

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09660

研究課題名(和文) 思春期特発性側弯症関連遺伝子LBX1の機能解析

研究課題名(英文) Investigation of the potential involvement of LBX1 in the development of adolescent idiopathic scoliosis

研究代表者

今林 英明 (IMABAYASHI, Hideaki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員

研究者番号：40296629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：LBX1遺伝子は、ヒト思春期突発性側弯症の発症と最も相関のある一塩基多型の近傍に局在する遺伝子である。本研究では、骨格筋特異的にLBX1遺伝子を欠失した遺伝子改変マウスを作成し、その表現型解析を行った。その結果、本マウスでは、前肢が低形成であり、加齢とともに脊椎の後弯が野生型マウスと比較して進行することが明らかとなった。また、興味深いことに、本遺伝子改変マウスは肥満抵抗性であり、エネルギー代謝が亢進していることが明らかとなった。これらの知見からLBX1の機能不全は、体組成の変化を誘導し、その結果間接的に脊柱側弯症の発生リスクを増加させると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

思春期突発性側弯症は多因子疾患であり、その発症には遺伝的素因や後天的な要素が関与していると考えられる。また、これまでの研究から、思春期突発性側弯症患者は健常な対象群と比較して痩せ体形であることが明らかとなっている。LBX1が体組成もしくはエネルギー代謝に関与しているという報告は従来なく、今回のマウスモデルから得られた知見は、このヒト側弯症患者との類似性があり、側弯症患者の病態を考える上で重要であると考えられる。さらに、本研究の成果から、LBX1の機能不全は、体組成の変化を誘導し、その結果間接的に脊柱側弯症の発生リスクを増加させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：LBX1 is a gene located near a single nucleotide polymorphism that is highly associated with susceptibility to adolescent idiopathic scoliosis. However, the potential involvement of LBX1 in the etiology of this spinal deformity has not been elucidated. In this study, we aimed to determine whether the lack of LBX1 in skeletal muscle results in spinal deformities in mice. We generated mutant mice in which the Lbx1 allele was conditionally excised under the control of a human muscle actin promoter. Mice lacking LBX1 from the skeletal muscle were fertile and available. The mutant mice had hypoplastic forelimbs and weighed less than control animals, but otherwise, there were no overt anomalies. The mice did not exhibit a scoliosis-like spinal deformity; however, they developed moderate kyphosis as they grew old. These observations indicated that LBX1 is involved in limb development and potentially in the maintenance of spinal alignment in mice.

研究分野：整形外科

キーワード：LBX1 脊柱変形 マウスモデル 思春期突発性側弯症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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, 以下 AIS) は就学期の青少年の約 2-3% に発生すると考えられている。脊柱の弯曲による肩・ウエストラインの左右差などの容姿の問題だけでなく、悪化した症例では胸郭変形や胸腰椎の変形・変性が進み大きな障害を来たしうる。一般的に、骨成長の終了とともに側弯の進行は停止するが、重症例では骨の成長後も側弯が進み、体幹変形、二次性の変形性脊椎症、さらには、腰痛、下肢痛など様々な神経障害の原因となりうる。このことから、成長期終了以前に進行した症例に対してはインプラントによる矯正手術の適応となる。しかしながら、手術は侵襲が大きく、合併症も無視できないことから、より有効な治療法・予防法の確立が強く望まれる。

AIS は多因子遺伝病であり、その発症や進行には、複数の遺伝因子が関与しているものと考えられる。すなわち、AIS の発症には複数の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism) もしくは遺伝子異常が関与していると考えられる。われわれの研究グループでは、網羅的遺伝子解析からヒト *LBX1* 遺伝子の近傍に存在する一遺伝子多型と思春期特発性側弯症に強い相関があることを見出し、報告した (Takahashi Y. et al. 2011, Nat Genet). *LBX1* は homeobox に属する転写因子であり、中枢神経ならびに筋組織で強く発現していることが明らかになっている。過去の報告から本遺伝子が、発達段階において筋肉の前駆細胞の遊走に関わることが明らかとなっているが、全身性に *Lbx1* 遺伝子を欠失した遺伝子改変マウスは周産期致死性であるため (Brohmann H. et al. 2000, Development), 本遺伝子の生体における機能、さらには AIS の発症における関与は十分に解明されていない状態であった。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、*Lbx1* 遺伝子改変マウスを作成し、成獣マウスの表現型解析から、*Lbx1* 遺伝子の個体発生、ならびに生体における機能を明らかにすることで AIS の新規治療法開発に繋がる知見を得ることである。

### 3. 研究の方法

ヒトにおいて *LBX1* 遺伝子は骨格筋ならびに中枢神経 (脊髄, 脳) に高発現していることから (Takahashi Y. et al. 2011, Nat Genet), *Lbx1*<sup>fl<sub>ox</sub>/fl<sub>ox</sub></sup> マウス (*Lbx1*<sup>tm1.1Khan</sup>, Watanabe S. et al. 2011, Genesis) とともに、骨格筋特異的、中枢神経特異的に Cre リコンビナントタンパク質を発現する遺伝子改変マウス (MuCre-A マウス (B6;FVB-Tg(ACTA1-cre)AMcle/Rbrc), および Nes-cre/ERT2 マウス (C57BL/6-Tg(Nes-cre/ERT2)KEisc/J) を入手した。さらに *Lbx1*<sup>fl<sub>ox</sub>/fl<sub>ox</sub></sup> マウスをそれぞれの Cre リコンビナントタンパク質トランスジェニックマウスと交配し、骨格筋特異的に *Lbx1* 遺伝子を欠損したモデル (以下 *Lbx1*<sup>Δ<sub>mus</sub></sup> マウス), および中枢神経特異的に *Lbx1* 遺伝子を欠損したモデル (以下 *Lbx1*<sup>Δ<sub>neu</sub></sup> マウス) を作成した。

作成した遺伝子改変マウスに対し、行動やマクロの形態観察を行い、さらに、骨格系はレントゲン、骨格筋を組織学的に解析する。また、成長、老化に伴う脊柱の変形の有無を経時的に解析するとともに、Bipedal model など、脊柱変形誘導モデルを作成し、*Lbx1* 欠損の脊柱変形に与える影響を検討する。

### 4. 研究成果

(1) 主な成果、国内外の位置づけとインパクト、今後の展望: *Lbx1*<sup>Δ<sub>mus</sub></sup> マウスは、その一部が新生仔致死であったが、生後 6 週以降は生殖、摂食行動において明らかな異常を認めなかった。一方、*Lbx1*<sup>Δ<sub>neu</sub></sup> マウスは 2 週間時点で生存した個体は確認されず、胎生致死もしくは周産期致死であると考えられた。*Lbx1*<sup>Δ<sub>mus</sub></sup> マウスは野生型マウスに比較して低体重であり、著明な前肢の低形成を認めた。また、レントゲンにても明らかな側弯の表現型は確認されなかった。しかしながら、高齢マウス (生後 50 週以降) では野生型マウスに比較し後弯が進行する傾向にあることが明らかとなった。このことから、筋肉に発現する LBX1 は脊椎の形態維持に関与するものと考えられた。また、*Lbx1*<sup>Δ<sub>neu</sub></sup> マウスが野生型マウスに比較し低体重であることから、LBX1 がエネルギー代謝に機能していると仮説をたて、高脂肪食にて体重の変化を観察したところ、*Lbx1*<sup>Δ<sub>mus</sub></sup> マウスは肥満抵抗性であることが明らかとなった。ヒト AIS 患者も痩せ体形であることから、LBX1 は体組成を制御し、間接的に脊椎の高次構造維持に関与していると示唆された。

個体発生において筋前駆細胞に発現する LBX1 が筋前駆細胞の遊走に機能し、その欠失のため四肢骨格筋の形成不全が生じる事は従来報告されていたが、LBX1 を骨格筋から欠失したマウスが加齢とともに脊椎前弯が亢進すること、また LBX1 がエネルギー代謝に関与していることは従来報告がなく、本研究で得られた新知見である。

エネルギー代謝における LBX1 の関与は、当初予期し得なかった結果であり、今後、エネルギー代謝に注目し、骨格筋の LBX1 の機能の解析を継続する予定である。

(2) *Lbx1*<sup>Δ<sub>mus</sub></sup> マウスおよび *Lbx1*<sup>Δ<sub>neu</sub></sup> マウスの作成: *Lbx1*<sup>Δ<sub>mus</sub></sup> マウスおよび *Lbx1*<sup>Δ<sub>neu</sub></sup> マウスを作成し、*Lbx1*<sup>Δ<sub>mus</sub></sup> マウスは野生型マウスに比較して、体重の低下傾向にあったが (後述)、生殖、摂食

行動において明らかな異常を認めなかった *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは、その一部が新生仔致死であり、生後 2 週の時点で優位に *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウス数の数の低下を認めた ( $\chi^2$  検定,  $P = 0.0007$ )。しかしながら、生後 6 週以降生存したマウスでは生殖、摂食行動において明らかな異常を認めなかった。一方、*Lbx1<sup>Δneu</sup>* マウスは 2 週間時点で生存した個体は確認されず、胎生致死もしくは周産期致死であると考えられた。

(3) *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは前肢の低形成を生じるが、側弯症を呈さない：*Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスでは、前肢の低形成、および肘関節と手関節の屈曲拘縮を認めた。この前肢の低形成のため *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは通常の歩容を保つことが困難であり、前胸部を地面に接地して歩行することが観察された。一方、肉眼的には、側弯や後弯などの体幹の形態異常を認めなかった (図 1 A)。

*Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスの前肢は全体的に筋低形成が顕著であったが、特に伸筋側により高度な筋量の低下を認めた (図 1 B)。組織学的に評価を行ったところ、*Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスの上肢伸筋 (上腕三頭筋) はほぼ消失しており、本来筋組織があるべき部位は脂肪組織に置換されていることが明らかとなった。一方、上肢屈筋 (上腕二頭筋)、下肢伸筋 (大腿四頭筋) は、ともに組織学的に明らかな異常を認めなかった。

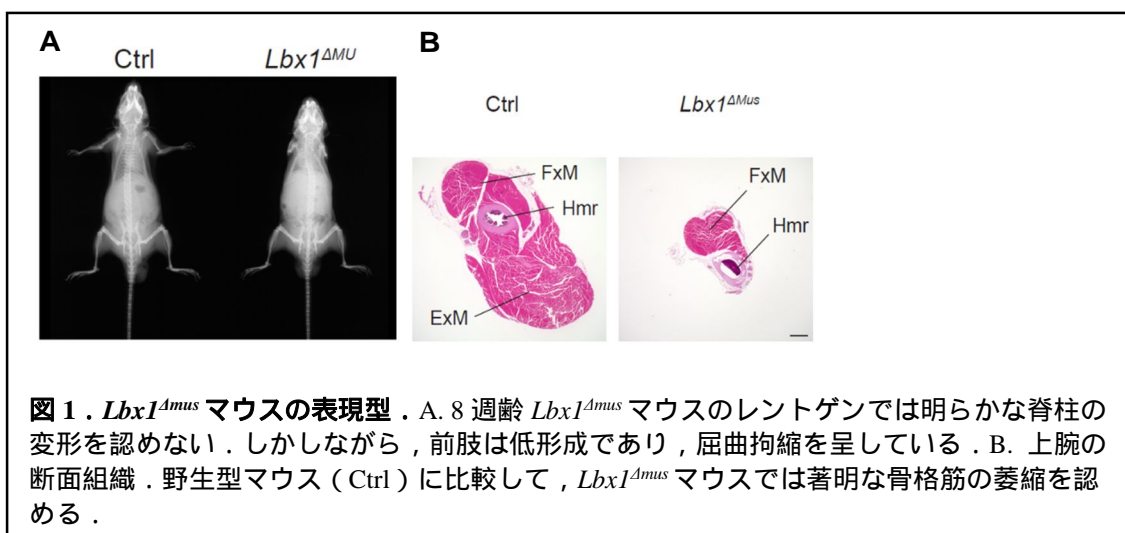


図 1. *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスの表現型。A. 8 週齢 *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスのレントゲンでは明らかな脊柱の変形を認めない。しかしながら、前肢は低形成であり、屈曲拘縮を呈している。B. 上腕の断面組織。野生型マウス (Ctrl) に比較して、*Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスでは著明な骨格筋の萎縮を認める。

(4) *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは加齢とともに脊柱後弯が進行する：上述のごとく、*Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスではヒト AIS で認められる側弯症は観察できなかったが、他の脊柱変形マウスモデルにおいても、側弯変形を呈することは極めてまれであり、多くの場合、前弯変形が生じる。このことから、*Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスにおいて、矢状面における脊柱変形の評価を試みた。矢状面の脊柱変形は、既報の方法に基づいて kyphosis index を算出した。8 週齢では、野生型マウス、*Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウス両群間、雌雄ともに有意差を認めなかったが、50 週齢では野生型マウスに比して *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスにおいて後弯変形が進行することが明らかとなった (図 2)。

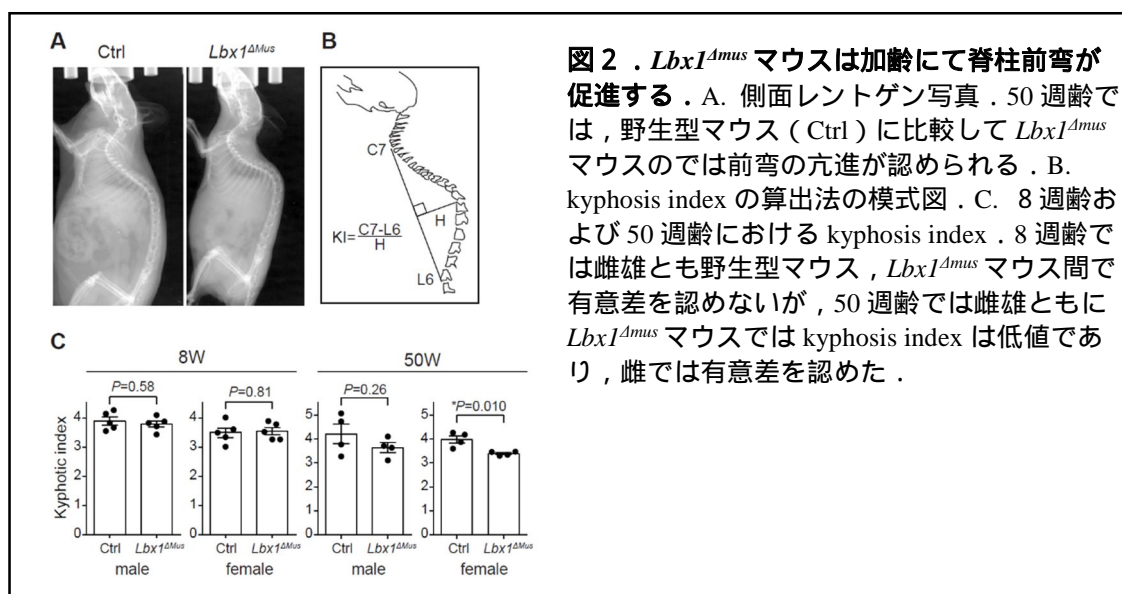
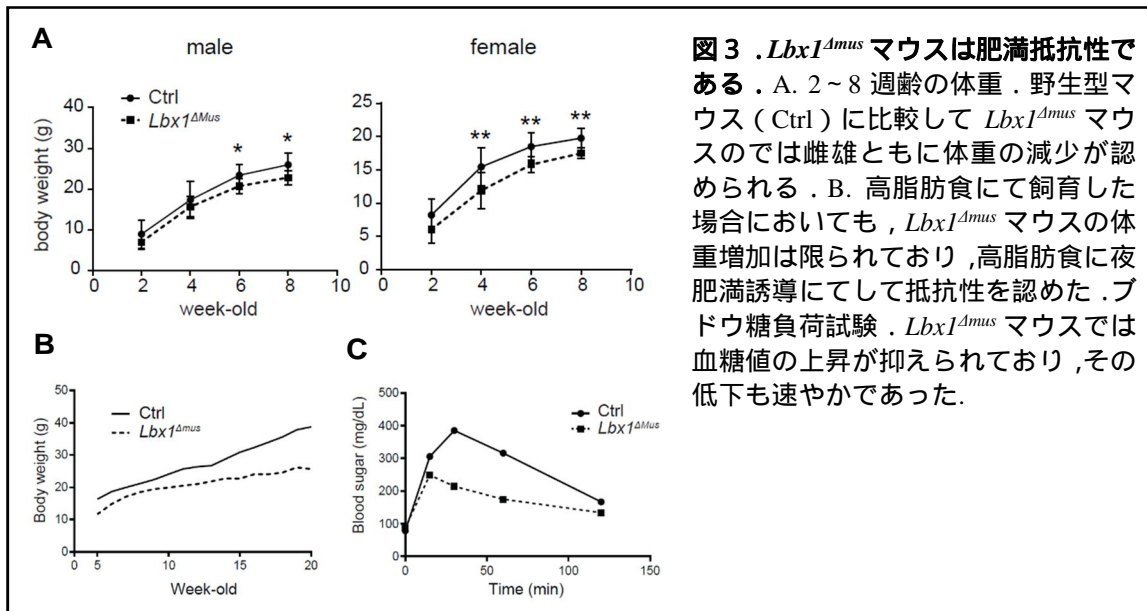


図 2. *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは加齢にて脊柱前弯が促進する。A. 側面レントゲン写真。50 週齢では、野生型マウス (Ctrl) に比較して *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスでは前弯の亢進が認められる。B. kyphosis index の算出法の模式図。C. 8 週齢および 50 週齢における kyphosis index。8 週齢では雌雄とも野生型マウス、*Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウス間で有意差を認めないが、50 週齢では雌雄ともに *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスでは kyphosis index は低値であり、雌では有意差を認めた。

(5) *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスにおけるエネルギー代謝: *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは, 2~8 週齢において, Ctrl マウスに比して約 10%の体重低下を示した(図3A). この体重差はその後も継続し, 50 週齢の時点においても, 雌雄ともに Ctrl マウスに比して有意に体重の低下を認めた. これは, *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスが何らかの原因でエネルギー代謝が亢進していることを示唆しており, この検証のため, 高脂肪食にて飼育を行ったところ, *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは野生マウスに比較し肥満抵抗性であることが明らかとなった(図3B). また, 暫定的ではあるが, ブドウ糖負荷試験においても, *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは野生マウスに比較し, ブドウ糖腹腔内投与後の上昇が抑えられており, その後の回復も速やかであった(図3C). これらの結果から, 骨格筋に発現する LBX1 はエネルギー代謝の負の制御因子であり, その機能不全にて糖代謝が亢進することが示唆された.



**図3 . *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスは肥満抵抗性である.** A. 2~8 週齢の体重. 野生型マウス (Ctrl) に比較して *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスでは雌雄ともに体重の減少が認められる. B. 高脂肪食にて飼育した場合においても, *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスの体重増加は限られており, 高脂肪食に夜肥満誘導にてして抵抗性を認めた. ブドウ糖負荷試験. *Lbx1<sup>Δmus</sup>* マウスでは血糖値の上昇が抑えられており, その低下も速やかであった.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松橋優介, 堀内圭輔, 高橋洋平, 渡邊航太, 池川志郎, 松本守雄, 千葉一裕
2. 発表標題 思春期特発性側弯症関連遺伝子 Lbx1 を骨格筋特異的に欠損したマウスは前肢の低形成を来すが, 脊柱変形は生じない
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松橋優介, 堀内圭輔, 高橋洋平, 渡邊航太, 池川士郎, 松本守雄, 千葉一裕
2. 発表標題 Conditional abrogation of Lbx1 in skeletal muscle results in defective forelimb development
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀内 圭輔  (HORIUCHI Keisuke)  (30327564)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・整形外科学・准教授   (82406)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松橋 優介  (MATSUHASHI Yuusuke)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・整形外科学・大学院生   (82406)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中川 敬博  (NAKAGAWA Takahiro)	防衛医科大学校（医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・整形外科学・大学院生  (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関