

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関連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 γ -glutamyl carboxylase (GGCX)遺伝子と 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、骨量との関連解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。

I.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関連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、 γ -glutamyl carboxylase (GGCX) 遺伝子と tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNSALP)遺伝子を取りあげた。GGCX はビタミン K サイクルにおける key enzyme 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 依存性たんぱく質)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。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。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。これらの遺伝子について、日本人集団における cSNP の探索、骨量との関連解析、遺伝子産物の機能解析をおこなった。

II. GGCX 遺伝子の検討

A. 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 法などを持ちいて 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 COS 7 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。

B. 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。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衛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。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。

C. 考察

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1。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。

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。

III. TNSALP の検討

A. 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 SNP s 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。このマイクロゾームを用いて alkaline phosphatase 活性を測定した。

B. 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 Vmax には差がないものの、787C の、Km 値は 787T に比較して有意に低いことが分かった。

C. 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。Km 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考えた。

IV. 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-men-

opausal 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
11. Sawabe M, Arai T, Kasahara I, Esaki Y, Nakahara K, Hosoi T, Orimo H, Takubo K, Murayama S, Tanaka N, Tokyo Metropolitan Geriatric Medical Center, Japan Science and Technology Agency. Developments of geriatric autopsy database and Internet-based database of Japanese single nucleotide polymorphisms for geriatric research (JG-SNP). *Mech Ageing Dev.* 2004 Aug;125(8):547-52
12. Saito Y, Ruberu NN, Sawabe M, Arai T, Kazama H, Hosoi T, Yamanouchi H, Murayama S. Lewy body-related alpha-synucleinopathy in aging. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004 Jul;63(7):742-9
13. Ezura Y, Kajita M, Ishida R, Yoshida S, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M. Association of multiple nucleotide variations in the pituitary glutamyl cyclase gene (QPCT) with low radial BMD in adult women. *J Bone Miner Res.* 2004 Aug;19(8):1296-301.
14. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single-nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab.* 2004;22(4):341-5.
15. Kazama H, Ruberu NN, Murayama S, Saito Y, Nakahara K, Kanemaru K, Nagura H, Arai T, Sawabe M, Yamanouchi H, Orimo H, Hosoi T. Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with neurofibrillary tangles. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2004;18(2):145-50.
16. Horiuchi T, Kazama H, Araki A, Inoue J, Hosoi T, Onouchi T, Mizuno S, Ito

H, Orimo H. Impaired gamma carboxylation of osteocalcin in elderly women with type II diabetes mellitus: relationship between increase in undercarboxylated osteocalcin levels and low bone mineral density.

J Bone Miner Metab. 2004;22(3):236-40.

17. Fukunaga M, Nakamura T, Shiraki M, Kuroda T, Ohta H, Hosoi T, Orimo H.

Absolute height reduction and percent height ratio of the vertebral body in incident fracture in Japanese women.

J Bone Miner Metab. 2004;22(2):104-10.

18. Muraki S, Yamamoto S, Ishibashi H, Horiuchi T, Hosoi T, Orimo H, Nakamura K.

Impact of degenerative spinal diseases on bone mineral density of the lumbar spine in elderly women. Osteoporos Int.

2004 Sep;15(9):724-8.

表1

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

表2

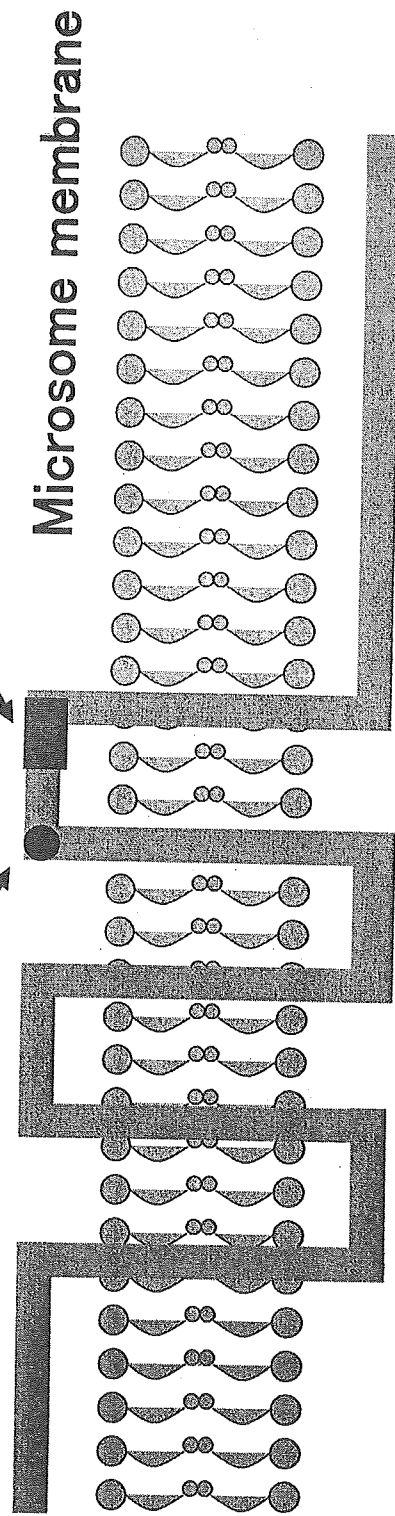
SNP	塩基の位置	変化	頻度	アミノ酸変異	位置
exon8 (Arg/Glu)	8762	G/A	0.66: 0.34	Arg/Glu	325
exon 9-1	9167	C/T	0.66: 0.34	none	406
exon 9-2	9191	C/T	0.94: 0.06	none	414

図1

GGCXの構造モデルと多型性部位

SNP (Arg325Glu)

Catalytic domain



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、sFRP4、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. 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、終板硬化を発症している脊椎の数を測定した。対象者の全身骨ならびに腰椎骨密度を測定した。以上の骨量ならびに変形性脊椎症と LRP5 遺伝子多型との相関について統計学的解析を行った。また、LRP5 遺伝子イントロン 17 における遺伝子多型(IVS17-1677C>A)ならびにエクソン内にある

Q89R に関して、閉経後女性を対象に全身骨ならびに腰椎骨密度に関して相関について統計学的解析を行った。

2. Wnt-LRP5 経路の WNT10B, WISP1 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。

3. Wnt-β カテニンシグナル伝達因子 sFRP4 の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響と骨芽細胞分化における発現変化に関する検討

sFRP4 遺伝子における Arg262 の SNP (CGC→CGT) に関して、Taqman PCR 法を用いて genotype の分類を行った。閉経後女性 379 人を対象として BMD との関連を検討した。

ラット頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞は、10% FBS、50 μ g/ml アスコルビン酸および 5 mM β -グリセロリン酸添加 α -MEM にて培養した。メディアウム交換を週二回のペースで行い、培養 3 日、5 日、8 日、11 日、13 日、15 日、18 日後に RNA を回収し、それぞれの時点での LRP5、sFRP4、

Kremen1、アルカリホスファターゼ(ALP)遺伝子発現の変化を SYBR Green Real Time PCR 法にて解析した。

C. 結果

1. LRP5 遺伝子多型と腰椎変形性関節症、骨粗鬆症

LRP5 遺伝子のイントロン 5 における遺伝子多型(IVS5-393C>T)では、C アレルを有する群(CC+CT)では T のホモ群(TT)と比して、椎間板狭小化が有意に減少していた(図 1)。また、腰椎骨密度においては C アレルを有する群(CC+CT)では T のホモ群(TT)と比して、骨量が有意に減少していた。それ以外の脊柱変形のパラメーターでは有意な相関は認めなかった。また、LRP5 遺伝子イントロン 17 における遺伝子多型(IVS17-1677C>A)に関しては、A アレルを有するもの(AA+CA)が C のホモ群(CC)に比べて有意に骨量が低いという強い相関($p=0.0022$;全身骨密度, $p=0.013$; 腰椎骨密度)が得られた(図 2)。

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 3A)有意差を呈していた。

2. Wnt-LRP5 経路の WNT10B, WISP1 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 4A)。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 4B、 $P=0.0596$)。

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5B)有意差を呈していた。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。

3. Wnt- β カテニンシグナル伝達因子sFRP4の遺伝子多型が骨量に及ぼす影響と骨芽細胞分化における発現変化に関する検討

Secreted Frizzled Related Protein 4 (sFRP4)の Arg262 の SNP (CGC→CGT) に関して、T アレルを持つ群(CT+TT; n=246)では持たない群(CC; n=133)に比べ有意に腰椎骨密度が低いことを認めた(Z score; -0.33 vs 0.03; p=0.023) (図6)。さらに LRP5 遺伝子と、sFRP4、そして関連する Kremen1 の骨芽細胞分化に伴う mRNA レベルでの発現変化に関して検討を行った。その結果 LRP5、sFRP4 ならびに Kremen1 はともに骨芽細胞で発現しており、その発現量は培養開始、分化誘導後 11-15 日の間でピークを迎えることが明らかとなった (図7)。

D. 考察

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 もしくは、そのインヒビターである sFRP4 における SNP が骨量と有意に相関することを明らかにした。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ー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. Urano T, Shiraki M, Ezura Y, Fujita M, Sekine E, Hoshino S, Hosoi T, Orimo H, Emi M, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene with bone mineral density. *J Bone Miner Metab* 22, 341-345, 2004.
2. Urano T, Takahashi S, Suzuki T, Fujimura T, Fujita M, Kumagai J, Horie-Inoue K, Sasano H, Kitamura T, Ouchi Y, Inoue S: 14-3-3sigma is down-regulated in human prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 319, 795-800, 2004.
3. Fujita M, Urano T, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S: Association of a single nucleotide polymorphism in the secreted frizzled related protein 4 (sFRP4) gene with bone mineral density. *Geriatric Gerontol Int* 4, 175-180, 2004.
4. Ikeda K, Ogawa S, Tsukui T, Horie-Inoue K, Ouchi Y, Kato S, Muramatsu M, Inoue S: Protein phosphatase 5 is a negative regulator of estrogen receptor-mediated transcription. *Mol Endocrinol* 18, 1131-1143, 2004.
5. Ezura Y, Kajita M, Ishida Y, Yoshida S, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M: Association of Multiple Nucleotide Variations in the Pituitary Glutamyl Cyclase Gene (QPCT) With Low Radial BMD in Adult Women. *J Bone Miner Res* 19, 1296-1301, 2004.
6. Sudo Y, Ezura Y, Ishida R, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ito H, Emi M: Association of a single-nucleotide polymorphism in the promoter region of leukemia inhibitory factor receptor gene with low bone mineral density in adult women. *Geriatric Gerontol Int* 4, 245-249, 2004.
7. Shimada N, Suzuki T, Inoue S, Kato K, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H: Systemic distribution of estrogen-responsive finger protein (Efp) in human tissues. *Mol Cell Endocrinol* 218, 147-153, 2004.
8. Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N: Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clin Cancer Res* 10, 2687-93, 2004.
9. Akahira J, Aoki M, Suzuki T, Moriya T, Niikura H,

- Ito K, Inoue S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N: Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer* 90, 2197-2202, 2004.
10. Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S: Identification and functional analysis of consensus androgen response elements in human prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 325, 1312-1317, 2004.
11. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R: Tubulin association and tyrosine phosphorylation of estrogen receptor at the plasma membrane. *FEBS Lett* 577, 339-344, 2004.
12. Tamura N, Hishikawa Y, Ejima K, Nagasue N, Inoue S, Muramatsu M, Hayashi T, Koji T: Estrogen receptor-associated expression of keratinocyte growth factor and its possible role in the inhibition of apoptosis human breast cancer. *Lab Invest* 84, 1460-1471, 2004.
13. Ikeda K, Inoue S: Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. *Arch Histol Cytol* 67, 435-442, 2004.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Sakuma M, Akahira J, 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.
21. 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.
22. 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.

23. 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)
24. 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 cell. *Histochem Cell Biol* (in press)
25. 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)

2. 学会発表

【国際学会】

1. Inoue S: Estrogen responsive gene in the growth control of breast tumors. 3rd International Nuclear Receptor Meeting, Osaka (2004.4.15-18)
2. Urano T, Fujita M, Hoshino S, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S: [New Investigator Award] SNP detection implicated in Wnt-beta-catenin signaling molecules as a genetic marker for involutional osteoporosis. The American Geriatrics Society, 2004 Annual Scientific Meeting, Las Vegas, NV, USA (2004.5.17-21)
3. Inoue S: [Symposium] “Molecular and cellular analysis of steroid hormone receptor: Expression and its role in reproductive organs” Estrogen receptors and their downstream targets in breast tumors. 16th International Congress of the IFAA (International Federation of Associations of Anatomists), Kyoto (2004.8.22-27)
4. Azuma K, Horie K, Inoue S, Ouchi Y, Sakai R: Analysis of estrogen receptor signaling complex at the plasma membrane. 12th International Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal (2004.8.31-9.4)
5. Ikeda K, Inoue S: The estrogen-responsive gene COX7RP is a direct target of Estrogen-related receptor alpha and exhibits tumor-promoting activity in endometrial cancer. The Japanese Biochemical Society International Symposium in 2005, New Frontier of Transcription Research, Kusatsu (2005.1.11-12)
6. Horie-Inoue K, Bono H, Okazaki Y, Inoue S: In silico genomic approach of consensus androgen response elements combined with experimental verification enable to identify novel hormone-responsive genes in prostate cancer cells. Keystone Symposia; Hormonal regulation of tumorigenesis, Monterey, CA, USA (2005.2.19-24)
7. 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)

8. 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)
9. 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. 星野眞二郎、井上聡、大内尉義：男性における骨粗鬆症の検討 (2004.4.8-10) 第 101 回日本内科学会 (東京)
2. 保母るつ子、池田和博、武田省、井上聡：エストロゲン応答遺伝子 COX7RP の子宮内膜癌における発現とその機能 (2004.4.12) 第 56 回日本産婦人科学会総会・学術講演会 (東京)
3. 浦野友彦、藤田雅代、白木正孝、星野眞二郎、大内尉義、井上聡：Wnt-beta-catenin シグナル伝達因子における遺伝子多型が骨量に与える影響 (2004.6.16-18) 第 46 回日本老年医学会学術集会 (千葉)
4. 木下博之、成沢研一郎、中村利孝、吉田英世、鈴木隆雄、大内尉義、井上聡、細井孝之：高齢女性の退行性脊椎病変における遺伝的素因の解析(2004.6.16-18) 第 46 回日本老年医学会学術集会 (千葉)
5. 浦野友彦、大内尉義、井上聡：エストロゲン応答遺伝子 Efp 結合蛋白の探索とその機能解析 (2004.6.24-26) 第 77 回日本内分泌学会学術総会 (京都)
6. 井上聡；[ランチョンセミナー] 骨代謝におけるビタミン K の作用メカニズムとその役割 (2004.8.4-7) 第 22 回日本骨代謝学会 (大阪)
7. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：骨芽細胞におけるステロイド X 受容体(SXR)ならびにビタミン K の新しい標的分子とその作用 (2004.8.4-7) 第 22 回日本骨代謝学会学術集会
8. 東浩太郎、田中正光、井上聡、横田淳、大内尉義、堺隆一：骨肉腫細胞の転移性に関わる paxillin のチロシンリン酸化亢進 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
9. 佐久間道子、赤平純平、鈴木貴、井上聡、伊藤潔、森谷卓也、笹野公伸、八重樫伸生：上皮性卵巣癌における Estrogen responsive RING finger protein (efp) の発現とその臨床病理学的意義 (2004.9.29-10.1) 第 63 回日本癌学会学術総会 (福岡)
10. 江見充、須藤悦弘、梶田満子、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江面陽一：プロオピオメラノコルチン遺伝子(POMC)の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
11. 須藤悦弘、梶田満子、中島敏晶、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江面陽一、江見充：I α B キナーゼ α および β 遺伝子(IKKA, IKKB)の遺伝子多型と成人女性補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第 49 回日本人類遺伝学会 (東京)
12. 梶田満子、須藤悦弘、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、

- 江面陽一、江見充：破骨細胞随伴受容体遺伝子 (OSCAR)の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第49回日本人類遺伝学会 (東京)
13. 江面陽一、梶田満子、須藤悦弘、齋藤実、小平美奈、河越美保、白木正孝、井上聡、細井孝之、鈴木隆雄、江見充： α -アデューシン遺伝子 (ADDI)の遺伝子多型と成人女性の補正橈骨骨密度値との相関 (2004.10.12-15) 第49回日本人類遺伝学会 (東京)
14. 菱沼俊樹、池田和博、井上聡：Gene structure and interferon inducible expression of human ifp1 (2004.10.13-16) 第77回日本生化学会大会 (横浜)
15. 藤田雅代、浦野友彦、大内尉義、井上聡：骨芽細胞の増殖ならびに分化過程におけるステロイド応答遺伝子群の探索 (2004.11.17-20) 第6回日本骨粗鬆症学会 (大宮)
16. 池田和博、保母るつ子、武田省、井上聡：細胞増殖におけるエストロゲン応答遺伝子 COX7RP の役割 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
17. 井上聡：[ワークショップ] 性ホルモン標的因子の同定とその機能 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
18. 今澤由紀子、津久井通、大羽沙弥佳、栗原真紀、堀江公仁子、村松正實、井上聡：Cre/lox P システムを用いた骨代謝におけるエストロゲンシグナルの解析 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
19. 大羽沙弥佳、津久井通、今澤由紀子、池田和博、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エストロゲンシグナルの解析 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
20. 津久井通、今澤由紀子、大羽沙弥佳、藤田雅代、浦野友彦、村松正實、井上聡：BGp コンディショナルトランスジェニックマウスにおける骨代謝の解析 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
21. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：骨芽細胞におけるステロイド X 受容体(SXR)を介したビタミンKの標的分子とその作用 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
22. 堀江公仁子、坊農秀雄、岡崎康司、井上聡：ゲノム情報に基づく新規アンドロゲン応答配列群の同定 (2004.12.8-11) 第27回日本分子生物学会年会 (神戸)
23. Inoue S: Downstream targets for sex steroid hormone receptors. (2005.2.28-3.1) Nagasaki Symposium on The Nuclear System to Decipher Operation Code (DECODE) for Biological Response (長崎)
24. 市川智恵、堀江公仁子、井上聡：核内受容体 SXR を介したビタミン K の骨芽細胞における標的分子とその作用 (2005.2.12) 第8回 Vitamin K & Bone 研究会 (東京)
25. 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)
26. 井上聡：[シンポジウム] 骨粗鬆症と未病-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)
27. 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)
28. 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)
29. 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)
30. 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)
31. 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)
32. 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)
33. 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)
34. 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)
35. 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)
36. 浦野友彦、白木正孝、臼井貴彦、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)
37. 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)
38. 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)
39. 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)
40. 東浩太郎、堀江公仁子、大内尉義、塚隆一、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)
41. 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)
42. 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)

図1. LRP5遺伝子イントロン5に存在する遺伝子多型が骨量ならびに脊椎変形に与える影響 (IVS5-393C>T, Nagano cohort)

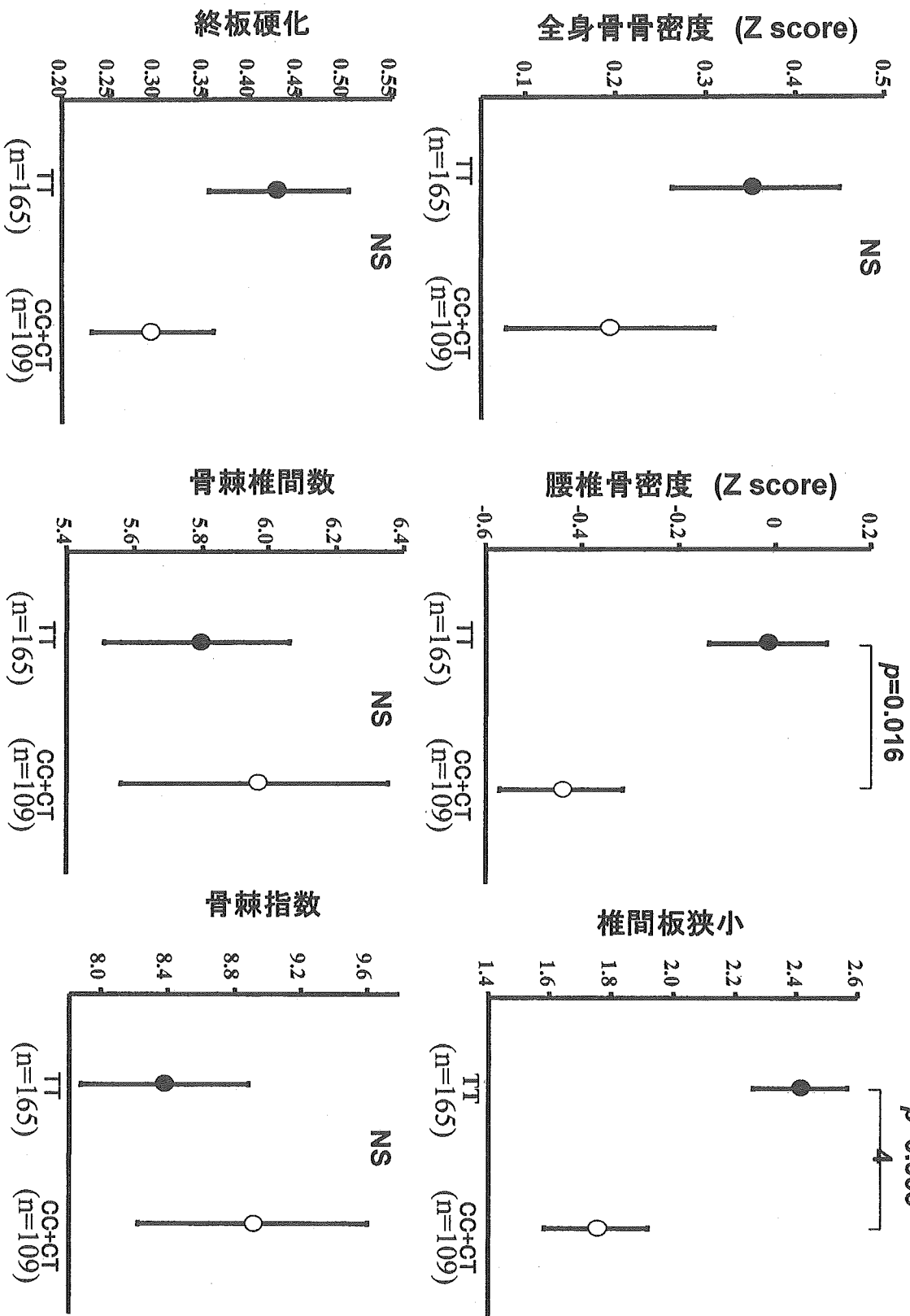


図2. LRP5遺伝子イントロン17に存在する遺伝子多型が骨量に与える影響
(IVS17-1677C>A polymorphism)

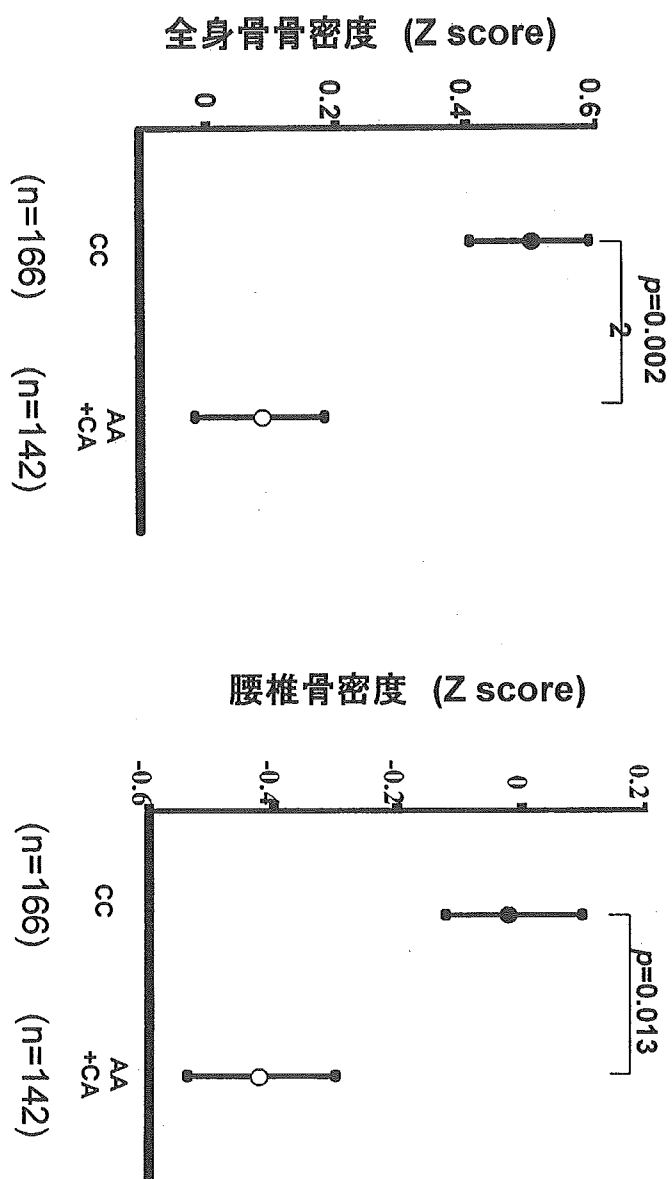


図3

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)

