

骨粗鬆症およびゲノム刷り込み関連遺伝子群の解明

●新川 詔夫¹⁾ ◆木住野 達也²⁾

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 2) 長崎大学先端生命科学支援センター

〈研究の目的と進め方〉

多くの疾患、とくに生活習慣病（多因子遺伝病）の原因遺伝子は依然として未知であり、その同定と分子病態解明の重要性はポストシーケンス時代においても減じない。本研究の目的は以下の2点である。

- (1) 多因子遺伝病である骨粗鬆症について、先天骨密度調節遺伝子を候補とした骨粗鬆症関連遺伝子を解明する。
- (2) 同じく多因子遺伝病である自閉症座を含むゲノムインプリンティング（刷り込み）関連遺伝子の単離・同定と分子病態の解明を行う。

研究の背景

骨粗鬆症：骨粗鬆症は骨密度の減少と脆弱性骨変形や骨折を特徴とする生活習慣病である。骨粗鬆症は加齢男性にも起こるが、主に加齢女性に多い。これは女性の生理学的特徴による。女性の骨密度は20歳前後をピークとしてその後毎年1%程度減少し、特に閉経後の骨密度低下は著しく、80歳以上になると多くが骨粗鬆症に罹患する。骨密度は主に腰椎で評価され、骨密度低下をきたす第1次原因が存在せず骨密度値が若年成人平均値の70%未満（50歳以上の女性では骨密度が0.33 g/cm³以下）のとき、原発性骨粗鬆症と診断される。骨密度減少による脆弱性骨折は老年のQOLならびに医療経済的視点から大きな問題となっている。骨粗鬆症治療の最大の目的は骨折の予防であり、成長期の十分な骨密度の獲得とその後の維持が防止策として重要である。したがって、骨粗鬆症の病態解明と予防医学の確立にむけた関連遺伝子の同定が期待されている。

骨粗鬆症はミレニアムプロジェクトの5大疾患ではないが重要な生活習慣病の1つであり、その発症にも環境要因と遺伝的要因がある。環境因子として最重要なのが加齢で、無重力下の宇宙飛行士は骨が軟化するように、骨に対する加重負荷が骨密度決定因子の一つである。また、運動、カルシウム摂取、女性ホルモン、加齢なども関与していることは確実であり、環境因子はほぼ推測されている。しかし遺伝的要因についてはほとんど未知である。双生児や多発家族の研究から、集団中の骨密度分散の50-80%は遺伝的に決定されると考えられている。ヒトゲノムにおけるSNPsのカatalog化と共に、タイピング技術の進展により、骨粗鬆症でも全ゲノムスキャンによる相関解析が行われている。一方、病態を考慮した候補遺伝子と骨粗鬆症の相関研究も多数報告されている。例えば、ビタミンD受容体遺伝子（VDR）、1型コラーゲン α 1鎖遺伝子（COL1A1）や副甲状腺ホルモン遺伝子（PTH）、TGF- β 1遺伝子（TGFB1）、インターロイキン6遺伝子（IL6）などについて研究されてきた。高い相関を示す遺伝子多型もあるが、全てを説明できるわけではない。

研究代表者らは過去の研究で、骨密度増加をきたす遺伝病であるCamurati-Engelmann病（CED）の原因がTGF- β 1遺伝子（TGFB1）中のミスセンス変異が原因であり、変異潜在型TGF- β 1蛋白の活性化亢進がその発症機構であ

ると推定した（Nature Genetics, 2000）。骨粗鬆症はCEDと逆の病態を示すことから、TGF- β 1シグナル伝達系に関する遺伝子群がその発症に関与していると推定した。この仮説は、最近本邦から報告されたTGFB1多型と骨粗鬆症の関連結果で支持される。つまり、TGFB1およびそのシグナル伝達系遺伝子のSNPsにより、TGF受容体を介するTGF- β 1細胞内シグナルの機能亢進が生じ、骨芽細胞の機能亢進あるいは破骨細胞の機能低下を導くと推定される。したがって本研究はエストロゲン不足に注目する従来の視点とは異なるアプローチを行うので独創的だと考える。骨粗鬆症とTGFB1との関連は米国グループが精力的にノックアウト動物を作成しているが得られた病態は骨粗鬆症とは異なるものである。

本研究は、単一遺伝子病において骨密度異常を引き起こす遺伝子群に焦点を当て、それらの遺伝子の多型が一般集団においても骨密度を規定する可能性があると考え、それらのSNPsやハプロタイプと密度値および骨粗鬆症との相関研究を行うものである。

ゲノム刷り込み関連遺伝子：ゲノム刷り込みは遺伝子変異以外の機序による親起源依存性の遺伝子の発現差やクロマチン構造の違いを表す現象である。ヒトにおけるゲノム刷り込みの主たる領域は現在までに、11p15.5、15q11-13、および7q32の3領域が知られ、そのうち前2領域では多数の刷り込み遺伝子クラスター（ドメイン）を形成している。さらに同一領域にありながら父性発現・母性発現と逆の刷り込み機転が知られ、その分子基盤の解明が期待されている。研究代表者・分担者は過去の研究で、7q32領域でも刷り込みドメインが存在することを示し（Genomics, 2000a）、さらに同領域では父性発現遺伝子MEST以外に数種の刷り込み遺伝子が存在することが明らかになった（Genomics, 2000b）。また、最近、自閉症がゲノム刷り込みを受けていることを示唆する研究があり、その疾患座の1つが7q32領域のマーカーと連鎖を示すことが報告され、さらに自閉症座は、研究代表者が過去の研究で構築した7q32領域のPAC/BACコンテグ内に局在することが判明した（Genomics 2000 a）。成長障害をきたすSilver-Russell症候群座や前立腺癌悪性因子の候補領域も7番染色体上の刷り込みに関係することも明らかになっている。

一方、ヒト15q11-13領域の刷り込み遺伝子群動態もよく解析され、Prader-Willi症候群（PWS）とAngelman症候群（AS）領域（マウスにおける相補領域である7C領域）のゲノム刷り込み制御は、刷り込みドメインに存在する2つの刷り込み調節中枢（PWS-ICとAS-IC）の共同支配化にあることが知られている。PWS-ICはヒトSNURF-SNRPNおよびマウスSnurf-Snrpn遺伝子のエクソン1を含む領域であり、体細胞では刷り込みドメインの父性エピジェノタイプの維持に働き、一方AS-ICはシス作動性因子として、雌性生殖細胞系または初期発生胚細胞のPWS-ICにおける1次母性マークの成立に関与している。マウスSnurf-Snrpn遺伝子プロモータ上流のこれらのIC付近から発現

しているIC転写物は、脳では父性発現している。ヒトとマウスでの発現パターンやゲノム構造はよく保存されていることから、これらの転写物は刷り込みドメインにおける1次母性マークの成立に重要な役割を果たすと推定されている。1次母性マークは雌性生殖細胞系において確立する。従って、IC転写物は雌性生殖細胞系で発現することが必須であるが、雌性生殖細胞系におけるその動態は不明である。

本研究では、7q32領域に局在する遺伝子を網羅的に解析し、それらの刷り込みの有無を明らかにし、その単離・同定と刷り込み分子機構を明らかにする。7q32領域の刷り込みドメインの研究は、国内外ともに本研究以外にない。また、15q11-q13領域のヒトゲノム構造を知るため、マウス相同7C領域のバーチャル解析、ギャップ領域、脆弱領域をPAC/BACクローンにより連結し、新規・既知刷り込み遺伝子の単離、転写物のpromoter/enhancer領域の同定及びその機能解析を行う。マウスIC転写産物の雌性生殖細胞系における発現を調べ、マウス7C領域の刷り込み機能に対する役割を明らかにする。

＜研究開始時の研究計画＞

(1)先天性骨密度疾患遺伝子を候補とした骨粗鬆症関連遺伝子の解明

■**TGFB1** およびその関連遺伝子内のSNPs同定：長崎大学医学部「倫理委員会」（厚生省ガイドラインに基づき平成12年8月に設置）の承認のもとに、インフォームド・コンセントを得て、48名の長崎市在住のボランティアの血液試料を収集し、Tgf- β 1シグナル伝達にかかわる遺伝子群、UTRおよび近接領域のDNA多型を網羅的に同定する。

■**骨代謝の分子病理の解明**：Tgf β 1変異をもつモデルマウスを作成し、マイクロアレイを用いて、マウス骨における遺伝子の発現プロファイルを作成し、骨代謝に影響を及ぼしている遺伝子群の同定を試みる。さらに、ノッキンマウスの組織病理学的解析を行い、モデル動物における骨粗鬆症の程度、経過を明らかにする。

■**骨粗鬆症検診受診者における関連解析**：長崎県の骨粗鬆症に関する集団検診の受診者（ほぼ全てが成人～老年女性）から、上記と同様にインフォームド・コンセントを得た後、血液試料を収集し、骨密度による分類を行い、各群毎に上記SNPsとの関連解析を行う。

■**骨粗鬆症患者における関連解析**：同様に、「長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会」（3省ガイドラインに基づき、全学委員会として再設置）の承認のもと、インフォームド・コンセントを得て、長崎県在住、あるいは異なる地域の骨粗鬆症患者の試料を収集し、上記のTGFB1関連遺伝子（TGFB1, TGFBR1, TGFBR2, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD7, IFNB1, IFNAR1, FOSなど）の多型、および理論的に骨粗鬆症の候補となる遺伝子の多型との関連（症例・対照）解析を行う。

(2)ヒト刷り込み遺伝子領域からの系統的遺伝子単離と、刷り込みの有無および疾患との関連の解明

■**7q32刷り込みドメイン遺伝子群の同定と単離**：7q32物理地図を構築し、刷り込みドメイン中の遺伝子を網羅的・系統的に単離・同定する。

■**自閉症罹患同胞対の集積と罹患同胞対解析**：東京大学との共同研究で、両大学「倫理委員会」の承認のもと、関連解析に用いるための罹患同胞対検体を、インフォームド・コンセントを得て、血液DNA試料を集積する。次いで、7q32刷り込みドメイン遺伝子群SNPsとの関連解析を行う。

■**7q32領域遺伝子群の刷り込み解析**：種々のヒト7番染色体断片を含むヒト・マウス雑種細胞を用いて、あるいは培養マウス脳組織（初代培養ニューロンおよびグリア組織）におけるマウスホモログの刷り込みの有無を検証する。

■**11p15.5および15q11-q13遺伝子群の刷り込み解析**：ヒト11p15.5や15q11-q13刷り込み領域あるいはそれらのマウス相同領域の刷り込み遺伝子の解析を行う。

＜研究期間の成果＞

(1)骨粗鬆症

●**骨粗鬆症関連・感受性遺伝子の多型の同定**（発表論文1）：TGFB1遺伝子とその関連遺伝子6種の領域（TGFB1, TGFBR2, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD7）に関して、48名の正常日本人（長崎県在住者）からの試料をPCR増幅、次いで直接塩基配列決定を行った。その結果、計106種のSNPsと11種のそれ以外の多型を同定した（図1）。TGFB1遺伝子内に11種類（うち、1946T/Cはアミノ酸置換P10L）、TGFBR1内に13種類、TGFBR2内に31種類、SMAD2内に6種類、SMAD3内に21種類、SMAD4内に8種類、SMAD7内に16種類のSNPを同定し、それらのアレル頻度を算定した（表1、2）。同定した計106種のうち、79種（75%）は、当時のNCBI-dbSNPには未登録であり、9種は反復配列内部に存在した。5種のSNPと1つの欠失多型は、希少な多型であり、16名中ではなく48名で発見されたものであった。コーディング領域に同定された5種のSNPのうち、2種はnon-synonymousであった。

また、IFNB1, IFNAR1, FOS遺伝子内の19種のSNPs（新規8種）、およびLRP5遺伝子内に21種（新規7種）を同定した（表3）。

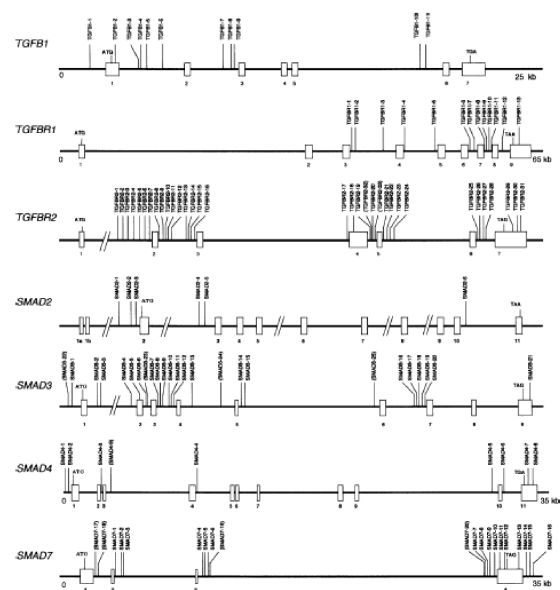


図1.TGFB1関連遺伝子計7種に同定した117種の多型

表3. LRP5遺伝子内同定したSNPs

SNPs	Position	Base alteration	Amino acid substitution	Allele frequency (minor allele)	dbSNP in NCBI and/or JSNP
LRP5-1	Intron 1	IVS1+4689G>C		0.453 (G)	rs312014
LRP5-2	Intron 1	IVS1-4340G>A		0.060 (A)	
LRP5-3	Intron 1	IVS1-4226T>C		0.099 (C)	rs74744, JST-IMS137909
LRP5-4	Intron 1	IVS1-4106G>A		0.039 (A)	rs74743
LRP5-5	Exon 2	c.206A>G	Q89R	0.087 (G)	
LRP5-6	Intron 6	IVS6+8G>A		0.061 (A)	
LRP5-7	Intron 7	IVS7-118T>G		0.283 (G)	rs686921
LRP5-8	Exon 8	c.1647C>T	F549F	0.072 (T)	rs545382
LRP5-9	Exon 10	c.2220C>T	N740 N	0.211 (T)	ds2306862, JST-IMS064599
LRP5-10	Intron 10	IVS10+6T>C		0.039 (C)	rs4988322
LRP5-11	Intron 10	IVS10+100A>G		0.293 (G)	rs576118
LRP5-12	Intron 10	IVS10+120T>C		0.283 (C)	rs667126
LRP5-13	Intron 10	IVS10-173A>G		0.041 (G)	
LRP5-14	Intron 11	IVS11+37C>T		0.039 (T)	rs2242339, JST-IMS014541
LRP5-15	Intron 11	IVS11+78G>A		0.276 (A)	rs689179, JST-IMS014542
LRP5-16	Intron 16	IVS16-21T>C		0.342 (C)	rs608343
LRP5-17	Intron 16	IVS16-82C>T		0.336 (T)	rs6073857, JST-IMS064603
LRP5-18	Intron 17	IVS17-125G>A		0.046 (A)	
LRP5-19	Intron 17	IVS17-63C>T		0.046 (T)	
LRP5-20	Intron 17	IVS17-30G>A		0.092 (A)	
LRP5-21	Exon 18	c.3989C>T	A1330V	0.217 (T)	JST-IMS080311

表4. NG-1 女性(481 名)における撓骨骨密度平均値

ハプロタイプ/ SNP	ディプロタイプ/ 遺伝子型	サンプル数	補正骨密度値 (g/cm ²)	p 値
ハプロタイプ3	その他	377	0.442±0.064*	0.023
	ホモ接合	94	0.424±0.063	
	ヘテロ接合	10	0.435±0.046	
	ホモ接合 + ヘテロ接合	104	0.425±0.062*	
c.2220C>T	C/C	275	0.444±0.065*	0.022
	C/T	166	0.432±0.064	
	T/T	40	0.425±0.051	
	C/T + T/T	206	0.430±0.062*	
IVS17-30G>A	G/G	375	0.441±0.064*	0.039
	G/A	93	0.426±0.064	
	A/A	13	0.434±0.045	
	G/A + A/A	106	0.427±0.062*	
c.3989C>T	C/C	271	0.443±0.065*	0.053
	C/T	165	0.434±0.065	
	T/T	45	0.424±0.049	
	C/T + T/T	210	0.432±0.062*	

*Student's t-test

●骨粗鬆症とLRP5との関連解析：LRP5 遺伝子内のSNP が骨密度や骨粗鬆症と相関すると、特定アレルが骨粗鬆症女性群に有意に蓄積していることが考えられる。LRP5-9、LRP5-20およびLRP5-21座について、異なる3地域(HK, NG-2, HS集団)の骨粗鬆症女性における症例-対照解析を行った。

HK集団中の骨粗鬆症女性126名と対照女性131名において、各SNP座のアレル頻度の偏りを解析した結果、c.2220C>T座の少数アレルTの有意な蓄積が患者群でみられた(p<0.01)(表5)。この結果は撓骨骨密度との相関研究でCC遺伝子型女性群の骨密度が有意に高い結果と矛盾しない。またc.1647C>Tでも有意な差を得たが、アレル頻度が低いため結論できない。IVS17-30G>Aとc.3989C>Tでは有意な相関は検出されなかった。

同様に、5種SNPについてNG-2集団の骨粗鬆症女性108名と対照女性131名における解析を行った。患者群において、IVS1+4689G>Cを除く4種SNP座の各少数アレルT、T、A、A、Tは有意に蓄積していた(p<0.05)(表6)。

一方、HS集団においてはいずれのSNPsにおいても有意差は得られなかった(表7)。試料数が少ないことやタイピングエラー、対照群のバイアスなどが考えられるが、相関研究では再現性が最も重要となるため、さらに症例を増やした解析が必要であろう。

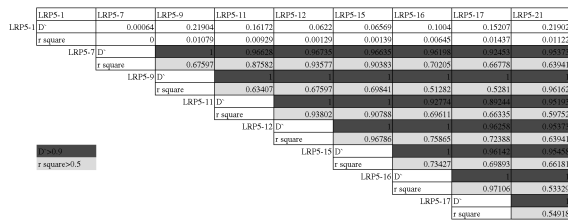


図2. LRP5 遺伝子内の連鎖不平衡 (LD)

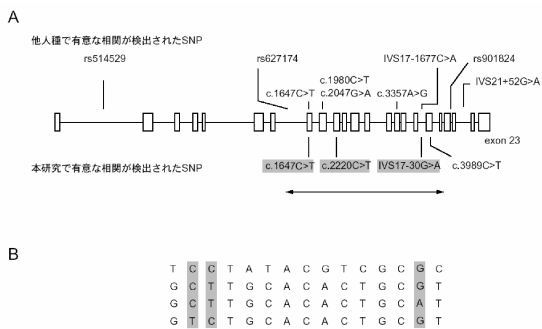


図3. LRP5 遺伝子の構造と有意な相関を示す SNPs (A)、LDB 内 SNPs を用いたハプロタイプ解析 (B)

NG-1 女性481名における、3種のタグSNPのタイピングを行い、各diplotypeをSNPalyzeにて推定した。Diplotype毎の撓骨骨密度の平均値の差を統計学的に検証した。ハプロタイプ1~4のうち、ハプロタイプ3を1コピー(ヘテロ接合体)もしくは2コピー(ホモ接合体)もつNG-1 女性は有しないNG-1 女性より、有意に撓骨骨密度値が低かった(p=0.023)(表4)。

LDブロック内の5つのSNP(c.2220C>T, IVS10+100A>G, IVS17-30G>A, c.3989C>T, c.3989C>T)について、同様に撓骨骨密度平均値との相関解析を行った。LRP5-9(c.2220C>T)座における遺伝子型C Tヘテロ接合体と、T Tホモ接合体が、C Cホモ接合体に対して骨密度が低値であった(p=0.022)(表4)。IVS17-30G>Aとc.3989C>Tでも各多数アレルのヘテロ接合体または少数アレルのホモ接合体は、多数アレルのホモ接合体より、有意に低い骨密度平均値を示した(p<0.05)(表4)。

表5. HK 集団におけるアレル頻度

SNP	アレル頻度(少数アレル)		χ ²	p
	骨粗鬆症 126名	対照 131名		
IVS1+4689G>C	0.472 (C)	0.511 (C)	0.791	0.374
c.1647C>T	0.008 (T)	0.061 (T)	10.731	0.001*
c.2220C>T	0.302 (T)	0.202 (T)	6.737	0.009*
IVS17-30G>A	0.123 (A)	0.084 (A)	2.118	0.146
c.3989C>T	0.302 (T)	0.237 (T)	2.759	0.097

*統計学的有意

表6. NG-2 集団におけるアレル頻度

SNP	アレル頻度(少数アレル)		χ ²	p
	骨粗鬆症 108名	対照 131名		
IVS1+4689G>C	0.468 (C)	0.511 (C)	0.903	0.342
c.1647C>T	0.018 (T)	0.061 (T)	5.438	0.020*
c.2220C>T	0.298 (T)	0.202 (T)	5.900	0.015*
IVS17-30G>A	0.142 (A)	0.084 (A)	4.108	0.043*
c.3989C>T	0.356 (T)	0.237 (T)	8.245	0.004*

*統計学的有意

表7. HS 集団におけるアレル頻度

SNP	アレル頻度(少数アレル)		χ ²	p
	骨粗鬆症 76名	対照 76名		
IVS1+4689G>C	0.423 (G)	0.481 (G)	1.138	0.286
c.1647C>T	0.024 (T)	0.025 (T)	0.002	0.958
c.2220C>T	0.274 (T)	0.259 (T)	0.089	0.765
IVS17-30G>A	0.138 (A)	0.112 (A)	0.481	0.488
c.3989C>T	0.310 (T)	0.342 (T)	0.386	0.534

(2)ゲノム刷り込み遺伝子群

- 7q32領域内の網羅的な刷り込み関連遺伝子単離（発表論文2、5、11）：7q32に局在するMEST周辺の転写地図を作製し、近傍に12種の遺伝子を同定した（図4）。刷り込みを証明もしくは否定したのはMEST、COPG 2、COPGIT 1、KIAA0265、CPA 3、CPA 1、TSGA1 4の7種である。MESTとCOPG 2 IT1は父性発現、CPA 3は部分的母性発現する刷り込み遺伝子であった。CPA 3は胎児心・腎・肺、成人前立腺組織では部分的刷り込みを示し、染色体上の局在は前立腺癌の増悪因子座であるD7S1804と一致することから、その腫瘍発生と増悪に刷り込みが関与する可能性がある。

精巣特異的転写物A14をコードする新規遺伝子TSGA14に2種の転写産物（胎児組織と成人精巣で発現）を同定した。

「長崎大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会」の承認のもと、十分なインフォームド・コンセントを得て集積した治療的流産由来の胎児組織と母のDNA/cDNAにおける発現解析の結果、TSGA14両型転写物共に種々の胎児組織で両アレル発現がみられた。また、TSGA14のCpG アイランドのメチル化には差異はみられなかった。結論として、MESTの両側に存在するTSGA14と COPG 2 が直接刷り込みを受けていないというこれらの結果は、7q32領域は刷り込みドメインとして強く制御されず、独立した刷り込みシグナルによって制御されていることを示唆する。

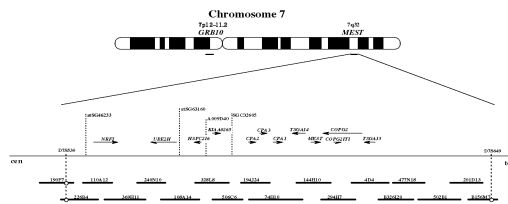


図4. 7q32 領域の物理地図と同定した 12 遺伝子

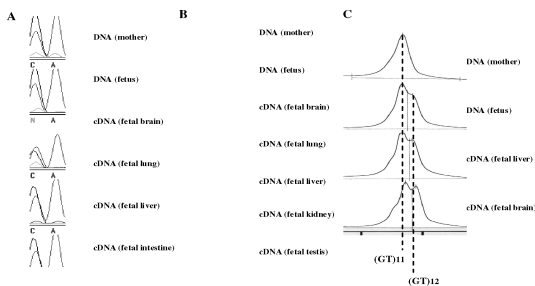


図5. TSGA14 の両アレル発現

- 15q11-q13 領域の刷り込み遺伝子の解析（発表論文4、6、7、12）：ヒト 15q11-q13 領域の母性発現遺伝子 *ATP10A* のマウスホモログ *Atp10a*（マウス 7C）の刷り込みの有無を、交雑マウスにおける組織発現でみた結果、両アレル発現であった（図6）。

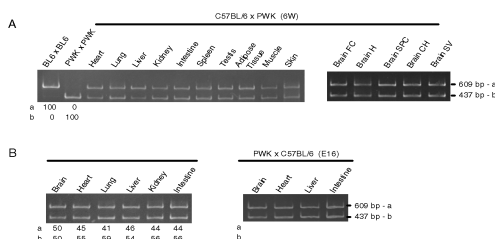
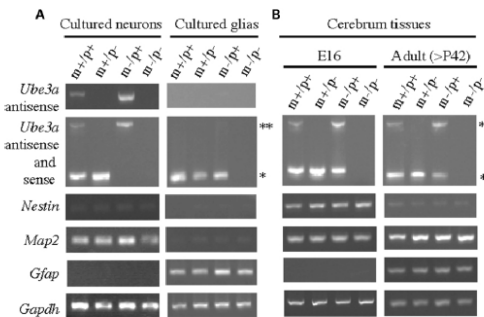


図6. *Atp10a* の両アレル発現

マウス *Ube 3 a* とそのアンチセンス転写物は、グリア細胞ではなく、ニューロンでのみ逆のインプリンティング発現を示した（図7）。

図7. ニューロン細胞におけるマウス *Ube 3 a* とそのアンチセンス転写物の逆刷り込み発現



15q11-q13に欠失のない54名のAngelman症候群患者をメチル化テストおよびマイクロサテライト解析し、3例に父性片親性ダイソミー（UPD）、7例に刷り込み変異を同定した（表8）。

表8. 54例のAngelman症候群患者の解析結果

Test/analysis	Results	No. of patients (%)
DNA methylation test	Negative	44 (81)
	Positive	10 (19)
Polymorphism study	Uniparental isodisomy 15	3 (6)
	Uniparental heterodisomy 15	0 (0)
IC deletion analysis	Biparental disomy 15	7 (13)
	IC deleted	1 sib-pair
	IC present	5

- 卵母細胞におけるPWS-IC転写物の発現とマウス7C刷り込みドメインの刷り込み機構（発表論文16）：マウスPWS-IC転写物（図8）の発現が脳に局限しているとの報告があるが、本研究によって、脳および卵巣に原局発現していることが明らかとなった（図9）。脳における発現量は卵巣の7倍であった。塩基配列決定の結果、RT-PCR産物のSnurf-SnrpnエクソンU1はエクソン1をスキップしエクソン2に連結していた。培養ニューロン、グリア細胞、線維芽細胞、卵母細胞、顆粒膜細胞を随伴した卵母細胞におけるIC転写物の発現量を解析した結果、IC転写産物はニューロン（卵母細胞の7倍）、卵母細胞（顆粒膜細胞を随伴した卵母細胞の1/3量）、顆粒膜細胞で発現していた（図10）。マウス卵巣におけるIC転写産物の発現局在は、強いISHシグナルがグラーフ濾胞の卵母細胞と顆粒膜細胞に局在していることから確認された。

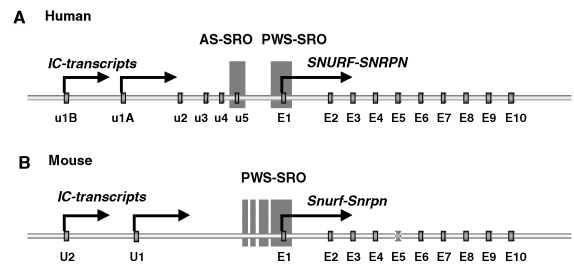


図8. ヒトとマウスPWS-IC (SRO)付近の遺伝子発現

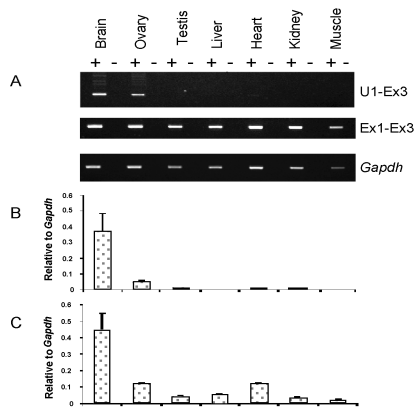


図9. マウスIC転写物の組織発現量

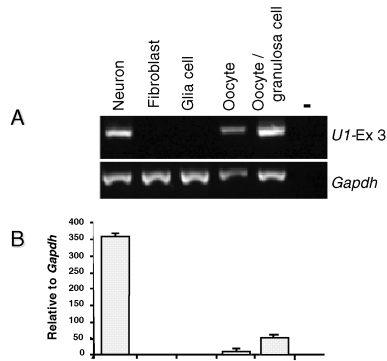


図10. マウスIC転写物の細胞特異的発現

- マウスIgf2rのニューロン特異的刷り込み喪失 (発表論文14) : 刷り込み遺伝子Igf2rの刷り込みの有無を、初代培養ニューロンとグリア細胞で調べた結果、従来判明していたニューロン特異的刷り込み喪失は、ニューロン特異的ヒストン修飾およびIgf2rのアンチセンス転写物の欠落と関連していることを明らかにした。

〈国内外での成果の位置づけ〉

骨粗鬆症：本研究では骨粗鬆症候補遺伝子を基に、最初に撓骨骨密度との相関解析を行い、次いで骨粗鬆症における症例・対照解析を行った。本研究結果から、LRP5は骨密度の決定因子の1つであり、骨粗鬆症の発症危険因子であることが明らかとなった。本研究結果はLRP5の骨密度への関連の世界で最初の報告であり、OMIMにも登録されている (OMIM *603506)。その再現性はスイス、UK、米国、豪州および国内の他のグループで相次いで確認された (Ferrari et al. 2004; Koay et al. 2004; Urano et al. 2004; Hartikka et al. 2005; Koller et al. 2005)。しかし、これら一連の研究でも、p値はまだ十分に低くなく、その再現性が問題となる。本研究で認めた連鎖不平衡ブロック内の他のSNPと骨密度との有意な相関を示すデータが報告されている。Hartikkaら (2005) は、原発性骨粗鬆症小児20例におけるLRP5遺伝子変異解析を行い、疾患と共分離する2種のミスセンス変異と1つのフレームシフト変異を報告した。他方、人種間で共通するcommon variantは同定されていない。この理由として、SNP頻度の民族差や、解析集団の不均一性、異なる骨密度測定部位などが挙げられる。Ferrariら (2004) は、男性において骨密度の差を認めるSNP (c.2047G>A) を報告したが、本研究における日本人集団154名中には同SNPはなく、白人特有のSNPであり日本人には適応できない。いずれにしても、本研究を初めとして複数の異なる集団においてLRP5と骨密度あるいは骨粗鬆症との関連が再現

性をもってみられ、その役割は確実となった。

ゲノム刷り込み遺伝子群の解析：7q32領域はシルバークラッシュ症、自閉症、前立腺癌悪性因子の候補領域であり、各疾患関連刷り込み遺伝子の探索が世界中で進行している。同領域における正確且つgapのない物理地図は本研究で作成したPAC/BACコンティグだけであり、刷り込みドメイン構造の解析に有用であり、その標準となっている。

7q32領域に局在する遺伝子群の刷り込み解析研究はMEST以外には国内外共に少ないが、ATP10aに関しては刷り込みパターンに異論があったが、本研究により、そのパターンの差は、用いたマウス系の違いに基づくことが示唆された。CPA3遺伝子クラスターを始め他の7q32領域遺伝子の刷り込み状態の解析は、本研究が最初である。

刷り込み遺伝子の組織特異的刷り込みパターンの解析は国内外とも多い。とりわけ、同一遺伝子の、脳と脳以外の組織における刷り込みの有無は、ヒトにおける神経系の発達に関与する可能性のあることから、ホットな研究領域である。本研究で行っている手法は、脳組織を特異的成長因子による細胞培養によって、ニューロンとグリア細胞とに明確に分けて解析したことにあり、他の研究の追従を許さないユニークなものである。この方法による、Ube3a(15q11-q13)の脳細胞特異的刷り込み、およびIgf2r(6q26)の脳細胞特異的刷り込みの喪失は国内外でも初めての知見である。

従来、マウスPWS-IC転写物の発現が脳に局限しているとされていたが、本研究によって、脳以外にも雌性生殖細胞系である卵巣でも原局発現していることが明らかとなった。すなわち、Snurf-Snrpn転写物は雌性生殖細胞系において選択的にスプライスされ、このIC転写物は、刷り込みの第1次刻印である母性マークの成立に対して何らかの重要な役割を担っていることが明らかとなった。本研究の結果は、IC転写物が母性染色体上のPWS-ICのメチル化に関するシスに作用する何らかの因子であるという仮説を支持するものである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- 研究開始時の研究計画のうち、TGFB1と骨密度との関連は否定され、また骨密度増加をもつモデルマウスの作成は、キメラマウス作成まで成功したが、F1以降の作成は困難を極め、Tgfb1の関連が否定的であることも勘案して、作成を断念した。
- 多数の骨粗鬆症患者試料の入手が予想外に困難であった。集積した医療機関は中堅施設であり、患者の絶対数が少ないこと、同意を得ることに難儀した。これが、本研究期間中、同解析に時間を要した最大の理由である。しかし、幸いにも解析に堪えうる試料数が複数地域から集積でき、無事解析が完了した。
- 本研究で、LRP5が骨粗鬆症の発症危険因子であることが判明したが、真の遺伝子発現変化をもたらす変異(SNP)は未発見である。
- 7q32刷り込み調節領域が、MESTプロモーター領域に存在すると理論的に考えたが、数種の遺伝子や転写物の刷り込みはなく、複数の調節領域の可能性が残ったが、最初の仮定に誤りがあった。予想を下回る刷り込み遺伝子数のため機構解明のためのKOマウスは作成できなかった。
- 7q32領域の自閉症座の解析は、最も困難を極めた。その理由は、本研究者の施設および共同研究施設両方で倫理委員会の承認を得て、研究を開始したにもかかわらず

ならず、共同研究者の施設からの試料提供が全くなかったことである。そのため、研究期間の第2年目から研究自体を断念した。

〈今後の課題〉

骨粗鬆症：骨密度を規定する遺伝子のうち、LRP5中のLDブロック中に真に骨密度を規定しているSNPを探索する必要がある。また、骨密度の決定因子は他にも多数存在すると考えられるので、それらについて同様の解析を行うことが必要である。

刷り込み機構：ゲノム刷り込みはエピジェネティック機構の1つであるが、未だ全ての刷り込み遺伝子が同定されていないし、またその発現様式の全解明も進んでいない。とりわけ、中枢神経系における刷り込みの有無の解明は、哺乳類やヒトの神経系の進化上の発達と関連する可能性があり、さらに研究を進展させる必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

- 0602091324
Watanabe Y, Kinoshita A, Yamada T, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Ishikawa M, Niikawa N, Yoshiura K: A catalog of 106 single nucleotide polymorphisms (SNPs) and 11 other types of variations in genes for transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and its signaling pathway. *J Hum Genet* 47: 478-483, 2002.
- 0602091339
Yamada T, Kayashima T, Yamasaki K, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Fujimoto S, Niikawa N, Kishino T: The novel gene, TSGA14, adjacent to the imprinted gene MEST escapes genomic imprinting. *Gene* 288 (1-2): 57-63, 2002.
- 0602091348
Miyamoto T, Hasuike S, Jinno Y, Soejima H, Yun K, Miura K, Ishikawa M, Niikawa N: The human ASCL2 gene escaping genomic imprinting and its expression pattern. *J Assist Reprod Genet* 19: 240-244, 2002.
- 0404121919
Kayashima T, Yamasaki K, Joh K, Yamada T, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Mukai T, Niikawa N, Kishino T: Atp10a, the mouse ortholog of the human imprinted ATP10C gene, escapes genomic imprinting. *Genomics* 81: 644-647, 2003.
- 030441609
Kayashima T, Yamasaki K, Yamada T, Sakai H, Miwa N, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Nakane Y, Kanetake H, Niikawa N, Kishino T: The novel imprinted carboxypeptidase A4 gene (CPA4) in the 7q32 imprinting domain. *Hum Genet* 112: 220-226, 2003.
- 0602091400
Kayashima T, Ohta T, Niikawa N, Kishino T: On the conflicting reports of imprinting status of mouse ATP10a in the adult brain: Strain-background-dependent imprinting? *J Hum Genet* 48(9): 492-493; . 2003.
- 0404121946
Yamasaki K, Joh K, Ohta T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Ogawa M, Wagstaff J, Kishino T: Neurons but not glial cells show reciprocal imprinting

of sense and antisense transcripts of Ube3a. *Hum Mol Genet* 12: 837-847, 2003.

- 0602091415
Higashimoto K, Urano T, Sugiura K, Yatsuki H, Joh K, Wei Z, Iwakawa M, Ohashi H, Oshimura M, Niikawa N, Mukai T, Soejima H: Loss of CpG methylation is strongly correlated with loss of histone H3 lysine 9 methylation at DMR-LIT1 in patients with Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Hum Genet* 73 (4): 948-956, 2003.
- 0602091420
Kinoshita A, Shirahama A, Miyahara A, Nishimura G, Haga N, Namba A, Ueda H, Hayashi H, Seidel J, Fukumaki Y, Ikegawa S, Niikawa N, Yoshiura K: TGFBI mutations in four new families with Camurati-Engelmann disease: Confirmation of independently arising LAP-domain-specific mutations. *Am J Med Genet* 127A: 104-107, 2004.
- 0404121900
Mizuguchi T, Furuta I, Watanabe Y, Tsukamoto K, Tomita H, Tsujihata M, Ohta T, Kishino T, Matsumoto N, Minakami H, Niikawa N, Yoshiura K: LRP5, low density lipoprotein receptor-related protein 5, is a determinant for bone mineral density (BMD). *J Hum Genet* 49: 80-86, 2004.
- 0602091433
Yamada T, Mitsuya K, Kayashima T, Yamasaki K, Ohta T, Yoshiura K, Matsumoto N, Yamada H, Minakami H, Oshimura M, Niikawa N, Kishino T: Imprinting analysis of 10 genes and/or transcripts in a 1.5-Mb MEST-flanking region at human chromosome 7q32. *Genomics* 83 (3): 402-412, 2004.
- 0602091450
Saitoh S, Wada T, Okajima M, Takano K, Sudo A, Niikawa N: Uniparental disomy and imprinting defects in Japanese patients with Angelman syndrome. *Brain Develop* 27: 389-391, 2005.
- 0602091455
Machida H, Tsukamoto K, Wen C-Y, Narumi Y, Shikuwa S, Isomoto H, Takeshima F, Mizuta Y, Niikawa N, Murata I, Kohno S. Association of polymorphic alleles of CTLA4 with inflammatory bowel disease in the Japanese. *World J Gastroenterol* 11 (27): 4188-4193, 2005.
- 0602091507
Yamasaki Y, Kayashima T, Soejima H, Kinoshita A, Yoshiura KI, Matsumoto N, Ohta T, Urano T, Masuzaki H, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N, Kishino T. Neuron-specific relaxation of Igf2r imprinting is associated with neuron-specific histone modifications and lack of its antisense transcript Air. *Hum Mol Genet* 14: 2511-2530, 2005.
- 0602091512
Amani D, Dehaghani SA, Zolghadri J, Ravangard F, Niikawa N, Yoshiura K, Ghaderi A: Lack of association between the TGF- β 1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* (in press)
- Mapendano CK, Kishino T, Miyazaki K, Kondo S, Yoshiura K, Hishikawa Y, Koji T, Niikawa N, Ohta T: Expression of the Snurf-Snrpn IC transcript in the

oocyte and putative role in the imprinting establishment of the mouse 7C imprinting domain. *J Hum Genet* (in press).