

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：13701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890074

研究課題名（和文） 骨粗鬆症に及ぼすヘパラン硫酸の役割の解明

研究課題名（英文） The role of heparan sulfate in osteoporosis.

研究代表者

瀧上 伊織 (TAKIGAMI IORI)

岐阜大学医学部附属病院・医員

研究者番号：90610410

研究成果の概要（和文）：ヘパラン硫酸合成酵素異常を有する遺伝性多発性外骨腫症患者の骨粗鬆症スクリーニングを行った結果、健常成人よりも骨減少傾向を示していることが明らかとなった。血液生化学的検査では活性化ビタミンD値の軽度高値を認め、その他骨代謝に関係する数値には明らかな異常は認めなかった。採取、抽出したゲノムDNAの解析結果では遺伝子異常の部位および型は様々であった。骨量減少と遺伝子異常との間には明らかな関連性は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：The screening for osteoporosis of hereditary multiple exostosis patients initiated osteopenia compare with healthy adults. The analysis of genomic DNA revealed that osteopenia occurs regardless of its type of gene mutation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1200000	360000	1560000
2012年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	2300000	690000	2990000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：骨粗鬆症、ヘパラン硫酸、遺伝性多発性外骨腫症、ゲノムDNA

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝性多発性外骨腫症は、常染色体優性遺伝性疾患であり、長管骨の骨幹端部に多発する骨腫瘍を特徴とする。その原因遺伝子はヘパラン硫酸合成酵素遺伝子である *EXT1* 及び *EXT2* であることが McComick らによって発見され、近年では、ヘパラン硫酸が骨形成機能に関与していることも明らかになってきた。しかし、ヘパラン硫酸合成酵素遺伝子の異常が本疾患における骨腫瘍の発生や骨変

形にどのように関与しているか等、それらの機序については全く不明のままである。われわれの研究室では、ヘパラン硫酸合成酵素遺伝子の異常に着目し、その解析を目的とする遺伝性多発性外骨腫症のモデルマウスを世界で初めて作製した。このモデルマウスでの実験解析において、同遺伝子異常が若年性の骨粗鬆症をも引き起こすことを突き止めた。そこで、この知見をヒトについても立証すれば、ヒトの骨粗鬆症に関する新たな機序を解

明でき、創薬への重要な手がかりが得られると予測した。

## 2. 研究の目的

本研究は、その予測を臨床医学的に立証するために

- (1) 遺伝性多発性外骨腫症患者のスクリーニングを行い、骨粗鬆症の頻度、病態を明らかにする。
- (2) 患者のゲノム DNA を解析し、遺伝子変異と骨粗鬆症との相関関係を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 遺伝性多発性外骨腫症患者の骨粗鬆症スクリーニング

平成 22 年 9 月に岐阜大学整形外科は日本で初めて遺伝性多発性外骨腫症専門外来を開設した。比較的稀である本症患者を全国より集約し、治療拠点として機能している。本研究は専門外来に受診した患者に対し、書面でインフォームドコンセントを行ったものを対象としサンプルを採取した。

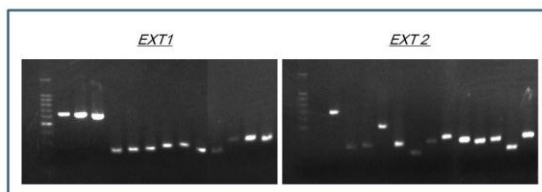
①骨量測定：二重エネルギー X 線吸収測定法 (dual-energy X-ray absorptiometry) にて腰椎及び大腿骨頸部の骨量を測定した。骨粗鬆症の判定は WHO の診断基準に準じて行った。

②血液生化学的検査：カルシウム代謝に関係する Ca、P、活性型ビタミン D、副甲状腺ホルモン (PTH) -C 末端および、骨形成マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ (BAP)、オステオカルシン、骨吸収マーカーとして NTX (I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド) を測定した。

(2) ゲノム DNA の採取：患者の末梢白血球からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA ライブラリーを構築した。

(3) 遺伝子異常と骨粗鬆症との関連性の説明：抽出されたゲノム DNA を用い、EXT1、EXT2 遺伝子の intron/exon 境界領域を含めて全 exon に対してプライマーをデザインし、polymerase-chain reaction (PCR) 法で増幅し (下図) EXT1、EXT2 遺伝子の全 exon のシーケンス解析を行った。

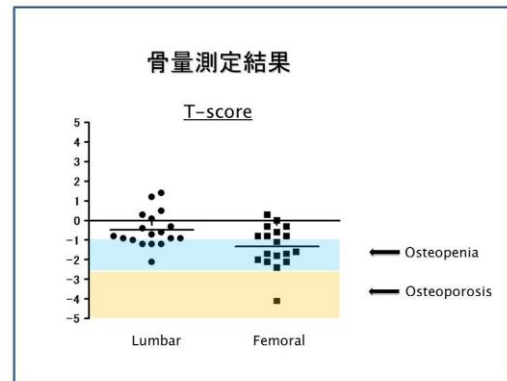
シーケンス後、データベースと照らし合わせ詳細に解析し、遺伝子変異とその型が骨量測定、血液生化学検査とどのような相関関係にあるかを検討した。



## 4. 研究成果

18 例の患者の骨量測定、血液生化学的検査による骨粗鬆症スクリーニング及び末梢白血球からのゲノム DNA の抽出が終了した。

(1) 二重エネルギー X 線吸収測定法 (dual-energy X-ray absorptiometry) による骨量測定では、腰椎および大腿骨頸部双方において健常成人よりも骨減少傾向を示していることが明らかとなった (下図)。



(2) 血液生化学的検査では活性化ビタミン D 値が軽度高値を認めた。

その他のカルシウム代謝に関連する Ca、P、副甲状腺ホルモン (PTH) -C 末端および、骨形成マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ値、オステオカルシン、骨吸収マーカーである NTX (I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド) の値には明らかな異常は認めなかった (下図)。

検査項目	平均値(基準値)
Cre	0.68 mg/dl (0.4-0.8)
ALP	186.2 IU/L (130-330)
Ca	9.1 mg/dl (8.2-10.2)
P	3.52 mg/dl (2.6-4.5)
25-(OH)2 D3	24.75 ng/ml (7-41)
1, 25-(OH)2 D3	69.84 pg/ml (20-60)
PTH-C	0.36 ng (<0.5)
Osteocalcin	5.33 ng/ml (2.5-13)

(3) ゲノム DNA の抽出は末梢血白血球より液相分離法にて行い解析した。

	Gender	Age			
1	F	45	EXT1 Exon6	T488~	フレームシフト (1ntΔ)
2	M	33	EXT1 Exon6	T490~	フレームシフト (1ntΔ)
3	M	53	EXT1 Exon5	R433~	フレームシフト (2ntΔ)
4	F	30	EXT1 Exon1	Q27X	ナンセンス
5	F	29	EXT1 Exon1	Q27X	ナンセンス
6	M	43	-	-	-
7	M	39	-	-	-
8	F	36	EXT1 Exon8	F550~	フレームシフト (1ntΔ)
9	M	38	EXT1 Exon2	R340H	ミスセンス
10	F	30	-	-	-
11	M	42	-	-	-
12	M	41	EXT2 Exon5	V282~	挿入
13	F	34	-	-	-
14	F	38	-	-	-
15	F	43	EXT1 Exon1	E74X	ナンセンス
16	M	43	検査中		
17	M	29	検査中		
18	M	45	検査中		

- : 未検出

解析の結果、遺伝子異常は8例は *EXT1* に、1例は *EXT2* にみられ、6例では未検出であった (3例は現在検査中)。遺伝子異常の部位および型は様々であった。骨量減少と遺伝子異常との間には現時点で明らかな関連性は認められていない。今後さらに症例を重ね、解析を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

Satoshi Nozawa, Fumitoshi Irie, Kazu Matsumoto, Iori Takigami, Yu Yamaguchi  
Targeted Disruption of Heparan Sulfate in Osteoblasts Leads to a Severe Osteoporotic Phenotype in

Mice

Orthopaedic Research Society 2013

2013年01月26日~2013

年01月29日

San Antonio, Texas, USA

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧上 伊織 (TAKIGAMI IORI)

岐阜大学 医学部附属病院 医員

研究者番号 : 90610410

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :