

骨粗鬆症の SNP 解析

関連遺伝子群の同定

江面 陽一¹ 岩崎 公典¹ 石田 良太¹ 白木 正孝² 井上 聡³
 細井 孝之⁴ 吉田 英世⁵ 鈴木 隆雄⁵ 折茂 肇⁴ 江見 充¹

¹ 日本医科大学 老人病研究所分子生物学部門

² 成人病診療研究所

³ 東京大学医学部老年病科

⁴ 東京都老人医療センター内科

⁵ 東京都老人総合研究所疫学部門

Genome-wide SNP Scanning for Identification of Susceptibility Genes of Osteoporosis

Yoichi Ezura¹, Hironori Iwasaki¹, Ryota Ishida¹, Masataka Shiraki², Satoshi Inoue³,
 Takayuki Hosoi⁴, Hideyo Yoshida⁵, Takao Suzuki⁵, Hajime Orimo⁴ and Mitsuru Emi¹

¹Department of Molecular Biology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School

²Research Institute and Practice for Involutional Diseases

³Department of Geriatric Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

⁴Department of Internal Medicine, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital

⁵Department of Epidemiology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

要 旨

多因子性疾患の遺伝子解析は困難とされてきたが、遺伝子多型マーカーと解析手法の進歩により、解析が試みられるようになった。多因子性疾患として骨粗鬆症についても、候補遺伝子群の相関解析から同胞対解析や家系を用いた連鎖解析まで、様々な研究がおこなわれてきた。現在もっとも期待される解析手法は、ゲノム上に多数存在する 1 塩基多型マーカー (SNP) を使って網羅的に感受性遺伝子を同定解析する方法である。われわれも、日本人で同定された SNP の情報を持ちいて、体系的な SNP 解析を始めたところである。多因子性疾患の解析は容易でなく、統計学上の問題もあるが、いくつかの重要な骨粗鬆症関連遺伝子が同定されるならば本症の病態解明と病型別の予防・治療方針、また新規治療法の開発が可能になると期待される。

はじめに

骨粗鬆症は、食事や運動などの生活習慣や、加齢に伴う生体維持バランスの異常に加えて遺伝的な要因が影響して発症する多因子性疾患である。遺伝的要因の

関与は、双子研究、人種間の発症率の相違などにより指摘されてきたが¹、具体的な遺伝的要因については明らかにされていない。従来難しいとされていた多因子性疾患の遺伝解析も、分子遺伝学的な解析法の進歩により、近年可能となりつつある。本稿では、骨粗鬆症の遺伝解析について、過去の研究を振るとともに、われわれの行なう SNP 解析の現状を報告する。

これまでの骨粗鬆症の遺伝解析

遺伝性疾患の原因遺伝子解析は、連鎖解析 (Linkage Analysis) と相関解析 (Association Study) により行われる。他の「ありふれた疾患」(Common Disease) 同様に、骨粗鬆症についても候補遺伝子の相関解析が初期には行われ、つづいて候補領域での同胞対解析による連鎖解析が行われてきた。しかし、これらの解析には再現性と重要性について問題があり、現在ではゲノムワイドな解析による網羅的な探索が必要と考えられている。骨粗鬆症の発症率は年齢と共に増加することから、罹患の有無により集団を分けて解析するよりも、年齢補正の可能な量的指標としての骨密度値をもちいた解析が好まれる。

候補遺伝子相関解析 (Association Study) の歴史

1992年Morrisonらは、ビタミンDレセプター (VDR) の遺伝子多型と血清オステオカルシン値との相関を報告², 双生児集団における腰椎骨密度との関連から, この多型が骨密度に及ぼす影響は最大 75% までであると報告した³. しかし, 多施設での追試の結果, 人種構成や遺伝背景によって上記相関は再現されないことが指摘され^{4,6}, 単一の遺伝子多型が発症に寄与する比率はそれほど高くないことが, 再認識された^{4,7}. つづいて様々な候補遺伝子の相関解析がおこなわれ, エストロゲンレセプター, インターロイキン 6 (IL-6) や I 型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) のプロモーター領域などの DNA 多型性の関連が示唆されたものの⁸⁻¹⁰, 再現性の問題は VDR と同様であった. 多数の遺伝子の多型性と環境要因とが相互作用しあって, 全体として個人の発症感受性を決定していると考えられる⁴.

特殊型骨粗鬆症についての連鎖解析

連鎖解析は, 罹患者を有す家系の, 各構成員の罹患者の有無と遺伝子マーカーの多型との関係を, 染色体上の連鎖として理解することにより原因遺伝子の存在領域を探り当てる方法である. 遺伝子マーカーとしては, マーカーあたりの多型情報量 (polymorphism information content: PIC) が多い, マイクロサテライトマーカーが用いられる. 古典的な連鎖解析は, メンデルの法則に従う古典的な単一遺伝性疾患の解析に用いられる手段であり, 家系性に発症する一部の特殊型骨粗鬆症について解析が進められている. たとえば偽神経膠腫を伴う骨粗鬆症 (非定型的骨形成不全症) では第 11 番染色体の長腕約 3 センチモルガンの範囲 (11q12-13) に原因遺伝子の存在が示唆され¹¹, 常染色体優性の遺伝様式を示した高骨密度を呈する家系¹², 常染色体劣性を示した貧血・難聴・視覚障害を伴う大理石骨病の家系¹³でも, 同じ領域 (11q12-13) に原因遺伝子領域がマップされた. この領域内の単一遺伝子もしくは遺伝子群が, 複数のタイプの骨系統疾患の発症を共通して規定しているのかもしれない.

I 型コラーゲン遺伝子 (COL1A1 または COL1A2) の変異を原因とする, 骨形成不全症は比較的発生頻度の高い骨系統疾患である¹⁴. Spotila らはコラーゲン遺伝子の多型によるいわば軽症の骨形成不全症が, 若年性骨粗鬆症患者の一部を占めるのではないかと推測した. 多数の骨粗鬆症患者における翻訳領域の全塩基配列解析では, あきらかな原因多型は同定されなかったが¹⁵, Ralston らは $\alpha 1$ 鎖遺伝子のプロモーター領域の一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNP) が

感受性遺伝子の多段階スクリーニング法

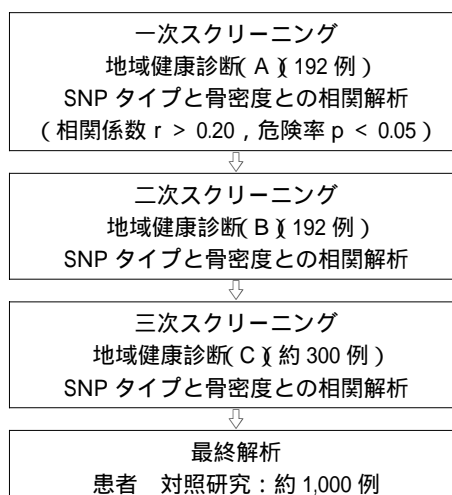


図 1 現行の多段階スクリーニング法の概略

骨密度と相関を示すことを見出しており¹⁰, 骨形成不全症の軽症例とも見なせる症例が原発性骨粗鬆症の一部に存在することを示唆した. 偽神経膠腫を伴う骨粗鬆症の場合にも, 軽症例が一般の原発性骨粗鬆症の一部を占める可能性もある. 但し, このことは多因子性疾患の病因論的な異質性 (Heterogeneity) を意味しており, 特殊病型での解析結果を疾患全体に一般化するには注意を要する.

候補遺伝子座領域についての連鎖解析

Common Disease の連鎖解析は, 同胞対解析により行われることが多い. 罹患者の有無と原因遺伝子領域との連鎖を判定する従来からの罹患者同胞対解析に加えて, 連続的数値をとる量的変数をもとに連鎖を解析する方法 (QTL 解析; Quantitative Trait Locus Analysis) もある. この方法は, 同胞間での量的変数による表現形質の差と共有するアレル数の差との関連を回帰分析に基づき遺伝子領域 (QTL) を同定するものである. Koller ら¹⁶ は前述の 11q12-13 の染色体領域周辺について, 一般人口から得られた姉妹対における骨密度値をもとに QTL 解析をおこなったところ, この領域の中央部にロッドスコア 3.5 のピークを認めた. この領域中の遺伝子が, 一般人においても骨密度を規定することが示唆されたが, 領域中にある 200 個余りの遺伝子のうち, いずれの遺伝子が関与するかはまだ決定されていない.

ゲノムワイドな連鎖解析

候補遺伝子領域に限られた多因子性疾患の解析には

限界があり、本来正当ではない。網羅的に遺伝的要因を同定するためにはゲノムワイドな解析が要求され、骨粗鬆症についても、このような解析が行なわれはじめた。Devoto¹⁷, Niu¹⁸, Kollerら¹⁹は、それぞれ数十家系、数百名を対象としてゲノムワイドに選択したマイクロサテライトマーカーと骨密度値との連鎖解析をおこない、複数の染色体領域(QTL)を報告している。今後、それぞれの領域について、更なる解析が要求されるが、膨大な時間と労力が必要とされることは言うまでもない。

これからの感受性遺伝子同定法

骨粗鬆症の遺伝子解析は、以上のように進められてきた。候補遺伝子相関解析では母集団による結果の相違が問題であり、複数の母集団での追試と共に、遺伝子間相互作用の解明のため更に多くの感受性遺伝子を同定する必要があった。候補遺伝子の選択基準と、判定基準、相互連鎖解析について方法論の確立が望まれる。一方、マイクロサテライトマーカーによる連鎖解析では、染色体上の領域を決定しても、原因遺伝子の確定のために更なるハプロタイプ/連鎖不平衡解析が要求され、かならずしも効率は良くない。通常用いられるのはゲノム上に高密度に存在する SNP であり、連鎖不平衡解析により厳選された SNP を用いた相関解析で推定または確定された原因遺伝子については、機能解析での確認が要求される。いくつもの候補領域について、これを遂行するには膨大な時間と労力が必要である。

高密度にゲノム上に存在する SNP の解析は、タイピング法の工夫と自動化により大量の高速処理が可能になったため、体系的解析に適している。連鎖解析で領域を絞り込み、改めて SNP に基づくハプロタイプ解析をおこなうよりも、はじめから高密度の SNP を用いた相関解析で網羅的に候補感受性遺伝子を見つけるほうが、設定によっては検出能力を高く出来、効率よい網羅的解析が可能である。SNP マーカーによるゲノムワイドな多型解析はすでに現実的であり、いくつかの疾患について大規模な解析が試みられている。われわれも以下に示す形で解析を始めたところである。

SNP マーカーの選別

多因子性疾患における、弱い危険因子を正確に検出するためには、大量のサンプルと多数の SNP マーカーが必要である。SNP マーカーの情報は種々の公的データベースから得られるが、ゲノムの多型性には人種格差があるため、日本人の情報に基き解析すべきである。

我々は東大医科研ヒトゲノム解析センターと科学技術振興事業団の報告するデータベース(<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)を利用し、アミノ酸置換を伴うコーディング領域の SNP(cSNP)と、プロモーター領域の SNP(rSNP)を優先して数千 SNP を選択している。これらはタンパク質構造またはその発現量に直接影響しうる SNP であり、マーカーとしてのみならず病因多型そのものである可能性も見込んで、骨密度との相関解析をおこなっている。

段階的スクリーニングによる解析

多数の SNP で、単一集団について何度も検定をおこなう場合、統計学的問題があるが、多段階スクリーニングではこの問題を緩和できる。一次スクリーニングとして、地域健康診断の受検者について(192例を無作為に抽出)網羅的に SNP のタイピングを行ない、年齢・身長・体重で補正した骨密度値と相関傾向を示す SNP を選り出す。選択基準(相関係数 $r > 0.20$ $p < 0.05$)は緩く設定しておき、選出された SNP 群をもちいて二次・三次スクリーニングを行なう。異なる母集団で再現よく相関を示す SNP を選別すれば、多重検定による偽陽性率は押さえることができるはずであり、最終段階の相関解析は大規模な患者・対照研究により検定する。この方法は、効率的にも優れており、数千例の DNA すべてにつき数千回の SNP タイピングを行なう場合に比べて、時間、コストおよび DNA 量のすべてに節約と効率化を実現している。

これまで約 300 SNP について 1 次スクリーニングの解析をおこない、11 個の候補 SNP を選出した。これらの内部 2 群での再現性は良く、効果的に選出が行われていると考える。今後の検定で同定される、多数の感受性遺伝子の組み合わせと重み付けについて、多変量解析を予定している。データの蓄積に加えて、疫学・統計学的方法論の進歩が欠かせないが、この領域の学際的進歩と貢献が得られるならば、将来骨粗鬆症の予防的診断のみならず、予防への取り組み、有効な治療法の選択について実際的に有用な SNP マーカー群が同定され、臨床応用されうるものと期待している。

文 献

1. Eisman JA: *Endocr Rev* 1999; 20: 788-804.
2. Chapuy MC, et al: *N Engl J Med* 1992; 327: 1637-1642.
3. Morrison NA, et al: *Nature* 1994; 367: 284-287.
4. Giguere Y, Rousseau F: *Clin Genet* 2000; 57: 161-169.
5. Stewart TL, Ralston SH: *J Endocrinol* 2000; 166: 235-245.
6. Hobson EE, Ralston SH: *Clin Endocrinol* 2001; 54: 1-9.

- 7 . Cooper GS: J Bone Miner Res 1999; 14: 1646 1648.
- 8 . Kobayashi, et al: J Bone Miner Res 1996; 11: 306 311.
- 9 . Murray, et al: Bone 1997; 21: 89 92.
- 10 . Grant SF, et al: Nat Genet 1996; 14: 203 205.
- 11 . Gong Y, et al: Am J Hum Genet 1996; 59: 146 151.
- 12 . Johnson ML, et al: Am J Hum Genet 1997; 60: 1326 1332.
- 13 . Heaney C, et al: Hum Mol Genet 1998; 7: 1407 1410.
- 14 . Scriver CR, Beaudet AL, Sly WL: The Metabolic Basis of Inherited Disease.(6th ed.) McGraw-Hill Health Professions Division, New York, 1989, pp. 2805 2842.
- 15 . Spotila LD, et al: Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88: 5423 5427.
- 16 . Koller DL, et al: J Bone Miner Res 1998; 13: 1903 1908.
- 17 . Devoto M, et al: Eur J Hum Genet 1998; 6: 151 157.
- 18 . Niu T, et al: Hum Genet 1999; 104: 226 233.
- 19 . Koller DL, et al: J Clin Endocrinol Metab 2000; 85: 3116 3120.

(受付 : 2001 年 8 月 1 日)

(受理 : 2001 年 8 月 16 日)
