

200936241A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

四肢短縮型小人症の新規遺伝子診断基準作成研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長谷川 高誠

平成22（2010）年5月

目 次

I. 総括研究報告	
四肢短縮型小人症の新規遺伝子診断基準作成研究 -----	1
長谷川 高誠	
(資料) 四肢短縮型小人症の診療実態に関するアンケート調査用紙	
II. 分担研究報告	
1. 新規四肢短縮型小人症原因候補遺伝子の同定 -----	7
今井 剛	
2. 四肢短縮型小人症の新規遺伝子同定を目指した高密度 SNP アレイによる 連鎖解析法の検証 -----	9
山本 健	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	12
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	13

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
総括研究報告書

四肢短縮型小人症の新規遺伝子診断基準作成研究

研究代表者 長谷川高誠 岡山大学病院 小児科 助教

研究の要旨

軟骨異栄養症をはじめとした四肢短縮型低身長症(小人症)の診療実態及び遺伝子診断に関するアンケートを日本小児内分泌学会評議委員の在籍施設(58 施設)と岡山大学病院小児科関連施設(33 施設)合計 91 施設に対して行い、61 施設(回答率 67%)から回答を得た。総数 193 名の四肢短縮型低身長症の診療実態が明らかとなり、線維芽細胞増殖因子受容体 3 型(FGFR3)遺伝子の変異による軟骨無形成症がもっとも多く 109 名、その軽症とされる軟骨低形成症が 47 名であった。その一方で 6 名の分別不能の四肢短縮型低身長症の存在も明らかとなった。その他の四肢短縮型低身長症についても報告数と軟骨無形成症の発症頻度からそれぞれの疾患の発症頻度の類推を行った。さらに成長科学協会における軟骨異栄養症に対する成長ホルモン治療データベース調査を行い、軟骨異栄養症以外の四肢短縮型低身長症の数や FGFR3 以外の原因も想定されている軟骨低形成症の数をアンケート調査の割合から類推した。

研究分担者である今井は脂肪特異的にエストロゲン受容体 α (ER α) をノックアウトしたマウスの成長軟骨層が幅広くなり、ER α を脂肪特異的に強制発現させたマウスでは逆に成長軟骨が短縮し、四肢短縮の表現型を呈した事を示した。四肢の短縮はマウスのバックグラウンドに関係なく生じる事から、脂肪特異的なエストロゲン受容体シグナル因子による新規の四肢短縮型低身長症の可能性を見いだした。さらに山本は高密度 SNP アレイを用いた家系解析法の有効性の検証を行った。

研究分担者

今井 剛 国立長寿医療センター老化制御研究部部長

山本 健 九州大学生体防御医学研究所准教授

研究協力者

田中 弘之 岡山済生会総合病院小児科部長

A. 研究目的

四肢短縮型低身長症は線維芽細胞増殖因子受容体3型(FGFR3)遺伝子の変異による軟骨異栄養症をはじめとして、多岐にわたる。しかしながらそれぞれの疾患については原因の明確でないものも多く、低身長に対する治療については現段階では軟骨異栄養症に対する成長ホルモン療法のみであり、その他の疾患については病態も不明なものが多く、病態に応じた治療がなされていない現状がある。そこで日本における四肢短縮型低身長症の疾患頻度調査及び分類不能の疾患の有無、新規の四肢短縮型低身長症の原因遺伝子の探索とその病態に基づいた治療の開発を目的として本研究を行った。

B. 研究方法

(1) 日本における四肢短縮型低身長症の診療実態の調査

日本小児内分泌学会評議委員の在籍施設(58施設)および岡山大学病院小児科関連病院(33施設)における四肢短縮型低身長症の診療実態及びそれぞれの疾患に対する遺伝子診断の施行状況についてアンケート(資料)を作成し、調査を行った。また成長科学協会における軟骨異栄養症に対する成長ホルモン治療適応判定データベース調査も行い、軟骨異栄養症及びその他の四肢短縮型低身長症の実態について調査を行った。

(2) 新規四肢短縮型小人症原因候補遺伝子の同定

作成しているエストロゲン受容体 α を脂肪特異的に過剰発現させたトランスジェニックマ

ウスはヒト四肢短縮型小人症のモデル動物であり、軟骨、骨端、骨等を解析することで、四肢短縮に関わる遺伝子群を同定する。

(3) 四肢短縮型小人症の新規遺伝子同定を目指した高密度 SNP アレイによる連鎖解析法の検証

四肢短縮型低身長症の新規原因遺伝子の同定へ向け、常染色体優性様式をとる5世代にわたる家族性腫瘍家系をモデルとして高密度 SNP アレイを用いた高検出力連鎖解析を用いて行い、実際の解析についての検証を行った。

(倫理面への配慮)

四肢短縮型低身長症に関するアンケート調査及び成長科学協会のデータベース調査においては患者及び遺伝子診断施行の数のみの調査であり、患者個人の臨床情報などについては調査を行っていない。マウスを用いた検討においては所属機関の実験動物、実験動物倫理等の委員会に、実験を申請し、承認されている。またヒトDNAを用いた解析を行うに当たって、所属機関の倫理委員会及び検体提供者より研究の同意を得た上で解析を行った。

C. 研究結果

(1) 日本における四肢短縮型低身長症の診療実態の調査(表)

日本小児内分泌学会評議委員の在籍施設35施設(回答率60.3%)、岡山大学病院小児科関連病院26施設(回答率78.8%)総数61施設からの解答を得た(回答率67%)。

調査の結果、総数193名の四肢短縮型低身長症の診療実態が明らかとなった(表1)。最も多

かったのが軟骨無形成症であり109名、次に多かったのが軟骨低形成症で47名であった。軟骨低形成症については線維芽細胞増殖因子受容体3型遺伝子(FGFR3)以外にも原因が想定されているが、遺伝子診断が行われているものは47名中13名であり、残りの34名については原因不明であった。その他の疾患については別表に示すとおりであり、軟骨無形成症及び低形成症以外の四肢短縮型低身長症の頻度は約3万分娩に一人であることがわかった。近年の日本における出生数が約90万人であることから約30人前後の四肢短縮型低身長症の患児が出生していると想定された。また分類不能である者は6名であった。今回の調査は小児科の施設に限って行ったものであるため、疾患頻度に関してはもう少し高くなる可能性があると考えられた。

また成長科学協会のデータベース調査においては1997年から2009年の間に683名のもものが軟骨異栄養症として成長ホルモン治療の判定依頼をしており、そのうち637名が軟骨異栄養症としての治療適応を得ている。その一方で判定保留となっているものは45名であり、これらが軟骨異栄養症以外の疾患であると考えられた。

(2) 新規四肢短縮型小人症原因候補遺伝子の同定

今回用いたモデルマウスは成長軟骨が短縮し、四肢短縮を呈する四肢短縮型モデルマウスであり、マウスのバックグラウンドに影響されないことがわかった。

このことから脂肪特異的なエストロゲンシ

グナルの下流に位置する遺伝子が新規の四肢短縮型低身長症の原因遺伝子であることが想定された。

(3) 四肢短縮型小人症の新規遺伝子同定を目指した高密度 SNP アレイによる連鎖解析法の検証

高密度SNPアレイにより10番染色体にモデル家系の責任領域が同定され、さらに0.65Mbに存在する4遺伝子に原因を絞り込むことができたことから四肢短縮型低身長症の新規責任遺伝子の同定にも有用な方法であると考えられた。

D. 考察

今回の調査において、原因不明の四肢短縮型低身長症の存在が明らかとなった。またFGFR3遺伝子以外の原因が想定されている軟骨低形成症においてはFGFR3遺伝子を初めとした原因検索がなされていない実態が明らかとなった。これらの事から診断及び原因の判明していない四肢短縮型低身長症患者は数多く存在し、原因に応じた適切な治療がなされていない可能性があると考えられた。脂肪特異的ER α シグナルに存在する遺伝子の検索及びこれらの患者の家系の情報を集めた上で高密度SNPアレイを用いて検索を行うことによりこれらの四肢短縮型低身長症患児から新規原因遺伝子を今後見だし、その原因に応じた治療法の解明につなげたい。

E. 結論

四肢短縮型低身長症のうち原因の明らかでないものが多く、新規原因遺伝子による四肢

短縮型低身長症の存在の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato J, Hasegawa K, Tanaka H & Morishima T. Urinary N-telopeptides of type collagen in healthy children. *Pediatr Int.* in press.

2. Maekawa N, Hiramoto M, Sakamoto S, Ikeda M, Naitou M, Acharya HP, Kobayashi Y, Suematsu M, Handa H & Imai T.

High performance affinity chromatography method for identification of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 interacting factors using magnetic nanobeads.

Biomed Chromatogr, in press.

3. Hiramoto M, Maekawa N, Masaike Y, Kuge T, Ayabe F, Watanabe A, Masaike Y, Hatakeyama M, Handa H & Imai T.

High-performance affinity chromatography method for identification of L-arginine interacting factors using magnetic nanobeads.

Biomed Chromatogr, in press.

4. Ohnaka K, Yamamoto K, Nakamura K, Adachi M, Kawate H, Kono S, Takayanagi R. Association of single nucleotide

polymorphisms in secreted frizzled-related protein 1 gene with bone mineral density in Japanese women. *Geriatr Gerontol Int.* 2009; 9 (3): 304-309.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1

疾患名	患者数	遺伝子診断数	軟骨無形成症の発症頻度 (1万分娩に1人) に対する発症割合
軟骨無形成症	109	32	1
軟骨低形成症	47	13	0.43
Acromesomelic Dysplasia Maroteaux type	1	0	0.009
偽性軟骨無形成症	4	0	0.037
Cartilage Hair Hypoplasia	2	1	0.018
Metaphyseal chondroplasia Schmid type	4	1	0.037
Multiple Epiphyseal Dysplasia	5	0	0.045
大理石骨病	4	3	0.037
Kniest dysplasia	1	0	0.009
Spondyloepiphyseal dysplasia	1	1	0.009
Dyspodyloenchondromatosis	1	0	0.009
Spondyloepimetaphyseal dysplasia	2	0	0.018
Severe Achondroplasia with Developmental Delay Acanthosis Nigricans	1	0	0.009
Jeune症候群	4	0	0.037
Ellis van Creveld 症候群	1	0	0.009
分類不能	6	0	0.055
総数	193	51	

表 2

申請年	判定保留	適応あり	適応なし	総計
1997	7	221	1	229
1998	7	85		92
1999	2	56		58
2000	4	41		45
2001		21		21
2002	2	34		36
2003	1	23		24
2004	4	34		38
2005	2	25		27
2006	3	23		26
2007	4	25		29
2008	6	26		32
2009	3	23		26
総計	45	637	1	683

病院名 ()	遺伝子変異
記入医師名 ()	確認 未確認
軟骨無形成症	名
軟骨低形成症	名
Acromesomelic Dysplasia Maroteaux type	名
偽性軟骨無形成症	名
Cartilage hair hypoplasia	名
Metaphyseal chondroplasia Schmidt type	名
Multiple epiphyseal dysplasia	名
大理石骨病	名
Kniest dysplasia	名
Spondyloepiphyseal dysplasia	名
そのほかの四肢短縮型小人症	
病名1:	名
病名2:	名
病名3:	名
病名4:	名
病名5:	名
診断不明	名
2次調査へのご協力をいただけますか？○をつけてください。 はい or いいえ	
遺伝子診断が可能な場合、遺伝子診断を希望されますか？ はい or いいえ	
岡山大学病院 小児科 長谷川 高誠	

ご協力ありがとうございました。

新規四肢短縮型小人症原因候補遺伝子の同定

研究分担者 今井 剛 国立長寿医療センター・老化制御研究部長

研究要旨

新規四肢短縮型小人症モデル動物の作成、解析を通じて新規四肢短縮型小人症原因候補遺伝子の同定を目指す。

A. 研究目的

四肢短縮型小人症はその原因遺伝子として、FGFR3 シグナル因子が同定されている。しかし、主任研究者らのグループの研究結果より、既知の遺伝子変異が見当たらない四肢短縮型小人症が多く見られる。そのため、独自の動物モデルを使用して新規原因遺伝子を同定することを目的とする。

B. 研究方法

作成している一種類のトランスジェニックマウス (DAI-TG2) はヒト四肢短縮型小人症のモデル動物である。その詳しい解析を行い、軟骨、骨端、骨等を解析する。

（倫理面への配慮）

所属機関の実験動物、実験動物倫理等の委員会に、実験を申請し、承認されている。勿論、それ以外の倫理面にも関して配慮している。

C. 研究結果

トランスジェニックマウスの遺伝子背景

を変化させるため、C57Black6 マウスへ交配を続けたもの、途中のものについて、各々交配を繰り返して、匹数を整えた。四肢短縮型小人症の表現型にさほど、変化は見られなかった。頭蓋骨については更に詳しく解析を行っている。他のモデル動物の作成を開始した。

D. 考察

小人症の表現型に対して、遺伝子背景（いわゆるジェネティックバックグラウンド）はあまり影響を及ぼさないことが判明した。

E. 結論

我々の作成した新規四肢短縮型小人症モデル動物における遺伝子背景はその表現型に殆ど影響を及ぼさない。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Maekawa N, Hiramoto M, Sakamoto S, Ikeda M, Naitou M, Acharya HP, Kobayashi Y, Suematsu M, Handa H & Imai T*.

High performance affinity chromatography method for identification of 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 interacting factors using magnetic nanobeads.
Biomed Chromatogr, in press.

2. Hiramoto M, Maekawa N, Masaike Y, Kuge T, Ayabe F, Watanabe A, Masaike Y, Hatakeyama M, Handa H & Imai T*.

High-performance affinity chromatography method for identification of L-arginine interacting factors using magnetic nanobeads.
Biomed Chromatogr, in press.

2. 学会発表

該当なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

四肢短縮型小人症の新規遺伝子同定を目指した

高密度 SNP アレイによる連鎖解析法の検証

研究分担者 山本 健 九州大学生体防御医学研究所・准教授

研究要旨

四肢短縮型小人症の新規遺伝子同定戦略の一つとなる、高密度 SNP アレイを用いた高検出力連鎖解析法の確立を目的として、モデル家系を用いた遺伝子型決定の品質チェックならびに連鎖解析の検証を行った。優性遺伝様式を示す家族性腫瘍のモデル家系について、得られた遺伝子型のメンデルエラーチェック、家系図と遺伝的近縁度の整合性チェック、複数のマーカー間隔による連鎖領域の変化と解析情報量の変化を検討した。その結果、イルミナ社 30 万 SNP アレイにおける高精度の遺伝子型決定、数 10 万 SNP 遺伝子型を用いた遺伝的近縁度確認の有用性、連鎖解析における自由度の高いマーカー間隔の設定とそれによる 1 Mb 以下の連鎖領域同定の可能性が示唆された。このように、高密度 SNP アレイを用いた全ゲノム連鎖解析は、四肢短縮小人症をはじめとする、未知の遺伝病の原因遺伝子探索に有用であることが示された。

A. 研究目的

四肢短縮型小人症の新規遺伝子同定戦略の一つとなる家系分析のうち、高密度 SNP アレイを用いた高検出力連鎖解析法の検証と確立を目的とする。

B. 研究方法

モデルとなる家系として、5 世代にわたって観察される家族性腫瘍家系を用いた。本家系では、常染色体優性の遺伝様式を認めた。

本家系を構成する 13 名について、30 万 SNP アレイ（イルミナ社）を用いて SNP 遺伝子型を決定し、PLINK プログラムを用いて、検体コール率による DNA 検体の質のチェック、SNP コール率による SNP 遺伝子型

決定過程の質のチェック、メンデルエラーチェックによる SNP 遺伝子型の整合性のチェック、遺伝的家族関係と家系図の一致度検証による家系図記載のチェックを行い、家系分析に供する SNP マーカーの妥当性を検討した。

良質な遺伝子型決定が施された SNP を用い、GeneHunter による多点連鎖解析を、優性遺伝モデル下にて実施した。連鎖解析に用いる SNP マーカーの間隔を 1cM, 0.5cM, 0.2cM と変化させ、LOD 値の変化および連鎖解析に関わる情報量の変化を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究は、九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会によ

る承認のもと、検体提供者より研究の同意を得て実施された。

C. 研究結果

SNP 遺伝子型決定過程における「品質チェック」：実験に使用した 13 検体の検体コール率は、平均値 0.998、最小値 0.998、最大値 0.999 を示し、きわめて良好な結果であった。これらの結果は、それぞれの DNA の品質が高密度 SNP アレイに用いる水準に達していることを示している。SNP コール率については、全 345,111 SNP 中、すべての検体で遺伝子型決定がなされた SNP 数が、342,115 個ときわめて良好な結果であった。この結果は、用いた高密度 SNP アレイのほとんどの SNP プローブが良質なものであることを示している。次にメンデルエラーチェックを行い、遺伝子型と家系図の整合性を検討した。その結果、上記 342,115 SNP 中、293 個が家系図との不整合を示した。このうちのほとんどが、遺伝子型決定の際に用いるクラスターの不備によるもので、これを改善することによって不整合は除去された。数 10 万 SNP の遺伝子型を決定することによって、遺伝的な近縁関係を算出することができる (IBD)。臨床的に取得された家系図が真に遺伝的血縁関係を反映していない場合、連鎖解析結果は信頼できない。したがって、あらかじめ IBD 値と家系図との整合性を検討することは極めて重要である。本家系において、約 30 万 SNP 遺伝子型を用いて算出された IBD、すなわち遺伝的近縁関係は家系図情報と一致していた。

連鎖解析：GeneHunter による多点解析を行った。1cM 間隔での連鎖解析によって、10 番、12 番、20 番染色体に連鎖が示唆される染色体領域を検出した。さらにマーカー間隔を狭め、0.5cM、0.2cM にて解析することによって、10 番染色体の LOD 値は上昇したが、他の染色体のピークは低下し、ほ

とんど 0 となった。マーカー間隔を狭めることによって、連鎖解析での情報量 (Information score) は、約 0.6 から 1.0 近くまで上昇した。すなわち、連鎖解析の検出力が上昇した。このことにより、本モデル家系においては、疾患の責任領域が 10 番染色体に同定された。さらに、マーカー間隔を狭めたことにより、責任領域の限定に成功し、約 0.65Mb に存在する 4 遺伝子まで絞り込むことができた。

D. 考察

四肢短縮型小人症の新規遺伝子を同定する戦略として、候補遺伝子群の直接 DNA 配列解析ならびに家系を用いた連鎖解析の二つが挙げられる。本研究では、後者の戦略に関する研究手法の検証を行った。

連鎖解析には、従来、マイクロサテライトマーカーが用いられていた。しかし、近年のゲノム解析技術の進歩により、高密度 SNP アレイを用いた遺伝子型決定とそのデータを応用した連鎖解析が可能となった。SNP アレイを用いた連鎖解析の長所として、研究期間の短縮と費用の低減、遺伝子型決定の容易さ、連鎖解析におけるマーカー間隔設定の自由度、高精度な家系情報の整合性チェック、などが挙げられる。SNP アレイは数種利用可能であるが、本研究で用いたイルミナ 30 万 SNP アレイは、タイピング効率および精度が高く、メンデルエラーが低いことから、有用であると考えられた。また、臨床の現場で得られた家系図と遺伝的近縁関係の整合性が検証できるのは、SNP アレイを用いた実験の特長であり、マイクロサテライトを用いた連鎖解析に比べ、正確な連鎖解析結果を得ることが出来よう。またマーカー間隔を狭めることによって、情報量の増加と連鎖領域の狭小化を認め、責任遺伝子へ早急に到達できる可能性が

示唆された。無論，マイクロサテライトマーカーによる遺伝子型決定とそれを用いた解析を，狭小化された候補連鎖領域に対して実施することにより，最終的に連鎖が確認され，より確実な責任遺伝子変異同定へと繋がる。

E. 結論

高密度 SNP アレイによる全ゲノム連鎖解析の有用性が示された。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ohnaka K, Yamamoto K, Nakamura K, Adachi M, Kawate H, Kono S, Takayanagi R. Association of single nucleotide polymorphisms in secreted frizzled-related protein 1 gene with bone mineral density in Japanese women. Geriatr Gerontol Int. 2009; 9 (3): 304-309.

2. 学会発表

特記事項なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特記事項なし

2. 実用新案登録

特記事項なし

3. その他

特記事項なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sato J, <u>Hasegawa K</u> , Tanaka H & Morishima T.	Urinary N-telopeptides of type collagen in healthy children.	Pediatrics International	印刷中		
Hiramoto M, Maekawa N, Masaike Y, Kuge T, Ayabe F, Watanabe A, Masaike Y, Hatakeyama M, Handa H & <u>Imai T</u> .	High-performance affinity chromatography method for identification of L-arginine interacting factors using magnetic nanobeads.	Biomed Chromatography	印刷中		
Maekawa N, Hiramoto M, Sakamoto S, Ikeda M, Naitou M, Acharya HP, Kobayashi Y, Suematsu M, Handa H & <u>Imai T</u>	High performance affinity chromatography method for identification of 15-deoxy- Δ 12, 14-prostaglandin J2 interacting factors using magnetic nanobeads.	Biomed Chromatography	印刷中		
Ohnaka K, <u>Yamamoto K</u> , Nakamura K, Adachi M, Kawate H, Kono S, Takayanagi R.	Association of single nucleotide polymorphisms in secreted frizzled-related protein 1 gene with bone mineral density in Japanese women.	Geriatrics & Gerontology International	9 卷 3 号	304-309	2009

ORIGINAL ARTICLE: EPIDEMIOLOGY,
CLINICAL PRACTICE AND HEALTH

Association of single nucleotide polymorphisms in secreted frizzled-related protein 1 gene with bone mineral density in Japanese women

Keizo Ohnaka,¹ Ken Yamamoto,² Kenjiro Nakamura,³ Masahiro Adachi,¹
Hisaya Kawate,⁴ Suminori Kono⁵ and Ryoichi Takayanagi⁴

Departments of ¹Geriatric Medicine, ⁴Medicine and Bioregulatory Science, and ⁵Preventive Medicine, Graduate School of Medical Sciences, ²Division of Molecular Population Genetics, Department of Molecular Genetics, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University, ³Tenjin Sogo Clinic, Fukuoka, Japan

Aim: Recent studies have demonstrated that the Wnt signaling pathway plays an important role in bone metabolism. The purpose of this study was to examine whether the gene of secreted frizzled-related protein 1 (*SFRP1*), a Wnt antagonist, is involved in the etiology of osteoporosis using association study.

Methods: Seven single nucleotide polymorphisms (SNP) in the *SFRP1* gene were genotyped and analyzed for association with bone mineral density (BMD) in 931 Japanese women (63.5 ± 6.7 years old, mean ± standard deviation).

Results: One SNP (rs16890444) located in intron and another (rs3242) located in the 3'-untranslated region of the *SFRP1* gene were significantly associated with the lumbar spine BMD value, and BMD values for both the femoral neck and the total hip, respectively. Women with the T/T genotype of the former SNP had a lower BMD value of the lumbar spine (L2–L4) compared with those with C/C or C/T (BMD value adjusted for age, duration after menopause, and body mass index: 0.781 vs 0.830, $P = 0.037$), while women with the T/T genotype of the latter SNP had higher BMD values of femoral neck and total hip compared with those with C/C or C/T (adjusted BMD value: femoral neck, 0.721 vs 0.633, $P = 0.025$; total hip, 0.834 vs 0.737, $P = 0.027$).

Conclusion: These results suggest that the *SFRP1* may be a candidate gene for a BMD determinant, but further studies need to consolidate the present findings.

Keywords: association, bone mineral density, osteoporosis, secreted frizzled-related protein 1 gene, single nucleotide polymorphism.

Accepted for publication 14 April 2009.

Correspondence: Dr Ryoichi Takayanagi MD PhD, Department of Medicine and Bioregulatory Science, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka, 812-8582, Japan. Email: takayana@intmed3.med.kyushu-u.ac.jp

Introduction

Osteoporosis is a skeletal disorder characterized by decreased bone strength and increased risk of bone fracture.¹ Bone strength is determined by bone mineral density (BMD) and bone quality including micro-architecture and bone turnover. Low BMD is one of the most clinically important risk factors for bone fracture.^{1,2}

Osteoporosis is considered to be a multifactorial disease caused by genetic factors as well as by environmental factors such as diet and exercise, and homeostatic age-related changes.³⁻⁵ In 1994, Morrison *et al.* first reported an association between the vitamin D receptor (*VDR*) gene allele and BMD.⁶ Since then, many association studies have been performed to clarify the genetic factors of osteoporosis. These studies have identified several candidate genes for osteoporosis, including genes for estrogen receptor α (*ESR1*),⁷ collagen type I α 1 (*COL1A1*),^{8,9} transforming growth factor- β 1 (*TGFB1*),^{10,11} parathyroid hormone (*PTH*),¹² interleukin-6 (*IL6*)¹³ and osteoprotegerin (*OPG*).¹⁴

The Wnt signaling pathway plays a pivotal role in embryogenesis and development.¹⁵ Recent studies have revealed that this pathway is also important in bone metabolism.¹⁶⁻²⁰ Loss-of-function mutation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (*LRP5*) gene, a Wnt co-receptor, causes osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG) in humans,¹⁶ while a gain-of-function mutation in the *LRP5* gene causes autosomal-dominant high bone mass trait.¹⁷ The Wnt signal is regulated by several secreted proteins such as dickkopf (*Dkk*), secreted frizzled-related protein (*sFRP*), Wnt inhibitory factor (*WIF*) and Cerberus.²¹ The *sFRP* family consists of five proteins named *sFRP1*, *sFRP2*, *sFRP3*, *sFRP4* and *sFRP5*.²¹ As targeted disruption of the *sFRP1* (*SFRP1*) gene increased the trabecular bone mass in mice, it is suggested that *sFRP1* is a negative regulator of bone accrual in vertebrates.²²

The purpose of this study was to investigate the association between BMD and single nucleotide polymorphisms (SNP) of the *SFRP1* gene in Japanese elderly women. Here we show that two SNP were significantly associated with BMD in a Japanese population.

Methods

Subjects

The study subjects were 931 Japanese women aged 50-77 years (mean \pm standard deviation, 63.5 \pm 6.7 years), who lived in the East Ward of Fukuoka City and participated in the Fukuoka Cohort Study. Lifestyle and medical history were ascertained by interview using a self-administered questionnaire. Excluded in the present study were women with the following conditions: diseases known to affect bone metabolism (endocrine disorders such as hyperthyroidism, hypothyroidism, hyperparathyroidism, hypoparathyroidism or diabetes mellitus, liver cirrhosis, chronic renal failure, and collagen diseases such as rheumatoid arthritis or systemic lupus erythematoses); use of drugs known to affect bone metabolism (e.g. glucocorticoids, bisphosphonates, selective estrogen receptor modulators, active vitamin D₃, vitamin K₂, estrogen and warfarin); and a

history of oophorectomy. The study was approved by the ethics committee of Kyushu University Faculty of Medical Sciences. All the study subjects gave written informed consent prior to their participation in this study.

Measurement of BMD

Bone mineral density of the lumbar spine (L2-L4), femoral neck and total hip was measured by dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) with a QDR-Delphi C instrument (Hologic, Waltham, MA, USA). The coefficient of variation at each site was less than 1% of all measurements. Deformity and fracture of vertebrae and calcification of aorta were screened by instant vertebral assessment (IVA) method, and those who had compression fracture of lumbar spine (L2-L4) or marked calcification of the abdominal aorta were excluded to avoid overestimation of BMD values by DXA.

DNA extraction and genotyping of the SFRP1 SNP

Genomic DNA was extracted from the peripheral leukocyte fraction using an automatic nucleic acid isolation system (NA-3000; Kurabo, Tokyo, Japan) and stored at -80°C until genotyping. Genotyping of intronic SNP (rs968427, rs9694405, rs16890444, rs10106678, rs7838918, rs7833518) and an SNP in the 3'-untranslated region (rs3242) of the *SFRP1* gene was performed using Assays-On-Demand primer and probe sets (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with an ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. Genotypes of each SNP were determined by the TaqMan polymerase chain reaction (PCR) method. The SNP examined in this study are listed in Table 2.

Statistical analysis

Adjusted means of BMD according to genotypes were calculated by ANCOVA, with age, duration after menopause and body mass index as covariates. Between-group comparisons of the adjusted means were done following the ANCOVA. Statistical adjustment for multiple comparisons was not considered so as to avoid missing potentially important associations with *SFRP1* polymorphisms. Lewontin's *D'* was calculated for assessing linkage disequilibrium between SNP on the basis of the maximum likelihood estimates of the haplotype frequencies. All statistical analyses were performed using SAS ver. 8.2, except for the analysis on linkage disequilibrium which used SAS/Genetics ver. 9.1. Statistical significance was declared at $P < 0.05$.

Results

The characteristics of the study subjects are summarized in Table 1. Premenopausal women numbered 55

Table 1 Characteristics of the 931 study subjects

Measure	Mean \pm SD
Age (years)	63.5 \pm 6.7
Height (cm)	153.2 \pm 5.4
Weight (kg)	53.0 \pm 7.4
Body mass index (kg/m ²)	22.6 \pm 3.1
Duration after menopause (years) [†]	12.2 \pm 8.2
Lumbar spine (L2–L4) BMD (g/cm ²)	0.829 \pm 0.141
Femoral neck BMD (g/cm ²)	0.634 \pm 0.100
Total hip BMD (g/cm ²)	0.738 \pm 0.110

[†]The study subjects included 55 premenopausal and 876 postmenopausal women. BMD, bone mineral density; SD, standard deviation.

(5.9%) and all the remaining were postmenopausal. Each of the covariates was modestly correlated with BMD values. The spine BMD value was correlated negatively with age ($r = -0.249$, $P < 0.0001$) and duration after menopause ($r = -0.268$, $P < 0.0001$), and positively with body mass index ($r = 0.244$, $P < 0.0001$). Similarly, BMD values of the femoral neck and the total hip correlated negatively with age (femoral neck, $r = -0.336$, $P < 0.0001$; total hip, $r = -0.300$, $P < 0.0001$) and duration after menopause (femoral neck, $r = -0.318$, $P < 0.0001$; total hip, $r = -0.289$, $P < 0.0001$), and positively with body mass index (femoral neck, $r = 0.262$, $P < 0.0001$; total hip, $r = 0.309$, $P < 0.0001$).

Table 2 shows the adjusted means of BMD values for each genotype of the SNP in the *SFRP1* gene. Of the seven SNP examined, one SNP (rs16890444) located in the intron were significantly associated with the lumbar spine (L2–L4) BMD. Women with the T/T genotype of this SNP had lower lumbar spine BMD values compared with those with the C/C or C/T genotypes (adjusted means \pm standard error of the mean [SEM] of BMD: 0.781 \pm 0.023 vs 0.830 \pm 0.004, $P = 0.037$, Fig. 1). The BMD values of both the femoral neck and the total hip in women with the T/T genotype were also lower than in women with the C/C or C/T genotypes, although the difference was not statistically significant (femoral neck, $P = 0.117$; total hip, $P = 0.057$).

There were also significant associations between another SNP (rs3242) located in the 3'-untranslated region (3'UTR) and the BMD values of both the femoral neck and the total hip (Fig. 2). Women with the T/T genotype had higher BMD values of both the femoral neck and the total hip compared with women with the C/C or C/T genotypes (adjusted means \pm SEM of BMD: femoral neck, 0.721 \pm 0.039 vs 0.633 \pm 0.003, $P = 0.025$; total hip, 0.834 \pm 0.043 vs 0.737 \pm 0.003, $P = 0.027$). In addition, the lumbar spine BMD value was higher in women with the T/T genotype compared with women with the C/C or C/T genotypes, although this difference was not statistically significant ($P = 0.176$). There was a

significant difference in the BMD value of femoral neck and among genotypes of the intron SNP (rs9694405) with an overall P -value of 0.019 (Table 2), but the BMD value was the lowest in women heterozygous for this SNP. There was no significant association between the BMD values and any other SNP of the *SFRP1* gene examined (Table 2).

Results from the analysis excluding premenopausal women ($n = 55$) were almost the same as described above (data not shown). The two polymorphisms (rs16890444 and rs3242) were not in a close linkage disequilibrium as shown by a small value for Lewontin's D' (0.02).

Discussion

In the present study, we measured the BMD values at the lumbar spine (L2–L4), femoral neck and total hip in 931 elderly Japanese women by DXA, and examined the association of the SNP of the *SFRP1* gene with BMD. We found that two SNP (rs16890444 and rs3242) of the *SFRP1* gene were significantly associated with BMD of the lumbar spine, femoral neck or total hip. The SNP (rs9694405) was also associated with femoral neck BMD with a statistical significance, but the lowest BMD value in those heterozygous for this SNP suggests that this SNP is unlikely to be importantly related to BMD. To our knowledge, this is the first report indicating that common SNP in the *SFRP1* gene may influence BMD in Japanese women.

Recent studies have shown that the Wnt signaling pathway is implicated in the control of bone turnover in humans and mice.^{16–18} The association of several SNP in the Wnt signaling-related genes with BMD or osteoporosis has been reported to date. Polymorphisms of the *LRP5* gene have been shown to be linked to BMD and the risk of osteoporosis and bone fracture.^{23–29} Furthermore, the Wnt10b (*Wnt10b*) gene polymorphism was reported to be associated with BMD in postmenopausal Japanese women.³⁰ More recently, it is reported that polymorphisms of the *SFRP1* gene were significantly associated with BMD in postmenopausal Australian women.³¹

Secreted frizzled-related protein 1 knockout mice exhibited increased trabecular bone formation through activation of the Wnt signaling pathway in osteoblasts as well as diminished apoptosis of osteoblasts and osteocytes.²² The fact that the increased bone mass was observed in adult sFRP1 knockout mice suggests a significant role of sFRP1 in age-related bone loss.²² Therefore, the *SFRP1* SNP identified in this study may be a useful marker for postmenopausal and senile osteoporosis, although the biological role of these SNP remains unclear. The intronic SNP rs16890444 might be linked with a regulatory SNP that may change the expression of the *SFRP1* mRNA or a coding SNP that

Table 2 Association of SNP in the *SFRP1* gene with BMD values of the lumbar spine (L2-L4), femoral neck and total hip

SNP	Genotype	n [†]	Adjusted mean of BMD [‡] (L2-L4, g/cm ²)	Overall difference [§]	Adjusted mean of BMD [‡] (Femoral neck, g/cm ²)	Overall difference [§]	Adjusted mean of BMD [‡] (Total hip, g/cm ²)	Overall difference [§]
SNP1	AA	341	0.825 ± 0.007	P = 0.748	0.632 ± 0.005	P = 0.776	0.735 ± 0.005	P = 0.427
	AG	442	0.831 ± 0.006		0.636 ± 0.004		0.743 ± 0.005	
	GG	143	0.833 ± 0.011		0.632 ± 0.007		0.735 ± 0.008	
SNP2	GA	391	0.831 ± 0.006	P = 0.339	0.642 ± 0.004	P = 0.019	0.741 ± 0.005	P = 0.469
	AA	422	0.823 ± 0.006		0.625 ± 0.004		0.734 ± 0.005	
	CC	114	0.842 ± 0.012		0.636 ± 0.008		0.745 ± 0.009	
SNP3	CT	631	0.832 ± 0.005	P = 0.106	0.635 ± 0.004	P = 0.288	0.739 ± 0.004	P = 0.162
	TT	267	0.828 ± 0.008		0.634 ± 0.005		0.739 ± 0.006	
	TT	31	0.781 ± 0.023*		0.610 ± 0.016		0.705 ± 0.017	
SNP4	TC	734	0.829 ± 0.005	P = 0.966	0.634 ± 0.003	P = 0.829	0.739 ± 0.004	P = 0.848
	CC	182	0.831 ± 0.010		0.636 ± 0.007		0.736 ± 0.007	
	CC	12	0.824 ± 0.037		0.622 ± 0.026		0.727 ± 0.028	
SNP5	CG	381	0.833 ± 0.007	P = 0.622	0.636 ± 0.005	P = 0.460	0.739 ± 0.005	P = 0.653
	GG	407	0.824 ± 0.006		0.630 ± 0.004		0.736 ± 0.005	
	GG	140	0.832 ± 0.011		0.639 ± 0.007		0.744 ± 0.008	
SNP6	GT	367	0.834 ± 0.007	P = 0.523	0.635 ± 0.005	P = 0.587	0.739 ± 0.005	P = 0.852
	TT	397	0.831 ± 0.006		0.631 ± 0.004		0.736 ± 0.005	
	CC	155	0.820 ± 0.010		0.639 ± 0.007		0.740 ± 0.008	
SNP7	CT	742	0.827 ± 0.005	P = 0.327	0.635 ± 0.003	P = 0.027	0.739 ± 0.004	P = 0.037
	CT	177	0.834 ± 0.010		0.624 ± 0.007		0.729 ± 0.007	
	TT	5	0.906 ± 0.057		0.721 ± 0.039*		0.834 ± 0.043*	

*P < 0.05 compared with the genotypes with CC or CT. [†]Number of individuals genotyped among 931 subjects. [‡]BMD values were adjusted for age, duration after menopause and body mass index (mean ± standard error of the mean). [§]Based on ANCOVA. BMD, bone mineral density, 3'UTR, 3'-untranslated region; *SFRP1*, secreted frizzled-related protein 1; SNP, single nucleotide polymorphisms.

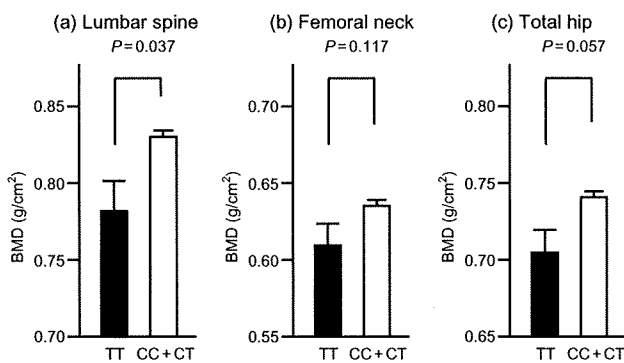


Figure 1 Adjusted means of bone mineral density (BMD) of the lumbar spine, femoral neck and total hip in women with genotype TT and genotype CC + CT polymorphisms in the intron (rs16890444) of the secreted frizzled-related protein 1 (*SFRP1*) gene. (a) Lumbar spine (L2–L4); (b) femoral neck; (c) total hip. BMD values were adjusted for age, duration after menopause and body mass index, and expressed as means \pm standard error of the mean. Between-group comparisons of the adjusted means were done following ANCOVA.

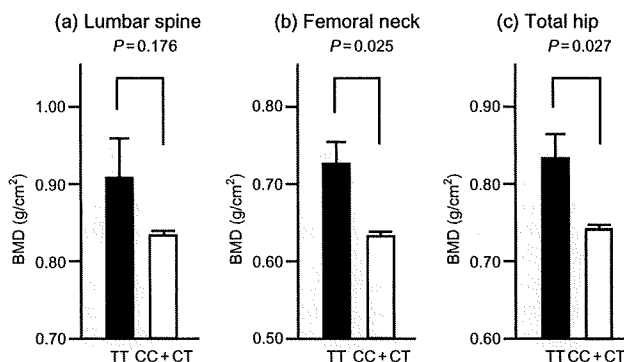


Figure 2 Adjusted means of bone mineral density (BMD) of the lumbar spine, femoral neck and total hip in women with genotype TT and genotype CC + CT polymorphisms in the 3'-untranslated region (rs3242) of the *SFRP1* gene. (a) Lumbar spine (L2–L4); (b) femoral neck; (c) total hip. BMD values were adjusted for age, duration after menopause and body mass index, and expressed as means \pm standard error of the mean. Between-group comparisons of the adjusted means were done following ANCOVA.

may cause a significant change in sFRP1 protein function. Sims *et al.* reported that two SNP located in the 3'UTR of the *SFRP1* gene were strongly associated with BMD in Australian people.³¹ As these SNP in the 3'UTR were located closely to the SNP rs3242 of the 3'UTR in the present study, genetic variation in this region may affect the *SFRP1* function, for example, by influencing the stability of *SFRP1* mRNA.

It may be of interest whether individuals differed by the SNP showing an association with BMD with respect to their characteristics. There was no material difference in age, body mass index and duration after menopause

by either of the two SNPs, however. As for the intronic SNP (rs16890444), for instance, the means of body mass index for the TT genotype and CC and CT genotypes combined were 22.3 and 22.6 kg/m², respectively, and the corresponding values for duration after menopause were 12.7 and 12.2 years, respectively. As regards the SNP in 3'UTR (rs3242), individuals with TT genotype had a mean of 24.8 kg/m² for body mass index and a mean of 12.4 years for duration after menopause while those with CT or CC genotype had means of 22.6 kg/m² and 12.2 years for body mass index and duration after menopause, respectively.

There are several limitations to be discussed in the present study. The number of subjects was not large. Although we excluded the subjects with current use of drugs which may have affected bone metabolism, we had no information on past use of such drugs. Furthermore, the association with seven SNP was evaluated in this study, raising a concern over multiple testing. When the Bonferroni method was applied to control for multiple testing problems, none of the *P*-values for the overall difference reached the statistical significance of 5% level. Thus, the present associations observed for the intronic SNP (rs16890444) and the SNP in 3'UTR (rs3242) need to be confirmed in further studies. In particular, further studies are necessary with respect to functionality of these SNP.

In summary, we found that two SNP of the *SFRP1* gene were significantly associated with the BMD of the lumbar spine, femoral neck and total hip in a general population of Japanese women. The results of this study suggest that *SFRP1* may be a candidate gene for a BMD determinant. However, the clinical significance of the *SFRP1* gene should be investigated in further clinical studies.

Acknowledgments

This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) and (C), a Grant-in-Aid for the Comprehensive Research on Aging and Health, Health and Labor Sciences Research Grants, the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and a grant for the 21st Century Center of Excellence (COE) Program (Kyushu University) from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology.

References

- 1 Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy. *NIH Consensus Statement* 2000; **17**: 1–45.
- 2 Deng HW, Mahaney MC, Williams JT *et al.* Relevance of the genes for bone mass variation to susceptibility to osteoporotic fractures and its implications to gene search for complex human diseases. *Genet Epidemiol* 2002; **22**: 12–25.

- 3 Eisman JA. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 1999; **20**: 788–804.
- 4 Peacock M, Turner CH, Econs MJ, Foroud T. Genetics of osteoporosis. *Endocr Rev* 2002; **23**: 303–326.
- 5 Ongphiphadhanakul B. Osteoporosis: The role of genetics and the environment. *Forum Nutr* 2007; **60**: 158–167.
- 6 Morrison NA, Qi JC, Tokita A *et al*. Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* 1994; **367**: 284–287.
- 7 Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 1996; **11**: 306–311.
- 8 Uitterlinden AG, Burger H, Huang WJ *et al*. Relation of alleles of the collagen type I alpha 1 gene to bone density and the risk of osteoporotic fractures in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1016–1021.
- 9 Grant SFA, Reid DM, Blake G, Herd R, Fogelman I, Ralston SH. Reduced bone density and osteoporosis associated with a polymorphic Sp1 binding site in the collagen type I alpha 1 gene. *Nature Genet* 1996; **14**: 203–205.
- 10 Yamada Y, Miyauchi A, Goto J *et al*. Association of a polymorphism of the transforming growth factor-beta 1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 1998; **13**: 1569–1576.
- 11 Bertoldo F, D'Agruma L, Furlan F *et al*. Transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism, bone turnover, and bone mass in Italian postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2000; **15**: 634–639.
- 12 Hosoi T, Miyao M, Inoue S *et al*. Association study of parathyroid hormone gene polymorphism and bone mineral density in Japanese postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 1999; **64**: 205–208.
- 13 Ota N, Nakajima T, Nakazawa I *et al*. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. *J Hum Genet* 2001; **46**: 267–272.
- 14 Ohmori H, Makita Y, Funamizu M *et al*. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet* 2002; **47**: 400–406.
- 15 Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; **14**: 59–88.
- 16 Gong YQ, Slee RB, Fukui N *et al*. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001; **107**: 513–523.
- 17 Boyden LM, Mao JH, Belsky J *et al*. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med* 2002; **346**: 1513–1521.
- 18 Kato M, Patel MS, Lvasseur R *et al*. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 2002; **157**: 303–314.
- 19 Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases. *Gene* 2004; **341**: 19–39.
- 20 Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1202–1209.
- 21 Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003; **116**: 2627–2634.
- 22 Bodine PVN, Zhao WG, Kharode YP *et al*. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. *Mol Endocrinol* 2004; **18**: 1222–1237.
- 23 Koay MA, Woon PY, Zhang Y *et al*. Influence of LRP5 polymorphisms on normal variation in BMD. *J Bone Miner Res* 2004; **19**: 1619–1627.
- 24 Mizuguchi T, Furuta I, Watanabe Y *et al*. LRP5, low-density-lipoprotein-receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density. *J Hum Genet* 2004; **49**: 80–86.
- 25 Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U *et al*. Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. *Am J Hum Genet* 2004; **74**: 866–875.
- 26 Urano T, Shiraki M, Ezura Y *et al*. 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**: 341–345.
- 27 Koller DL, Ichikawa S, Johnson ML *et al*. Contribution of the LRP5 gene to normal variation in peak BMD in women. *J Bone Miner Res* 2005; **20**: 75–80.
- 28 Ferrari SL, Deutsch S, Baudoin C *et al*. LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. *Bone* 2005; **37**: 770–775.
- 29 Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M *et al*. Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet* 2008; **371**: 1505–1512.
- 30 Usui T, Urano T, Shiraki M, Ouchi Y, Inoue S. Association of a single nucleotide polymorphism in Wnt10b gene with bone mineral density. *Geriatr Gerontol Int* 2007; **7**: 48–53.
- 31 Sims AM, Shephard N, Carter K *et al*. Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res* 2008; **23**: 499–506.