

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09416

研究課題名（和文）先天性側弯症の原因遺伝子探索

研究課題名（英文）Research for causative gene of congenital scoliosis

研究代表者

渡邊 航太（Watanabe, Kota）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・准教授

研究者番号：60317170

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）：先天性側弯症（以下CS）と脊椎肋骨異骨症（以下SCD）の新規原因遺伝子を明らかにするため、CS患者143サンプル、SCD患者18サンプルとなり更に、66家系のトリオ解析を行った。その結果、常染色体優性遺伝モデルから6つ、常染色体劣性遺伝モデルから14つの計20の候補遺伝子が挙げられた。その中に繊毛運動に関与しているDNAH3やDNAH12、神経発生に関与しているIRX6、脊椎の形態に関与している可能性があるPLXNA3といった有望な候補遺伝子があった。今後、共同研究グループと協力しオルガノイドを使用した体節形成に関与する遺伝子の評価を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CS、SCDは低年齢で発症し、重症例は胸郭容量の減少により肺成長が阻害されてQOLや生命予後を低下させる可能性がある疾患である。我々は日本人CSの約10%がTBX6遺伝子の変異によって起こること、さらにCSとSCDは、TBX6遺伝子においては一連の疾患群であり、表現型は変異の重症度に依存していること、TBX6に加えてLFNG遺伝子が、CSの新規原因遺伝子であることを明らかにした。しかしこれらの変異はCS全体の約10-15%程度であり、未だ病因に関しては不明な点が多い。本病態を明らかにすることは、CSやSCDの生命予後を改善する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To identify novel causative genes for Congenital Scoliosis (CS) and Spondylocostal Dysostosis (SCD), we analyzed 143 samples from CS patients, 18 samples from SCD patients, and performed trio analysis on 66 pedigrees. As a result, we identified a total of 20 candidate genes, with 6 showing an autosomal dominant inheritance model and 14 showing an autosomal recessive inheritance model. Among these candidates, there were promising genes such as DNAH3 and DNAH12, which are involved in ciliary motility, IRX6, which is involved in neurogenesis, and PLXNA3, which potentially plays a role in spinal morphology. Moving forward, we plan to collaborate with a research group to evaluate the genes involved in somite formation using organoids.

研究分野：整形外科

キーワード：脊椎 側弯症 先天性側弯症 遺伝子

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

先天性側弯症 (以下 CS) は低年齢で発症し、脊椎の奇形、発生異常により重症度の高い側弯へと進行する可能性が高い側弯症である。特に新生児、乳幼児期に高度の側弯症を発症すると、胸郭変形も高度になり、胸郭容量の減少により肺成長が阻害されて呼吸機能が著しく低下し、いわゆる胸郭不全症候群の病態を呈し QOL や生命予後を低下させる可能性があるため早期に診断し、集学的治療が必要な疾患である。本疾患は 10 歳以下の小児において 2000 人以下の発症頻度であること、発病の機構が不明であること、効果的な治療方法が未確立であることが判明しており、指定難病となっている。我々は日本人 CS 196 症例、脊椎肋骨異骨症 (以下 SCD) 4 症例に対して遺伝子解析を行い、日本人 CS の約 10% が TBX6 遺伝子の変異によって起こることを明らかにした (Hum Mut. 2017)。また TBX6 についての機能解析の結果、機能喪失を来す missense mutation と risk haplotype のヘテロ接合性により CS を発症する事を明らかにしている (Hum Mut. 2017)。この機能喪失を来す機序には転写活性の喪失と TBX6 タンパク質の細胞内局在異常の 2 種類が存在するが、後者が機能喪失を来す主な病因である事を明らかにした (J Med Genet. 2019)。表現型とこの遺伝型についても解析し、TBX6 の両アレルに機能喪失を来す変異を有すると、より重症な表現型を呈す SCD を発症する事を明らかにした。以上より、これまで全く異なる疾患と考えられていた CS と SCD は、TBX6 遺伝子においては一連の疾患群であり、表現型は変異の重症度に依存していることが明らかとなった (J Med Genet. 2019)。我々は、これら TBX6 に加えて全エクソーム解析により LFNG 遺伝子が、CS の新規原因遺伝子であることを明らかにした (J Hum Genet. 2019)。同遺伝子の変異は、SCD の原因遺伝子として先に報告されており、LFNG 遺伝子においても CS と SCD は一連の疾患群を形成していることを明らかにした。しかしながら、TBX6 と LFNG 遺伝子変異による CS は全体の約 10-15% 程度であり、未だ病因に関しては不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

TBX6 と LFNG 以外の CS、SCD の候補遺伝子を同定するために、本研究では全エクソンレベルでの網羅的解析 (エクソーム解析) と被験者の健常な両親から採取したサンプルを使用するトリオ解析により、より効率的に原因遺伝子の同定を行う。さらに、この解析で特定された遺伝子に関して Big data を用いた in silico 解析および in vitro/vivo 機能解析することにより、病態解明を目指す。

## 3. 研究の方法

CS および SCD の新規原因遺伝子を明らかにするため、原因候補遺伝子を遺伝学的強力で検索可能な CS 患者およびその両親の 51 家系 (計 153 サンプル) と SCD 2 例の全エクソーム解析を新たに施行する。収集した被験者および健常な両親のトリオ DNA サンプルに対して、全エクソンレベルでの網羅的解析を行うことにより、様々な遺伝形式を想定しての解析が可能となり候補遺伝子を効率的に絞り込むことが可能である。今回新たに提出したサンプルを加えることでこれまで全エクソーム解析に提出したサンプルは CS 患者 143 サンプル、SCD 患者 18 サンプルとなり更に、66 家系のトリオ解析が可能となった。また以前行われたエクソーム解析は 2019 年が最後であり、遺伝解析に使用するプラットフォームはこの数年で情報が刷新されてきている。今回は新たに Illumina 社の最新の解析プラットフォーム (DRAGEN) を使用して解析を行う。トリオ解析により得られた候補遺伝子変異リストから READ depth で Sequencing が正常に行われた

正確性の高い候補に限定し、CADD スコアの高いもの、そしてアレル頻度が 0.01 以下のものに絞り込みを行う。トリオ解析の利点である常染色体優性モデル、常染色体劣性モデルで解析を行い、それぞれのモデルでサンプル数が 2 つ以上ある変異が有力候補となる。得られた結果は、国際 Consortium (ICSG : International Consortium for Scoliosis Genetics) において validation が可能であり、日本人だけでなく多人種に共通する疾患感受性遺伝子の同定をより迅速に正確に行うことが可能である。同定した遺伝子変異に対し、タンパク質構造予測データベースを用いた変異タンパク質の機能予測、あるいは変異タンパク質を用いた機能解析を行う。同定した遺伝子が発現調節に関わる場合には、ルシフェラーゼアッセイやゲルシフト法を用いた転写調節機構の解明を行い、疾患発症のメカニズムを明らかにする。またゼブラフィッシュなど動物モデルやオルガノイドに CRIPR-Cas9 による遺伝子編集技術を使用し、発生における候補遺伝子の体節形成、脊椎発生についての解析を行う。

#### 4 . 研究成果

(1)全エクソーム解析結果についてクオリティーコントロールおよび遺伝モデルを使用した in silico 解析の結果、現在常染色体優性遺伝モデルから 6 つ、常染色体劣性遺伝モデルから 14 つの計 20 の候補遺伝子が挙がっている。今後この中から脊椎の発生に関与があると考えられる遺伝子を優先に、パルセロナの研究グループとの協力しオルガノイドを使用した体節形成に関与する遺伝子の評価を行う準備をしている。特に遺伝子の発現周期の変化を指標に SCD や CS の原因候補遺伝子のスクリーニングを行う準備を進めている。また、今回挙がってきている候補遺伝子には、繊毛運動に関与している DNAH3 や DNAH12、神経発生に関与している IRX6、脊椎の形態に関与している可能性がある PLXNA3 といった有望な候補遺伝子がある。思春期特発性側弯症(AIS)のモデル動物が近年ゼブラフィッシュで作成されているが、ターゲットの遺伝子である *ptk7* という遺伝子は繊毛運動に関与しており、この遺伝子はゼブラフィッシュにおいては椎体奇形の原因ともなることが知られている。今回 CS のエクソーム解析より得られた繊毛に関与する遺伝子は今後機能解析を行なっていく予定である。

(2)中国の研究グループとの共同研究で、体節形成に関与する Wnt/PCP signaling pathway の VANGLE2 について検索を行ったところ、日本人でも 1 例において p.D282E の変異を確認した。今回の研究では、VANGLE1 と VANGLE2 の機能喪失が体節形成異常、脊椎奇形に関与しており、ゼブラフィッシュとマウスの実験系において証明を行った。現在論文作成し、投稿準備を進めている。

(3)我々は AIS 患者の全ゲノム相関解析の結果から、体節形成遺伝子と知られている UNCX が疾患感受性遺伝子であることを明らかとした。UNCX の mRNA をゼブラフィッシュ胚にインジェクションすると、ゼブラフィッシュでは容量依存性に体軸形成不全を呈した(図 1)。UNCX は体節形成だけでなく、ゼブラフィッシュにおいて体軸の形成、神経の軸索形成に関与している (J Bone Miner Res.2023)。 UNCX のような体節形成や神経軸索に関与した遺伝子が側弯の発症に関与していることが示唆され、これにより CS と AIS の関連性が期待される。例えば、変異の重症度や発現時期に応じて CS と AIS も特定の遺伝子において一連の疾患群である可能性があり、発生期の遺伝子の機能喪失では椎体の奇形の原因となるが、成長期の機能喪失では AIS を呈するといったことが考えられる。今回候補遺伝子として、残っている遺伝子にも SLIT1 といった UNCX のように神経の軸索誘導に関わる遺伝子が候補として挙がっている。胎生期の SLIT1 の

異常が椎体に及ぼす影響を in vivo の実験で検討したいと考える。

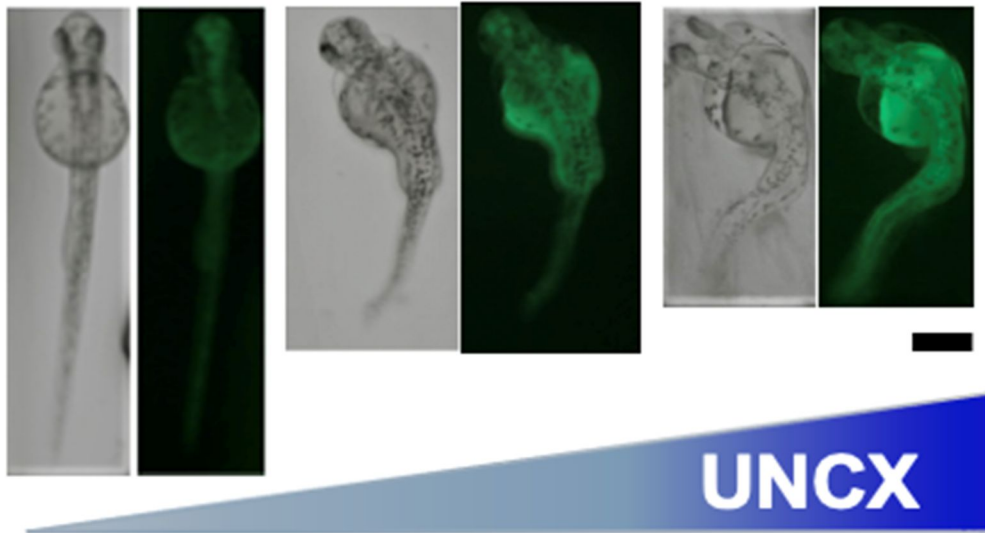


図 1

(4)我々は AIS の GWAS データと BMI の GWAS データを使用して、AIS と body mass index (BMI) の遺伝的な因果関係を mendelian randomization という手法で解析した。(図 2) BMI と AIS は遺伝的に負の因果関係にあり、太りにくい遺伝的因子を持つ人は AIS の発症のリスクが高いことが示唆された。現在論文投稿中であり、この手法が確立されることで今後 CS 患者全てと AIS 患者の遺伝学的な相関関係も評価できるのではないかと期待している。

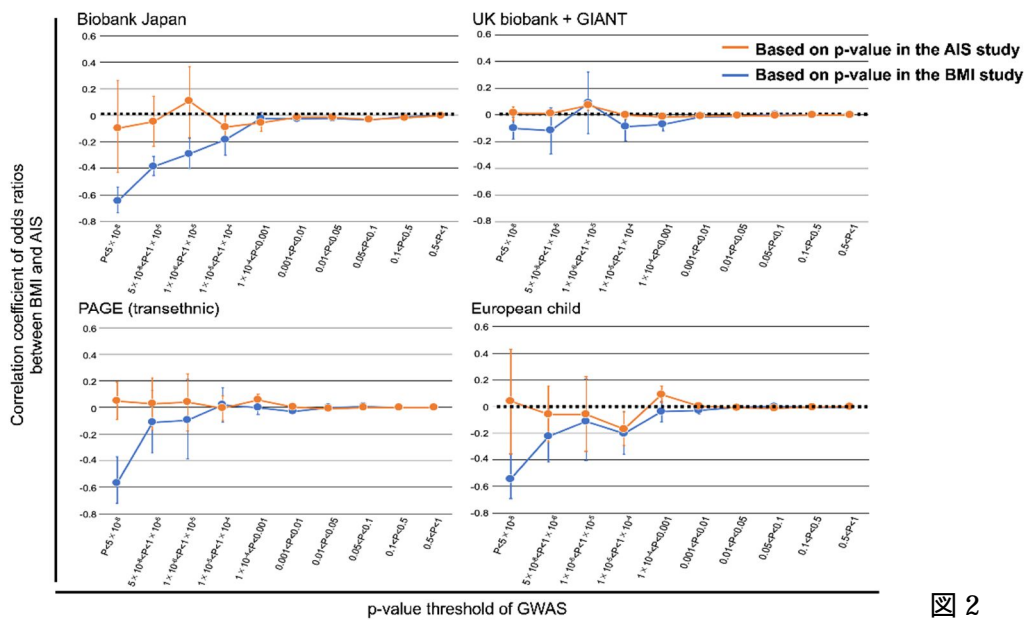


図 2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 武田和樹, 大伴直央, 川井俊介, 中村雅也, 松本守雄, 戸口田 淳也, 池川志郎, 渡辺航太	4. 巻 72
2. 論文標題 革新的技術がもたらす小児運動器難病の新展開 基礎から臨床へ 先天性側彎症 基礎(TBX6遺伝子)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 整形外科	6. 最初と最後の頁 259-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡辺航太	4. 巻 64
2. 論文標題 肋骨異常を伴う先天性側弯症	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 整形・災害外科	6. 最初と最後の頁 1099-1106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 渡辺航太	4. 巻 22
2. 論文標題 (1章)脊椎 脊柱変形 思春期特発性側彎症の原因・診断・治療	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 整形外科学レビュー	6. 最初と最後の頁 67-71
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 武田和樹, 黄 郁代, 小倉洋二, 川上紀明, 小谷俊明, 須藤英毅, 米澤郁穂, 宇野耕吉, 種市 洋, 渡辺慶, 三宅紀子, 重松英樹, 菅原 亮, 谷口優樹, 中村雅也, 松本守雄, 渡辺航太, 千葉一裕, 池川志郎	4. 巻 94
2. 論文標題 整形外科領域におけるゲノム医療:現状と臨床への展開 先天性側彎症に対する遺伝子解析の現状.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 24-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 松本守雄, 渡邊航太, 池川志郎	4. 巻 94
2. 論文標題 整形外科領域におけるゲノム医療:現状と臨床への展開 思春期特発性側彎症の遺伝子研究 臨床応用をめざして.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本整形外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 19-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 米澤嘉朗, 大伴直央, 武田和樹, 中村雅也, 松本守雄, 池川志郎, 渡辺航太
2. 発表標題 思春期特発性側彎症の GWAS より同定したリスクバリエントが与える UNCX 遺伝子の発現上昇について.
3. 学会等名 第55回日本側彎症学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大伴 直央, 米澤 嘉朗, 武田 和樹, 小倉 洋二, 高橋 洋平, 八木 満, 中村 雅也, 池川 志郎, 松本 守雄, 寺尾 知可史, 渡辺 航太, 日本側彎症臨床研究グループ
2. 発表標題 Mendelian randomizationによるBMIと思春期特発性側彎症の遺伝的因果関係の検討
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡辺航太
2. 発表標題 特発性側彎症の発症に関連する遺伝子と環境因子
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大伴直央, 武田和樹, 小倉洋二, 高橋洋平, 重松英樹, 飯田尚裕, 出村 論, 菅原 亮, 藤田順之, 八木 満, 岡田 英次朗, 細金直文, 河野克己, 千葉一裕, 小谷俊明, 佐久間 毅, 赤澤 努, 鈴木哲平, 西田 康太郎, 角谷 賢一朗, 辻 太一, 須藤英毅, 岩田 玲, 佐藤達哉, 稲見 聡, 寺尾 知可史, 中村雅也, 松本守雄, 池川志郎, 渡辺航太
2. 発表標題 世界最大規模のゲノムワイド関連解析による思春期特発性側弯症の疾患感受性遺伝子の同定.
3. 学会等名 第49回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大伴直央, 武田和樹, 小倉洋二, 高橋洋平, 重松英樹, 飯田尚裕, 出村 論, 菅原 亮, 藤田順之, 八木 満, 岡田 英次朗, 細金直文, 河野克己, 千葉一裕, 小谷俊明, 佐久間 毅, 赤澤 努, 鈴木哲平, 西田 康太郎, 角谷 賢一朗, 辻 太一, 須藤英毅, 岩田 玲, 佐藤達哉, 稲見 聡, 寺尾 知可史, 中村雅也, 松本守雄, 池川志郎, 渡辺航太
2. 発表標題 Polygenic risk scoreを用いた遺伝情報を用いた思春期特発性側弯症の発症 予測モデル
3. 学会等名 第49回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Otomo N, Takeda K, Ogura Y, Takahashi Y, Shigematsu H, Iida T, Demura S, Sugawara R, Fujita N, Yagi M, Okada E, Hosogane N, Chiba K, Kotani T, Sakuma T, Akazawa T, Suzuki T, Nishida K, Kakutani K, Tsuji T, Sato T, Inami S, Nakamura M, Matsumoto M, Ikegawa S, Terao C, Watanabe K
2. 発表標題 Genetic Prediction of Onset and Progression of Adolescent Idiopathic Scoliosis.
3. 学会等名 Scoliosis Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeda K, Otomo N, Anna Grauers, Yan-Hui Fan; Ogura Y, Takahashi Y, Elisabet Einarsdottir; Juha Kere; Matsumoto M, Yong Qiu, You-Qiang Song, Paul Gerdhem, Ikegawa S, Watanabe K
2. 発表標題 A Multi-ethnic Meta-analysis Defined the Association of rs12946942 with Progression of Adolescent Idiopathic Scoliosis.
3. 学会等名 Scoliosis 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	米澤 嘉朗 (Yonezawa Yoshiro)  (40865763)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教  (32612)	
研究分担者	武田 和樹 (Takeda Kazuki)  (50594735)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・訪問研究員  (32612)	
研究分担者	寺尾 知可史 (Terao Chikasi)  (60610459)	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・ チームリーダー  (82401)	

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
---------	---------