

令和元年5月27日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16709

研究課題名(和文) 時期及び軟骨特異的Gpr126ノックアウトマウスを用いた特発性側彎症の病態の解明

研究課題名(英文) Analysis on the pathogenesis of idiopathic scoliosis using Gpr126 conditional knock-out mice

研究代表者

郭 竜 (Guo, Long)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50784055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：思春期特発性側彎症(AIS)は思春期に発症する原因不明の疾患である。本研究では、全ゲノム相関解析(GWAS)により発見された遺伝子のひとつであるGPR126の脊椎の形成、成長における機能解析を行い、以下の結果を得た。

1)軟骨様細胞株、iPS細胞等を用い、細胞レベルで、軟骨分化、脊椎発生における脊椎形成関連遺伝子の機能を明らかにした。2)マウスの成長過程の脊椎におけるGpr126の発現解析を行い、遺伝子発現の部位、時期などを個体レベルで明らかにした。3)タモキシフェン誘導性遺伝子改変システムを用いて、時期および軟骨特異的にGpr126をノックアウトしたcKOマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AISは原因不明の難病で、全世界で、人口の2-4%に発症するcommon diseaseであり、その病因の解明、効果的な治療法の開発は、世界の医療、医療経済上の大きな課題となっている。しかし、その病因、病態は、ほとんど不明である。先にGWASによりいくつかの原因遺伝子が同定されたが、AISの分子病態の解明には繋がっていない。本研究は、GWASにより発見された遺伝子のひとつであるGPR126を突破口に、脊椎の形成、成長における遺伝子機能の解析を通じて、AISの分子病態を解明した。

研究成果の概要(英文)：Adolescent Idiopathic Scoliosis(AIS) is a very common disease with a prevalence of 2-4% all over the world. Its treatment is a global medical and medico-social problem; however, its etiology and pathogenesis remain mostly unclarified.

In this study, we investigated GPR126(G-protein-coupled receptor 126), one of the GWAS-identified gene in vitro and in vivo. We have clarified the function of genes involved in formation and development of the spine at the cell level using iPS cells, etc. We have also clarified special and temporal expression profiles of Gpr126 during the development of the spine in mouse. By using a tamoxifen-induced system, we have established a Gpr126 conditional knock-out mouse (Sox9-CreERT2; Gpr126<sup>fl/fl</sup>), which would be a good tool of AIS genetic studies.

研究分野：疾患遺伝学、医学遺伝学、ゲノム医科学

キーワード：側彎 思春期特発性側彎症 GWAS GPR126 多因子遺伝病 ゲノム解析 分子病態 ノックアウトマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

思春期特発性側弯症 (Adolescent Idiopathic Scoliosis: AIS) は思春期に発症・進行する原因不明の疾患である。全世界で、人口の 2-4% に発症する common disease で、その病因の解明、効果的な治療法の開発は、世界の医療、医療経済上の大きな課題となっている。AIS は遺伝因子と環境因子の相互作用により発症する多因子疾患と考えられている。これまで、世界中の研究グループがさまざまな手法を用いて AIS の遺伝因子の探索を行ってきたが、明らかな原因遺伝子 (疾患感受性遺伝子) の同定には至らなかった。

申請者の所属する研究室では、日本全国の側弯症の専門医の集団、日本側弯症臨床学術研究グループと共に収集した約 1,500 例の AIS 患者サンプルを用いて、GWAS を行い、世界に先駆けて AIS の疾患感受性遺伝子の同定に成功した (Takahashi *et al.* Nat Genet 2011)。次いで、規模を拡大した GWAS により G-protein-coupled receptor 126 (*GPR126*)、Basonuclin 2 (*BNC2*) の同定にも成功している。しかし、その後の機能解析が十分でないため疾患感受性遺伝子から AIS 発症に至るメカニズムは依然として不明であった。

### 2. 研究の目的

AIS の疾患感受性遺伝子のひとつ、*GPR126* の機能を明らかにする。*Gpr126* の脊椎の形成、成長、発達における機能を明らかにし、AIS の分子病態を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞レベルで、軟骨分化における *GPR126* の機能を明らかにする。ヒト軟骨細胞様細胞 (OUMS-27 細胞または HCS2/8 細胞)、マウス由来の軟骨前駆細胞 (ATDC5 細胞) 等の培養細胞株を用いる。各細胞での発現、分化誘導下の *GPR126* 発現 profile は確認済み。*GPR126* の発現制御解析により、軟骨における *GPR126* の機能を明らかにする。発現ベクターを用いた *GPR126* の一過性過剰発現、siRNA による *GPR126* の一過性ノックダウン、およびレンチウイルス発現システムを利用した *GPR126* 安定発現細胞株・安定的ノックダウン細胞株を作製し、*GPR126* の発現制御による軟骨分化マーカー遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR システムで解析する。*GPR126* cDNA のクローニング、*GPR126* 発現ベクターの作製は完了している。軟骨細胞は遺伝子導入効率が悪いいため、まず導入条件の最適化を行い、導入法を確立する。遺伝子導入法としては、ポリマーや脂質ベースのトランスフェクション試薬、4D-Nucleofector システム (現有機器) を用いたエレクトロポレーション法の検討を行う。確立した条件で、*GPR126* の強制発現およびノックダウンを行い、一過性の発現制御による機能解析を行う。

(2) マウスの成長過程の脊椎における *Gpr126* の発現解析を行い、遺伝子発現の部位、時期などを個体レベルで明らかにする。AIS は思春期特異的に発症、進展する脊椎疾患である。よって、成長過程における脊椎での発現パターンを理解することが重要である。*in situ* hybridization 法と免疫組織染色法を用いて、新生児期～成人期マウスの脊椎、及びその周辺組織における発現を解析する。

(3) タモキシフェン誘導性遺伝子改変システムを用いて、時期および軟骨特異的に *Gpr126* をノックアウトした cKO マウス (*Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>; Gpr126<sup>fl/fl</sup>* マウスおよび *Col2a1-Cre<sup>ERT</sup>; Gpr126<sup>fl/fl</sup>* マウス) を作製する。作製した *Gpr126* cKO マウスの表現型解析、組織学的解析により、マウスの発生・成長過程の脊椎における *Gpr126* の機能、側弯の発生メカニズムを明らかにする。タモキシフェン誘導性 *Gpr126* cKO マウスの作製には、変異エストロゲンレセプター (CreERT、CreERT2 等) を用いた Cre 組換え酵素誘導システムを用いる。本システムは、タモキシフェン投与下でのみ DNA 組換え酵素 Cre が働き、loxP 配列部位で組換えを起こす特異的な組換え反応を利用した遺伝子組換えシステムである。既に、*Gpr126* 遺伝子破壊のターゲティングベクターを構築した。ES 細胞を用いた相同組換え法による *Gpr126* キメラマウスを作製しこれとキメラマウスと野生型マウスを交配し、ヘテロマウスを作製する。

#### 4. 研究成果

*GPR126* 発現レンチウイルスベクター、shRNA 発現レンチウイルスベクターを作製した。作製したレンチウイルスベクターをヒト軟骨細胞様細胞株に導入し、*GPR126* 安定発現細胞株および安定的ノックダウン細胞株を取得した。取得した各細胞株を用いて、軟骨分化マーカー遺伝子の発現変化をリアルタイム PCR システムで解析した。

時期および軟骨特異的に *Gpr126* をノックアウトするため、軟骨分化のマスターレギュレーターである *Sox9* のトランスジェニックマウス (*Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>* マウス) と交配させ、タモキシフェン誘導性 *Gpr126* cKO マウス (*Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>; Gpr126<sup>f1/f1</sup>* マウス) を作製した。作製した *Gpr126* cKO マウスを用いてタモキシフェンの投与方法に対する予備実験を行い、タモキシフェンの至適投与条件を決定した。

胎生期 ~ 思春期にかけてタモキシフェンを投与した *Gpr126* cKO マウス (*Sox9-Cre<sup>ERT2</sup>; Gpr126<sup>f1/f1</sup>* マウス) を順次作製した。各時期について、表現型の確認や組織学的解析を行なった。側彎の表現型が見られた *Gpr126* cKO マウスに対しては、コントロールマウスとともに脊椎から RNA を抽出し、リアルタイム PCR システムを用いて軟骨の分化マーカー遺伝子 (*Col2a1*, *Agc1*, *Col10a1* 等) の発現を比較した。

各時期の全身骨格と脊椎の組織切片を作製し、Alcian blue、アリザリンレッド等の染色法を用いて骨・軟骨形成を検討した。*in situ* hybridization や免疫組織染色により、脊椎での AIS 関連遺伝子群の発現を調べた。

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 2 件)

Otomo N, Takeda K, Kawai S, Kou I, Guo L, Osawa M, Alev C, Kawakami N, Miyake N, Matsumoto N, Yasuhiko Y, Kotani T, Suzuki T, Uno K, Sudo H, Inami S, Taneichi H, Shigematsu H, Watanabe K, Yonezawa I, Sugawara R, Taniguchi Y, Minami S, Kaneko K, Nakamura M, Matsumoto M, Toguchida J, Watanabe K, Ikegawa S, Bi-allelic loss of function variants of TBX6 causes a spectrum of malformation of spine and rib including congenital scoliosis and spondylocostal dysostosis, J Med Genet, 査読有, 2019 [Epub ahead of print], doi: 10.1136/jmedgenet-2018-105920

Otomo N, Mizumoto S, Lu HF, Takeda K, Campos-Xavier B, Mittaz-Crettol L, Guo L, Takikawa K, Nakamura M, Yamada S, Matsumoto M, Watanabe K, Ikegawa S, Identification of novel LFNG mutations in spondylocostal dysostosis, J Hum Genet, 査読有, 64(3):261-264, 2019, doi: 10.1038/s10038-018-0548-2

##### [学会発表](計 4 件)

郭 竜、大規模ゲノム解析を出発点とする脊椎の形成機構と側彎症の分子病態の解明、京都大学ウイルス・再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合の共同研究拠点」「ウイルス感染症・生命科学先端融合の共同研究拠点」平成 30 年度共同研究合同報告会、2019 年

郭 竜、王 錚、池川 志郎、Mutations in TMEM53 cause a novel type of skeletal dysplasia、第 9 回 Orthopedic Research Club、2019 年

郭 竜、iPS 細胞を用いた脊椎の形成機構と側彎症の分子病態の解明、京都大学ウイルス・再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合の共同研究拠点」平成 29 年度共同研究報告会、2018 年

郭 竜、王 錚、池川 志郎、Mutations in TMEM53 cause a novel type of skeletal dysplasia、第 8 回 Orthopedic Research Club、2017 年

##### [図書](計 1 件)

Long Guo, Shiro Ikegawa, Chisa Shukunami, Springer, Zebrafish, Medaka, and Other Small Fishes - New Model Animals in Biology, Medicine, and Beyond, 2018, 217-234.

##### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

(1) <http://www2.riken.jp/lab-www/OA-team/research.html>

(2) <http://www2.riken.jp/lab-www/OA-team/JSDC/>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：宿南 知佐

ローマ字氏名：(SHUKUNAMI, chisa)

研究協力者氏名：王 錚

ローマ字氏名：(WANG, zheng)

研究協力者氏名：池川 志郎

ローマ字氏名：(IKEGAWA, shiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。