

学位論文題名

Bone mineral density of the lumbar spine is associated
with TNF gene polymorphisms in early
postmenopausal Japanese women.

(TNF 遺伝子多型は閉経後早期日本人女性における
腰椎骨密度と関連する)

学位論文内容の要旨

[はじめに]

骨吸収性サイトカインである TNF α は、in vitro において破骨細胞を誘導・活性化することが報告されており、閉経後女性に起こる骨吸収の増加に関与していることが示唆されている。TNF 遺伝子 locus には多くの一塩基多型が存在しており、これらの遺伝子多型と TNF α 産生能との関連についての研究はいくつか報告されているが、骨密度との関連にまで言及した報告は少ない。本研究において我々は、閉経後早期日本人女性における TNF 遺伝子多型と腰椎骨密度および血中 TNF α 濃度との関連について検討した。

[対象および方法]

対象：1995 年から 2003 年までの間に北海道大学医学部附属病院産婦人科骨粗鬆症外来を受診した閉経後 10 年以内の女性 531 例のうち、合併症例、エストロゲン製剤服用例、早発閉経例、腰椎圧迫骨折例を除く 177 例 (56.4 \pm 4.5 歳, mean \pm SD) を対象とした。

骨密度(BMD)および血中 TNF α の測定：骨密度は二重エネルギー X 線吸収法 (DXA) により第 2 から第 4 腰椎を測定した。血清中の TNF α 濃度は ELISA キットで測定した。

遺伝子多型の解析：末梢血白血球から DNA を抽出し、TNF β 遺伝子 intron1 の Nco I site および、TNF α promoter 領域の -857(C \rightarrow T), -863(C \rightarrow A), -1031(T \rightarrow C) 部位について RFLP(制限酵素断片長多型)法で遺伝子多型を解析した。PCR 法で各遺伝子多型部位を含むゲノム DNA を増幅し、PCR 産物を制限酵素で切断後アガロースにて電気泳動した。TNF β 遺伝子多型は切断部位を持つものを b1, 持たないものを b2 とし、TNF α -857, -863, -1031 遺伝子多型はそれぞれ切断部位を持つものを C, A, C, 持たないものを T, C, T として RFLP 分類した。

統計解析：Allele の出現頻度の比較は χ^2 検定で行った。骨密度の比較は ANOVA, Fisher's PLSD, 血中 TNF α 濃度の比較は Kruskal Wallis test で行った。

[結果]

1. Allele の出現頻度と連鎖不平衡

4ヶ所の遺伝子多型における各 Allele の出現頻度は既報の日本人における出現頻度と同等であり、いずれも Hardy-Weinberg 平衡に達していた。TNF β b1/b2 は TNF α -857C/T, -863C/A, -1031T/C と連鎖不平衡の関係にあり、TNF α -863C/A は-1031T/C と連鎖不平衡の関係にあった。

2. TNF 遺伝子型と骨密度

全症例を Z-score (性・年齢を一致させた正常値からの偏位) が 0 以上の高骨密度群(H 群: n=86)と 0 未満の低骨密度群(L 群: n=91)の 2 群に分けて比較すると、TNF α -863C/A の各遺伝子型の出現頻度は、H 群と L 群とで差異が認められた。また、TNF α -863A allele, -1031C allele の出現頻度は H 群に比べ L 群において有意に高かった。各遺伝子多型における遺伝子型と骨密度との関係を検討した結果、出現頻度の低い allele(rare allele)のホモ型である TNF β b1/b1, TNF α -863A/A, TNF α -1031C/C の Z-score は他の型より低値を示し、特に TNF α -857T/T の Z-score は C/T, C/C より有意に低値を示した。次に、4ヶ所の遺伝子多型を組み合わせた遺伝子型と骨密度との関係について調べた。rare allele のホモ型では Z-score が低値を示したことに着目し、これらの allele の合計数と骨密度との関係について検討を行った。全症例を rare allele の合計数で 5 群に分類(0 個:n=14, 1 個:n=53, 2 個:n=72, 3 個:n=24, 4 個:n=11, 5 個以上持つ群は無し)して比較すると、Z-score は rare allele の合計数が多い群ほど低値を示した。5 群の間に body mass index の差異は認められなかった。閉経後早期女性の骨密度を予測する因子について重回帰分析を行った結果、閉経後年数、body mass index および rare allele の合計数が独立因子として選択された。

3. TNF 遺伝子型と血中 TNF α 濃度

4ヶ所の遺伝子多型のいずれにおいても、各遺伝子型(TNF β b1/b1, b1/b2, b2b2; TNF α -857C/C, C/T, T/T; TNF α -863C/C, C/A, A/A; TNF α -1031T/T, T/C, C/C)の間に血中 TNF α 濃度の違いは認められなかった。

[考察]

骨粗鬆症の病因・病態には遺伝的要因が関与していると考えられており、いくつかの候補遺伝子については骨密度との関連が調べられている。本研究において我々は TNF β 遺伝子 intron1 の NcoI 多型および、TNF α promoter 領域の-857(C \rightarrow T), -863(C \rightarrow A), -1031(T \rightarrow C)部位の多型と閉経後早期女性の腰椎骨密度との関係について検討した。その結果、低骨密度群では高骨密度群に比べて TNF α -863A allele, -1031C allele の出現頻度が有意に高いこと、rare allele のホモ型の Z-score は他の型より低値を示すこと、rare allele の合計数が多いほど Z-score が低値を示すことが明らかとなった。

我々の結果に反して、Wennberg et al は思春期の白人女性を対象として TNF α -863A allele carrier は腰椎骨密度が高いと報告している。思春期(骨形成優位)と閉経後(骨吸収優位)とでは骨代謝が異なることから、この不一致は年齢の違いに起因するものと考えられた。また、Ota et al は我々より高齢(平均 73.2 歳)の日本人女性を対象とし、橈骨の骨密度を指標として TNF α -1031C のホモ型は骨密度が高いと報告している。海綿骨の多い腰椎では閉経後早期から骨減少が生じるのに対し、皮質骨の多い橈骨で骨減少が明らかになるのは高齢になってからであるとされていること、同一人でも場所によって骨密度の高低があること

から、Ota et al の結果との不一致は骨密度の測定部位の違いによるものと考えられた。

TNF α は骨吸収促進作用を有する、TNF 遺伝子多型はTNF α 産生能に関係する、といった過去の報告から骨密度が低く血中TNF α 濃度が高いという特定の遺伝子型の存在が期待されたが、今回検討した遺伝子多型およびrare alleleの合計による分類のどちらにおいても血中TNF α 濃度の違いは認められなかった。特定の遺伝子型でTNF α 分泌が増強されるとしても、それは骨の周りの微細環境における事象であり、末梢血レベルにまで反映されるものではないと思われた。

本研究の対象は専門外来受診者という特殊な集団ではあるが、criteriaに沿って慎重に選抜され、各遺伝子多型の出現頻度および骨粗鬆症発症率が既報の健康日本人集団のものと同ほ等しい点から、極めて正常人に近似した集団であると考えられた。

本研究によりTNF β およびTNF α promoter領域の遺伝子多型が閉経後早期日本人女性の腰椎骨密度に関連すること、rare alleleの合計数によって閉経後女性の骨密度を予測する可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 三 浪 明 男
副 査 教 授 水 上 尚 典
副 査 教 授 櫻 木 範 明

学 位 論 文 題 名

Bone mineral density of the lumbar spine is associated with TNF gene polymorphisms in early postmenopausal Japanese women.

(TNF 遺伝子多型は閉経後早期日本人女性における
腰椎骨密度と関連する)

この論文は閉経後 10 年以内の 177 名の婦人を対象として腰椎骨密度、TNF 遺伝子多型 (TNF β b1/b2、TNF α -857C/T, -863C/A, -1031T/C)、末梢血中 TNF α 濃度の三者の関連について検討したものである。出現頻度の低い allele (rare allele) のホモ型である TNF β b1/b1(15.9%), TNF α -857T/T (3.4%), TNF α -863A/A (3.4%), TNF α -1031C/C (5.2%) であった婦人群では他群に比して腰椎骨密度が低くまたこれら rare alleles を数多く有する女性ほど骨密度が低いことを明らかにした。また、これら rare alleles の合計数は閉経後年数、body mass index とともに腰椎骨密度の独立予測因子であることを明らかにした。一方、腰椎骨密度と末梢血中 TNF α 濃度間、TNF 遺伝子多型と末梢血中 TNF α 濃度間には関連が認められないことを明らかにした。

発表終了後、副査である婦人科学分野櫻木教授より、今回示した TNF α promoter の多型が TNF α 産生に促進的に関与するというこれはこれまでの報告、特にレポーターアッセイなどの基礎的検討と一致するか、という質問があった。発表者は、今回検討した多型について、in vitro の系で TNF α 産生を調べた 2 編の論文を引用して以下のように説明した。「1 編は TNF α -863 多型についての報告であり、本論文とは逆に出現頻度の低い -863A allele が TNF α 遺伝子の低発現と関連するという結果であった。もう 1 編は TNF α -857, -863, -1031 多型についての報告であり、出現頻度の低い allele が TNF α 遺伝子の高発現と関連するという内容で、本論文と一致する結果であった。」さらに櫻木教授からは、TNF α が骨塩量低下以外に臓器あるいは組織に影響を及ぼす可能性はあるか、という質問があった。発表者は、局所的な TNF α 産生により特定の臓器・組織へ影響を与える可能性としては、関節リウマチで関節滑膜における局所的 TNF α 産生により滑膜腔の炎症・関節破壊がおこる可能性、また産科領域では、子宮内感染時に羊水中の TNF

α 濃度が上昇し、子宮収縮が惹起されて早産に至る可能性について述べた。櫻木教授からは、最後にこの研究は骨粗鬆症の治療という面でどのように利用できるかという質問があった。発表者は、「本研究の臨床応用としては予防医学的な応用、たとえば閉経後に骨密度が早く減少しそうな遺伝子型の女性には、食事指導や運動の奨励、骨密度の減少を抑制する治療を早期から行う、ことなどが考えられる」と回答した。次に、主査である整形外科分野三浪教授より、骨密度は DXA 法で測定しているがその測定に際し、骨粗鬆症では骨の変性が高く、骨密度の値が異常に高く出ることがあるが、そのような例はどのように除外しているかという質問があった。発表者は、「X 線画像上の腰椎圧迫骨折の有無等の臨床的な診断は、共同研究者である骨粗鬆症外来担当医師の診断にしたがっている」と回答した。さらに三浪教授から、骨密度の低い群では TNF α -863A, -1031C allele の出現頻度が高いという結果だが、これらの allele は骨粗鬆症の risk factor だが、原因と関連するか、結果と関連するか、という質問があった。発表者は、「これらの allele は機能的に TNF α 産生能に関与していると考えられるので、原因と関連する」と回答した。また、三浪教授からは、このような遺伝子多型を応用して TNF α 産生亢進が関与するような骨粗鬆症の治療法として、整形外科分野で使われている分子標的薬剤（抗 TNF α 抗体、可溶性 TNF α レセプター製剤）が利用できるようになると良いという意見が述べられた。最後に、副査であり指導教官である産科・生殖医学分野水上教授より、どの多型においても rare allele のホモ型が最も骨密度が低いという結果であるがこれをどのように解釈するかという質問があった。発表者は、「これらの allele のホモ型は局所における TNF α 産生能が高く、そのことが骨密度が低いということ以外にも何らかの生存に不利益な条件となって、淘汰がおこり結果的に dominant ではなく rare な allele として遺残した、ということが考えられる」と回答した。さらに水上教授より、discussion にあるように-863A を有する思春期女性は反対に骨密度が高いという報告があるがこれをどのように考えるかという質問があった。発表者は、「思春期も閉経後早期もいずれも骨吸収・骨形成ともに活発な時期であるが、TNF α -863A allele を持つ女性は、骨の代謝活性が高い、即ち、思春期に他の型より早くピークボーンマスに到達し、閉経後には他の型より速やかに骨量が減少する可能性が考えられる」と回答した。

この論文は、閉経後に骨密度が低下する危険性の高い日本人女性を遺伝子多型検査によって予測しうる可能性を示した点で高く評価され、今後閉経後の骨粗鬆症発症予防に役立つことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。