

学位の種類	博士	氏名	大森 博之
-------	----	----	-------

学位論文題目

Linkage and association analyses of osteoprotegerin gene locus to human osteoporosis
(骨粗鬆症におけるオステオプロテジェリン遺伝子の関与 -連鎖解析と相関解析による検討-)

共著者名 蒔田芳男、船水真紀子、廣岡憲造、細井孝之、折茂肇、鈴木隆雄、猪狩勝則、中島敏晶、井ノ上逸朗、羽田明 と共著

印刷公表の方法及び時期 Journal of Human Genetics 平成 14 年掲載予定

研究目的

骨粗鬆症は、生活習慣や加齢に伴うホルモンバランスの変化などの環境要因と複数の遺伝的要因により、主に中年期以降に発症する多因子疾患である。遺伝的要因の存在は、ふたご研究などから明らかであるが、具体的な原因遺伝子は、ほとんどわかっていないのが現状である。これまでに、ビタミン D 受容体、I 型コラーゲン、エストロゲン受容体、IL-6、カルシトニン、カルシトニン受容体などの遺伝子の関与が報告されているが、最終的な結論は得られていない。オステオプロテジェリン(OPG)は TNF 受容体のスーパーファミリーに属する骨芽細胞由来の分泌型タンパクである。トランスジェニックマウスで過剰発現させると骨密度の上昇を示す一方、ノックアウトマウスでは早期に重篤な骨粗鬆症像を呈する。また閉経後骨粗鬆症のモデルである卵巣摘除ラットに OPG タンパクを投与すると骨量低下が抑えられる。これらの知見より OPG は閉経後骨粗鬆症の重要な候補遺伝子の一つと考えられる。本研究の目的は、現時点でヒトを対象とした多因子疾患の遺伝子研究では最も有用であると考えられている、同胞対による連鎖解析と、閉経後女性集団を対象とした相関解析をおこない、OPG 遺伝子の関与の有無を明らかにすることである。

材料・方法

以下の検体は全て研究内容について説明し、同意を得た上で使用した。

連鎖解析: 閉経後女性の 164 同胞対(131 家系 283 名)を、日本骨代謝学会の診断基準(1996)に従って、罹患同胞対、罹患および非罹患の同胞対、非罹患同胞対の 3 群に分類した。マイクロサテライト DNA 多型として CA リピートを 2 種類(OPG1, OPG2)、OPG 遺伝子領域から単離同定し、使用した。多型タイピングは、血液検体から得られたゲノム DNA を蛍光ラベルプライマーで増幅し、ABI 377DNA シークエンサーと GeneScan Analysis software および Genotyper program を使っておこなった。連鎖解析は SIBPAL プログラム(SAGE package)を使用した。罹患同胞対と非罹患同胞対においてはアレル共有が 0.5 を越える場合、罹患および非罹患の同胞対においてはアレル共有が 0.5 を下回る場合を連鎖ありと見なした。

相関解析: 閉経後女性 394 人を対象とした。骨密度(bone mineral density: BMD)は年齢と body mass index(BMI)で補正し(adjBMD)、遺伝子型群による adjBMD 値の差の比較(t-test, Mann-Whitney U test)をおこなった。一塩基多型(SNPs)はゲノムデータベースから得られた OPG 遺伝子領域の塩基配列情報を基に、10 人の DNA(20 アレル)をシークエンスし、アレル頻度 5%以上の多型を解析に用いた。遺伝子タイピングは ARMS 法(amplification refractory mutation system)、SSCP 法(single strand conformation polymorphism analysis)、ダイレクトシークエンス法を適宜、使い分けた。検出された SNPs のうち、転写活性への影響が推測される 5'上流域(SNP1)とエクソン 1 にあるシグナルペプチドをコードしている部位(SNP2)の 2 種類について、遺伝子型を決定した。

ハプロタイプ解析：一般集団 48 名を対象に、6SNPs タイピングをおこない、ハプロタイプの推定と連鎖不平衡(LD :linkage disequilibrium)の強さを Arlequin software で解析した。

成績

OPG1 と OPG2 の CA リピート回数はそれぞれ 16-23, 15-21 回であった。ヘテロである頻度は OPG1 で 80.1%, OPG2 で 53.7%であった。非罹患同胞対, 罹患および非罹患の同胞対, 罹患同胞対におけるアレル共有頻度を比較した結果, 有意な連鎖は認められなかった。一方, SNPs 検索の結果, SNP1, SNP2 以外にイントロン 2 の 2 カ所(SNP3, SNP4), イントロン 3 の 2 カ所(SNP5, SNP6)の合計 6 つの多型を見いだした。SNP1 は翻訳開始点から 223 塩基上流で T/C, SNP2 は翻訳開始点から 9 番目の G/C で Lys→Asn のアミノ酸置換を伴う。6 SNPs から一般集団のハプロタイプ頻度を推定すると, 頻度の高い 4 ハプロタイプで全体の 71%を占めることが分かった。SNP1 および SNP2 の遺伝子型による群間で adjBMD 値を比較した結果, SNP1 の TC+CC 群は TT 群に比べて adjBMD 値が有意に高いことがわかった。これは C アレルをもつと骨密度が高い, すなわち骨粗鬆症になりにくいことを示している。

考案

相関解析では SNP1 の遺伝子型が骨密度に有意に影響していることが示された。SNP1 がプロモーター部位に位置することから, 塩基置換によるプロモーター活性への影響が考えられるが, 今回はプロモーターアッセイをおこなっていないため, 今後の検討が必要である。シグナルペプチド領域の多型である SNP2 はアミノ酸置換を引き起こす。Lys は塩基性アミノ酸であり, Asn は非荷電極性アミノ酸に属する。OPG は分泌蛋白であり, シグナルペプチド内の塩基性アミノ酸の置換が分泌動態に影響を与えることが予想されたが, 相関解析では有意差を認めなかった。6 SNPs によりハプロタイプ解析をしてみると, 頻度の高い上位 4 つで全体の 71%を占め, 6 SNPs 間にかなり強い LD が存在することが明らかになった。

今回の検討において, 同胞対による連鎖解析では有意な結果を得ることができなかった。疾患の家系内集積の度合いは, その疾患発端者の同胞 S の危険率と集団の危険率との比である λ_s で表される。 $\lambda_s=3$ の場合, すなわち 3 倍の危険率である場合, 統計学的検出力 80%を得るには 100 同胞対が必要である。今回, 有意な結果を得られなかった原因として, λ_s が 3 よりも小さい, 解析した同胞対数では十分な検出力が得られないなどの可能性も考えられ, OPG が骨粗鬆症の感受性遺伝子であることを必ずしも否定するものではない。

OPG 欠損マウスでは生後早期に腎動脈, 大動脈など大血管に著しい石灰化を生じること, 血清 OPG 蛋白レベルは糖尿病, 心血管系疾患の死亡率との相関が報告されていること, OPG の発現は骨にとどまらず, 心, 肺, 腎, 胎盤, 肝, 甲状腺, 脊髄, 脳のほか, 免疫, 造血系組織にも認められることなどから, OPG 遺伝子は骨粗鬆症以外の疾患でも何らかの関与をしている可能性があると思われる。本研究で解析したハプロタイプ情報は他の疾患における OPG 遺伝子の関与を検討する上でも有用である。

結論

- OPG 遺伝子 5'上流の SNP では C アレルを持つことが骨量減少に対して, 予防的に作用していることが分かった。
- OPG 遺伝子領域に 6 SNPs を見いだした。ハプロタイプ解析の結果, 頻度の高い上位 4 ハプロタイプが全体の 71%を占めることが分かった。
- OPG 遺伝子のエクソン 1 のシグナルペプチドをコードする領域にアミノ酸置換を伴う多型が検出されたが, 相関解析では骨密度への影響は示されなかった。
- 同胞対解析の結果, OPG と骨粗鬆症の連鎖は示されなかった。




引用文献

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Amgen EST Program, Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309-319

Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H (1998) Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor / osteoprotegerin. *Biochem Biophys Res Commun* 247: 610-615

Hofbauer LC (1999) Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 141: 195-210

学位論文の審査結果の要旨

報告番号	第 号		
学位の種類	博士（医学）	氏 名	大森 博之
審査委員長 松野 丈夫 			
審査委員 羽田 明 			
審査委員 片桐 一 			
学位論文題目 Linkage and association analyses of osteoprotegerin gene locus to human osteoporosis (骨粗鬆症におけるオステオプロテジェリン遺伝子の関与 -連鎖 解析と相関解析による検討-)			
骨粗鬆症は多因子疾患であり、遺伝要因について具体的な原因遺伝子は最終的な結論に至っていない。 オステオプロテジェリン(OPG)は TNF 受容体のスーパーファミリーに属する骨芽細胞由来の分泌型タンパクである。トランスジェニックマウスで過剰発現させると骨密度の上昇を示す一方、ノックアウトマウスでは早期に重篤な骨粗鬆症像を呈する。また閉経後骨粗鬆症のモデルである卵巣摘除ラットに OPG タンパクを投与すると骨量低下を抑える。以上より OPG は閉経後骨粗鬆症の重要な候補遺伝子の一つと考えられる。 本研究の目的は、同胞対による連鎖解析と閉経後女性集団を対象とした相関解析をおこない、OPG 遺伝子の関与の有無を明らかにすることである。連鎖解析は閉経後女性の 164 同胞対を対象に罹患同胞対、罹患および非罹患の同胞対、非罹患同胞対の 3 群に分類し、マイクロサテライト DNA 多型 2 種類を用いて施行した。3 群におけるアレル共有頻度を比較した結果、有意な連鎖は認められなかった。相関解析は閉経後女性 394 人を対象に年齢と BMI で補正した骨密度を遺伝子型群間で比較した。OPG 遺伝子領域から一塩基多型 6 座位検出した。			

そのうち、転写活性への影響が推測されるプロモーター領域とエクソン1内のシグナルペプチドをコードしている部位の2多型について遺伝子型を決定した。前者は翻訳開始点から223塩基上流でTとCアレルを持ち、後者は翻訳開始点から9番目のGとCアレルを持ち、その結果リジンからアスパラギンのアミノ酸置換を伴う。相関解析の結果、プロモーター領域多型のTC群とCC群を合わせた群はTT群に比べて補正後骨密度が有意に高いことがわかった。これは同領域にCアレルを持つと骨密度が高い、即ち骨粗鬆症になりにくいことを示唆している。

本研究では、OPG遺伝子の多型と閉経後骨粗鬆症の相関を証明した点で意義深く、優れた論文である。

なお、各審査委員は論文提出者に試問を行い、本論文の内容およびその関連分野について適格な解答を得た。以上より、本審査委員は本論文が医学博士の学位論文に値するものと判定した。