

# 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臨床医学部門 外科学講座 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環境因子だけではなく、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、疾患感受性領域として12q24、20q12を得た。現在、20q12における候補遺伝子について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、その機能解析を行うことで、本症の病態解明、さらにはバイオマーカーや予防法・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( $p < 5.0 \times 10^{-8}$ )を超えるSNP(Single Nucleotide Polymorphism)を2つの領域(12q24と20q12)に同定した。

12q24の領域に関しては、過去の文献にて飲酒習慣との関連が報告されており、誘因別で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。以上より、12q24領域は、飲酒耐用能を介してONFHの発生に関連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*は肝臓特異的に発現しており、pathway解析にて脂質代謝に関連していることが推測された。ONFHと脂質代謝が関連する可能性はこれまでも報告されており(Miyanishi *et al*, 2002)、*LINC01370*を疾患感受性遺伝子の候補として有望であると、昨年の班会議で報告していた。

## 2. *LINC01370*のin vitro解析

昨年、rs6028703が*LINC01370*の発現調節を介して、ONFHの疾患感受性に関連している可能性があることを報告した。rs6028703は*LINC01370*から100kb程離れているため、転写因子を介して3次的にSNPと遺伝子が近接することで発現を調節していると考えられた。luciferase assayを行ってアレル間の転写活性の差を確認したところ、わずかな差ではあるが、ノンリスクアレルに対し、リスクアレルの方が有意に*LINC01370*の転写活性が高かった(figure 2)。しかしながら、アレル間での転写因子の結合に違いがあるか、EMSA(Electrophoresis Mobility Shift Assay)を行ったが、差は認めなかった(figure 3)。以上より、現時点で*LINC01370*に関しては、分子生物学的な証明はできていない。

## 3. *MAFB*のインフォマティクス解析

*LINC01370*の他にも疾患感受性遺伝子の候補が無いが、TAD(Topologically Associated Domain)を調べた。疾患感受性領域を含むTAD内には、*LINC01370*の他に*MAFB*が存在した(figure 4)。

*MAFB*のpathway解析を行うと、同遺伝子は破骨細胞の分化への関連が示唆された(figure 5)。また、*MAFB*の発現量の増加は、マクロファージの血管内皮細胞への沈着を促進し、動脈硬化を起こすという

報告もある (Hamada *et al.*, 2014)。このため、*MAFB* は ONFH の疾患感受性遺伝子の候補として有望と考えられた。

*MAFB* の転写に関わっている SNP を選定するため、GWAS 4 D というデータベースを調べた結果、rs6065171 が *MAFB* に 3 次元的に近接しており (figure 6)、*MAFB* の転写に関わっている可能性が示唆された。

#### 4. *MAFB* の in vitro 解析

rs6065171 が *MAFB* の発現を調節しているか否かを検討するため、EMSA を行った。rs6065171 に関して、アレル間で転写因子の結合に差を認めた。(figure 7)。

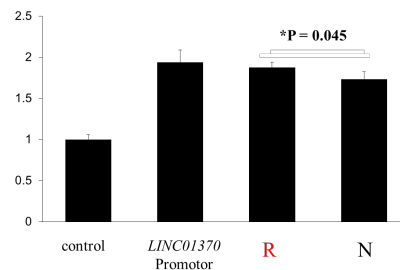
#### 5. 結論

*MAFB* は破骨細胞の分化や血管障害を通じて ONFH の病態に関与している可能性がある。rs6065171 が *MAFB* の発現を制御している可能性があり、今後は luciferase assay にてアレル間で *MAFB* の転写活性の差の有無を検証する。

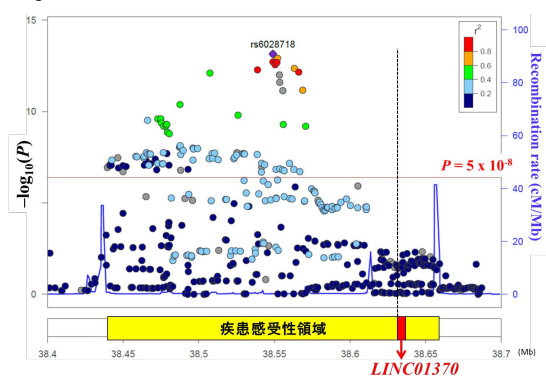
また、*LINC01370* についても引き続き分子生物学的検証を継続する。

細胞: Huh-7

R: リスクアレル  
N: ノンリスクアレル

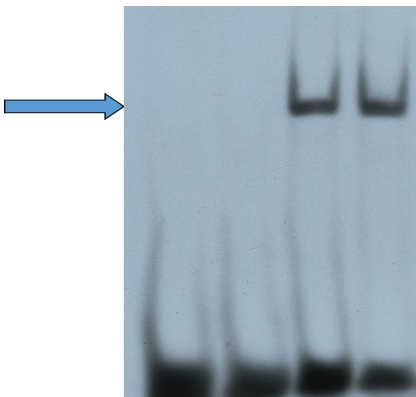


(figure 1)



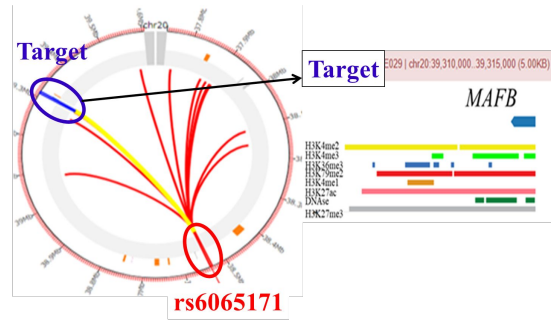
( figure 2 )

(figure 3)

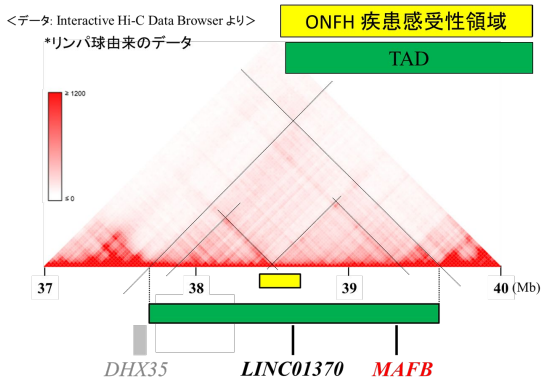


rs6028703	R	N	R	N
転写因子	-	-	+	+

転写因子: Huh-7 より抽出した核タンパク



(figure 4)



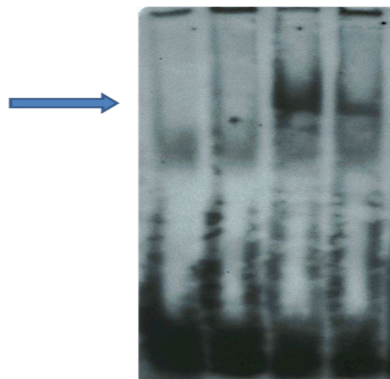
(figure 5)

Top 300 coexpressed genes to MAFB (Hsa c4.0 coexpression data)

KEGG* ID	Title	#genes
hsa04380	<u>Osteoclast differentiation</u>	24
hsa04145	Phagosome	23
hsa05152	Tuberculosis	23
hsa05150	Staphylococcus aureus infection	21
hsa05140	Leishmaniasis	17

( figure 6 )

(figure 7)



rs6065171	R	N	R	N
転写因子	-	-	+	+

転写因子: U937 より抽出した核タンパク

## 6. 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、基礎疾患の遺伝的背景の違いが GWAS の結果に影響を及ぼす可能性がある。ケース・コントロールを SLE 患者に限定することで、基礎疾患の遺伝的背景を排除した状態で GWAS を行い、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。有望な SNP と ONFH の真の相関の有無を検証するため、昨年班会議にて、検体の追加収集をお願いした。その結果、SLE で ONFH 発生患者・非発生患者合わせて 390 例を提供いただいた。今後、GWAS を行い、疾患感受性遺伝子を同定する。

## 7. 謝辞

本研究に御協力頂いております先生方に、この場を借りて深くお礼を申し上げます。

## 8. 研究発表

- 論文発表  
なし
- 学会発表  
1) なし

## 9. 知的所有権の取得状況

- 特許の取得  
なし
- 実用新案登録  
なし
- その他  
なし

## 10. 参考文献

- Miyanishi K, Yamamoto T, Iriya 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
- Hamada M, Nakamura M, Tran MT, Moriguchi T, Hong C, Ohsumi T, Dinh TT, Kusakabe M, Hattori M, Katsumata T, Arai S, Nakashima K, Kudo T, Kuroda E, Wu CH, Kao PH, Sakai M, Shimano H, Miyazaki T, Tontonoz P, Takahashi S. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. *Nat Commun*. 2014; 5: 3147
- 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.
- 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

- 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