

論文の内容の要旨

論文題目 老化関連遺伝子 *klotho* と PPAR- γ 多型の閉経後女性
骨密度への関与

指導教官 中村耕三教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 川野 健一

骨粗鬆症は骨密度の減少および骨構造の変化に象徴される全身性の骨疾患であり、骨折の危険性を高めると同時に、罹病率、死亡率の増加をもたらしている。特に、女性においては一生の間に最大骨量のうち皮質骨の35%、海綿骨の50%を失うとされており、骨粗鬆症は女性にとってより重要な問題である。女性の生涯における骨量の変化は3相にわかれており、青壮年期に最大骨量を得た後、エストロゲン欠乏により、閉経直後に海綿骨優位の骨塩喪失が急速に起こる。その後加齢による緩徐な骨量減少へと移行していくことになる。この加齢に伴う骨代謝の変化に関しては未だ不明な点が多い。

これまでの様々な研究成果により、骨粗鬆症の背景に遺伝的因子の存在することが明らかになってきた。双生児および家系による研究から、遺伝的因子の寄与度は50-90%であるとも言われており、骨粗鬆症に関与する遺伝子を検索し、同定することは、骨粗鬆症の早期診断、骨折の防止などにつながり、高齢化社会において大変重要な課題とも言える。

近年、Kuro-o らはヒトの老化のモデルマウスを確立し、*klotho* と名付けた。このマウスは新しい膜1回貫通型の蛋白をコードしている *klotho* 遺伝子を欠失

しており、ヒトの老化に関連した様々な表現型を呈する。中でも骨に見られる骨量減少は、低回転型の骨量減少であることがわかっており、ヒトの加齢現象の一つと考えられる。

一方、Peroxisome proliferator-activated receptor γ (ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 γ 型 以下 PPARG と略す) はリガンド依存性の転写因子の働きをもつ核内受容体で、主に脂肪細胞の分化、糖、脂質のホメオスターシスを調節している。近年この分子が骨芽細胞の分化にも関与していることがわかってきており、PPARG ヘテロノックアウトマウスを用いた研究により、PPARG が骨芽細胞抑制因子として加齢による骨量減少に関与している可能性が示されている。

本研究の目的は加齢による骨量減少に関与している可能性のある *klotho*、PPARG 遺伝子について、遺伝子多型による骨密度への関与を検討することである。両遺伝子について、蛋白翻訳領域における 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphism 以下 SNP と略す) を検索し、見つかった SNP について骨密度との相関を調べた。

Klotho 遺伝子の SNP の検索にはイギリス在住の白人女性と日本人女性の DNA を用いた。ダイレクトシーケンス法で検索した結果、白人女性で 8 つ、日本人女性で 6 つの SNP を検出した。同定された全 11 個の SNP のうち、3 つは両人種に共通であった。3 つのうち 1 つはプロモーター領域 (G-395A) に、2 つはエクソン 4 (C1818T と C2298T) に位置していた。エクソン 4 の SNP はアミノ酸の置換を伴わない多型であった。両人種においてこれらの SNP のマイナーアレルの頻度は高かったが、人種間で有意に異なっていた。次にこの両人種に共通の 3 つの SNP について骨密度との関連を検討した。対象は白人女性 1187 名 (年齢 18~72 歳、平均 47.1 ± 12.0 歳)、日本人女性 215 名 (年齢 66~92 歳、平均 72.9 ± 5.5 歳) である。閉経、加齢は女性の骨量減少における主要因子であるため、広い年齢層におよぶ白人女性の解析に際しては、閉経前後そして閉経後の年齢による階層化を行いそれぞれの群で骨密度との相関を調べた。各群におけるマイナーアレルの頻度に有意な差はなかった。また、身長、体重、BMI についても各群の遺伝子型による有意な差はなかった (全て $P > 0.05$)。まず、1187 名の白人女性全体では、3 つの SNP においてメジャーアレルとマイナーアレル間で全身の骨密度に有意な差はなかった。次に閉経の前後にわけて検討すると、閉経後群 (364 名) では C1818T SNP と骨密度に有意な相関が見られ、マイナーアレル

である T をもつ群がメジャーアレルである C をもつ群に比べ骨密度が低いという結果であった ($P=0.029$)。この閉経後の集団を更に「54 歳以下」、「55-64 歳」、「65 歳以上」の 3 つに階層化して検討すると、最高齢である「65 歳以上」の年齢層では、C1818T ($P=0.010$) のみならず G-395A ($P=0.001$) も骨密度との相関を示した。より若い他の年齢層では明らかな相関は見られなかった。また、3 つの遺伝子型における解析では、この「65 歳以上」の年齢層において G-395A ($P=0.003$)、C1818T ($P=0.014$) にて明らかな相関が見られており、BMD はマイナーアレルを含む程、低下する傾向にあった。以上の結果は年齢、体重で BMD を補正した値である Z スコアを用いても同様であった。G-395A SNP と C1818T SNP のハプロタイプによる解析では閉経後女性およびその最高年齢層においてマイナーアレルはより低い骨密度を呈する結果となった。

白人女性で認められた SNP と骨密度との関連について、遺伝的に異なる人種にもあてはまるかどうかを調べるため、同様の解析を日本人の閉経後女性 215 名 (全例 65 歳以上) について行った。その結果、この集団においても G-395A と C1818T では骨密度との有意な相関が見られた ($P=0.023$ 、 0.035)。またこれらの結果は Z スコアを用いた解析でも変わらず、2 つの SNP を組み合わせたハプロタイプの解析でも P 値が 0.009 と有意な相関を示した。

閉経後女性の骨密度に関連のあった SNP の機能について検討した。G-395A SNP はプロモーター領域に位置しているため、その機能に影響している可能性がある。この G→A アミノ酸置換の影響を確認すべく、Electrophoretic mobility shift assay を行い、DNA とタンパクの結合能を検討した。*Klotho* 遺伝子は腎臓など特定の臓器にしか発現しておらず、骨、骨髄には発現していない。まず、ヒト胎生期腎臓由来の 293 細胞でのヒト *klotho* 遺伝子の発現を RT-PCR 法にて確認し、この細胞を実験に用いた。G-395A の 2 種類の塩基を含んだ 24 塩基の合成オリゴヌクレオチドを作製し、293 細胞の核抽出液とインキュベートした。すると G、A それぞれの塩基を含むオリゴで異なった結合パターンを示し、DNA-タンパク間の結合は A を持つオリゴよりも G を持つオリゴにおいてより強かった。アイソトープでラベルしていないオリゴを用いたコンペティター実験でも、その添加する濃度に比例して、DNA-タンパク複合体の量が減少し、100 倍添加では複合体のバンドを消し去る程になった。また、どの濃度の非ラベル化オリゴにおいても A を持つオリゴよりも G をもつオリゴの方が強く競合しているのがわかった。これらの結果より、おそらく転写因子と考えられる複合体中のタンパ

クの結合能はプロモーター領域の G→A アミノ酸置換により阻害され、*klotho* 遺伝子の発現量を変化させている可能性がある。次にこの SNP による *klotho* 遺伝子の発現量の変化を luciferase assay を用いて検討したが、G アレルは A アレルよりもルシフェラーゼ活性をあげる傾向にあったが、有意な差ではなかった。

ヒト PPARG 遺伝子における SNP の検索には日本人のサンプルを用いた。その結果、エクソン B、エクソン 5、エクソン 6 内に一カ所ずつ点変異を見出した。エクソン B 内の SNP はアミノ酸の置換を伴うものであったが、他の 2 カ所はアミノ酸の置換を伴わなかった。3 つの SNP ともアレル頻度は比較的小さかった。

これらの SNP と骨密度の関連を検討した。対象は 501 名の日本人閉経後女性である（年齢 65–93 歳、平均 73.6 ± 5.8 歳）。*klotho* 遺伝子と同じく、加齢による影響を検討するため、全体を 3 つの年齢層（69 歳以下、70–79 歳、80 歳以上）にわけて分析した。検出された 3 つの SNP においても、各群におけるマイナーアレルの頻度に有意な差はなかった。また、身長、体重、BMI についても各群の遺伝子型による有意な差はなかった（全て $P > 0.05$ ）。

各 SNP と骨密度との相関を調べた結果、明らかな相関は見られなかった。また年齢により階層化した集団においても同様の結果であった。Z スコアを用いた解析、ハプロタイプの解析でも有意な差はなかった。

本研究では、加齢による骨量減少に関与していると考えられる *klotho*、PPARG 遺伝子について、遺伝子多型の骨密度への関与を検討した。*klotho* 遺伝子の解析では白人女性を閉経の状態および年齢により階層化して分析した。*klotho* 遺伝子多型は閉経の有無、年齢との関連を示さなかったが、高齢の閉経後女性の骨密度と有意な相関を示し、閉経前女性や、比較的若い閉経後女性の骨密度との相関はなかった。このことは、最大骨量や閉経による骨量減少ではなく、加齢による骨量減少の病態生理に *klotho* 遺伝子に関与している可能性を示唆している。PPARG 遺伝子については、骨密度との関連を示すことはできなかったが、本研究で新たに見つかった SNP は骨代謝、脂質代謝の表現型のマーカーとなる可能性がある。

老化による骨粗鬆化の病態は決して単一の分子異常によって説明しうるものではなく、おそらく局所因子の異常による骨芽細胞の機能低下を主原因として、それに全身性因子の異常が修飾して起こるものと推測される。今後も本研究のようなゲノム解析の手法によりさらに詳細な分子レベルにおけるメカニズムの解明が進むものと考えられる。