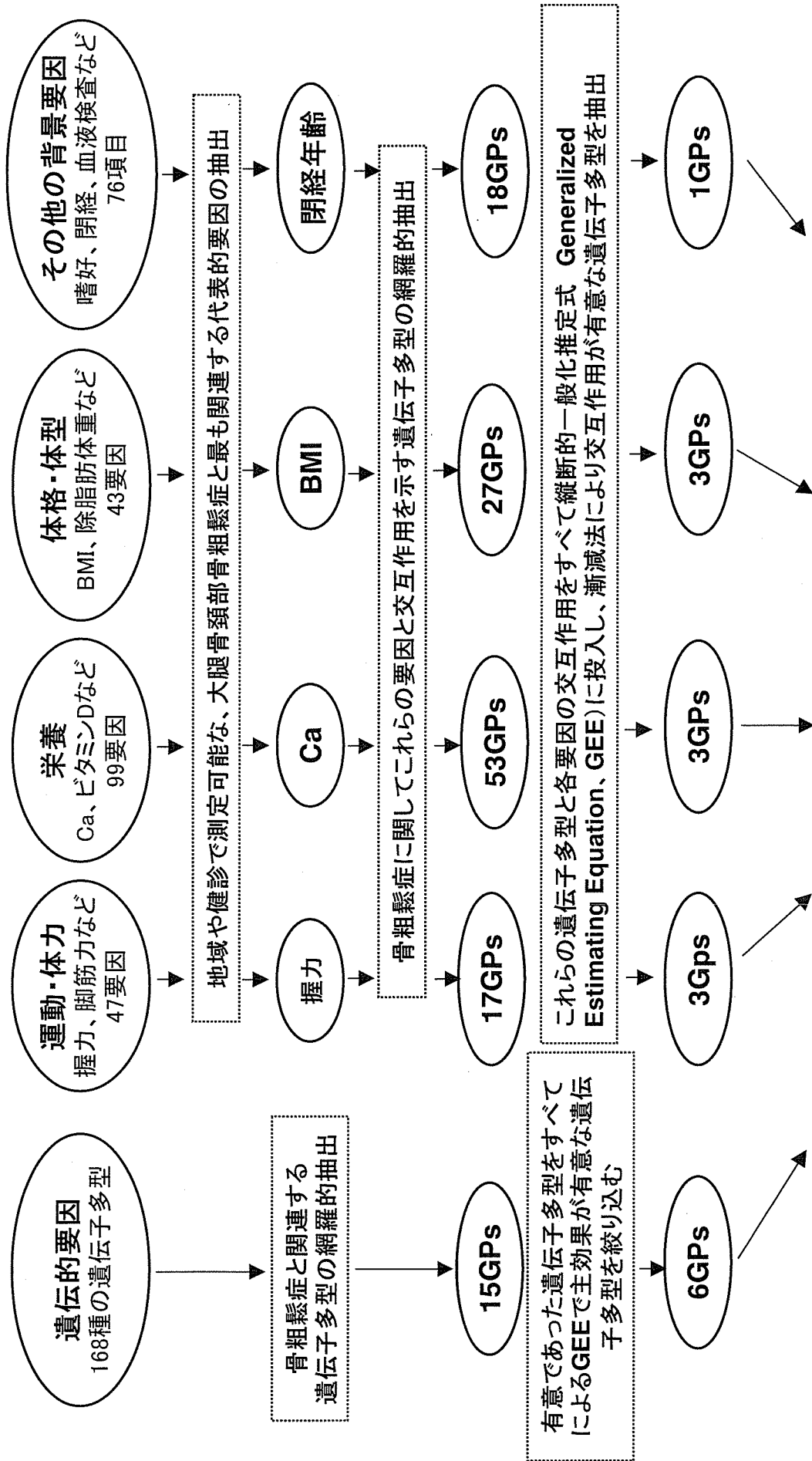


図1. 生活習慣・背景要因・遺伝要因・遺伝要因・大腿骨頸部骨密度と大腿骨頸部骨密度からの閉経女性の骨粗鬆症リスク推定式の作成（4年間の縦断解析）



(Gp:遺伝子多型、Ca:カルシウム摂取量、BMI:体格指数)

表2. 閉経女性大腿骨頸部骨粗鬆症に関連する要因  
(Generalized equation model による縦断解析結果)

	estimate	p
Intercept	-7.4017	<.0001
IGF2R2	6.5160	<.0001
ADR	0.9366	0.0053
CX37	-0.7479	0.0119
ESR2	7.2730	0.0162
IL6	6.1183	0.0064
IL6 * BMI	-0.2149	0.0469
BMI	-0.3012	<.0001
IGF2R2 * 閉経年齢	-0.1191	0.0004
IL1 $\beta$ * Ca	-0.0011	0.0001
PAFAH * 握力	0.0270	0.0247
ESR2 * 握力	-0.2786	0.0307
年齢	0.1667	<.0001

ADR; Androgen receptor (S;CAG repeat<23, L=CAG repeat $\geq$ 23), CX37; Connexin37(C1019T), IL6; Interleukin-6(C-634G), ESR2; Estrogen Receptor  $\alpha$  (XX/xx), PAFAH; Platelet-activating factor acetylhydrolase (G994T (Val279Phe)), IL1B; Interleukin-1  $\beta$  (C-511T), IGF2R2; Insulin-like growth factor 2 receptor(A5002G(Arg1619Gly))

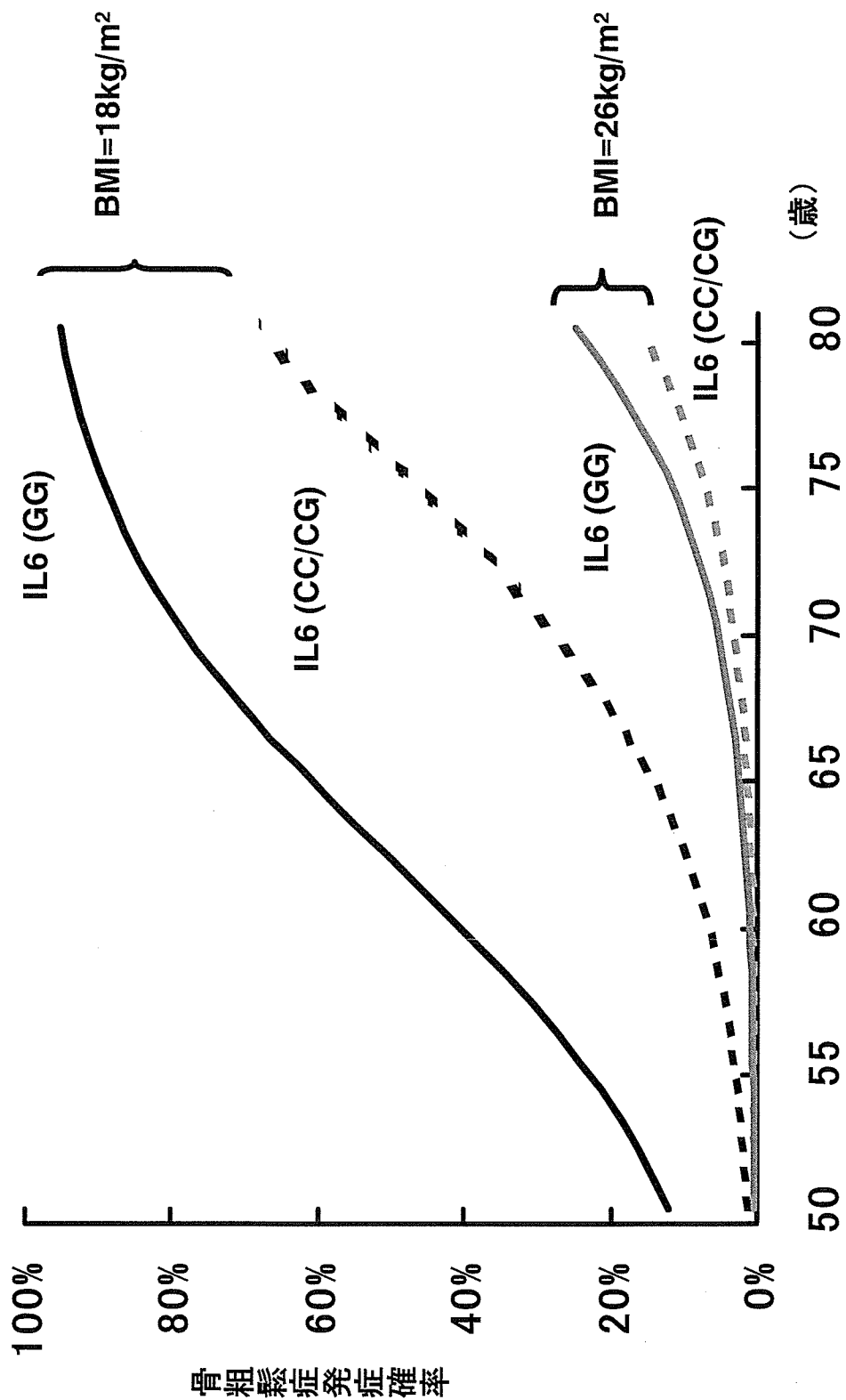
表3. 閉経女性の骨粗鬆症リスクファクター

(大腿骨頸部骨密度から判定した骨粗鬆症を目的変数としたGeneralized Estimating Equationによる)

骨粗鬆症関連要因		Odds比	95%信頼区間	p値
ADR	(0=SS, 1=SL/SS)	2.55	1.32 - 4.93	0.0053
CX37	(0=CT/TT, 1=CC)	2.11	1.18 - 3.78	0.0119
IL6 (BMI=18kg/m <sup>2</sup> )	(0=CC/CG, 1=GG)	9.49	3.86 - 23.32	<.0001
IL6 (BMI=22kg/m <sup>2</sup> )		4.02	1.79 - 9.00	0.0007
IL6 (BMI=26kg/m <sup>2</sup> )		1.70	0.42 - 6.82	n.s.
BMI (IL6=GGの場合)	(BMI 2kg/m <sup>2</sup> 減少ごとに)	2.81	1.90 - 4.14	<.0001
BMI (IL6=CC/CGの場合)	(BMI 2kg/m <sup>2</sup> 減少ごとに)	1.83	1.52 - 2.20	<.0001
ESR2 (握力=18kg)	(0=AA/AG, 1=GG)	9.57	2.02 - 45.44	0.0045
ESR2 (握力=22kg)		3.14	1.31 - 7.55	0.0105
ESR2 (握力=26kg)		1.03	0.35 - 3.02	0.9558
PAFAH (握力=18kg)	(0=GT/TT, 1=GG)	0.62	0.40 - 0.94	0.0247
PAFAH (握力=22kg)		0.55	0.33 - 0.93	0.0247
PAFAH (握力=26kg)		0.50	0.27 - 0.91	0.0247
IL1B (Ca摂取=400mg/day)	(0=CC, 1=CT/TT)	0.64	0.51 - 0.80	0.0001
IL1B (Ca摂取=600mg/day)		0.51	0.36 - 0.72	0.0001
IL1B (Ca摂取=800mg/day)		0.41	0.26 - 0.65	0.0001
IGF2R2 (閉経年齢=40歳)	(0=GG, 1=GA/AA)	5.76	2.72 - 12.18	<.0001
IGF2R2 (閉経年齢=45歳)		3.17	1.83 - 5.49	<.0001
IGF2R2 (閉経年齢=50歳)		1.75	1.06 - 2.90	0.0299
IGF2R2 (閉経年齢=55歳)		0.96	0.50 - 1.85	n.s.
年齢	(年齢 10歳上昇ごとに)	5.30	3.84 - 7.30	<.0001

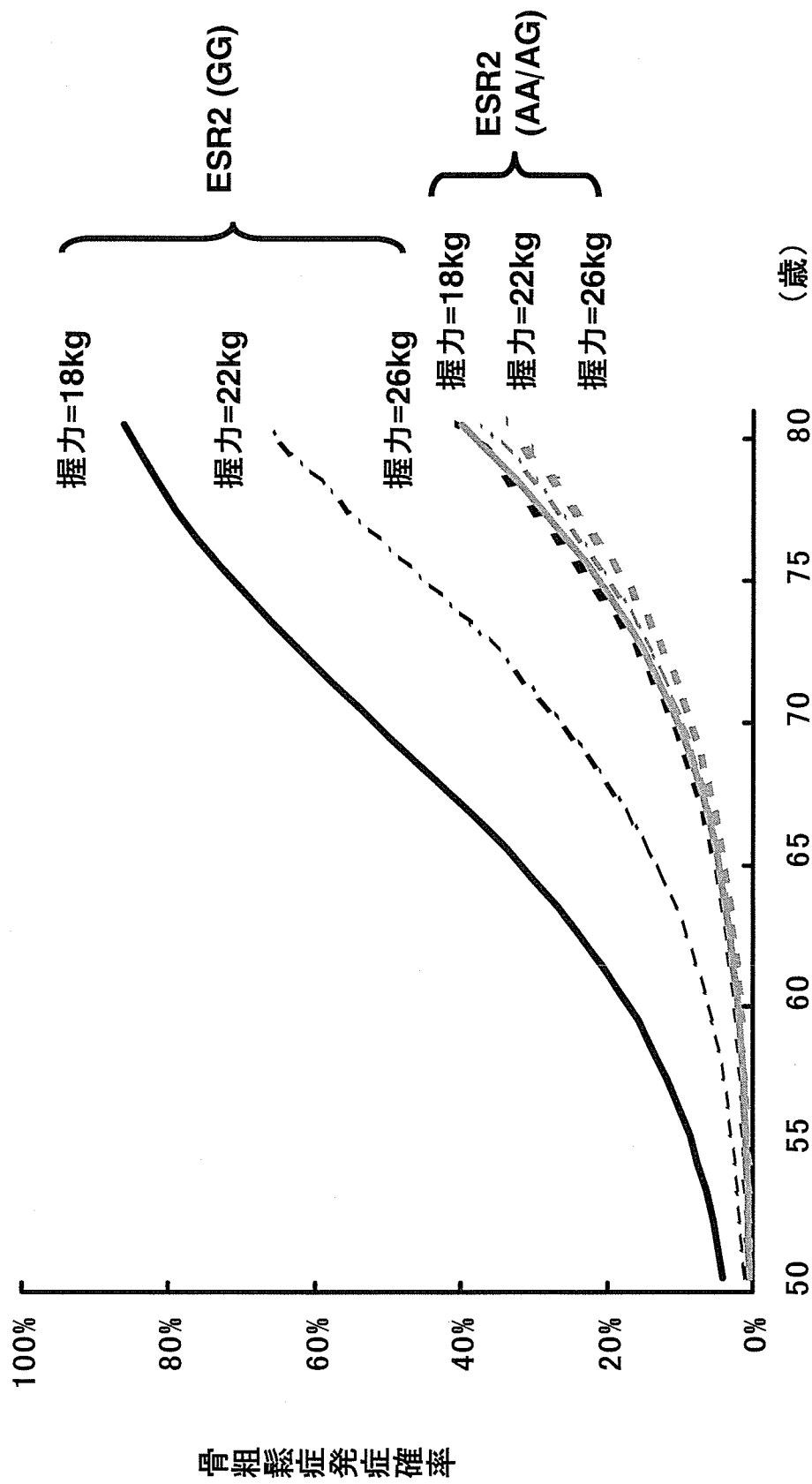
ADR; Androgen receptor (S;CAG repeat<23, L=CAG repeat>=23), CX37; Connexin37(C1019T), IL6; Interleukin-6(C-634G), ESR2; Estrogen Receptor  $\alpha$  (XX/xx), PAFAH; Platelet-activating factor acetylhydrolase (G994T (Val279Phe)), IL1B; Interleukin-1  $\beta$  (C-511T), IGF2R2; Insulin-like growth factor 2 receptor(A5002G(Arg1619Gly))

図2. 遺伝子多型との交互作用の例 (1) - IL6とBMI



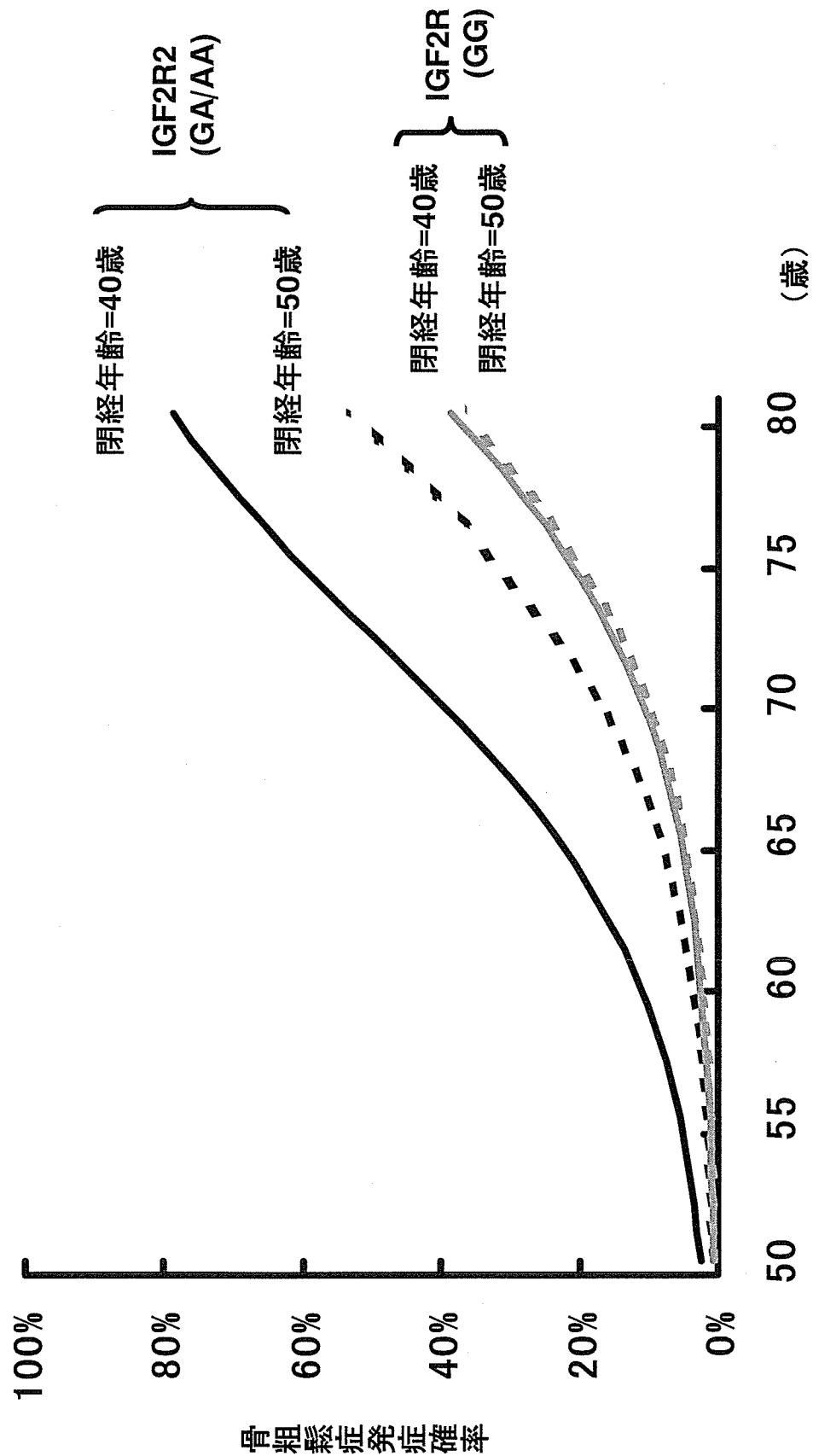
BMIが平均よりも大きければIL6遺伝子多型による骨粗鬆症発症リスクには差がないが、BMIが小さければ小さいほど、遺伝子多型とBMIとの相乗効果で加齢に伴う骨粗鬆症発症リスクは急速に高まる。

図3. 遺伝子多型との交互作用の例 (2) - ESR2と握力



ESR2遺伝子多型のAA/AGでは骨粗鬆症発症リスクの握力による差は認められないがGGでは握力の低い者では顕著に骨粗鬆症の発症リスクが上昇する。

図4. 遺伝子多型との交互作用の例 (3) - IGF2R2と閉経年齢



IGF2R2遺伝子多型のGA/AA多型は閉経年齢の骨粗鬆症へのリスクを強めている。

## II. 分担研究報告書

生活習慣・背景要因・遺伝的要因による総合的骨粗鬆症リスク診断システムの開発

分担研究課題：ゲノム多型による骨粗鬆症の遺伝因子の解明

分担研究者：山田芳司 三重大学生命科学研究支援センター 教授

研究要旨 骨リモデリングへの関与が推定される 21 遺伝子 22 多型と骨密度との関連を、国立長寿医療センター研究所疫学研究部の長期縦断研究 (NILS-LSA) 参加者において検討した。これらの多型の中で、adipocyte-derived leucine aminopeptidase 遺伝子 A→G (Lys528Arg) 多型と procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 遺伝子 G→A (Ala99Thr) 多型は閉経前女性の骨密度、intercellular adhesion molecule 1 遺伝子 A→G (Lys469Glu) 多型と lipase, hepatic 遺伝子-514C→T 多型は閉経後女性の骨密度、cannabinoid receptor 2 遺伝子 A→G 多型 (rs2501431) は閉経前および閉経後女性の骨密度、gap junction protein, alpha-4 遺伝子 1019C→T (Pro319Ser) 多型は男性の骨密度と有意な関連を示した。その中でも、*ICAMI* 多型と *CNR2* 多型は女性の閉経後骨粗鬆症、*GJA4* 多型は男性の骨粗鬆症に関連することが示唆された。

#### A. 研究目的

骨粗鬆症の発症には多数の環境因子と遺伝因子が関与し、それらの相互作用により発症が規定される。骨粗鬆症における遺伝子多型の関与については、1 個 1 個の多型の影響は小さいが、多数の多型の組み合わせにより最終的には 50~75%の影響を与えていると推定される。本研究の目的は、骨リモデリングへの関与が推定される遺伝子群の多型と骨密度との関連について国立長寿医療センター研究所疫学研究部の長期縦断研究 (NILS-LSA) 参加者において検討し、骨密度に関わる遺伝子多型群を確定することにより、骨粗鬆症およびそれに起因する骨折のオーダーメイド予防に貢献することである。

#### B. 研究方法

対象は NILS-LSA 参加者 2238 名で、橈骨遠位部・近位部の骨密度は pQCT で測定し、全身骨、腰椎 (L2-L4)、大腿骨頸部、転子部、ワード三角の骨密度は DXA で測定した。遺伝子多型は、(1) osteoclast-associated receptor 遺伝子 (*OSCAR*) -2322A→G 多型、(2) collagen, type I, alpha-2 遺伝子 (*COL1A2*) GT repeat 多型、(3) insulin-included gene 2 (*INSIG2*) G→C 多型 (rs7566605)、(4) intercellular adhesion molecule 1 遺伝子 (*ICAMI*) A→G (Lys469Glu) 多型、(5) beta-1-adrenergic receptor 遺伝子 (*ADRB1*) G→C (Gly398Arg) 多型、(6) regulator of G protein signaling 2 遺伝子 (*RGS2*) 1026T→A 多型、(7) brain-derived neurotrophic factor 遺伝子 (*BDNF*) G→A



(Val66Met) 多型、(8) adipocyte-derived leucine aminopeptidase 遺伝子 (*ALAP*) A→G (Lys528Arg) 多型、(9) cannabinoid receptor 2 遺伝子 (*CNR2*) A→G 多型 (rs2501431)、(10) lipase, hepatic 遺伝子 (*LIPC*) -514C→T 多型、(11) rho-associated coiled-coil-containing protein kinase 2 遺伝子 (*ROCK2*) C→A (Thr431Asn) 多型、(12) apolipoprotein B 遺伝子 (*APOB*) 1/D (signal peptide) 多型、(13) chloride channel 7 遺伝子 (*CLCN7*) G→A (Val418Met) 多型、(14) gap junction protein, alpha-4 遺伝子 (*GJA4*) 1019C→T (Pro319Ser) 多型、(15) gap junction protein, alpha-5 遺伝子 (*GJA5*) -44G→A 多型、(16) caveolin 1 遺伝子 (*CAVI*) 1/D (22375delAC) 多型、(17) estrogen receptor 2 遺伝子 (*ESR2*) -1213T→C 多型、(18) cytochrome P450, subfamily Y XIB, polypeptide 2 遺伝子 (*CYP11B2*) -344C→T 多型、(19) glutathione peroxidase 遺伝子 (*GPX1*) C→T (Pro198Leu) 多型、(20) beta-1-adrenergic receptor 遺伝子 (*ADRB1*) A→G (Ser49Gly) 多型、(21) fatty acid amide hydrolase 遺伝子 (*FAAH*) 385C→A 多型、(22) procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 遺伝子 (*PLOD1*) G→A (Ala99Thr) 多型の 21 遺伝子 22 多型について検討した。遺伝子型のタイピングは、fluorescence-based allele-specific DNA primer assay system または intercalater-mediated fluorescence resonance energy transfer probe method (融解曲線法) (東洋紡ジーンアナリシス) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立長寿医療センター倫理委員会

で承認されており、対象者全員から書面でインフォームドコンセントを得ている。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年 12 月 28 日全部改正、平成 17 年 6 月 29 日一部改正)」を遵守し研究を行った。

### C. 研究結果

今回検討した多型群の中で、*ICAMI* 多型、*CNR2* 多型、*GJA4* 多型、*ALAP* 多型、*LIPC* 多型、*PLOD1* 多型が骨密度と有意な関連を示した。

*ICAMI* 多型は女性全体では D50、D100 と有意に関連し、閉経後女性では D50、D100 および全身骨、腰椎、転子部、ワード三角の骨密度と有意に関連した。いずれの群においても、A アリルが低骨密度を呈した。男性では、*ICAMI* 多型は骨密度と有意な関連を示さなかった。

*CNR2* 多型は、女性全体では D50 および全身骨、腰椎の骨密度と有意に関連し、閉経前女性では D50 および腰椎骨密度と、閉経後女性では D50 および全身骨骨密度と有意に関連した。いずれの群においても G アリルが低骨密度を呈した。男性では全身骨、大腿骨頸部、転子部の骨密度と有意に関連したが、女性とは異なり A アリルが低骨密度を示した。

*GJA4* 多型は、男性では全身骨、腰椎、大腿骨頸部、転子部、ワード三角の骨密度と有意に関連し、T アリルが低骨密度を呈した。一方女性では、*GJA4* 多型は女性全体および閉経後女性において大腿骨頸部骨密度と関連したが、男性とは異なり C アリルが低骨密度を呈した。

*ALAP* 多型は、閉経前女性では全身骨、大

腿骨頸部、転子部、ワード三角の骨密度と関連し、男性では大腿骨頸部骨密度と関連した。男女共 *T* アリルが低骨密度を呈した。

*LIPC* 多型は、女性全体では D50 および全身骨、転子部の骨密度と有意に関連し、閉経後女性では D50 および全身骨骨密度と有意に関連した。いずれの群においても *T* アリルが低骨密度を示した。

*PLOD1* 多型は、女性全体および閉経前女性において大腿骨頸部と転子部の骨密度と有意に関連し、いずれも *A* アリルが低骨密度を呈した。

一方、*CYP11B2* 多型、*ADRB1* Gly398Arg 多型、*ADRB1* Ser49Gly 多型、*RGS2* 多型、*BDNF* 多型、*ROCK2* 多型、*APOB* 多型、*GJA5* 多型、*ESR2* 多型、*CAVI* 多型、*FAAH* 多型、*GPX1* 多型、*OSCAR* 多型、*INSIG2* 多型、*COL1A2* 多型は、男女共に骨密度との有意な関連を認めなかった。また *CLCN7* 多型は NLS-LSA の対象者においては認められなかった。

#### D. 考察

本研究から、*ALAP*、*PLOD1*、*ICAMI*、*LIPC*、*CNR2* が日本人女性の骨密度感受性遺伝子であり、*GJA4* が男性の骨密度感受性遺伝子であることが示唆された。その中でも、*ICAMI* と *CNR2* は女性の閉経後骨粗鬆症に関連し、*GJA4* は男性の骨粗鬆症に関連することが示唆された。この結果から、骨粗鬆症感受性遺伝子は男女で異なる可能性が示唆された。また女性においても、*ALAP* 多型と *PLOD1* 多型は閉経前女性の骨密度、*ICAMI* 多型と *LIPC* 多型は閉経後女性の骨密度、*CNR2* 多型は閉経前および閉経後女性の骨密度に関連

するという結果が得られ、*CNR2* 多型以外は閉経前後で骨密度に関連する遺伝子多型が異なっていた。この結果は、peak bone mass (骨量頂値) と閉経後の骨量減少に関連する多型が異なる可能性を示唆する。本研究において骨密度との関連が認められた多型については縦断的な解析を行い、加齢や閉経による骨密度の変化に対しどのような影響を及ぼすかについてさらに検討する必要がある。

#### E. 結論

本年度検討した 21 遺伝子 22 多型のうち、*ICAMI* 多型、*CNR2* 多型、*GJA4* 多型、*ALAP* 多型、*LIPC* 多型、*PLOD1* 多型の 6 多型が骨密度と有意な関連を示した。とりわけ、*ICAMI* と *CNR2* は女性の閉経後骨粗鬆症に関連し、*GJA4* は男性の骨粗鬆症に関連することが示唆された。今後は縦断的な解析により、加齢や閉経による骨密度の変化に対しこれらの多型がどのような影響を及ぼすかについて検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) [Yoshiji Yamada, Fujiko Ando, Hiroshi Shimokata](#). Association of polymorphisms in forkhead box C2 and perilipin genes with bone mineral density in community-dwelling Japanese individuals. *Int J Mol Med* 2006;18:119-127.

2) [Yoshiji Yamada, Fujiko Ando, Hiroshi Shimokata](#). Association of candidate gene

polymorphisms with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men.

なし

**Int J Mol Med** (in press).

H. 知的財産権の出願・登録状況

3) Yoshiji Yamada. Genomics of osteoporosis and related phenotypes. **Genomics and Clinical Medicine**, Dhavendra Kumar, editor, Oxford University Press, New York (in press).

1. 特許取得

なし

4) Yoshiji Yamada, Sahoko Ichihara, Masaharu Takemura. Human functional genomics and proteomics. **Genomics and Clinical Medicine**, Dhavendra Kumar, editor, Oxford University Press, New York (in press)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

2. 学会発表

分担研究報告書

骨密度関連遺伝子多型群の縦断的多変量解析

分担研究者 下方 浩史

国立長寿医療センター疫学研究部長

研究要旨 「老化に関する長期縦断疫学研究（NILS-LSA）」の第1次調査から第3次調査に参加した閉経女性を対象に、4年間の縦断的なデータを元に骨粗鬆症を予測するための遺伝子多型の最適な組み合わせを見出すための解析を行った。候補遺伝子多型 154 種類について、15 多型で骨粗鬆症との関連が認められた。このうち変異群での骨粗鬆症発症者数が少なかった 1 多型を除いた 14 多型について、前回測定値、年齢、肥満度を調整した縦断的解析を行った。その結果、6 種類の遺伝子多型の組み合わせが得られた。これにより特定の遺伝子多型を持つ人で年齢および BMI から骨粗鬆症になる確率を式を作成することができた。

A. 研究目的

閉経後の女性の骨粗鬆症とそれに伴う骨折は、疼痛やADLの障害により寝たきりになるなど生活を大きく阻害し、QOLを低下させる重要な要因である。

骨粗鬆症の発症には遺伝的な素因が大きく関与する。遺伝的にハイ・リスクのグループを見出して、積極的な介入による予防を行っていくことが発症率を下げるためには是非必要である。しかし大規模な集団の縦断的データに基づいた解析はほとんど行われていない。

本研究は大規模な地域住民の縦断的データから閉経女性の骨粗鬆症発症に関連する遺伝子多型を網羅的に解析し、骨粗

鬆症を予測する遺伝子多型の最適な組み合わせを見出すことである。これにより骨粗鬆症発症率を高い精度で推定することができ、ハイ・リスクのグループを選定することが可能となる。

B. 研究方法

1. 対象

研究の対象は、「国立長寿医療センター老化に関する長期縦断疫学研究（NILS-LSA）」の第1次調査参加者した閉経女性 826 名のうち骨粗鬆症の治療を受けておらず、遺伝子多型の解析が可能であった 756 名（平均年齢  $63.4 \pm 8.6$  歳）である。第1次調査、2年後の第2次調査、

4年後の第3次調査までの延べ1920回の骨密度の縦断的測定結果を用いて解析した。これらの参加者は愛知県大府市および知多郡東浦町の地域住民からの無作為抽出者である。

## 2. 骨密度

骨密度は二重X線吸収装置（DXA：Hologic 4500）にて測定し、右大腿骨頸部の骨密度（g/cm<sup>2</sup>）が20歳から44歳の平均値（YAM：Young Adult Means）の70%未満である場合を骨粗鬆症と判定した。

## 3. 遺伝子検査

調査参加者のEDTA採血血漿からDNAを分離し、凍結保存している。この保存DNAを用いて、蛍光法によるアレル特異DNAプライマー測定システム（東洋紡）を用いてタイピングを行った。

現在までにタイピングの終了している遺伝子多型のうち、解析に必要な多型の分布が得られた154の遺伝多型について解析を行った。

## 5. 解析方法

154の遺伝多型について一般化線形モ

デルによるGeneral Estimating Equation (GEE)にて縦断的データを個人ごとに前回測定値の影響を調整し、また年齢および肥満度(BMI)で調整して骨粗鬆症との関連が $p < 0.05$ の多型を網羅的に求めた。

さらに変数減少法にて骨粗鬆症を予測する $p < 0.01$ となる遺伝子多型の最適な組み合わせを求めた。

解析にはSASリリース8.2を用いた。（倫理面への配慮）

本研究は、国立長寿医療センターにおける倫理委員会での研究実施の承認を受けた上で実施し、調査の対象者全員からインフォームドコンセントを得ている。

## C. 研究結果

候補遺伝子多型154種類について、15多型で閉経女性の大腿骨頸部における骨粗鬆症との関連が認められた。（表1）。このうち変異群での骨粗鬆症発症者数が少なかった1多型を除いた14多型について、前回測定値、年齢、肥満度を調整した縦断的解析を行った。その結果、表2に示したような6種類の遺伝子多型の

表1. 閉経女性大腿骨頸部骨密度と有意な関連を示した遺伝子多型

遺伝子	略号	多型
Peroxisome proliferator-activated receptor $\gamma$ (Pro12Ala)	PAR	CC/CG vs GG
Estrogen Receptor $\alpha$ (PP/pp)	ESR1	TT vs TC/CC
Estrogen Receptor $\alpha$ (XX/xx)	ESR2	AA/AG vs GG
Interleukin-6(C-634G)	IL6	CC/CG vs GG
Paraoxonase-1 (Gln192Arg)	PONA1	GG vs GA/AA
Calcitonin receptor (C1377T)	CAL	CC/CT vs TT
Paraoxonase-2 (Ser311Cys)	PON2	CC vs CG/GG
Dopamine receptor D2 CG(Ser311Cys)	DRD2	CC/CG vs GG
TOM40 polymorphism SNP988 T5328C	TOM40	TT/TC vs CC
Calcium-sensing receptor (Arg990Gly)	CASR	GG vs GA/AA
Insulin-like growth factor 2 receptor(A5002G(Arg1619Gly))	IGF2R2	GG vs GA/AA
Androgen receptor (CAG repeat)	ADR	SS vs SL/LL
bone morphogenetic protein 2 (Ser37Ala)	BMP2	TT vs TG/GG
Rho-associated coiled-coll-containing protein kinase 2(Thr431Asn)	ROCK2	GG/GT vs TT
Connexin37(C1019T)	CX37	CC vs CT/TT

表 2. ロジスティック回帰変数選択法により求められた腰椎骨密度と有意に関連する遺伝子多型

遺伝子多型	オッズ比	95%信頼区間	p値	
Insulin-like growth factor 2 receptor (A5002G(Arg1619G))	GG vs GA/AA	2.19	1.36 3.53	0.001
Androgen receptor (CAG repeat: 23未満をS、23以上をL)	SS vs SL/LL	2.73	1.43 5.21	0.006
Connexin37 (C1019T)	CC vs TC/TT	0.45	0.27 0.77	0.007
Estrogen Receptor $\alpha$ (XX/xx)	AA/AG vs GG	4.95	1.99 12.34	0.006
Interleukin-6 (C-634G)	CC/CG vs GG	3.25	1.62 6.50	0.003
Calcitonin receptor (C1377T)	CC/CT vs TT	5.06	1.72 14.92	0.002

多型の対の左側を0、右側を1としてオッズ比を求めた。

組み合わせが得られた。これらの遺伝子多型により 64 種類の遺伝子多型の組み合わせが考えられるが、骨粗鬆症となる確率が最大となる組み合わせ、最小となる組み合わせについて、BMI が 22 である時の骨粗鬆症となる推定確率を年齢別計算し、図 1 に示した。

#### D. 考察

骨粗鬆症の発症には遺伝的な素因の影響が大きい。骨粗鬆症の候補遺伝子の多型を網羅的に検討し、閉経女性の大腿骨頸部骨密度を指標とした骨粗鬆症発症に関わる遺伝子多型 6 種類を 4 年間の縦断的な骨密度観察データから抽出した。こ

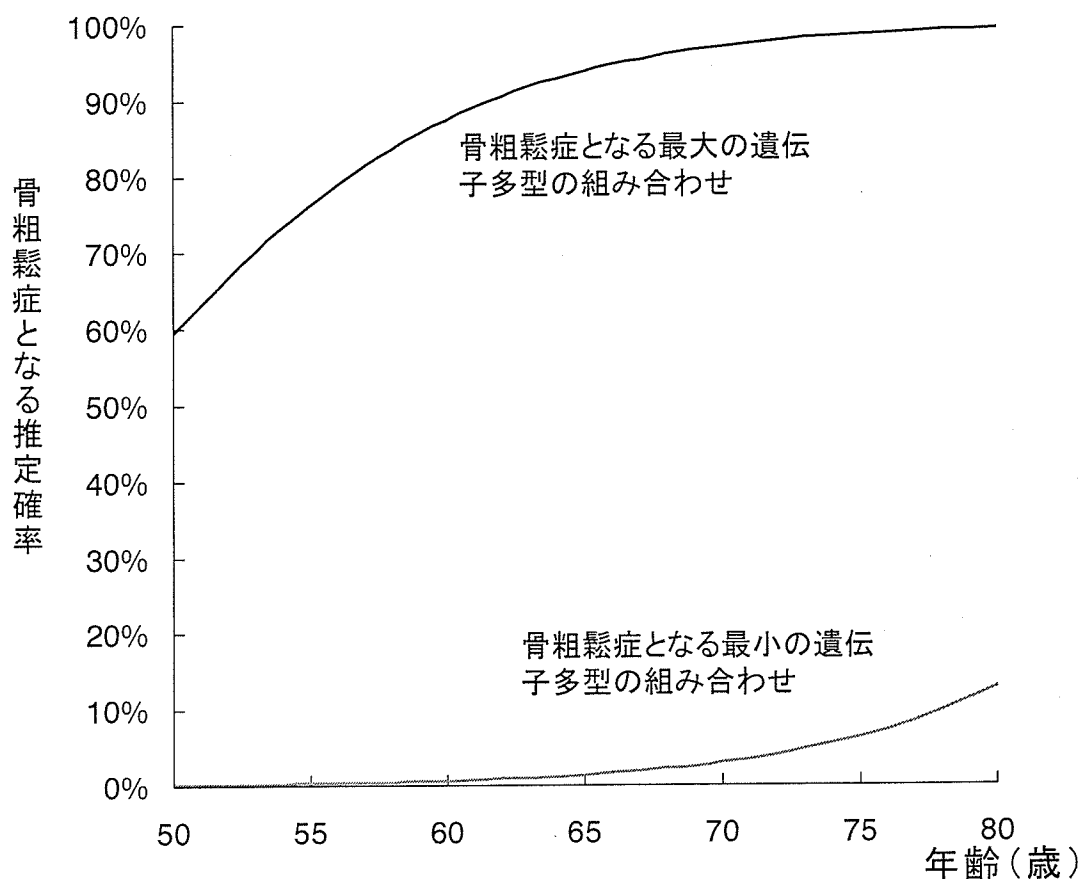


図 1. 閉経女性のた遺伝子多型の組み合わせと骨粗鬆症となる推定確率 (BMI が 22 である場合として計算を行った)

の結果、それぞれの遺伝子多型の組み合わせごとに各年齢で骨粗鬆症になる確率を回帰式を作成できた。

この骨粗鬆症となる最大の遺伝子多型の組み合わせと、最小の組み合わせでは、オッズ比は 1072 (95%信頼区間 148.1~7758.9) となった。すなわちオッズは遺伝子多型の組み合わせで 1000 倍も異なっていた。図 1 から分かるように最大の組み合わせでは 65 歳を超えるとほとんどの女性が骨粗鬆症となるが、最小の組み合わせでは 80 歳近くになっても骨粗鬆症となる確率が 10%程度ときわめて低い。

骨粗鬆症となりやすい遺伝子多型をもつ者では、若い頃から無理な減量を避ける、運動習慣を身につける、カルシウム摂取に心がけるなどの生活習慣を守っていくことがきわめて重要になる。

今後は、さらに他の部位での検討、男性での縦断的データに基づいた検討を行っていく必要があるだろう。

## E. 結論

4 年間の縦断的データを用いて骨粗鬆症の候補遺伝子の多型を網羅的に検討し、閉経女性の大腿骨頸部骨密度を指標とした骨粗鬆症発症に関わる遺伝子多型 6 種類を抽出し、特定の遺伝子多型を持つ人で年齢および BMI から骨粗鬆症になる確率を式を作成することができた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 下方浩史、安藤富士子、今井具子、中村美詠子：栄養摂取と骨密度減少との関

連への遺伝子の影響に関する研究. 日本未病システム学会雑誌 12(1):180-184, 2006.

2) 安藤富士子、小坂井留美、道用亘、下方浩史：閉経女性の体力と骨密度の関連に MMP-12(A-82G)が及ぼす影響. 日本未病システム学会雑誌 12(1):188-191, 2006.

3) Itho Z, Harada A, Matsui Y, Takemura M, Wakao N, Suzuki T, Nihashi S, Kawatsu S, Shimokata H, Ishiguro N. Can you diagnose for vertebral fracture correctly in plain X-ray? Osteoporos Int 2006 (in press).

4) Yamada Y, Ando F, Shimokata H: Association of polymorphisms in forkhead box C2 and perilipin genes with bone mineral density in community-dwelling Japanese individuals Int J Mol Med 18(1), 119-127, 2006.

5) 竹村真里枝、松井康素、原田敦、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高者年の骨代謝マーカーによる骨量減少/骨粗鬆症予測. Osteoporosis Japan 15(1); 28-32, 2007.

6) Yamada Y, Ando F, Shimokata H: Association of candidate gene polymorphisms with bone mineral density in community-dwelling Japanese women and men. Int J Mol Med (in press).

## 2. 学会発表

1) 中村美詠子、安藤富士子、下方浩史(疫学研究部)栄養と骨密度との関連に及ぼす Interleukin-6 遺伝子多型の影響. 第 48 回日本老年医学会総会. 金沢. 2006 年 6 月 8 日.

2) 松井康素、竹村真理枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高年者の骨密度に関する縦断的研究-(2)-骨塩量、計測面積変化の分けての解析. 第 24 回日本骨代謝学会学術集会、東京、2006 年 7 月 8 日.

3) 竹村真理枝、松井康素、原田敦、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高年者の骨密度に関する縦断的研究-(1)-. 第 24 回日本骨代謝学会学術集会、東京、2006 年 7 月 6 日.

4) 竹村真理枝、松井康素、原田敦、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高年者の骨密度に関する縦断研究(6年間). 第 17 回日本老年医学会東海地方会、愛知、2006 年 9 月 9 日.

5) 竹村真里枝、松井康素、原田敦、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高者年の骨代謝マーカーによる骨量減少/骨粗鬆症予測. 第 8 回日本骨粗鬆症学会、東京、2006 年 10 月 13 日

6) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史：血清脂質と骨密度との関係の検討. 第 8 回日本骨粗鬆症学会、東京、2006 年 10 月 13 日

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



分担研究報告書

運動関連要因と骨密度との関連に遺伝子多型の及ぼす影響

分担研究者 新野 直明 桜美林大学大学院国際学研究科老年学 教授

研究協力者 小坂井 留美 国立長寿医療センター疫学研究部 予防疫学研究室長

研究要旨 国立長寿医療センター(研究所)・老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)の第1次調査に参加した閉経女性約800名を対象として、運動機能や日常の身体活動量などの運動関連要因と骨密度との関連に遺伝子多型の及ぼす影響について縦断的に検討した。候補遺伝子多型は、同コホートで調査されている遺伝子多型のうち骨密度と有意な関連が認められた遺伝子150種類である。網羅的な縦断解析において、骨密度との関係が有意であった運動関連要因は、歩数計による総消費量、普通歩行頻度、脚伸展パワー、速歩行歩幅、握力( $p < 0.05$ )であった。総消費量を除く運動機能4項目と骨密度との関連における遺伝子多型(野生型 vs. 変異型)の影響を検討したところ、交互作用が有意であった遺伝子は握力8、脚伸展パワー11、普通歩行頻度20、速歩行歩幅7種であった。このうち2つの運動関連要因で交互作用が有意となった遺伝子は、Matrix metalloproteinase-12, Mitochondrial DNA 12811, Steroid 5-alpha-reductase であった。運動関連要因と遺伝子多型の骨粗鬆症罹患リスクに及ぼす影響について検討したところ、交互作用が有意であった遺伝子は握力7、脚伸展パワー12、普通歩行頻度14、速歩行歩幅16種であった。2つの運動関連要因で交互作用が有意となった遺伝子は、Vitamin D receptor (A-3731G), Dopamine receptor D2 (A1/A2 Taq I A), Type I Collagen alpha1 であった。

本研究では、閉経女性において、運動機能と大腿骨頸部骨密度及び骨粗鬆症罹患との関係に影響を及ぼす遺伝子多型の存在が示された。

A. 研究目的

骨粗鬆症は、骨密度の低下を伴い年齢や性あるいは遺伝的因子など制御できない要因の影響が大きいとされる一方、運動、栄養、嗜好などの生活習慣や日照時間などの環境因子など制御可能な要因も影響するといわれる。

運動要因については、運動不足など身体活動量の減少やそれに伴う機能低下が骨密度低下の危険因子とされており、骨粗鬆症の予防には運動の実施が推奨されている。しかし、運動習慣が骨密度に及ぼす影響は遺伝子形質によって異なる可能性があるが、これらの関

連はまだほとんど検討されていない。さらに、遺伝要因と骨密度の低下や骨粗鬆症罹患のリスクとの関連を明らかにするためには、縦断データを用いた検討が重要である。

本研究の目的は、運動機能や日常の身体活動量などの運動関連要因が骨密度に及ぼす影響について遺伝形質を考慮して縦断的に検討することである。

本研究では、主任研究者のコホートで調査されている遺伝子多型のうち骨密度との有意な関連が認められた150種類を候補遺伝子として、その影響を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 対象

対象は、「国立長寿医療センター(研究所)・老化に関する長期縦断疫学調査(NILS-LSA)」の第1次調査に参加した閉経後女性のうち、骨粗鬆症の治療を受けておらず、本研究の対象遺伝子が同定された813名(平均年齢  $63.9 \pm 8.6$  歳)とした。

### 2. 骨密度

骨密度は、二重X線吸収装置(Dual energy X-ray Absorptiometry: DXA, Hologic 社, QDR4500)を用いて測定した。分析は、右大腿骨頸部について行った( $\text{g}/\text{cm}^2$ )。骨粗鬆症の判定は、右大腿骨頸部の骨密度が20歳から44歳までの平均値(YAM: Young Adult Mean)の70%未満である場合とした。

### 3. 運動関連要因

運動関連要因は、運動機能として握力、閉眼片足立、全身反応時間、脚伸展パワー、上体起こし、膝伸展筋力、普通歩行(歩幅、頻度、速度)、速歩行(歩幅、頻度、速度)、日常

身体活動量として余暇身体活動量、総身体活動量、歩数計による総消費量、歩数を用いた。これらの項目の詳細については<http://www.nils.go.jp/index-e.html>に掲載のNILS-LSA Monograph the First Waveを参考にされたい。

### 4. 遺伝子検査

遺伝子多型については、ASP-PCR法やフラグメント法を用いてタイピングを行った。候補遺伝子多型は同コホートで調査されている遺伝子多型うち骨密度との有意な関連が認められた遺伝子多型150種類を取り上げた。本稿では、遺伝子を略語で記す。各遺伝子の名称は、主任研究者の資料を参照されたい。

### 5. 解析方法

解析では、ベースラインの値と約2年後と4年後に実施した第二回と第三回調査の値を用いて次の3つの検討を行った。

- 1) 骨密度に対する運動関連要因の主効果の縦断解析
- 2) 運動関連要因と骨密度との関係に遺伝子多型の交互作用が及ぼす影響についての縦断解析
- 3) 運動関連要因と遺伝子多型の交互作用が骨粗鬆症罹患に及ぼす影響についての縦断解析

全ての解析はSASリリース8.2を使用し、1)では、年齢とBMIを調整したMIXED EFFECT MODEL および年齢を調整したPearsonの相関係数、2)では年齢とBMIを調整したMIXED EFFECT MODEL、3)では年齢とBMIを調整した一般線形モデルによるGeneralized Estimating Equation (GEE)を用いて解析した。統計的有意水準は、全て5%未満とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立長寿医療センターにおける倫理委員会での研究実施の承認を受けた上で実施し(承認番号 175)、対象者全員からインフォームドコンセントを得ている。

## C. 研究結果

### 1. 骨密度に対する運動関連要因の主効果の縦断解析

MIXED EFFECT MODEL を用いた縦断解析の結果、運動関連要因と骨密度との関係が有意であったのは、歩数計による総消費量(F値:14.03)、普通歩行頻度(10.93)、脚伸展パワー(5.26)、速歩行歩幅(4.94)、握力(4.60)であった( $p<0.05$ )。また、有意な傾向を示した項目は普通歩行速度(3.24)、歩数の8000歩未満以上(2.99)であった( $p<0.10$ )。いずれの項目においても、値の高い人で骨密度は高かった。図1にBMI22、年齢70歳時の推定骨密度と普通歩行頻度との関連を示した。大腿骨頸部骨密度は、普通歩行頻度の多い人ほど高いことが示された。

運動関連要因間の相互関係について年齢を調整した偏相関係数により確認したところ、普通歩行頻度を除く全ての項目で有意な正の相関が認められた(表1)。各運動機能は、相互に関係することが示された。

### 2. 運動関連要因と骨密度との関係に遺伝子多型の交互作用が及ぼす影響についての縦断解析

分析1で有意となった運動機能の4項目(普通歩行頻度、脚伸展パワー、速歩行歩幅、握力)と大腿骨頸部骨密度との関連における遺伝子多型(野生型 vs. ヘテロ+ホモ変異

型)の交互作用の影響を検討した。尚、歩数計による総消費量は、年齢や性別、体格を考慮した推定値であることから、これ以降の分析からは除外した。

交互作用が有意であった遺伝子は、握力においてDLST2, PRC, ESR1, ESR2, TOM40, SRD5A, VLDLR, ALAPの8種、脚伸展パワーにおいて, B3ADR, CP10, DAT, MMP12, OPG2, MT12811, CD14, SRD5A, MTP1, RAGE1, RSの11種、普通歩行頻度において, APOE4, PONA2, CAL, CCR, FGB, IL1B, IGF2R, SOD2, CASR, LEPR, MT12811, BDKRB2, KLOT, LPL, PPARG3, RIL, CYP19, ALPL, BMP2, CX37の20種、速歩行歩幅において PONA1, IL10, MMP12, MT12811, VEGF4, ADR, GH1の7種であった。このうち2つの運動関連要因で交互作用が有意となった遺伝子は、MMP12, MT12811, SRD5Aであった( $p<0.05$ , 先述に下線を付した)。但し、変異型を持つ人の数を確認したところ、MMP12は30名、MT12811は33名と比較的少なく、SRD5Aのみ526名と多かった。図2に、脚伸展パワーと大腿骨頸部骨密度との関連にSRD5A遺伝子多型の交互作用の影響について示した。BMI22、年齢70歳時の骨密度の推定値を算出したところ、野生型の人では、脚伸展パワーの多寡により骨密度に差は認められないが、ヘテロ/ホモ変異型の人では、脚伸展パワーの高い人で骨密度は高値を示した。また、脚伸展パワーが600Wの場合の推定骨密度において、変異型を持つ人( $620\text{mg}/\text{cm}^2$ )は野生型を持つ人( $599\text{mg}/\text{cm}^2$ )よりも有意に骨密度は高かった( $p<0.05$ )。

### 3. 運動関連要因と骨粗鬆症罹患リスクとの関連に遺伝子多型の交互作用が及ぼす影響に

## ついでに縦断解析

運動関連要因と骨粗鬆症罹患リスクとの関連に遺伝子多型の交互作用が及ぼす影響について検討した。交互作用が有意であった遺伝子は握力において DLST2, B3ADR, PAFAH, IL6, VEGF1, MT15524, VDR2 の7種, 脚伸展パワーにおいて, ACE, APOE1, VDR2, MT6253, SRD5A, ANP2, DRD2a, Ghrelin, GNRH1, COL1A2, RS, ROCK2 の12種, 普通歩行頻度において, IL1A, B2ADR, TF1, TOM40, APM1, COL, CASR, VEGF4, CD14, RAGE2, FOXC2, CHRM2, RGS2, ALAP の14種, 速歩歩幅において APOE1, TGF2, PONA2, FGB, OPG1, FABP2, DRD2a, LPL, SCNN1G, GP1BA, G1A3, ALPL, COL1A2, ADRB1, HL, CYP11B2 の16種であった。2つの運動関連要因で交互作用が有意となった遺伝子は VDR2, DRD2a, COL1A2 であった ( $p < 0.05$ , 先述に下線を付した.)。図3に脚伸展パワーにおける骨粗鬆症罹患リスクへの DRD2a 遺伝子多型の交互作用の影響について示した。BMI22, 年齢70歳での骨粗鬆症罹患リスクを算出したところ, 野生型を持つ人では脚伸展パワーが100Wの場合の骨粗鬆症になるリスクは約15%程度であり, これは脚伸展パワーが600Wと高くなった場合でもほぼ同じであった。一方, 変異型を持つ人は脚伸展パワーが100Wと低い場合は約25%程度であるのに対し, 600Wの場合は約5%程度であった。脚伸展パワーと骨粗鬆症罹患リスクとの関連において, 野生型では脚伸展パワーの多寡により骨粗鬆症罹患リスクの差は認められなかったが, 変異型では脚伸展パワーの高い人で骨粗鬆症罹患リスクは低くなることが示された。

## D. 考察

運動関連要因と骨密度との網羅的検討において, 脚伸展パワーおよび歩行能力に関連する機能と大腿骨頸部骨密度との関連の強かったことは, 運動機能の高いことが同部位の骨密度の保持に関連することを示すと考えられた。しかし, 下肢の運動機能の一つである膝伸展筋力では骨密度と有意な関連を認めなかったこと, 歩行能力においても要素によって有意性の異なったことについては, 機能特性と骨密度との関連について更に検討が必要であると考えられた。

遺伝子多型の交互作用の検討において, 普通歩行頻度, 速歩歩幅, 脚伸展パワーは比較的多くの遺伝子で交互作用が有意となり, 下肢の運動機能と骨密度との関係の強さに関連している遺伝子が多いと考えられた。骨密度との関連では, MMP12 (Matrix metalloproteinase-12), MT12811 (Mitochondrial DNA 12811), SRD5A (Steroid 5-alpha-reductase), 骨粗鬆症罹患リスクとの関連では, VDR2 (Vitamin D receptor: A-3731G), DRD2a (Dopamine receptor D2: A1/A2 Taq I A), COL1A2 (Type I Collagen alpha1)が複数の運動機能について遺伝子多型の交互作用が有意であり, これらの遺伝子において, 運動機能と骨密度あるいは骨粗鬆症罹患リスクとの関係が遺伝子多型により異なる可能性の高いことが考えられた。しかし, 二つの分析を通じて同様の傾向の認められた遺伝子はなく, 運動機能との関連で骨密度の多寡に影響する遺伝子多型と骨粗鬆症罹患リスクに影響する遺伝子多型は一致しない可能性が考えられた。

骨粗鬆症と遺伝的要因との関連において, 単独で骨粗鬆症の罹患を決定するような遺伝