

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24年 5月28日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390417

研究課題名（和文） 網羅的同定を目指した変形性膝関節症感受性遺伝子の解明

研究課題名（英文） Genetic analysis of susceptibility genes for osteoarthritis of the knee joint

研究代表者

馬淵 昭彦 (MABUCHI AKIHIKO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80312312

研究成果の概要（和文）：変形性関節症の感受性遺伝子の同定のため、*EPAS1* と *MMP13* を候補遺伝子として関連解析を行った。板橋と美山の二つのコホートから患者 475 名、対照 563 名を選択し、解析方法は RFLP 法と TaqMan 法を用いた。*EPAS1* の rs1703192 と *MMP13* の rs2252070 の二つの SNP で関連があった。板橋コホートでは、rs1703192 がアレルモデル (χ^2 検定 $p=0.018$) と劣性モデル ($p=0.031$) で関連があり、二つのコホートを併せて解析すると、rs1703192 では、アレルモデル ($p=0.013$) と劣性モデル ($p=0.018$) で、rs2252070 では、劣性モデル ($p=0.039$) で関連があった。

研究成果の概要（英文）：To investigate the underlying genetic variants in *EPAS1* and *MMP13* in osteoarthritis, we conducted a case-control association study in Japanese population. 475 patients and 563 health individuals from two areas (Itabashi and Miyama) of Japan were genotyped using restriction fragment length polymorphism and TaqMan SNP Genotyping Assays. The allele frequencies of rs1703192 in *EPAS1* and rs2252070 in *MMP13* were significantly different between knee osteoarthritis patients and healthy controls. In Itabashi cohort analysis, rs1703192 was associated with knee osteoarthritis under allelic (χ^2 test: $p=0.018$) and recessive model ($p=0.031$). In the cohorts-combined analysis, the associations were observed in rs1703192 under allelic ($p=0.013$) and recessive ($p=0.018$) models, and in rs2252070 under recessive model ($p=0.039$).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科

キーワード：変形性関節症

1. 研究開始当初の背景

骨関節加齢性疾患は、超高齢社会を迎えた我が国において、国民の有訴症状第1位の疾患(厚生労働省平成16年国民生活基礎調査)で、介護保険要支援原因疾患の1/3以上を占めている(同平成16年度国民健康調査)。その中で変形性関節症は、多くの高齢者が罹患するにも拘らず、発症メカニズムの詳細は未解明であり、本質的な根本療法は存在しない。本疾患はいわゆる多因子性疾患で、発症には環境要因と遺伝的素因の両者の関与が考えられているが、その系統的・統合的な研究はこれまで行われてこなかった。

変形性関節症に関して申請者らは、その発症に関わる原因遺伝子として、*COL9A3*、*Asporin*、*CALMI*、*GDF5*などを同定し報告してきた。この4つの変形性関節症感受性遺伝子は、いずれも発症リスクを上昇させ、病勢の進展に関与していると考えられる。しかながらこれらは、変形性関節症の遺伝的要因のごく一部を説明しているに過ぎない。というのも申請者らによるこれらの研究で解明された遺伝子には、1) 疾患集団におけるアレル頻度が低い場合がある、2) 感受性多型のオッズ比が低い、3) アジア人と欧米人では、オッズ比が大きく異なる。4) 治療に結びつく具体的な解決策が未提供、という大きな問題が存在する。

近年、多因子性疾患を対象に感受性遺伝子を同定しようとする試みが盛んに行われ、SNPを多数搭載するマイクロチップを用いたゲノムワイド関連解析の報告が相次いでいるが、その大半は単純に疾患の有無による大まかな区分に基づいた検討によるもので、検体数を確保するため診断基準を緩く設定したり、遺伝的に別個の疾患・病態を同一範疇に入れるなどの問題があるため、多額の費用が無駄となったり貴重な臨床検体を浪費してしまうことがおこりがちであった。変形性関節症でも、最近 Spector らは、*LRCHI* のイントロン1内の SNP との関連を報告した(Spector TD et al. Arthritis Rheum 54:524, 2006)が、その後複数の論文により、その関連は否定された。また、疾患特性に基づく解析上の工夫や臨床遺伝疫学に立脚した効率的な手法もほとんど用いられて来なかった。解析対象の無駄を省くには、家族集積性や遺伝性の情報に基づく対象検体の絞込みにより効率化を図ることが重要である。

2. 研究の目的

詳細な臨床情報により層別化・階層化することで背景因子を平均化させる。既に、申請

者らは、関連解析を実施し、変形性関節症の遺伝的負荷を有するゲノム検体を解析する。具体的には、*SOX9*、*Runx2*、*Lrp-5*、*COL2A1*、*IGF-I*、*PPAR γ* 、*Fos B*、*delta-Fos B*、*fra-1*、*Akt-1*、 β -catenin、*C/EBP- α* 、*C/EBP- β* 、*C/EBP- δ* 、*EPAS1*、*Osteocalcin*、*Osteopontin*、*Osterix*、*MMP-13*、*RANKL*、*Osteoprotegerin*などを対象としこれらの遺伝子領域に存在する SNP に関して関連解析を行い、変形性関節症感受性遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

関連解析では、日本人膝変形性関節症患者と健常者を研究代表者らが構築しているコホートから選出した。本解析では、このコホート研究参加者の膝レ線写真をもとに、変形性関節症を有するもの475名(患者群)と健常者563名(対照群)を選出した。尚、対照としたコホートは、板橋コホートと美山コホートとした。

上記20余の遺伝子に存在する SNP を選定したが特に機能解析の結果から、特に *EPAS1* と *MMP13* に注目し、minor allele frequency (MAF) が0.1以上となるものと機能的な重要性からミスセンス SNP を選出、*EPAS1* 領域では、4つの SNP を *MMP13* 領域では、2つの SNP を解析した。

SNP の解析では、TaqMan assay を用いたジェノタイピングを行ったが、*EPAS1* 領域の rs17039192 では、TaqMan プロブがデザインが不可能であったため、PCR-Restriction

fragment length polymorphism (RFLP)

法を用いたジェノタイピングを行った。

PCR-RFLP 法では、

EPAS1_e1_P2RFLP1:CCGACGGAGTTTTTAAAGTGG

および

EPAS1_e1_P2RFLP1:GCTGTCAGACCCGAAAAGAG を

用いて PCR(断片長 294 bp)を行い、得られた PCR 産物を *Ban I* で切断、2%アガロースゲルでの電気泳動により遺伝子型を決定した。

関連解析では、遺伝子型、アレル、優性、劣性の4つのモデルに関して、 χ^2 検定を用いた関連解析を行った。

4. 研究成果

まず、板橋コホートから、レ線上変形性膝関節症が存在する患者283名と対照群371名を抽出、*EPAS1*に関しては4つの SNP を、*MMP13*に関しては2つの SNP について遺伝子型を決定した。対照群におけるハーディーワイベル

グ平衡の検定では、いずれも有意ではなかった。また MAF は全て 0.1 以上であった(表 1)。

表 1 Minor allele frequencies と HWE.

SNPs	Physical position	Gene Location	Itabashi		Miyama		Combined	
			Control n=371	Case n=283	Control n=192	Case n=563	Case n=475	
rs17039192	25346517*	<i>EPAS1</i> exon 1	Call rate 100%	99.5%	100.0%	99.5%	100%	99.7%
			MAF 0.169	0.114	0.130	0.107	0.152	0.111
			HWE p-value 0.177		0.424		0.486	
rs1867787	25347328*	<i>EPAS1</i> intron 1	Call rate 99.2%	99.5%	97.9%	100.0%	99.3%	99.8%
			MAF 0.284	0.298	0.381	0.391	0.326	0.342
			HWE p-value 0.393		0.659		0.494	
rs4953361	25420505*	<i>EPAS1</i> intron 7	Call rate 100.0%	96.7%	95%	95%	98.9%	98.5%
			MAF 0.468	0.471	0.467	0.497	0.495	0.483
			HWE p-value 0.800		0.812		0.666	
rs59901247	25431509*	<i>EPAS1</i> exon 15	Call rate 98.9%	98.2%	99.0%	99.5%	99.1%	98.7%
			MAF 0.101	0.103	0.092	0.068	0.098	0.088
			HWE p-value 0.117		0.736		0.264	
rs659383	6393557 [#]	<i>MMP13</i> promoter	Call rate 99.7%	100.0%	99.5%	100.0%	99.8%	100%
			MAF 0.281	0.302	0.288	0.294	0.283	0.299
			HWE p-value 0.566		0.517		0.398	
rs2252070	6389005 [#]	<i>MMP13</i> promoter	Call rate 99.5%	99.6%	98.4%	100.0%	99.8%	100%
			MAF 0.472	0.449	0.463	0.409	0.469	0.432
			HWE p-value 0.827		0.466		0.805	

MAF : minor allele frequency ; HW : hardy weinberg test.
EPAS1 : Endothelial PAS domain-containing protein 1
MMP13 : Matrix metalloproteinase 13
 * : NCBI Reference Sequence: NT_022184.15
 # : NCBI Reference Sequence: NT_033899.8

解析を行った SNP のうち、*EPAS1* 遺伝子領域の rs17039192 では、患者群と対照群間でアレル頻度に有意な差が存在 (χ^2 -test p-value=0.018, OR=1.58, 95%CI 1.08-2.33) した。また、劣性モデルでも有意な差が存在 (χ^2 -test p-value=0.031, OR=1.61, 95%CI 1.04-2.48) した (表 2)。

表 2 *EPAS1* と *MMP13* の変形性膝関節症関連解析

SNPs	Model	Itabashi cohort		Miyama cohort	
		OR (95%CI)	χ^2 p-value	OR (95%CI)	χ^2 p-value
rs17039192 in <i>EPAS1</i>					
	Genotype		0.077		0.552
	Allele	1.58 (1.08-2.33)	0.018*	1.25 (0.80-1.93)	0.328
	Dominant	2.15 (0.66-6.96)	0.192	1.01 (0.14-7.21)	0.996
	Recessive	1.61 (1.04-2.48)	0.031*	1.30 (0.80-2.10)	0.285
rs1867787 in <i>EPAS1</i>					
	Genotype		0.807		0.215
	Allele	1.07 (0.80-1.43)	0.644	1.04 (0.78-1.39)	0.784
	Dominant	1.26 (0.63-2.51)	0.515	1.45 (0.83-2.51)	0.187
	Recessive	1.05 (0.72-1.51)	0.806	1.14 (0.75-1.72)	0.541
rs4953361 in <i>EPAS1</i>					
	Genotype		0.523		0.476
	Allele	1.11 (0.89-1.39)	0.347	1.14 (0.85-1.52)	0.382
	Dominant	1.22 (0.87-1.70)	0.255	1.33 (0.83-2.12)	0.233
	Recessive	1.07 (0.72-1.59)	0.734	1.05 (0.67-1.65)	0.830
rs59901247 in <i>EPAS1</i>					
	Genotype		0.659		0.268
	Allele	1.02 (0.71-1.47)	0.907	1.39 (0.82-2.36)	0.221
	Dominant	1.04 (0.71-1.54)	0.834	1.33 (0.76-2.33)	0.311
	Recessive	Not calculated	0.384	Not calculated	0.155
rs2252070 in <i>MMP13</i>					
	Genotype		0.315		0.289
	Allele	1.10 (0.88-1.37)	0.410	1.25 (0.94-1.66)	0.132
	Dominant	1.00 (0.71-1.42)	0.996	1.24 (0.81-1.91)	0.324
	Recessive	1.34 (0.90-1.98)	0.148	1.47 (0.88-2.45)	0.135
rs659383 in <i>MMP13</i>					
	Genotype		0.496		0.314
	Allele	1.11 (0.87-1.41)	0.406	1.03 (0.75-1.41)	0.848
	Dominant	1.39 (0.80-2.42)	0.236	1.55 (0.76-3.15)	0.221
	Recessive	1.07(0.78-1.45)	0.683	1.10 (0.74-1.64)	0.646

OR : odds ratio; CI : confidence interval; * significant p-value

美山コホートでは、同じ基準で、患者 192 名、対照群 192 名を抽出し関連解析を行った。対照群におけるハーディーワイベルグ平衡

の検定では、いずれも有意ではなかった。また MAF は全て 0.1 以上であった (表 1)。

EPAS1 遺伝子領域に存在する rs1867787, rs4953361, rs59901247 と *MMP13* 遺伝子領域の SNP rs659383 では美山コホート単独および combined analysis での関連はなかったが、combined analysis における *EPAS1* 遺伝子領域の rs17039192 では、アレルモデル (χ^2 -test p-value=0.013, OR=1.44, 95%CI 1.08-1.92) と劣性モデル (χ^2 -test p-value=0.018, OR=1.47, 95%CI 1.07-2.03) で有意な差があった。また、*MMP13* 遺伝子領域の rs2252070 では、劣性モデルで有意 (χ^2 -test p-value=0.039, OR=1.39 95%CI 1.02-1.89) な差があった。

ハプロタイプ解析では *EPAS1* 遺伝子領域および *MMP13* 遺伝子領域ともに有意な差は観察されなかった (表 3)。

表 3 *EPAS1* と *MMP13* のハプロタイプ解析

Gene	SNPs	χ^2 p-value *	Haplotype	Permutation p-value		
				Itabashi cohort	miyama cohort	cohort combined
<i>EPAS1</i>			CG	0.0779 *	0.9911	0.4947
	rs17039192	0.018	TG	0.1309	0.6144	0.2413
	rs1867787		TC	0.4565	0.9700	0.7936
			CC	0.7335	0.7714	0.9999
<i>MMP13</i>			CA	0	0.7597	0.1421 #
	rs2252070	0.039	TG	0.1599	0.7956	0.4389
	rs659383		TA	0.8423	0.6272	0.9568
			CG	0.912	0.8064	0.9177

The p values were calculated using permutation test (10,000 permutations). No haplotype showed the stronger association than SNP rs17039192 in *EPAS1* and SNP rs2252070 in *MMP13*.

* : The lowest single SNP χ^2 p-value.

: The lowest haplotype permutation p-value.

本研究の結果から *EPAS1* 遺伝子領域の SNP rs17039192 と *MMP13* 遺伝子領域の rs2252070 が変形性膝関節症と関連のあることが示された。

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 3 件)

- Hirata M, Kugimiya F, Fukai A, Saito T, Yano F, Ikeda T, Mabuchi A, Sapkota BR, Akune T, Nishida N, Yoshimura N, Nakagawa T, Tokunaga K, Nakamura K, Chung UI, Kawaguchi H, C/EBP β and RUNX2 cooperate to degrade cartilage with MMP13 as the target and HIF-2 α as the inducer in chondrocytes. Human

Molecular Genetics、査読有、Vol. 21、No. 5、
2012、pp.1111 - 1123、DOI:
10.1093/hmg/ddr540

- ② Evangelou E, Valdes AM, Kerkhof HJ, Styrkarsdottir U, Zhu Y, Meulenberg I, Lories RJ, Karassa FB, Tylzanowski P, Bos SD; arcOGEN Consortium, Akune T, Arden NK, Carr A, Chapman K, Cupples LA, Dai J, Deloukas P, Doherty M, Doherty S, Engstrom G, Gonzalez A, Halldorsson BV, Hammond CL, Hart DJ, Helgadóttir H, Hofman A, Ikegawa S, Ingvarsson T, Jiang Q, Jonsson H, Kaprio J, Kawaguchi H, Kisand K, Kloppenburg M, Kujala UM, Lohmander LS, Loughlin J, Luyten FP, Mabuchi A, McCaskie A, Nakajima M, Nilsson PM, Nishida N, Ollier WE, Panoutsopoulou K, van de Putte T, Ralston SH, Rivadeneira F, Saarela J, Schulte-Merker S, Shi D, Slagboom PE, Sudo A, Tamm A, Tamm A, Thorleifsson G, Thorsteinsdóttir U, Tsezou A, Wallis GA, Wilkinson JM, Yoshimura N, Zeggini E, Zhai G, Zhang F, Jonsdóttir I, Uitterlinden AG, Felson DT, van Meurs JB, Stefansson K, Ioannidis JP, Spector TD; Translation Research in Europe Applied Technologies for Osteoarthritis (TreatOA)、Meta-analysis of genome-wide association studies confirms a susceptibility locus for knee osteoarthritis on chromosome 7q22. *Annals of the Rheumatic Diseases*、査読有、Vol. 70、No. 2、2011、pp. 349-355、DOI: 10.1136/ard.2010.132787

- ③ Saito T, Fukai A, Mabuchi A, Ikeda T, Yano F, Ohba S, Nishida N, Akune T, Yoshimura N, Nakagawa T, Nakamura K, Tokunaga K, Chung UI, Kawaguchi H, Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF2A during skeletal growth and osteoarthritis development. *Nature Medicine*、査読有、Vol. 16、2010、pp. 678-686、DOI: 10.1038/nm.2146

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬淵 昭彦 (MABUCHI AKIHIKO)
東京大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80312312

(2) 研究分担者

徳永 勝士 (TOKUNAGA KATSUSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40163977

吉村 典子 (YOSHIMURA NORIKO)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：60240355

阿久根 徹 (AKUNE TOORU)
東京大学・医学部附属病院・特任准教授
研究者番号：60282662

(3) 連携研究者

村木 重之 (MURAKI SHIGEYUKI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：40401070
(H22 から連携研究者)

岡 敬之 (OKA HIROYUKI)
東京大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：60401064
(H22 から連携研究者)