

特発性大腿骨頭壊死症のゲノム研究—成果と現況の報告

末次弘征 坂本悠磨 中島康晴 (九州大学大学院医学研究院 整形外科)
山本卓明 (福岡大学医学部 整形外科)
池川志郎 (理化学研究所 骨関節疾患研究チーム)

特発性大腿骨頭壊死症 (osteonecrosis of femoral head: ONFH) の発生には、ステロイド全身投与や飲酒などの主要関連因子だけではなく、個人の病気のなり易さ (疾患感受性) を規定する遺伝因子も関連すると考えられている。我々は、全ゲノム相関解析 (genome-wide association study: GWAS) を行い、疾患感受性候補遺伝子として *LINC01370* を同定した。現在、その遺伝子機能解析を施行中である。また、ステロイド関連 ONFH の疾患感受性遺伝子を同定すべく、ONFH 発生例・非発生例共に SLE 患者に限定して検体を収集し、GWAS を行う予定である。

1. はじめに

本研究の目的は、ONFH の疾患感受性遺伝子を同定し、その機能を解析することによってバイオマーカー及び予防法・治療法の開発に繋げることである。我々は ONFH 患者 1,602 例の DNA を用いて GWAS を行い、有意水準を超える SNP ($p \leq 5.0 \times 10^{-8}$) を 2 つの領域 (12q24 と 20q12) に同定した。12q24 の領域に関しては、過去の文献では飲酒習慣との関連が報告されている領域であり、誘因別の層別化解析を行うとアルコール関連 ONFH のみで有意な相関を認めため、飲酒耐用能を介して ONFH の発生に関与している可能性が示唆された。20q12 の領域において、その疾患感受性領域内にある遺伝子は、*LINC01370* のみであった (figure 1)。*LINC01370* は lncRNA (long non-coding RNA) の一種である。lncRNA はタンパク質をコードしない RNA であり、他の遺伝子 (群) の発現調節に関与する可能性が示唆されている。インフォマティクス解析によって *LINC01370* は肝臓特異的に発現しており (figure 2)、pathway 解析では脂質代謝異常及び脂肪細胞分化に関連していることが推測された (figure 3)。この結果は、これまで提唱されてきた ONFH の病態の仮説と矛盾しない。よって我々は *LINC01370* を疾患感受性候補遺伝子と考え、機能解析を行った。

2. *LINC01370* のインフォマティクス解析

有意水準を超える SNP は *LINC01370* からは 100kb 程離れた位置に存在しており、*LINC01370* の発現調節に関連していると考えられる。有意水準を満たす SNP のうち、p 値が 5×10^{-10} 以下の SNP は本症と特に相関が強いと考えられる。その中でも *LINC01370* の発現に関連している可能性がある SNP を eQTL (expression quantitative trait loci) 解析により絞り込んだ (figure 4)。eQTL 解析における $p \leq 0.05$ の SNP は、アレル間での *LINC01370* の発現量に有意差が存在する SNP である。*LINC01370* は肝臓特異的に発現していることから、肝臓での enhancer 活性を調べたところ、rs6028703 のみが肝臓で enhancer としての活性を持つという結果であった。また、rs6028703 はリスクアレル (コントロール群より患者群において頻度が高いアレル) において活性が高いという結果であった (figure 5)。この結果から、rs6028703 が *LINC01370* の発現を調節している可能性、もしくは rs6028703 と連鎖不平衡にある SNP が *LINC01370* の発現を調節している可能性が考えられた。

3. *LINC01370* の in vitro 解析

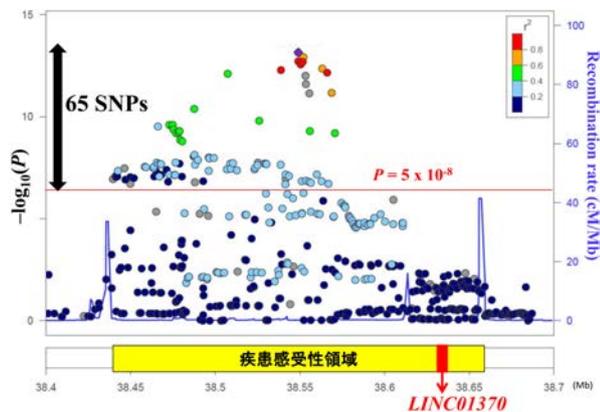
実際に rs6028703 が *LINC01370* の発現を調節しているか否かを、in vitro にて解析を行った。肝細胞株 Huh-7 を用いて luciferase assay を行い、リスクアレル

とノンリスクアレル間での活性の差を検討した。
rs6028703 のリスクアレルとノンリスクアレルの周辺配列を加えた oligomer をそれぞれ作成し、*LINC01370* の promoter 領域とともに luciferase 酵素を発現する遺伝子が入った vector に別々に組み込んだ。各々の vector を Huh-7 に transfection し、24 時間後に luciferase 酵素の発現量の差、即ちリスクアレルとノンリスクアレルの enhancer 活性の差を観察した。結果は、リスクアレルで有意に活性が高かった (figure 6)。
rs6028703 は実際に *LINC01370* の発現を調整していると考えられた。

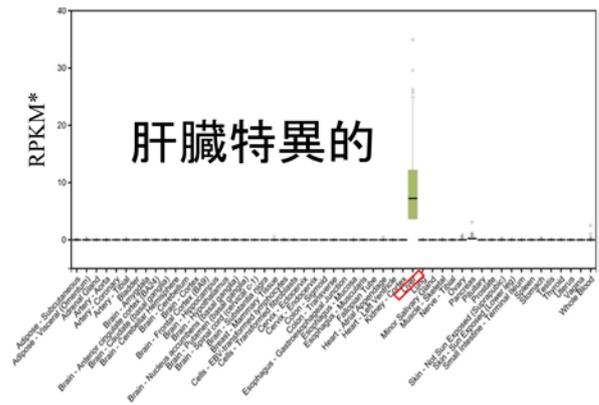
4. 結論

以上の結果より、rs6028703 はリスクアレルにおいて *LINC01370* の発現量を増加させる可能性があると考えられる。前述の通り *LINC01370* は他の遺伝子の発現を調節していると考えられているため、その発現量が変わることで、他の遺伝子の発現に影響を及ぼしている可能性がある。

(figure 1)



(figure 2)



(figure 3)

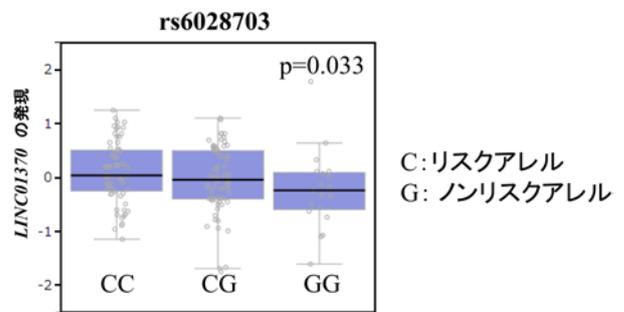
Top3 term and pathway	Enrichment P value		
	Nominal	BH	Bonf
Gene ontology (Biological process)			
1 Cellular lipid metabolic process	4.4 x 10 ⁻⁷	2.0 x 10 ⁻⁵	2.8 x 10 ⁻⁴
2 Translational initiation	1.8 x 10 ⁻⁵	3.0 x 10 ⁻⁴	0.011
3 Fatty acid beta-oxidation	2.1 x 10 ⁻⁵	3.1 x 10 ⁻⁴	0.013
KEGG pathway			
1 Fatty acid metabolism	1.3 x 10 ⁻⁶	1.2 x 10 ⁻⁴	1.2 x 10 ⁻⁴
2 PPAR signaling pathway	1.6 x 10 ⁻⁵	7.0 x 10 ⁻⁴	0.001
3 Ribosome	5.1 x 10 ⁻⁵	0.001	0.004

BH: Benjamini & Hochberg correction, Bonf: Bonferroni correction.

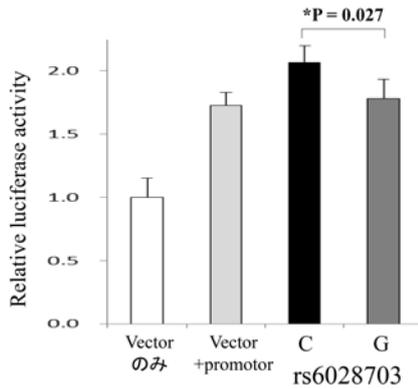
(figure 4)

dbSNP	GWAS p value	e-QTL p value	Enhancer histone mark
rs2224539	5.57 x 10 ⁻¹⁴	0.0025	
rs2145943	2.32 x 10 ⁻¹³	0.0033	
rs6028703	4.00 x 10 ⁻¹³	0.033	14 tissues(include liver)
rs10211813	2.20 x 10 ⁻¹¹	0.024	
rs12625145	8.90 x 10 ⁻¹¹	0.019	11 tissues(not include liver)
rs2208649	2.83 x 10 ⁻¹⁰	0.0026	
rs62212405	3.53 x 10 ⁻¹⁰	0.0024	muscle

(figure 5)



(figure 6)



5. ステロイド関連 ONFH の GWAS

ステロイド関連 ONFH は基礎疾患が多岐に渡り、その遺伝的背景の違いが GWAS の結果に影響している可能性がある。従って、基礎疾患として最も多い SLE に限定して GWAS を行うことで、遺伝的背景に左右されずにステロイド関連 ONFH の疾患感受性遺伝子を探索する。既に SLE で ONFH 発生患者 441 例、SLE で ONFH 非発生患者 401 例を用いて GWAS の予備解析を行い、p 値が 10^{-6} ~ 10^{-7} 位の有望な SNP を複数同定している。試算の結果、GWAS で有意な相関を得るためには、SLE 患者 300 例 (ONFH 発生群・非発生群あわせて) の検体が追加が必要であると考えている。

6. 謝辞

最後になりましたが、研究に御協力頂いている先生方には、この場を借りて深くお礼を申し上げます。

7. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
1) なし

8. 知的所有権の取得状況

1. 特許の取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

9. 参考文献

- 1) Sakamoto Y, Yamamoto T, Sugano N, Takahashi D, Watanabe T, Atsumi T, Nakamura J, Hasegawa Y, Akashi K, Narita I, Miyamoto T, Takeuchi T, Ikari K, Amano K, Fjie A, Kubo T, Tada Y, Kaneuji A, Nakamura H, Miyamura T, Kabata T, Yamaji K, Okawa T, Sudo A, Ohzono K, Tanaka Y, Yasunaga Y, Matsuda S, Imai Y, ; Japanese Research Committee on Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head, Akiyama M, Kubo M, Kamatani Y, Iwamoto Y, Ikegawa S. Genome-wide Association Study of Idiopathic Osteonecrosis of the Femoral Head. *Sci Rep.* 2017 Nov 8;7(1):15035.
- 2) Miyanishi K, Yamamoto T, Irisa T, Yamashita A, Jingushi Y, Noguchi Y, Iwamoto Y. Bone Marrow Fat Cell Enlargement and a Rise in Intraosseous Pressure in Steroid-treated Rabbits With Osteonecrosis. *Bone.* 2002 Jan ; 30 (1) : 185-190
- 3) Kuroda T, Tanabe N, Wakamatsu A, Takai C, Sato H, Nakatsue T, Wada Y, Nakano M, Narita I. High Triglyceride is a risk factor for silent osteonecrosis of the femoral head in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* 2015 Dec ; 34 (12) : 2071-2077
- 4) Ikemura S, Yamamoto T, Motomura G, Iwasaki K, Yamaguchi R, Zhao G, Iwamoto Y. Lipid metabolism abnormalities in alcohol-treated rabbits: a morphometric and haematologic study comparing high and low alcohol doses. *Int J Exp Pathol.* 2011 Aug ; 92 (4) : 290-295
- 5) Nagasawa K, Tada Y, Koarada S, Horiuchi T, Tsukamoto H, Murai K, Ueda A, Yoshizawa S, Ohta A. Very early development of steroid-associated osteonecrosis of femoral head in systemic lupus erythematosus : prospective study by MRI. *Lupus.* 2005 ; 14 (5) : 385-390
- 6) Yang X, Lu X, Wang L, Chen S, Li J, Cao

J, Chen J, Hao Y, Li Y, Zhao L, Li H, Liu D, Wang L, Lu F, Shen C, Yu L, Wu X, Zhao Q, Ji X, Guo D, Peng X, Huang J, Gu D. Common variants at 12q24 are associated with drinking behavior in Han Chinese. *Am J Clin Nutr* 2013 Mar; 97(3): 545-551