高齢女性を対象とした。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) で前腕骨遠位端を測定した。
- ④ 遺伝子産物の酵素活性測定：TNSALP 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 COS 7 細胞に遺伝子導入し、発現させた後に形質膜分画を得た。このミクロゾームを用いて alkaline phosphatase 活性を測定した。

C. 結果

TNSALP 遺伝子のエクソン内について SNP 検索を行った結果、4 つの SNP が検出された(表 1)。このうちエクソン 7 のもの(787C>T)は 246 番目のアミノ酸である Tyr が His に置換する non-synonymous SNP であった。また、787C>T とエクソン 8 の 876A>G との間の連鎖不平衡係数は高く、完全に連鎖していることも明らかとなった。787C>T の遺伝子型分布はにそれぞれのホモが全体の約 4

分の一を、ヘテロがほぼ半数を占めるかなり common な多型性である。

高齢女性集団(平均 74 才)において前腕骨の骨量と 787C/T 多型性との関連を検討したところ、この集団全体では、CC 群で骨量が高い傾向にあったが統計的に有意ではなかった。ところが、この集団の平均年齢である 74 才を境に年齢で層別した上で解析すると、74 才以上の集団では遺伝子型間で有意な骨量の差が見出された($p < 0.002$)。これらのことから、この遺伝子多型性は後期高齢女性において影響を及ぼす遺伝的素因を反映していることが示唆された。

787C または 787T の TNSALP 遺伝子について発現ベクターを作成し、COS 7 細胞に遺伝子導入した。遺伝子発現を確認した後、それぞれの細胞から plasma membrane 分画を調製した。これを酵素サンプルとし TNSALP の酵素活性を測定した。その結果、それぞれのサンプルがもつ V_{max} には差がないものの、787C の、 K_m 値は 787T に比較して有意に低いことが分かった。

D. 考察

エクソン 7 の 787T/C SNP はいわゆる機能的な SNP であり、その酵素としての特性の差を通して、高齢女性の骨量における個人差をもたらしていることが示唆された。 K_m 値が低いことは、より少ない基質においても効率よく反応が触媒されることを意味する。今回の結果は高齢女性の骨代謝におけるリン酸

代謝の重要性を示唆するものでもあり、骨粗鬆症の予防と治療を目指した今後の研究に対して一つの方向性をしめすものとする。

E. 謝辞

本研究は日本女子大学五関正江博士、東京都老人総合研究所鈴木隆雄博士、吉田英世博士、日本医科大学折茂英夫博士、健康科学大学折茂肇博士らとの共同研究によって行われた。

F. 発表

1. Koshizuka Y, Ogata N, Shiraki M, Hosoi T, Seichi A, Takeshita K, Nakamura K, Kawaguchi H
Distinct association of gene polymorphisms of estrogen receptor and vitamin D receptor with lumbar spondylosis in post-menopausal women. *Eur Spine J.* 2005 Dec 14;:1-8
2. Nishijima R, Araki A, Ando M, Nemoto T, Ohashi K, Kobayashi Y, Chiba Y, Horiuchi T, Morio K, Sawabe M, Hosoi T. Diabetes mellitus complicated with rapidly progressive glomerulonephritis in an elderly patient. *Intern Med.* 2005 Oct;44(10):1078-83.
3. Ito M, Ikeda K, Nishiguchi M, Shindo H, Uetani M, Hosoi T, Orimo H. Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for

evaluation of fracture risk.. *J Bone Miner Res.* 2005 Oct;20(10):1828-36

4. Suzuki M, Mamun MR, Hara K, Ozeki T, Yamada Y, Kadowaki T, Honda H, Yanagihara Y, Ito YM, Kameyama S, Ohta N, Hosoi T, Arai T, Sawabe M, Takeuchi T, Takahashi S, Kitamura T
The Val158Met polymorphism of the catechol-O-methyltransferase gene is associated with the PSA-progression-free survival in prostate cancer patients treated with estramustine phosphate. *Eur Urol.* 2005 Nov;48(5):752-9.
5. Yoshimura N, Suzuki T, Hosoi T, Orimo H.
Epidemiology of hip fracture in Japan: incidence and risk factors. *J Bone Miner Metab.* 2005;23 Suppl:78-80.
6. Araki A, Hosoi T, Orimo H, Ito H.
Association of plasma homocysteine with serum interleukin-6 and C-peptide levels in patients with type 2 diabetes. *Metabolism.* 2005 Jun;54(6):809-14.
7. Sudo Y, Ezura Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Emi M.
Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the pro-opiomelanocortin gene (POMC) with low bone mineral density in adult. Women. *J Hum Genet.* 2005;50(5):235-40
8. Urano T, Shiraki M, Fujita M, Hosoi T, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in the lipoxigenase ALOX15 5'-flanking region (-5229G/A) with bone mineral density. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(3):226-30.

9. Goseki-Sone M, Sogabe N, Fukushi-Irie M, Mizoi L, Orimo H, Suzuki T, Nakamura H, Orimo H, Hosoi T. Functional analysis of the single nucleotide polymorphism (787T>C) in the tissue-nonspecific alkaline phosphatase gene associated with BMD. *J Bone Miner Res.* 2005 May;20(5):773-82.
10. Nishizawa Y, Nakamura T, Ohta H, Kushida K, Gorai I, Shiraki M, Fukunaga M, Hosoi T, Miki T, Chaki O, Ichimura S, Nakatsuka K, Miura M: Committee on the Guideline for the Use of Biochemical Markers of Bone Turnover in Osteoporosis Japan Osteoporosis Society. Guidelines for the use of biochemical markers of bone turnover in osteoporosis (2004). *J Bone Miner Metab.* 2005;23(2):97-104

表1

Location	Nucleotide	Amino acid
	change	substitution
Exon 5	330 (T>C)	Ser 93 Ser
Exon 6	534 (C>T)	Tyr 161 Tyr
Exon 7	787 (T>C)	Tyr 246 His
Exon 9	876 (A>G)	Pro 275 Pro

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

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担う 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 は脊柱変形のパラメーターの一つである骨棘形成と有意に相関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 WNT10B、WISP1 の SNP は骨量もしくは終板硬化と相関することも見出した。今後これら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診断法ならびに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. 方法

1. Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性腰椎症

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により Wnt-LRP5 シグナル伝達調節因子であるヒト Wnt10B 遺伝子における遺伝子多型に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行い、BMD との相関を検討した。

日本人非血縁閉経後女性を対象として末梢血 DNA を抽出し、TaqMan PCR 法により Wnt-LRP5 シグナル伝達調節因子であるヒト LRP5 ならびに Wnt-LRP5 シグナル伝達応答遺伝子である WISP1

における SNP を決定した。対象者の胸腰椎 X 線写真を撮影し、変形性脊椎症の指標(椎間板狭小、骨棘形成、終板硬化)を評価した。骨密度ならびに各種臨床データに関しても同時に測定し、得られたデータに関し統計学的な解析を行った。

C. 結果

1.Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性腰椎症

LRP5/6 に対してリガンドとして働く Wnt10B の 5'上流域に存在する遺伝子多型(-2043C/G)においては全身骨骨密度に関して有意差を呈していた(図 1A)。腰椎に関しては統計的有意差はなかったが傾向は示した(図 1B、 $P=0.0596$)。

LRP5 遺伝子のアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)では、骨棘形成において(図 2A)、また WISP1 遺伝子の 3'非翻訳領域に存在する SNP においては終板硬化において(図 3B)有意差を呈していた。LRP5 ならびに WISP1 遺伝子におけるこれら遺伝子多型は骨量に関しては有意差を示さなかった。

D. 考察

1.Wnt-LRP5 経路と骨粗鬆症ならびに変形性関節症との関連

Wnt- β -catenin シグナル伝達経路は哺乳動物での細胞増殖や分化の制御において重要な役割を果たす。近年このシグナル伝達系の構成因子のひとつである LDL receptor-related protein 5(LRP5)遺伝子は、ヒトでの遺伝子変異やノックアウトマウス

の解析から骨芽細胞による骨形成において中心的な役割を果たしていることが明らかにされた。我々は今までに、LRP5 の一塩基置換遺伝子多型性(SNP)と骨量との関連について検討してきた。その結果、LRP5 遺伝子イントロン 17 に存在する SNP は腰椎骨密度と有意に相関することを発見した(Urano et al., J Bone Miner Metab, 2004)。さらに、アミノ酸変異を伴う SNP に注目し解析を行った結果、エクソン 18 に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(A1330V)が腰椎骨密度と有意に相関することも見出した(Ezura et al Bone in press)。Wnt- β -catenin シグナル伝達因子は多数同定されており LRP5 のみならず、他の因子に関しても骨量を規定する遺伝子マーカーが存在する可能性がある。そこで今回、我々は Wnt-LRP シグナル伝達因子である Wnt10B における SNP が骨量と有意に相関することを明らかとした。Wnt10B は哺乳動物に多数存在する Wnt シグナルのリガンドとして機能する因子の一つである。近年 Wnt10B 遺伝子のトランスジェニックマウスにおいて骨量増加を示し、ノックアウトマウスでは骨量減少を示すことが報告されている。このマウスのデータと今回の我々の遺伝子多型での解析から、多数存在する Wnt-LRP シグナル制御因子の中で Wnt10B-LRP5 経路が骨形成においては他の Wnt シグナルでは代償できない重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

前述したように我々は LRP5 が閉経後女性の骨量を規定する遺伝子マーカーである可能性を示してきた。その一方、中国や韓国では LRP5 のエクソン2に存在するアミノ酸変異を伴う SNP(Q89R)が大腿骨頸部における骨密度との相関が報告されている。我々は今回この SNP に関して、本研究

において検討したところ腰椎骨密度との有意な相関は見出されなかった。その一方で、本研究においてこの Q89R の SNP に関して変形性脊椎症におけるパラメータ(骨棘形成、椎間板狭小、終板硬化)との相関を検討したところ、骨棘形成との間に有意な相関を見出した。以上より本研究において LRP5 の遺伝子多型が骨量ばかりでなく骨棘形成に関与することを発見した。したがって LRP5 は骨芽細胞の増殖や分化制御ばかりでなく、軟骨の変成にも関与することが示唆された。さらに我々は Wnt-LRP5 シグナルの下流シグナルである WISP1 と変形性脊椎症におけるパラメータとの相関を検討したところ、終板硬化との間に有意な相関を見出した。

以上より、Wnt-LRP5 シグナル伝達因子は脊椎変形を規定する遺伝子であることが示唆された。LRP5 ならびにその下流シグナルである WISP1 が脊柱変形にはたす役割を探求することで、新たな変形性脊椎症における遺伝子マーカーや治療薬の応用や開発が期待される。

E. 研究発表

1. 論文発表

1. Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, Trentalancia A, Muramatsu M, Mario M: Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: Role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol* 203, 193-201, 2005.
2. Azuma K, Tanaka M, Uekita T, Inoue S, Yokota J, Ouchi Y, Sakai R: Tyrosine phosphorylation of

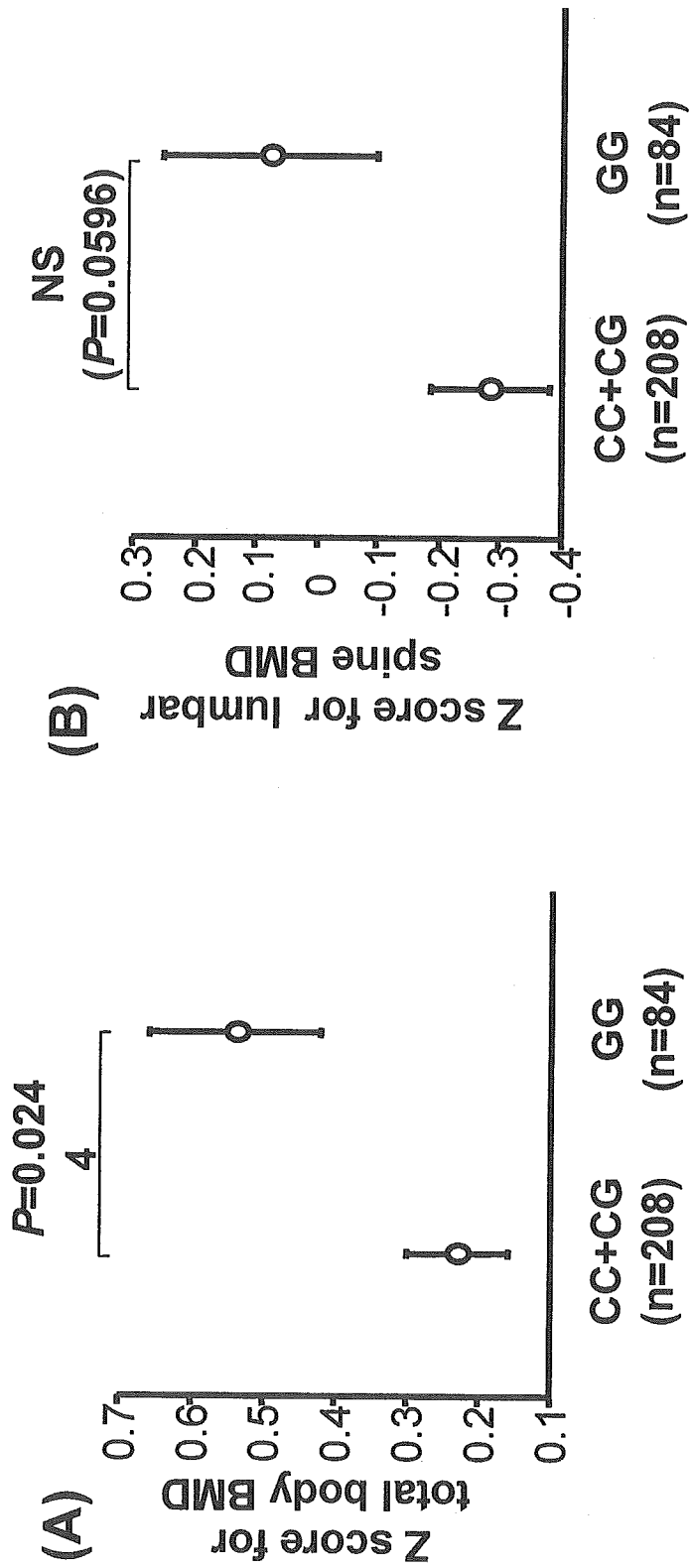
paxillin affects the metastatic potential of human osteosarcoma. *Oncogene* 24, 4754-4764, 2005.

3. Ogushi T, Takahashi S, Takeuchi T, Urano T, Horie-Inoue K, Kumagai J, Kitamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S: Estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 is a tumor-promoting and prognostic factor for renal cell carcinoma. *Cancer Res* 65, 3700-3706, 2005.
4. Sudo Y, Ezura Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Ito H, Emi M: Association of single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the pro-opiomelanocortin gene (POMC) with low bone mineral density in adult women. *J Hum Genet* 50, 235-240, 2005.
5. Suzuki T, Urano T, Tsukui T, Horie-Inoue K, Moriya T, Ishida T, Muramatsu M, Ouchi Y, Sasano H, Inoue S: Estrogen-responsive finger protein as a new potential biomarker for breast cancer. *Clin Cancer Res* 11, 6148-6154, 2005.
6. Ito K, Suzuki T, Akahira J, Sakuma M, Saitou S, Okamoto S, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H, Inoue S: 14-3-3 sigma in endometrial cancer – A possible prognostic marker in early stage cancer -. *Clin Cancer Res* 11, 7384-7391, 2005.
7. Sakuma M, Akahira JI, Suzuki T, Inoue S, Ito K, Moriya T, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N: Expression of estrogen-responsive finger protein (Efp) is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 99, 664-670, 2005.
8. Ezura Y, Nakajima T, Urano T, Sudo Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Emi M: Association of a single-nucleotide variation

- (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. *Bone* (in press)
9. Asaoka K, Ikeda K, Hishinuma T, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S: A retrovirus restriction factor TRIM5alpha is transcriptionally regulated by interferons. *Biochem Biophys Res Commun* 338, 1950-1956, 2005.
 10. Horie-Inoue K, Takayama K, Bono H, Ouchi Y, Okazaki Y, Inoue S: Identification of novel steroid target genes through the combination of bioinformatics and functional analysis of hormone response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 339, 99-106, 2006.
 11. Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the steroid and xenobiotic receptor (SXR) gene (IVS1-579A/G) with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* (in press)
 12. Shukuwa K, Izumi SI, Hishikawa Y, Ejima K, Inoue S, Muramatsu M, Ouchi Y, Kitaoka T, Koji T: Diethylstilbestrol increases the density of prolactin cells in male mouse pituitary by inducing proliferation of prolactin cells and transdifferentiation of gonadotropic cells. *Histochem Cell Biol* (in press)
2. 学会発表
- 【国際学会】
1. Horie-Inoue K, Takayama K, Inoue S: Identification of novel hormone-responsive genes through the combination of bioinformatics and functional analysis in cells derived from different tissues. *Tissue-selective Nuclear Receptors. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. Breckenridge, CO, USA* (2005.9.18-22)
 2. Urano T, Shiraki M, Narusawa K, Usui T, Hosoi T, Ouchi Y, Nakamura T, Inoue S: Q89R polymorphism in the LDL receptor-related protein 5 gene is associated with spine osteoarthritis in postmenopausal Japanese women. *American Society of Bone and Mineral Research 27th Annual Meeting, Nashville, Tennessee, USA* (2005.9.23-27)
 3. Inoue S: [Luncheon Seminar] Novel mechanism of vitamin K action via transcriptional regulation. *International Interdisciplinary Conference on Vitamins, Coenzymes, and Biofactors 2005, Awaji, Japan*, (2005. 11. 7-11)
- 【国内学会】
1. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：ビタミン K は核内受容体 SXR を介し転写レベルで応答遺伝子の発現を制御する (2005.5.26-27) 日本ビタミン学会第 57 回大会 (三重)
 2. 井上聡：[シンポジウム] 骨粗鬆症と未病ーゲノムからのアプローチ (2005.6.16-17) 第 47 回日本老年医学会学術集会 (東京)
 3. 浦野友彦、白木正孝、大内尉義、井上聡：脂肪細胞分化制御因子における遺伝子多型が骨量に与える影響 (2005.6.16-17) 第 47 回日本老年医学会学術集会 (東京)
 4. 浦野友彦、大内尉義、井上聡：前立腺肥大と前立腺癌における 14-3-3sigma の発現に関する検討 (2005.6.16-17) 第 47 回日本老年医学会学術集会 (東京)

5. 堀江久仁子、高山賢一、大内尉義、井上聡：前立腺癌細胞株を用いた新規アンドロゲン応答配列の機能解析 (2005.7.1-3) 第 78 回日本内分泌学会学術総会 (東京)
6. 鈴木貴、三木康宏、森谷卓也、石田孝宣、井上聡、大内憲明、笹野公伸：乳癌組織における estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) の発現 (2005.7.1-3) 第 78 回日本内分泌学会学術総会 (東京)
7. 井上聡：[シンポジウム] 脂質代謝に関わる遺伝子の変異・多型と骨病変 (2005.7.21-23) 第 23 回日本骨代謝学会学術集会 (大阪)
8. 今澤由紀子、津久井通、井上聡：選択的エストロゲンシグナルの骨代謝における作用：II 型コラーゲンプロモーターを利用した ER alpha および ER beta コンディショナルトランスジェニックマウスの解析 (2005.7.21-23) 第 23 回日本骨代謝学会学術集会 (大阪)
9. 井上聡：[シンポジウム] 癌における性ホルモン標的遺伝子の探索とその役割 (2005.9.16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
10. 浦野友彦、大内尉義、井上聡：[シンポジウム] 癌において細胞周期調節に関わるホルモン応答性ユビキチンリガーゼ (2005.9.16) 第 64 回日本癌学会学術総会 (札幌)
11. 塩之入温、井上聡、大内尉義：高齢骨粗鬆症女性患者における転倒者と非転倒者の重心動揺計による評価 (2005.10.10) 転倒予防医学研究会 第 2 回研究集会 (京都)
12. 浦野友彦、白木正孝、白井貴彦、大内尉義、井上聡：ステロイド X 受容体(SXR)ならびに CAR の遺伝子多型が骨量に与える影響 (2005.10.13-5) 第 7 回日本骨粗鬆症学会 (大阪)
13. 井上聡：ビタミン K の骨における新しい作用メカニズム (2005.10.8-9) Bone & Joint Research Club～骨と関節の代謝調節を考える基礎の会～ (千葉)
14. Urata Y, Ihara Y, Murata H, Koji T, Yodoi J, Inoue S, Kondo T: Analysis of the induction of glutaredoxin 1 by estradiol. 第 78 回日本生化学会学術総会 (神戸)
15. Wei J, Fujita M, Inoue S, Masliah E, Hashimoto M: Beta-synuclein mutants (V70M, P123H) self-aggregate and stimulate alpha-synuclein aggregation in vitro. 第 78 回日本生化学会学術総会 (神戸)
16. 東浩太郎、堀江公仁子、大内尉義、堺隆一、井上聡：腫瘍細胞における核内受容体結合因子の解析 (2005.10.29) 第 4 回関東ホルモンと癌研究会 (東京)
17. 堀江公仁子、高山賢一、井上聡：ホルモン依存性癌におけるゲノム応答配列に基づいた新規ステロイド応答遺伝子の探索 (2005.10.29) 第 4 回関東ホルモンと癌研究会 (東京)
18. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、栗原真紀、堀江公仁子、久武幸司、禾泰寿、村松正實、井上聡：トランスジェニックマウスを用いた卵巣における ER alpha・ER beta の解析 (2005.12.6-8) 第 28 回日本分子生物学会年会 (福岡)

Wnt10B遺伝子多型と骨量との相関 (5'上流域-2043C/G)



LRP5遺伝子多型と変形性腰椎症における 各パラメーターとの相関(Q89R)

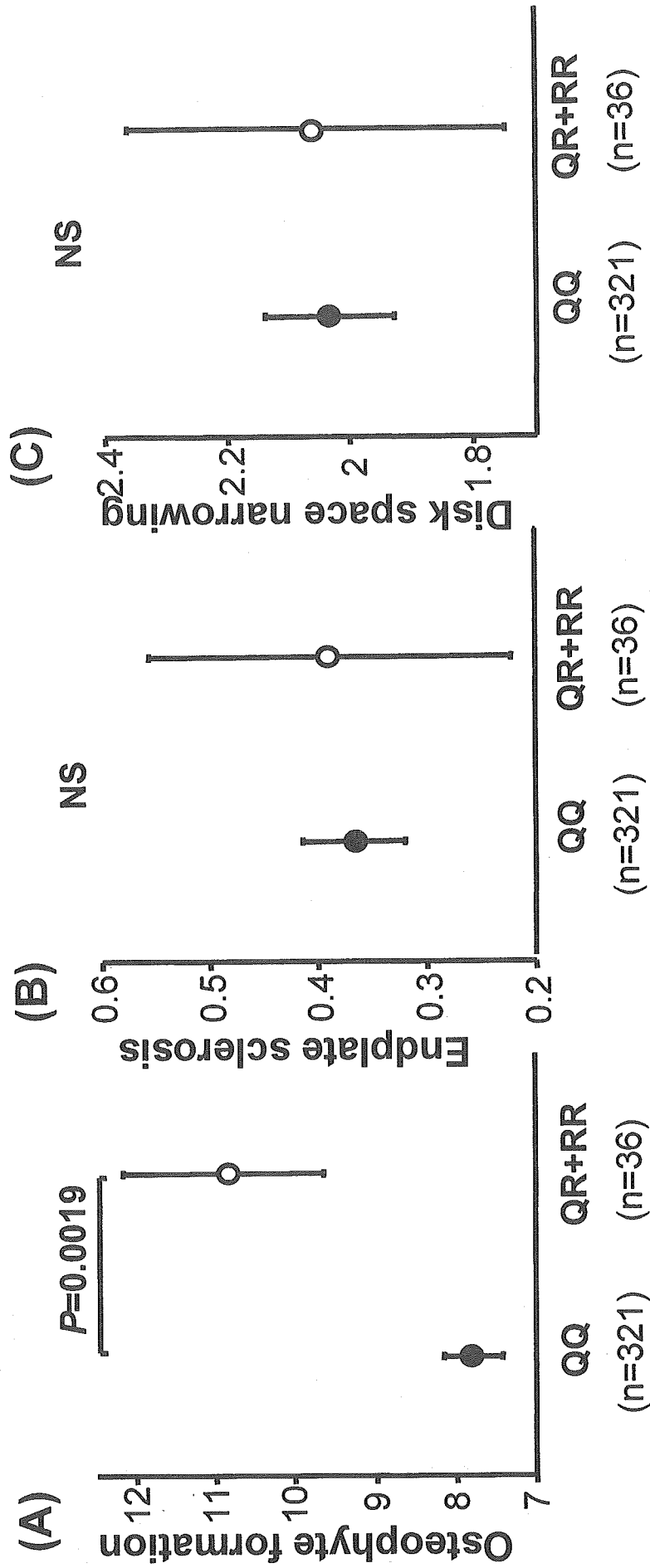
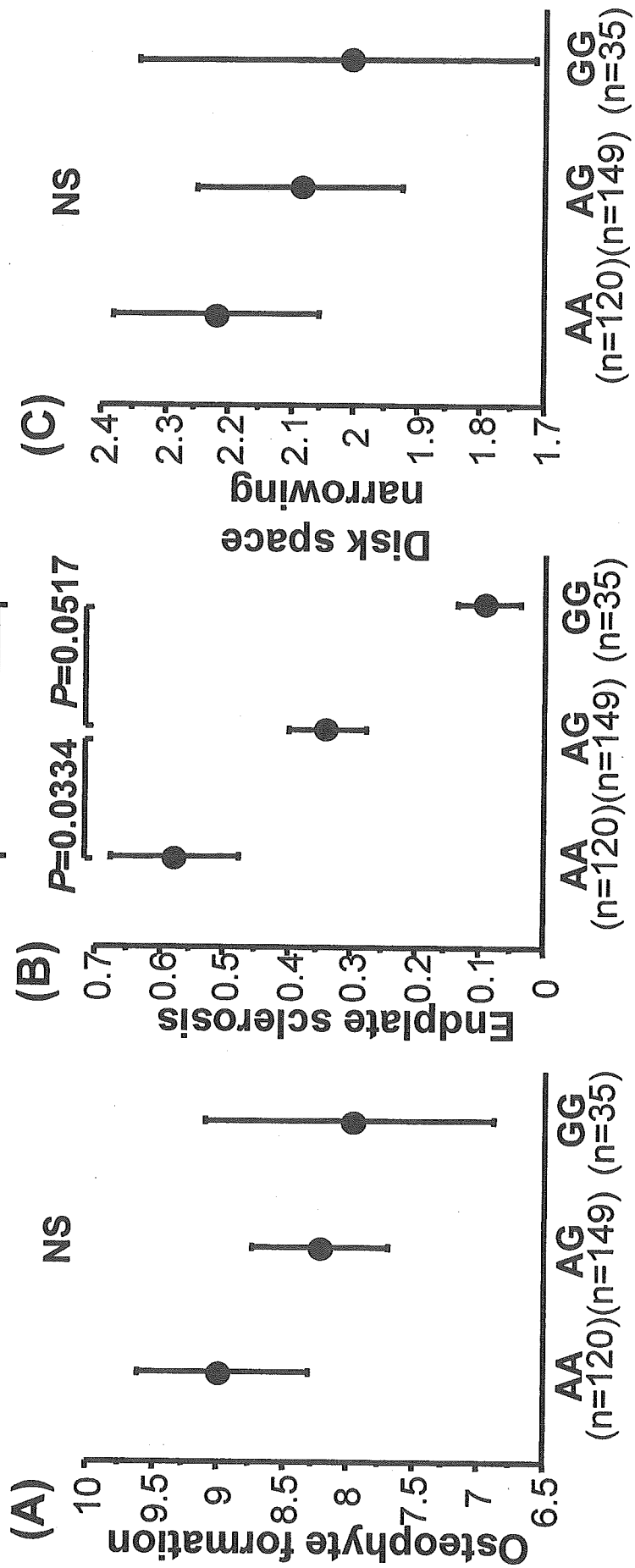


図3

WISP1遺伝子多型と変形性腰椎症における 各パラメーターとの相関(3'非翻訳領域)



研究成果の刊行