

機関番号：17102  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20390264  
 研究課題名（和文） 骨粗鬆症コホート集団の高密度 SNP 解析による骨密度規定遺伝子群の  
 同定と機能解析  
 研究課題名（英文） Investigation of the genes associated with bone mineral density  
 by high-density SNP chip analysis in a large cohort study  
 研究代表者  
 高柳 涼一（TAKAYANAGI RYOICHI）  
 九州大学・大学院医学研究院・教授  
 研究者番号：30154917

## 研究成果の概要（和文）：

福岡市東区在住の女性（50～74歳）を対象に骨密度検診を施行した「福岡骨粗鬆症コホート」の中で、骨密度に影響する因子（薬剤内服、骨代謝に影響する疾患、異常な婦人科疾患既往歴）を有する者を除き、年齢、BMI で補正した骨密度の分布上下位者について、高密度 SNP チップ（Illumina 社）を用いた全ゲノム関連解析（GWAS）を行い、骨密度を規定する日本人に特異的な遺伝子の網羅的同定を施行し、複数の候補遺伝子を見いだした。

## 研究成果の概要（英文）：

To explore candidate genes associated with bone mineral density (BMD) of Japanese women, we performed a genome-wide association study (GWAS) in a large community-based cohort. The study subjects were postmenopausal women without taking any drugs, having any diseases or gynecological history. The GWAS and the following analyses uncovered several candidate genes to be associated with BMD in Japanese women.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、内分泌学

キーワード：骨密度、遺伝子多型、骨粗鬆症、コホート

## 1. 研究開始当初の背景

社会の急速な高齢化にともないわが国における骨粗鬆症の患者数は 1000 万人を越え、さらに増加し続けると推定されている。骨粗鬆症をベースとした転倒・骨折はわが国における「寝たきり」の原因として脳血管障害、老衰について第 3 位であり、高齢化に伴い今

後さらに増加することが予想される。「骨粗鬆症をベースとした骨折」の予防は高齢者の健康ならびに QOL の維持、また医療費抑制の観点からも非常に重要な課題である。

骨粗鬆症の大部分を占める閉経後骨粗鬆症の最大原因は加齢に伴う閉経であるが、すべての女性が閉経後骨粗鬆症を発症するわ

けではなく、個人差が存在することが疫学的研究でも明らかにされている。わが国の「骨粗鬆症の予防と治療のガイドライン 2006 年度版」や WHO が策定した骨折リスク予測プログラム (FRAX) でも大腿骨頸部骨折の家族歴が取り上げられており、骨粗鬆症をベースとした骨折には遺伝素因が明白に存在すると考えられている。骨密度や骨折に關与する遺伝子の検索は、過去十数年間、骨代謝に關係のある個々の遺伝子についてその遺伝子多型 (SNP) と骨密度、骨折との相関が統計的に検討されてきた。骨粗鬆症は、栄養、成長歴、日光暴露などの生活習慣が關与することもこれまでの疫学調査から明らかとなっており、その発症に遺伝素因と生活習慣が關与する生活習慣病と現在、とらえられている。従って、骨粗鬆症発症の効果的予防と治療法の確立のためには骨粗鬆症発症に關与する遺伝素因と生活習慣の両方の研究、さらに両者がいかに相互影響するかを明らかにしなければならない。即ち、骨粗鬆症発症に關与するヒトのゲノムの網羅的解析と生活習慣因子の影響研究が必須である。

## 2. 研究の目的

他の生活習慣病と同様に、骨粗鬆症もその遺伝素因に人種差が存在する。本研究では「福岡骨粗鬆症コホート」に参加した対象者の骨密度を規定する遺伝子を、高密度 SNP チップを用いた全ゲノムスキャンにより網羅的に解析して同定することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 福岡骨粗鬆症コホートの構築と研究の対象者：

「大規模コホートに基づく生活習慣病研究教育」のゲノム疫学コホートの部分研究として、福岡市東区に在住する 50~74 歳の女性を対象に骨密度検診を行い、受診女性約 4,000 名からなる「福岡骨粗鬆症コホート」を構築した。

この中で、次の基準を満たしたものを対象者とした。すなわち、1) 閉経後 5 年以上の女

性、2) Body mass index (BMI) が 16~28、3) 以下の除外条件に該当しないもの、関節リウマチなどの膠原病、内分泌疾患 (糖尿病、甲状腺疾患、副甲状腺疾患)、悪性腫瘍、重症の肝疾患、腎不全など、骨代謝に影響する薬剤を服用中 (ビスフォスフォネート、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM)、活性型ビタミン D3、ビタミン K2、ステロイド、女性ホルモン、ワーファリンなど)、異常な婦人科疾患既往歴 (卵巣切除など)、骨密度は年齢、BMI の影響が大きいため、骨密度と年齢、BMI の相関式を算出した。これを基に年齢、BMI を補正した骨密度の分布より、上位 150 名 (高骨密度群)、下位 150 名 (低骨密度群) を選別した。

(2) 高密度 SNP チップによる全ゲノム関連解析

タイピングプラットフォーム・チップとして Illumina 社 HumanCNV370-Duo BeadChip を用いて、高骨密度群、低骨密度群について全ゲノム関連解析を行う。1 次スクリーニングにて allelic test で P 値が低い順に 1,000~2,000 個の SNP を選別する。1 次スクリーニングで残った中間の骨密度を有する対象者について 2 次スクリーニングを施行する。統計学的有意水準を認めた SNP について 1 次と 2 次スクリーニングの結果を統合して Linear regression 解析を行い、有意水準を満たす SNP を探索する。なお骨密度検診受診者に対するゲノム DNA 採取と遺伝子解析については十分な説明の後、文書にて同意を取得する。

(3) 他の GAWS で報告されている SNP との比較検討：

欧米人を対象とした 2 つの大規模な GWAS の研究にて報告されている複数の関連遺伝子について、本研究のコホート集団の対象者において骨密度との関連を解析する。

(4) 骨組織での発現解析：

上記のスクリーニングで見いだされた SNP に關連する遺伝子については、その発現を骨組織 (骨芽細胞、破骨細胞、骨組織など) で遺伝子レベルや蛋白レベルで検討する。

(5) 同定された SNP と骨密度の経時的変化の関連：

骨密度の経時的測定を行った対象者について、骨密度の変化量と SNP との関連を他の生活習慣関連因子で調整して解析する。

#### 4 . 研究の結果

(1) 対象者の骨密度：

対象者の腰椎骨密度 (L2-L4) は年齢、閉経後年数とは負の相関を、BMI、大腿骨頸部、全大腿骨の骨密度と正の相関を認めた。年齢、BMI にて調整した腰椎骨密度 (L2-L4) の上位 150 名 (高骨密度群)、下位 150 名 (低骨密度群) を選び、1 次解析の対象とした。両群の対象者の平均年齢は約 66 歳で、BMI は 22、閉経後年数は平均 15 年で、両群間に有意差を認めなかった。腰椎骨密度 (L2-L4) の平均は高骨密度群 1.048(g/cm<sup>2</sup>)、低骨密度群 0.615(g/cm<sup>2</sup>) であった。大腿骨頸部、全大腿骨の骨密度も両群で有意差を認めた。

(2) 高密度 SNP チップによる全ゲノム関連解析：

高骨密度群と低骨密度群を対象とし、高密度 SNP チップを用いた全ゲノム解析により、1 次スクリーニングを行い、allelic test において P 値の低い順に約 1,500 個の SNP を選別した。1 次スクリーニングで残った中間の骨密度を有する対象者 (中間群) においてこの 1,500 個の SNP について 2 次スクリーニングを施行したところ、60 個の SNP が統計学的に有意であった。この 60 個の SNP について 1 次スクリーニングと 2 次スクリーニングの検体を合計した Linear regression 解析を行い、8 個の SNP について  $P < 1 \times 10^{-4}$

表1. スクリーニングの結果

SNP No.	Chromosome	Combined P value	Effect size
1	6	$2.1 \times 10^{-6}$	-0.023
2	7	$4.9 \times 10^{-6}$	0.022
3	21	$4.8 \times 10^{-5}$	0.024
4	2	$6.2 \times 10^{-6}$	-0.020
5	1	$7.6 \times 10^{-5}$	0.020
6	3	$8.3 \times 10^{-5}$	0.019
7	1	$8.4 \times 10^{-5}$	0.021
8	16	$9.1 \times 10^{-5}$	-0.023

の有意差を認めた。最も P 値の低かったものは第 6 染色体上に位置した (表 1)。

(3) スクリーニングで見いだされた SNP 並びに他の GAWs で報告されている SNP の比較検討：

欧米人を対象とした 2 つの大規模な GWAS の研究 (Lancet 2008、N Eng J Med 2008) にて報告された 5 つの遺伝子について、本コホートの対象者においても骨密度との関連を比較検討した。上記 SNP のうち、RANKL および osteoprotegerin については本コホートの閉経後日本人女性においても骨密度と非常に強い関連を認めたと、一方で他の遺伝子については関連が弱い、もしくは有意な関連が認められず、日本人と欧米人では遺伝的差異が大きいことが示唆された。

(4) 骨組織での発現解析：

上記のスクリーニングで見いだされた 8 個の SNP に関連する遺伝子について骨組織での発現解析をおこなったところ、複数の遺伝子で発現が認められた。

(5) 同定された SNP と骨密度の経時的変化の関連：

骨密度の経時的測定を行った対象者 1,120 名について骨密度の変化量と SNP との関連を解析したところ、他の生活習慣関連因子と独立して骨密度の減少と関連する遺伝子を認めた。

今後は他の集団での検証が必要と考えられた。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Takayanagi R, Inoguchi T, Ohnaka K. Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. J Clin Biochem Nutr 48(1):72-77, 2011. 査読有

Gushima M, Kawate H, Ohnaka K, Nomura M, Takayanagi R. Raloxifene induces nucleolar translocation of the estrogen receptor. Mol Cell Endocrinol 319(1-2): 14-22, 2010 査読有

Kawate H, Ohnaka K, Adachi M, Kono S, Ikematsu H, Matsuo H, Higuchi K, Takayama T, Takayanagi R. Alendronate improves QOL of postmenopausal women with osteoporosis. Clin Interv Aging 5:123-131, 2010 査読有

Ohnaka K, Kono S, Inoguchi T, Yin G, Morita M, Adachi M, Kawate H, Takayanagi R. Inverse associations of serum bilirubin with C-reactive protein, glycosylated hemoglobin, and prevalence of diabetes mellitus in middle-aged and elderly Japanese men and women. Diabetes Res Clin Pract 88(1): 103-110, 2010 査読有

Takeuchi F, Isono M, Katsuya T, Yamamoto K, Yokota M, Sugiyama T, Nabika T, Fujioka A, Ohnaka K, Asano H, Yamori Y, Yamaguchi S, Kobayashi S, Takayanagi R, Ogihara T, Kato N. Blood pressure and hypertension are associated with 7 loci in the Japanese population. Circulation 121(21):2302-2309, 2010 査読有

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 9(3): 304-309, 2009. 査読有

大中佳三 日本人の骨密度関連遺伝子の網羅的解析：福岡骨粗鬆症コホート研究．日本老年医学会雑誌 46(2): 114-116, 2009 査読有

大中佳三、高柳涼一．アンドロゲン、エストロゲンと骨代謝マーカー．CLINICAL CALCIUM 19(8): 1118-1124, 2009 査読有

高柳涼一、大中佳三．閉経後のステロイド性骨粗鬆症に対するラロキシフェンとビスフォスフォネートの臨床効果の比較．Osteoporosis Japan 16(4): 298-301, 2008 査読有

〔学会発表〕(計5件)

Ryoichi Takayanagi, Toyoshi Inoguchi, Keizo Ohnaka. Clinical and experimental evidence for oxidative stress as an exacerbating factor of diabetes mellitus. International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine, Kyoto, 2011年1月22日

古野純典、高柳涼一、大中佳三．九州大学福岡コホートの展望 第21回日本疫学会学術集会 2011年1月21日

大中佳三．シンポジウム「酸化ストレスと抗酸化システム」-「ビリルビンの抗酸化作用と生活習慣病」 第63回日本栄養・食糧学会大会 2009年5月20日、長崎

大中佳三、河手久弥、高柳涼一．Wntシグナル関連遺伝子の一塩基多型(SNPs)と骨密度の相関解析．第25回日本骨代謝学会 2008年10月29日、大阪．

大中佳三．「日本人の骨密度関連遺伝子の網羅的解析(高密度 SNP): 福岡骨粗鬆症コホート研究」 第50回日本老年医学会学術総会 - シンポジウム「骨粗鬆症と変形性関節症: 研究と診療の最前線」 2008年6月21日、千葉．

〔図書〕(計1件)

大中佳三．副甲状腺疾患．新老年学 第3版(大内尉義・秋山弘子編) 東京大学出版会 1050-1059, 2010

## 6．研究組織

### (1) 研究代表者

高柳 涼一 (TAKAYANAGI RYOICHI)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：30154917

### (2) 連携研究者

大中 佳三 (OHNAKA KEIZO)  
九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：30325518

山本 健 (YAMAMOTO KEN)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：60274528