

因)、「栄養関連要因」、「体型関連要因」と骨密度・骨粗鬆症との関連については他の分担研究者が分析を行っているので、本分担研究では、運動、栄養、体型および年齢以外の生活習慣および背景要因、血液データについて、閉経女性の大腿骨頸部骨密度および骨粗鬆症との関連を網羅的に検索した。さらに関連が有意であった項目の中で「閉経年齢」について候補関連遺伝子多型との交互作用が閉経女性の大腿骨頸部骨密度で判定した骨粗鬆症に及ぼす影響について検討した。

## 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研究(NILS-LSA)」の第1次(1997年11月~2000年4月)、第2次(2000年4月~2002年5月)、第3次(2002年5月~2004年6月)調査の少なくともいずれかに参加した地域在住中高年女性の中で初回調査時にすでに閉経を迎えていた、のべ1981人(63.5±8.7歳)である。NILS-LSAの対象者は愛知県大府市および知多郡東浦町の40歳から79歳までの住民から性・年齢層化無作為抽出で選ばれている。

遺伝子多型との交互作用の検討にはこの中から、第1次調査に参加し、遺伝子多型データのあるのべ1923人のデータを用いた。

### 2. 骨密度および骨粗鬆症の判定

骨密度は二重X線吸収装置(DXA, Hologic社, QDR4500)を用いて測定し、右大腿骨頸部骨密度が20歳から44歳の平均値(YAM: Young Adult Mean)の70%(534.455mg/cm<sup>2</sup>)未満である場合を骨粗鬆

症と定義した。

### 3. 遺伝子多型

第1次調査時にEDTA採血血漿から分離凍結保存されたDNAを用い、蛍光法によるアレルト異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。本研究の解析時までにはNILS-LSAでタイピングが終了した老化・老年病関連候補遺伝子多型170種の中で解析に必要な多型の分布が得られた153種の遺伝多型について解析をおこなった。

### 4. 解析方法

(1) 閉経女性の大腿骨頸部骨粗鬆症に関わる生活習慣・背景要因・血液データの抽出:内外の文献、特に日本での総説を元に日本人の骨粗鬆症に関わることが報告されている閉経要因を抽出した(表1)。この中でNILS-LSAで調査がなされている項目(表2)ならびにNILS-LSAでの血液生化学検査項目および血圧(表3)について大腿骨頸部骨密度および大腿骨頸部骨粗鬆症との関連を年齢、BMIを調整したMixed Effect ModelおよびGeneralized Estimating Equationを用いて縦断的に検討した。

(2) 閉経年齢と大腿骨頸部骨粗鬆症との関連に遺伝子多型が及ぼす影響の縦断的検討:閉経女性の大腿骨粗鬆症有病に関連する背景要因として抽出された「閉経年齢」と骨粗鬆症有病との関係に影響を及ぼす遺伝子多型を年齢、BMIを調整したGeneralized Estimating Equationを用いて縦断的データで検討した。

この分析で遺伝子多型と閉経年齢の交互作用が有意であったすべての遺伝子多型について、その閉経年齢との交互作用と閉経年齢の主効果を説明変数、年齢およびBMI

を調整変数とし、閉経女性の大腿骨骨粗鬆症の有無を目的変数とした Generalized Estimating Equation で変数漸減法を行い、閉経年齢との交互作用が骨粗鬆症有病リスクに関連する遺伝子多型を抽出した。

解析には SAS 8.2 を用い、 $p < 0.05$  を統計的有意とした。

(倫理面への配慮)

本研究は、「疫学研究における倫理指針」ならびに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、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、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. 閉経女性の大腿骨頸部骨粗鬆症に関わる生活習慣・背景要因・血液データの抽出(表 2、表 3):

月経に関する項目では、閉経年齢、有月経期間(閉経年齢-初潮年齢)、閉経からの期間が骨密度と有意な関連を示した。もともと F 値が大きかったのは有月経期間であったが、算出に二つの変数が必要であることを考慮して、閉経年齢を代表値とすることとした。閉経年齢 1s.d.(8.9 歳)上昇毎の骨粗鬆症有病リスク Odds 比は 0.7660(95%信頼区間 0.6001-0.9776)であった。

ダイエット経験の有無も骨密度と有意な関連を示したが、ダイエット経験のある者で骨密度が高かったことから、肥満が交絡要因となっていると考えられ、以後の解析から除外した。

既往歴・手術歴では骨粗鬆症の既往が骨密度と関連していた。骨粗鬆症既往のある者は治療のバイアスがかかることから、以後

の解析や班全体での解析からは除外することとした。

喫煙、アルコール、コーヒーなどの嗜好については骨密度と有意な関連は認められなかった。

学歴については高学歴ほど骨密度が高い、という結果が得られたが、学歴・骨密度ともに年齢と深く関係することから、以後の解析からは除外した。

薬剤の使用歴との関係は従来骨密度との関連が報告されている薬剤について検討したが、有意な関連は認められなかった。

血液生化学検査項目では骨代謝に関連するアルカリフォスファターゼ、 $\gamma$  GTP が正の相関を示したほか、過酸化脂質が正の関連を、血清ナトリウムが負の関連を示した。

血圧は拡張期血圧のみが正の関連を示した。

2. 閉経年齢と大腿骨頸部骨粗鬆症との関連に遺伝子多型が及ぼす影響の縦断的検討:

154 種の遺伝子多型の中で閉経年齢と大腿骨頸部骨粗鬆症との関係に影響を及ぼしていたのは Insulin-like growth factor 2 receptor (A5002G (Arg1619 Gly))、Tumor necrosis factor  $\alpha$  (C-863A)、Calcitonin receptor (C1377T)、Uncoupling protein 1 (A-3826G)、Alpha Adducin (G460W)、Matrix metalloproteinase-12(A-82G)、Atrial natriuretic peptide(NPPA) (C-664G)、Serotonin transporter (repeat)、perilipin (C1243T)、Dopamine receptor D2(DRD2) (A1/A2 Taq I A)、NADH/NADPH p22phox (242C/T(His /Try))、Paraoxonase-1 (Met 55Leu)、Endothelin-1(Lys198Asn)、 $\beta$  1-adreno-receptor (Ser49Gly)、Receptor

of advanced glycation end products (AGER) (2184A/G)、Interleukin-10 (A-592C)、Superoxide dismutase 2 Val-9Ala の 17 種であった。

これらの遺伝子多型と閉経年齢の交互作用項、閉経年齢の主効果を説明変数、年齢および BMI を調整変数とし、閉経女性の大腿骨骨粗鬆症の有無を目的変数とした Generalized Estimating Equation での変数漸減法を行ったところ、Insulin-like growth factor 2 receptor の遺伝子多型のみが閉経年齢との有意な交互作用を示す遺伝子多型として抽出された (estimate=0.013, p=0.006)。

#### D. 考察

女性では閉経後、骨粗鬆症発症リスクが飛躍的に上昇することはよく知られている。これはエストロジェンの骨吸収抑制作用がエストロジェン血中濃度の低下に伴い低下するためと考えられている。本研究でも閉経年齢が約 9 歳遅いと骨粗鬆症の有病リスクが約 25%低下することが示された。

骨粗鬆症と閉経年齢との関係に影響を及ぼす遺伝子多型として抽出された Insulin-like growth factor 2 receptor は骨芽細胞から分泌される Insulin-like growth factor 2(IGF-II)の受容体遺伝子である。IGF-II は骨芽細胞から分泌され、骨基質中に存在し、骨芽細胞の分化や機能を調整するオートクリン、パラクリン的作用を示すと考えられている。エストロジェン受容体は生体内に幅広く分布し、骨芽細胞にも存在する。

本研究で早期閉経と IGF-II との骨粗鬆症に対する相互作用が示されたことから、エストロジェンの作用機序に IGF-II が関わってい

る可能性が示唆された。

#### E. 結論

地域在住の閉経女性のべ 1981 人の縦断データを元に、運動・栄養・体格・年齢以外の大腿骨骨粗鬆症リスクファクターを抽出し、その中で閉経年齢について骨粗鬆症との関連に影響を与える遺伝子多型を抽出した。閉経年齢が約 9 歳上昇する毎に骨粗鬆症のリスクは約 3/4 に低下した。また、IGF-II 受容体遺伝子多型が早期閉経との交互作用を示した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamada Y, Ando F, Shimokata H: Association of a microsomal triglyceride transfer protein gene polymorphism with blood pressure in Japanese women. *Int J Mol Med* 17(1):83-88, 2006.

Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H: Effect of smoking habit on age-related changes in serum lipids: cross-sectional and longitudinal analysis in a Japanese large cohort. *Atherosclerosis* 185(1); 183-199, 2006.

Suzuki Y, Ando F, Ohsawa I, Shimokata H, Ohta S: Association of alcohol dehydrogenase 2\*1 allele with liver damage and insulin concentration in the Japanese. *J Hum Genet* 51(1); 31-37, 2006.

今井具子, 安藤富士子, 新野直明, 下方浩史: 四訂および五訂日本食品標準成分表を

用いて算出した栄養素等摂取量推定値の比較. 日本栄養・食糧学会誌. 59(1): 21-29, 2006.

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.

Shimokata H, Ando F, Fukukawa Y, Nishita Y: Klotho gene promoter polymorphism and cognitive impairment. Geriatr Gerontol Int 6(2):136-141, 2006.

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.

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.

Ishida S, Funakoshi A, Miyasaka K, Shimokata H, Ando F, Taguchi S: Association of SH-2 containing Inositol 5'-phosphatase 2 gene polymorphisms and hyperglycemia. Pancreas. 33:63-67, 2006.

Imai T, Nakamura M, Ando F, Shimokata H: Dietary supplement use by community-living population in Japan: Data from the National Institute for Longevity Sciences

Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA) J. Epidemiol, 16,249-260, 2006

Kozakai R, Doyo W, Ando F, Shimokata H: Age-related changes of postural stability and physical function in middle-aged and elderly Japanese Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine, 55(Suppl), S227-230, 2006.

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.

安藤富士子: 高齢者の看護・介護. 老年学テキスト. 飯島節、鳥羽研二編集. p 225-234, 南江堂. 東京、2006.

安藤富士子、中村美詠子: 骨と栄養. アクティブシニア社会の食品開発指針(津志田藤二郎、高城孝助、小久保貞之、横山理雄編集)、Science Forum. (東京) p128-137, 2006.

安藤富士子、北村伊都子、甲田道子、大藏倫博、下方浩史: 一般地域住民における腹部肥満感受性因子の網羅的検討. 日本未病システム学会誌. (in press)

下方浩史、安藤富士子、北村伊都子、甲田道子、大藏倫博: 加齢とメタボリックシンドローム—年齢別にみたメタボリックシンドロームのウエスト基準値の妥当性—. 日本未病システム学会誌. (in press)

Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H: Preproghrelin Leu72Met variant contributes to overweight in middle-aged men of a Japanese large cohort. Intern J Obes (in press).

Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H: Age-specific change of prevalence of metabolic syndrome: Longitudinal observation of large Japanese cohort. Atherosclerosis (in press).

Yamada Y, Ando F, Shimokata H: Association of gene polymorphisms with blood pressure and the prevalence of hypertension in community-dwelling Japanese individuals. Int J Mol Med (in press).

Itsuko Kitamura, Fujiko Ando, Michiko Koda, Tomohiro Okura, and Hiroshi Shimokata :Effects of the interaction between lean tissue mass and estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphism on bone mineral density in middle-aged and elderly Japanese. Bone (in press).

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

安藤富士子:「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)」～老化・老年病の発症・進行・

予防方策を明らかにするために～. 果樹試験研究推進協議会会誌. (in press)

## 2. 学会発表

今井具子, 中村美詠子, 安藤富士子, 下方浩史: 栄養調査における栄養補助食品について—栄養素を含む処方薬の実態—. 第16回日本疫学会大会. 名古屋. 2006年1月24日.

道用 亘, 小坂井留美, 安藤富士子, 下方浩史: 中高年者における歩行中の床反力特性 --加齢変化とその性差--. 第16回日本疫学会大会. 名古屋. 2006年1月23日.

小坂井留美, 北村伊都子, 甲田道子, 道用亘, 安藤富士子, 下方浩史: 中高年者における筋量と脂肪量による体格分類とその筋力特性 —Sarcopenia の評価に向けた基礎的検討—. 第16回日本疫学会大会. 名古屋. 2006年1月23日.

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. 第12回日本未病システム学会. 大阪. 2006年1月28日.

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. 第12回日本未病システム学会. 大阪. 2006年1月28日.

Kozakai R, Kitamura I, Koda M, Doyo W, Ando F, Shimokata H: The relationship between body composition and physical activity in Japanese middle-aged and

elderly. Sixth International Conference on Dietary Assessment Methods. Copenhagen, April 27-29, 2006.

Imai T, Nakamura M, Ando F, Shimokata H: Nutrient assessment of dietary supplement and medicine (prescription and non-prescription), The sixth international conference on dietary assessment methods. Copenhagen, Denmark, April 29, 2006.

Ando F, Kitamura I, Kozakai R, Imai T, Shimokata H: Impact of Obesity-related Factors on Urinary Incontinence in the Middle-aged and Elderly Women. The 6th International Conference on Dietary Assessment Methods. Copenhagen, Denmark, April 29, 2006.

小坂井留美, 北村伊都子, 甲田道子, 道用亘, 安藤富士子, 下方浩史: 中高年者における筋量と脂肪量による体格分類と身体活動量との関連. 第 48 回日本老年医学会総会. 金沢. 2006 年 6 月 8 日.

北村伊都子, 小坂井留美, 甲田道子, 安藤富士子, 下方浩史: 中高年者の身体組成とサルコペニアの分布についての横断的検討. 第 48 回日本老年医学会総会. 金沢. 2006 年 6 月 7 日.

中村美詠子, 安藤富士子, 下方浩史: 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.

道用亘, 小坂井留美, 安藤富士子, 下方浩史: 中高年者における歩行中の両脚支持時間と床反力ピーク値との関連. 第 48 回日本老年医学会総会. 金沢. 2006 年 6 月 9 日.

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.

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. ポスター賞受賞

葛谷雅文, 安藤富士子, 井口昭久, 下方浩史: メタボリックシンドローム発症率の加齢変化ならびに過去 16 年間の発症率の動向: -10 万人の 16 年間の縦断的解析結果から-. シンポジウム 3. メタボリックシンドローム: 診療基準から 1 年を経過して. 第 38 回日本動脈硬化学会総会、東京、2006 年 7 月 13 日.

Kitamura I, Koda M, Ando F, Shimokata H: Associations of serum testosterone with obesity and insulin resistance in the middle-aged and elderly Japanese men. The 10th International Congress on Obesity. Sydney, Australia, September 7, 2006.

Koda M, Kitamura I, Imai M, Ando F, Shimokata H, Miyasaka K, Funakoshi A: The polymorphisms in cholecystokinin 1

receptor was associated with midlife weight gain in women. The 10th International Congress on Obesity. Sydney, Australia, September 7, 2006.

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.

西田裕紀子, 新野直明, 福川康之, 安藤富士子, 下方浩史: 地域在住高齢者の転倒恐怖感と Quality of life に関する疫学研究. 転倒予防医学研究会第3回研究集会, 東京, 2006年10月1日.

竹村真里枝, 松井康素, 原田敦, 安藤富士子, 下方浩史. 地域在住中高年者の骨密度に関する縦断研究一(1). 第24回骨代謝学会, 東京, 7月6日, 2006 (優秀ポスター賞).

竹村真里枝, 松井康素, 原田敦, 安藤富士子, 下方浩史. 地域在住中高年者の骨代謝マーカーによる骨量減少/骨粗鬆症予測. 第8回骨粗鬆症学会, 東京, 10月13日, 2006 (学術奨励賞).

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

福川康之, 新野直明, 西田裕紀子, 丹下智香子, 安藤富士子, 下方浩史: 運動介入プ

ログラムの実践による地域高齢者の転倒予防と心身機能の維持に関する研究. 日本心理学会第70回大会, 福岡, 2006年11月3日.

安藤富士子, 北村伊都子, 甲田道子, 大藏倫博, 下方浩史: 一般地域住民における腹部肥満感受性因子の網羅的検討. 第13回日本未病システム学会学術集会. 東京, 2006年12月3日

下方浩史, 安藤富士子, 北村伊都子, 甲田道子, 大藏倫博: 加齢とメタボリックシンドローム一年齢別にみたメタボリックシンドロームのウエスト基準値の妥当性一. 第13回日本未病システム学会学術集会. 東京, 2006年12月3日

小坂井留美, 北村伊都子, 道用亘, 金興烈, 甲田道子, 安藤富士子, 下方浩史(疫学研究部) 中高年者における加齢に伴う筋力低下と筋量および脂肪量との関連一 Sarcopenia 指標の作成に向けた基礎的検討 II一. 第17回日本疫学会. 2007年1月26日.

道用 亘, 金興烈, 小坂井留美, 安藤富士子, 下方浩史(疫学研究部) 地域在住中高年者における歩行中の両脚支持時間と歩幅との関連. 第17回日本疫学会. 広島, 2007年1月27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

(研究協力者)

下方浩史 (国立長寿医療センター疫学研  
究部)



表 1. 閉経女性の骨密度関連要因として考慮すべき項目 (過去の報告から)

- 
- ① 属性：性、年齢
  - ② 月経関連：初潮年齢、閉経年齢、卵巣手術の有無（早期閉経）
  - ③ 遺伝的要因：骨粗鬆症の家族歴（母）、遺伝子多型
  - ④ 体格：痩せ、体重減少、高身長、身長低下、低 BMI、BMI 低下
  - ⑤ 食生活：カルシウム不足（牛乳、小魚）
  - ⑥ 嗜好：コーヒー（3 杯/day 以上）  
喫煙  
アルコール（予防因子）
  - ⑦ 運動：定期的運動（予防因子）、活発な運動（予防因子）
  - ⑧ 服薬：トランキライザー、ステロイド、ホルモン補充療法(予防因子)
  - ⑨ 既往歴：骨粗鬆症、胃切除、過去の骨折
  - ⑩ その他：高学歴、良好な健康自己評価
-

表 2. 閉経女性の大腿骨骨密度・骨粗鬆症との関連を検討した項目

(1) 生活習慣および背景要因

- 
- ① 初潮、閉経
    - 閉経年齢
    - 初潮年齢
    - 有月経期間
    - 閉経からの期間
  - ② 出産の有無（子供の有無で判定）
  - ③ ダイエット経験
  - ④ 手術・疾患既往
    - 胃切除の既往
    - 骨折
    - 骨粗鬆症
    - 腎臓病
    - 糖尿病
    - 関節リウマチ
  - ⑤ 喫煙
    - 喫煙の有無
    - 喫煙量 (pack year)
  - ⑥ 学歴
  - ⑦ 健康自己評価
  - ⑧ 薬剤の使用
    - トランキライザー
    - ステロイド
    - 女性ホルモン
    - 甲状腺・副甲状腺ホルモン
    - ビタミン A,D
    - 高脂血症治療薬
  - ⑩ 嗜好飲料
    - アルコール
    - コーヒー
- 

下線；年齢・BMI を調整した Mixed Effect Model、Generalized Estimating Equation のいずれかで骨密度あるいは骨粗鬆症との関連が有意であった項目

表 3. 閉経女性の大腿骨骨密度・骨粗鬆症との関連を検討した項目

(2) 血液生化学検査・血圧

---

総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、GOT、GPT、LDH、リン、アルカリフォスファターゼ、γGTP、コリンエステラーゼ、トリグリセライド、総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、過酸化脂質、血清ジホモγリノレン酸、血清アラキドン酸、血清エイコサペンタエン酸、血清ドコサヘキサエン酸、尿素窒素、尿酸、クレアチニン、ナトリウム、クロール、カリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄、銅、亜鉛、ビタミンA、遊離T3、遊離T4、TSH、DHEA-S、エストラジオール、総テストステロン、遊離テストステロン、性ホルモン結合グロブリン、インスリン、グルコース、ヘモグロビンA1c、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、血小板数、シアル酸、パラオキシネース、フィブリノーゲン、血小板促進因子活性、アポA1、アポA2、アポB、アポC2、アポC3、アポE、リポタンパク(a)、レプチン

安静時収縮期血圧、拡張期血圧

---

下線；年齢・BMIを調整したMixed Effect Model、Generalized Estimating Equationのいずれかで骨密度あるいは骨粗鬆症との関連が有意であった項目

### Ⅲ. 研究成果の刊行に 関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
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
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
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
Imai T, Nakamura M, Ando F, Shimokata H	Dietary supplement use by community-living population in Japan: Data from the National Institute for Longevity Sciences Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA)	J. Epidemiol	16	249-260	2006
Kozakai R, Doyo W, Ando F, Shimokata H	Age-related changes of postural stability and physical function in middle-aged and elderly Japanese.	Japanese Journal of Physical Fitness and Sports Medicine	55(S)	S227-230	2006
下方浩史	高齢者の生活習慣はどこまで是正すべきか	日本老年医学会雑誌	43(4)	462-464	2006
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	17(1)	1584-1591	2006
新野直明, 福川康之	転倒予防	総合リハ	34	1035-1039	2006
Okura T, Rankinen T, Gagnon J, Lussier-Cacan S, Davignon J, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Bouchard C.	Effect of regular exercise on homocysteine concentrations: the HERITAGE Family Study.	European Journal of Applied Physiology	298	394-401	2006
Shigematsu R, Okura T.	A novel exercise for improving lower-extremity functional fitness in the elderly.	Aging Clinical and Experimental Research	18	242-248	2006
Shigematsu R, Okura T, Kumagai S, Hiyama T, Amagai H, Tanaka K	Cutoff and Target value for Intra-abdominal fat area for the prevention of metabolic disorders in pre- and post-menopausal obese women before and after weight reduction	Circulation Journal	70	110-114	2006
田中喜代次, 林容市, 中田由夫, 大藏倫博	メタボリックシンドローム診断における運動療法の基本コンセプト	日本臨床	64	574-579	2006
魏丞完, 大藏倫博, 中田由夫, 大河原一憲, 沼尾成晴, 片山靖富, 田中喜代次	肥満度と介入方法の違いが内臓脂肪型肥満者の減量効果に及ぼす影響	肥満研究	12	47-53	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
鈴木恵美, 大藏倫博, 中田由夫, 大河原一 憲, 片山靖富, 沼尾成 晴, 田中喜代次	食行動意識が肥満男性の活力年齢および減 量効果に及ぼす影響	肥満研究	12	112-118	2006
片山靖富, 中田由夫, 大河原一憲, 沼尾成 晴, 松尾知明, 大藏倫 博, 田中喜代次	食事制限と運動の実践による血清脂質の変化 が血液流動性に及ぼす影響—減量前後の変 化に着目して	肥満研究	12	225-233	2006
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
下方浩史	老化および老年病の疫学的研究	Geriatric Medicine	45(1)	13-17	2007
安藤富士子, 北村伊都 子, 甲田道子, 大藏倫 博, 下方浩史	一般地域住民における腹部肥満感受性因子 の網羅的検討	日本未病シス テム学会誌	in press		
Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H	Preproghrelin Leu72Met variant contributes to overweight in middle-aged men of a Japanese large cohort.	Intern J Obes	in press		
Kuzuya M, Ando F, Iguchi A, Shimokata H	Age-specific change of prevalence of metabolic syndrome: Longitudinal observation of large Japanese cohort	Atherosclerosi s	in press		
Itsuko Kitamura, Fujiko Ando, Michiko Koda, Tomohiro Okura, and Hiroshi Shimokata	Effects of the interaction between lean tissue mass and estrogen receptor $\alpha$ gene polymorphism on bone mineral density in middle-aged and elderly Japanese	Bone	in press		
下方浩史	食生活と長寿	日本老年医学 会雑誌	in press		
Yoshiji Yamada, Fujiko Ando, Hiroshi Shimokata	Association of candidate gene polymorphisms with bone mineral density in community- dwelling Japanese women and men	Int J Mol Med	in press		

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
安藤富士子	高齢者の看護・介護	飯島節、鳥羽研二	老年学テキスト	南江堂	東京	2006	225-234
安藤富士子、 中村美詠子	骨と栄養	津志田藤二郎、高城孝助、小久保貞之、横山理雄	アクティブシニア社会の食品開発指針	Science Forum	東京	2006	128-137
小坂井留美、 下方浩史	スポーツと長寿	長寿科学健康財団	Advances in Aging and Health Research 2006 健康長寿と運動	長寿科学健康財団	愛知	2006	7-13
新野直明	老化と老年病	飯島節、鳥羽研二	老年学テキスト	南江堂	東京	2006	10-18
Yamada Y	Genomics of osteoporosis and related phenotypes	Dhavendra Kumar	Genomics and Clinical Medicine	Oxford University Press	New York	in press	
Yamada Y, Ichihara S, Takemura M	Human functional genomics and proteomics	Dhavendra Kumar	Genomics and Clinical Medicine	Oxford University Press	New York	in press	

## IV. 研究成果の 刊行物・別刷



# Association of polymorphisms in forkhead box C2 and perilipin genes with bone mineral density in community-dwelling Japanese individuals

YOSHIJI YAMADA<sup>1</sup>, FUJIKO ANDO<sup>2</sup> and HIROSHI SHIMOKATA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Human Functional Genomics, Life Science Research Center, Mie University, Tsu, Mie;

<sup>2</sup>Department of Epidemiology, National Institute for Longevity Sciences, Obu, Aichi, Japan

Received January 16, 2006; Accepted March 22, 2006

**Abstract.** Evidence suggests the existence of a close relation between lipid metabolism and bone remodeling. We hypothesized that polymorphisms of genes that play a role in lipid metabolism, such as those for forkhead box C2 (*FOXC2*) and perilipin (*PLIN*), might affect bone mineral density (BMD). We thus examined the possible relationships between a -512C→T polymorphism of *FOXC2* and a 1243C→T polymorphism of *PLIN* to BMD in community-dwelling Japanese women and men. The subjects (1129 men, 1114 women for *FOXC2*; 1122 men, 1112 women for *PLIN*) were aged 40 to 79 years and were randomly recruited to a population-based prospective cohort study of aging and age-related diseases in Japan. Genotypes for *FOXC2* and *PLIN* were determined with a fluorescence-based allele-specific DNA primer assay system. The -512C→T polymorphism of *FOXC2* was associated with BMD for the distal and proximal radius in men and in premenopausal women as well as with BMD for the distal radius and total body in postmenopausal women, with the T allele being related to reduced BMD. The 1243C→T polymorphism of *PLIN* was associated with BMD for the total body, lumbar spine, femoral neck, and trochanter in men, with the C allele being related to reduced BMD. This polymorphism of *PLIN* was not associated with BMD in all women. These results suggest that *FOXC2* is a susceptibility locus for reduced BMD in Japanese men and women, and that *PLIN* constitutes such a locus in Japanese men.

## Introduction

Osteoporosis, a major health problem of the elderly, is characterized by a reduction in bone mineral density (BMD) and a

deterioration in the microarchitecture of bone, both of which result in predisposition to fractures (1). Although reproductive, nutritional, and lifestyle factors influence BMD, family and twin studies have suggested that BMD is largely heritable and under the control of multiple genes (2-4). Personalized prevention of osteoporosis and osteoporotic fractures is an important public health goal, one approach to which is to identify disease susceptibility genes. Although genetic linkage analyses (5-7) and candidate gene association studies (7-10) have implicated various loci and genes in predisposition to osteoporosis or fractures, the genes that confer susceptibility to this disease remain to be identified definitively. In addition, because of ethnic differences in gene polymorphisms as well as in lifestyle and environmental factors, it is important to examine polymorphisms related to BMD in each ethnic group.

Bone loss is associated with an expansion of adipose tissue in bone marrow (11), and osteoblasts and adipocytes share a common progenitor derived from stromal cells in bone marrow (12). Products of lipoprotein oxidation and an atherogenic diet also inhibit preosteoblast differentiation and result in reduced bone mineralization (12,13). In addition, lipid-lowering agents (statins) stimulate bone formation and inhibit bone resorption, resulting in the prevention of both bone loss and osteoporotic fractures (14). Early postmenopausal women with an atherogenic serum lipid profile were found to have a lower BMD for the lumbar spine or femoral neck and an increased risk of osteopenia compared with those with a normal lipid profile (15). Postmenopausal women with increased plasma concentrations of low density lipoprotein (LDL) cholesterol have also been shown to be at greater risk of developing osteopenia than are those with normal concentrations, suggesting that an increased plasma level of LDL-cholesterol is a risk factor for reduced BMD (16). These observations suggest the existence of a close relationship between lipid metabolism and bone remodeling as well as demonstrating adverse effects of an atherogenic lipid profile on the latter. We thus hypothesized that polymorphisms of genes that play a role in lipid metabolism, such as those for forkhead box C2 (*FOXC2*) and perilipin (*PLIN*), might affect BMD.

*FOXC2*, a forkhead-winged helix transcription factor, is a key regulator of adipocyte metabolism (17). Transgenic mice that overexpress *FOXC2* specifically in white and brown adipocytes manifest a lean and insulin-sensitive phenotype.

---

*Correspondence to:* Dr Yoshiji Yamada, Department of Human Functional Genomics, Life Science Research Center, Mie University, 1577 Kurima-machiya, Tsu, Mie 514-8507, Japan  
E-mail: yamada@gene.mie-u.ac.jp

*Key words:* polymorphism, genetics, osteoporosis, bone density, forkhead box C2, perilipin

In these mice, deposition of white adipose tissue in the abdomen is reduced, with such tissue also exhibiting a brown fat-like histology, whereas interscapular brown adipose tissue is hypertrophic. Increased expression of *FOXC2* in adipocytes had pleiotropic effects on the expression of genes important in cellular differentiation and metabolism, insulin action, adrenergic sensitivity, and intracellular signaling. These various *FOXC2*-dependent changes appeared to confer protection against obesity. Furthermore, increased *FOXC2* expression induced by a high-fat diet in wild-type mice seems to counteract most of the signs associated with obesity, including hypertriglyceridemia and diet-induced insulin resistance, suggesting that this gene might also protect against type 2 diabetes (17). These findings suggest that *FOXC2* is a candidate gene for predisposition to obesity and type 2 diabetes mellitus, and that it may also play a role in bone remodeling.

Perilipins are a family of proteins that coat intracellular lipid droplets. Expression of *PLIN* is largely restricted to adipocytes and steroidogenic cells (18,19), and it appears to function primarily in the regulation of intracellular lipolysis in adipocytes (20,21). Perilipin promotes cellular storage of triglycerides by reducing the rate of triglyceride hydrolysis, and it also controls the release of triglycerides when required. The absence of *PLIN* confers a lean phenotype and counterbalances both genetic and diet-induced obesity in mice (22,23). In contrast, increased expression of *PLIN* correlates with increased adiposity in humans (24). *PLIN* is thus implicated as a candidate gene for human obesity, and it may therefore also affect bone remodeling.

We have been attempting to identify gene polymorphisms that are significantly associated with BMD in Japanese women or men in a population-based study. In the present study, we examined the relationship with polymorphisms of *FOXC2* and *PLIN* to BMD, even though there is no apparent biological link between these genes. Our aim was to identify a single polymorphism significantly associated with BMD for each gene. Among several polymorphisms previously identified, the -512C→T polymorphism of *FOXC2* and the 1243C→T polymorphism of *PLIN* have been shown to potentially affect gene function (25,26). We thus examined the relations of these polymorphisms to BMD in Japanese women and men in our population-based cohort.

## Materials and methods

**Study population.** The National Institute for Longevity Sciences-Longitudinal Study of Aging is a population-based prospective cohort study of aging and age-related diseases (27). The subjects are stratified by both age and sex, and are randomly selected from resident registrations in the city of Obu and town of Higashiura in central Japan (28, 29). The lifestyle of residents in this area is typical of that of Japanese individuals. The numbers of men and women recruited were similar and ages at the baseline were 40 to 79 years, with similar numbers of participants in each decade (40s, 50s, 60s, 70s). The subjects were followed up every 2 years. All participants were subjected at a special center to a detailed examination, which included not only medical evaluation but also assessment of exercise physiology, body composition, nutrition, and psychology. Individuals with disorders known to

cause abnormalities of bone metabolism, including diabetes mellitus, chronic renal failure, rheumatoid arthritis, as well as thyroid, parathyroid, adrenal, and other endocrine diseases, or those who had taken drugs that affect bone metabolism, such as estrogen, glucocorticoids, bisphosphonates, vitamin D, and statins, were excluded from the present study. Individuals whose genotypes were not successfully determined (nine individuals for *PLIN*) were also excluded from the analysis.

We examined the relationship of BMD at various sites to the -512C→T polymorphism of *FOXC2* (NCBI, Y08223, nt685) in 2243 individuals (1129 men, 1114 women) and to the 1243C→T polymorphism of *PLIN* (NCBI, dbSNP, rs2304796) in 2234 individuals (1122 men and 1112 women). In addition, to uncover potential differences between women according to menopausal status, we conducted all analyses separately for premenopausal and postmenopausal women. Menopausal status was evaluated with a detailed questionnaire, and menopause was defined as complete cessation of menstruation. The study protocol complies with the Declaration of Helsinki and was approved by the Committee on Ethics of Human Research of the National Institute for Longevity Sciences. Written informed consent was obtained from each subject.

**Measurement of BMD.** BMD at the radius was measured by peripheral quantitative computed tomography (pQCT) (Desiscan 1000; Scanco Medical, Bassersdorf, Switzerland) and was expressed as D50 (BMD for the inner 50% of the cross-sectional area of the distal radius, comprising mostly cancellous bone), D100 (BMD for the entire cross-sectional area of the distal radius, including both cancellous and cortical bone), and P100 (BMD for the entire cross-sectional area of the proximal radius, consisting mostly of cortical bone). BMD for the total body, lumbar spine (L2-L4), right femoral neck, and right trochanter was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) (QDR 4500; Hologic, Bedford, MA). The coefficients of variation of the pQCT instrument for BMD values were 0.7% (D50), 1.0% (D100), and 0.6% (P100), and those of the DXA instrument were 0.9% (total body), 0.9% (L2-L4), 1.3% (femoral neck), and 1.0% (trochanter).

**Determination of genotype.** Genotypes for *FOXC2* and *PLIN* were determined with a fluorescence-based allele-specific DNA primer assay system (Toyobo Gene Analysis, Tsuruga, Japan) (30). The polymorphic region of *FOXC2* was amplified by the polymerase chain reaction with sense primers labeled at the 5' end with either fluorescein isothiocyanate (5'-AACTCGCTTTCAGCAAGAAGXCT-3') or Texas red (5'-ACTCGCTTTCAGCAAGAAGXTT-3') and with an antisense primer labeled at the 5' end with biotin (5'-AGGCCAAGTCCCTTTTAGGGA-3'). The polymorphic region of *PLIN* was amplified with allele-specific sense primers labeled at the 5' end with either fluorescein isothiocyanate (5'-CCTCCCCTTGTTGAGGXGA-3') or Texas red (5'-GCCCTCCCC TTGTTGAGGXAA-3') and with an antisense primer labeled at the 5' end with biotin (5'-AGGGAGGGTGC TGCACCTCAC-3'). The reaction mixture (25  $\mu$ l) contained 20 ng of DNA, 5 pmol of each primer, 0.2 mmol/l of each deoxynucleoside triphosphate, 4 (for *FOXC2*) or 3.5 (for *PLIN*) mmol/l MgCl<sub>2</sub>, and 1 U of rTaq DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan) in polymerase buffer. The ampli-

Table I. BMD and other characteristics for all men (n=1129) according to *FOXC2* genotype.<sup>a</sup>

Characteristic	CC	CT	TT	CT+TT
Number (%)	543 (48.1)	468 (41.5)	118 (10.5)	586 (51.9)
Age (years)	59.4±0.5	58.8±0.5	60.0±1.0	59.0±0.5
Height (cm)	164.6±0.3	164.6±0.3	164.6±0.6	164.6±0.3
Body weight (kg)	62.8±0.4	61.9±0.4	63.1±0.8	62.1±0.4
BMD measured with pQCT (mg/cm <sup>3</sup> )				
D50	273.0±2.8	262.5±3.1 <sup>b</sup>	254.4±6.1 <sup>c</sup>	260.8±2.7 <sup>d</sup>
D100	548.3±3.9	536.3±4.2	524.7±8.5 <sup>e</sup>	533.9±3.8 <sup>f</sup>
P100	1194.7±6.0	1176.5±6.5	1175.7±12.9	1176.3±5.8 <sup>g</sup>
BMD measured with DXA (g/cm <sup>2</sup> )				
Total body	1.090±0.004	1.085±0.004	1.086±0.008	1.085±0.004
L2-L4	0.989±0.006	0.974±0.007	0.989±0.014	0.977±0.006
Femoral neck	0.753±0.004	0.756±0.005	0.743±0.009	0.753±0.004
Trochanter	0.669±0.004	0.668±0.004	0.667±0.009	0.667±0.004

<sup>a</sup>BMD is adjusted for age, height, and body weight. Data are means ± SE. <sup>b</sup>P=0.0307, <sup>c</sup>P=0.0158, <sup>d</sup>P=0.0020, <sup>e</sup>P=0.0306, <sup>f</sup>P=0.0084, <sup>g</sup>P=0.0270 versus CC.

fication protocol comprised initial denaturation at 95°C for 5 min; 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 sec, annealing at 60°C (for *FOXC2*) or 67.5°C (for *PLIN*) for 30 sec, and extension at 72°C for 30 sec; and a final extension at 72°C for 2 min. The amplified DNA was then incubated in a solution containing streptavidin-conjugated magnetic beads in the wells of a 96-well plate at room temperature, and the plate was placed on a magnetic stand. The supernatants from each well were transferred to the wells of a 96-well plate containing 0.01 mol/l NaOH and were measured for fluorescence with a microplate reader (Fluoroscan Ascent; Dainippon Pharmaceutical, Osaka, Japan) at excitation and emission wavelengths of 485 and 538 nm, respectively, for fluorescein isothiocyanate and of 584 and 612 nm, respectively, for Texas red.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed with SAS software (SAS Institute, Cary, NC). Data were compared among three genotype groups by one-way analysis of variance and the Tukey-Kramer post hoc test, and between two groups (dominant or recessive model) by the unpaired Student's t-test. BMD values were compared among genotypes for each polymorphism with adjustment for age, height, and body weight by the least squares method in a general linear model. Allele frequencies were estimated by the gene-counting method, and the chi-square test was used to identify significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium. The effect of genotype for each polymorphism on BMD was evaluated by single regression analysis; P values and R<sup>2</sup> were calculated from analysis of genotype for *FOXC2* (CC=0, CT=TT=1 for men; CC=CT=0, TT=1 for women) or *PLIN* (CC=CT=0, TT=1). A P value of <0.05 was considered statistically significant.

## Results

**Relationship between the -512C→T polymorphism of *FOXC2* and BMD.** The distribution of -512C→T genotypes of *FOXC2* was in Hardy-Weinberg equilibrium, and age, height, and body weight did not differ among genotypes, for all men (Table I). Among all men, BMD for D50, with adjustment for age, height, and body weight, was greater in individuals with the CC genotype than in those with the CT genotype, the TT genotype, or in the combined group of CT and TT genotypes (Table I). BMD for D100 was greater in individuals with the CC genotype than in those with the TT genotype or in the combined group of CT and TT genotypes. BMD for P100 was also greater in individuals with the CC genotype than in the combined group of CT and TT genotypes. The differences in BMD for D50 and D100 between individuals with the CC genotype and those with the TT genotype (expressed as a percentage of the larger value) were 6.8 and 4.3%, respectively. The difference in BMD for P100 between individuals with the CC genotype and the combined group of CT and TT genotypes was 1.5%.

The distribution of -512C→T genotypes of *FOXC2* was in Hardy-Weinberg equilibrium, and age, height, and body weight did not differ among genotypes, for all women (Table II). Among all women, BMD for D50, with adjustment for age, height, and body weight, was greater in the combined group of CC and CT genotypes than in individuals with the TT genotype (Table II). BMD for D100 was greater in individuals with the CC genotype, in individuals with the CT genotype, or in the combined group of CC and CT genotypes than in those with the TT genotype. BMD for the total body was also greater in the combined group of CC and CT genotypes than in individuals with the TT genotype. The differences in BMD for

Table II. BMD and other characteristics for all women (n=1114) according to *FOXC2* genotype.<sup>a</sup>

Characteristic	CC	CT	TT	CC+CT
Number (%)	525 (47.1)	479 (43.0)	110 (9.9)	1004 (90.1)
Age (years)	59.2±0.5	59.4±0.5	59.1±1.0	59.3±0.3
Height (cm)	151.5±0.3	151.1±0.3	151.8±0.6	151.3±0.2
Body weight (kg)	52.5±0.4	52.6±0.4	52.7±0.8	52.6±0.3
BMD measured with pQCT (mg/cm <sup>3</sup> )				
D50	187.2±2.7	185.9±2.8	172.8±6.0	186.6±1.9 <sup>b</sup>
D100	487.5±3.9 <sup>c</sup>	489.2±4.1 <sup>d</sup>	463.2±8.6	488.3±2.8 <sup>e</sup>
P100	1156.6±6.3	1156.4±6.6	1130.3±13.9	1156.5±4.5
BMD measured with DXA (g/cm <sup>2</sup> )				
Total body	0.967±0.004	0.968±0.004	0.948±0.008	0.968±0.003 <sup>f</sup>
L2-L4	0.869±0.006	0.866±0.006	0.854±0.012	0.867±0.004
Femoral neck	0.680±0.004	0.679±0.004	0.666±0.008	0.679±0.003
Trochanter	0.574±0.004	0.570±0.004	0.560±0.008	0.572±0.003

<sup>a</sup>BMD is adjusted for age, height, and body weight. Data are means ± SE <sup>b</sup>P=0.0284, <sup>c</sup>P=0.0275, <sup>d</sup>P=0.0174, <sup>e</sup>P=0.0056, <sup>f</sup>P=0.0200 versus TT.

Table III. BMD and other characteristics for premenopausal women (n=281) according to *FOXC2* genotype.<sup>a</sup>

Characteristic	CC	CT	TT	CT+TT
Number (%)	132 (47.0)	122 (43.4)	27 (9.6)	254 (90.4)
Age (years)	45.7±0.4	46.9±0.4	45.1±0.9	46.3±0.3
Height (cm)	155.7±0.4 <sup>b</sup>	153.4±0.4	153.7±0.9	154.6±0.3
Body weight (kg)	54.4±0.7	54.4±0.7	53.9±1.6	54.4±0.5
BMD measured with pQCT (mg/cm <sup>3</sup> )				
D50	248.3±4.9	244.1±5.1	236.6±10.8	246.3±3.5
D100	614.0±6.8 <sup>c</sup>	603.0±7.1	571.6±15.2	608.8±4.8 <sup>d</sup>
P100	1374.7±10.1 <sup>e</sup>	1354.7±10.6	1315.3±22.6	1365.1±7.2 <sup>f</sup>
BMD measured with DXA (g/cm <sup>2</sup> )				
Total body	1.098±0.007	1.093±0.007	1.073±0.016	1.095±0.005
L2-L4	1.032±0.010	1.018±0.010	1.020±0.022	1.025±0.007
Femoral neck	0.772±0.008	0.770±0.008	0.773±0.017	0.771±0.006
Trochanter	0.662±0.007	0.655±0.008	0.643±0.016	0.659±0.005

<sup>a</sup>BMD is adjusted for age, height and body weight. Data are means ± SE. <sup>b</sup>P=0.0004 versus CT; <sup>c</sup>P=0.0308, <sup>d</sup>P=0.0209, <sup>e</sup>P=0.0448, <sup>f</sup>P=0.0368 versus TT.

D50, D100, and total body between the combined group of CC and CT genotypes and individuals with the TT genotype were 7.4, 5.1, and 2.1%, respectively.

To examine the possible influence of menopause on the relationship between *FOXC2* genotype and BMD, we analyzed premenopausal and postmenopausal women independently.