

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249080

研究課題名（和文） 腰椎椎間板ヘルニアの疾患感受性遺伝子の同定と分子病態の解明

研究課題名（英文） Identification of susceptibility gene for lumbar disc disease and clarification of its molecular pathogenesis

研究代表者

池川 志郎 (IKEGAWA SHIRO)

独立行政法人理化学研究所・骨関節疾患研究チーム・チームリーダー

研究者番号：30272496

研究成果の概要（和文）：

国内の主要な脊椎外科の専門医と協力し、椎間板ヘルニア患者の検体、約1,600を収集した。それらの患者の臨床的、X線学的表現型を詳細に分析し、椎間板ヘルニア疾患関連因子に関する臨床データをデータベース化した。検体からゲノムDNAを抽出し、椎間板遺伝子発現プロファイル、コンピュータ解析による知識発見システムなどにに基づき決定された候補遺伝子に対する症例-対照相関解析、約55万のSNPマーカーによる全ゲノムスクリーニング等のゲノム解析を行った。その結果、いくつかの非常に高い相関を示すSNPマーカーを発見した。それらの中には、椎間板の発生やプロテオグリカンの代謝に関係するものが見られた。

研究成果の概要（英文）：

In collaboration with expert spinal surgeons in Japan, we collected ~1,600 samples from patients with lumbar disc herniation (LDH). We analyzed their clinical and radiographic phenotypes in detail and established clinical database for LDH. Using these samples and data, we performed various genetic analyses (candidate gene approach based on expression profile and computer-prediction, and genome-wide association study) and identified several highly associated SNPs for LDH susceptibility, including those in genes involved in development of vertebral disc and proteoglycan metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	17,100,000	5,130,000	22,230,000
2010年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
2011年度	9,800,000	2,940,000	12,740,000
年度			
年度			
総計	36,700,000	11,010,000	47,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：(1) 脊椎脊髄病学 (2) 腰椎椎間板ヘルニア (3) 相関解析
(4) 遺伝子 (5) 分子病態 (6) SNP

1. 研究開始当初の背景

WHOが2000年からの10年を「Bone and Joint Decade」として啓蒙活動を行なったことからわかるように、骨・関節疾患の克服は世界規模の問題である。骨・関節疾患の中でも、椎間板ヘルニアは非常に頻度が高く、最優先で取り組むべき課題と言える。

疾患の解明、より良い治療法の開発のためには、何よりもまずその『原因』を突き止めることが肝要である。近年のゲノム医学研究の急速な進展により、多くの疾患でそれが可能となった。しかし、腰椎椎間板ヘルニア、およびその基礎病変である椎間板変性症の原因遺伝子の同定を目指した研究は、小規模な相関解析の研究が、香港、フィンランドなど数カ所で行なわれているのみで、遺伝子の探索を大規模に系統的に行なう研究はなかった。

2. 研究の目的

腰椎椎間板ヘルニアの遺伝学的要因（複数の疾患感受性遺伝子）を解明する。相関解析（association study）をはじめとするゲノム医学的手法により、椎間板ヘルニアの疾患感受性遺伝子を同定し、その知識をもとに分子病態を解明する。

3. 研究の方法

研究協力施設（慶應大学、富山大学、京都府立医科大学、熊本大学の整形外科、及びその関連病院と函館中央病院脊椎センター）の脊椎外科の専門医と協力して、腰椎椎間板ヘルニア患者の検体（血液、組織など）を収集する。これらの患者における疾患の臨床的、X線学的表現型を分析し、椎間板ヘルニアの疾患関連因子に関する臨床データをデータベース化する。また、腰椎椎間板ヘルニアの疾患感受性遺伝子同定に向けての症例-対照相関解析（case-control association study）に用いるサンプルを収集、整理する。収集したサンプルを整理、保存、管理し、核酸（DNA, RNA）、タンパクを抽出するなど実験室での分子遺伝学的、分子生物学的実験が可能な状態にし、分子遺伝学的実験を行う。マイクロアレーを用いたヒト椎間板遺伝子の発現プロファイル

やコンピュータ解析による知識発見システムなどに基づき決定された椎間板ヘルニアの候補遺伝子に対する症例-対照相関解析、HapMapのデータをもとにした約55万のSNPマーカーによる全ゲノム相関解析（GWAS: genome-wide association study）を行ない、腰椎椎間板ヘルニアの発症や進展に関連する遺伝子多型を同定する。

4. 研究成果

椎間板ヘルニア患者の検体、約1,600を収集した。これは、世界最大規模の検体コレクションである。患者の椎間板ヘルニア疾患関連因子に関する臨床データをデータベース化した。これは、椎間板ヘルニアの遺伝関連のデータベースとしては、世界最大である。これらの研究基盤を基にして、ゲノム解析を行い、以下の成果を得た。

1) 候補遺伝子アプローチによる相関解析により、*SKT* (*Sickle tail*) 遺伝子と椎間板ヘルニアの相関を発見した。*SKT*は、マウスの発生において脊椎、椎間板の形成に関与する事が知られている遺伝子である。*SKT* 遺伝子の欠損マウスは出生後の椎間板の進行性の変性と、尾の鎌状変形を呈する。このマウスの表現型とヒト*SKT*が椎間板で特異的に高い発現を示す実験的事実から、患者、対照それぞれ約500人を用いて症例-対照相関解析を行った所、*SKT* 遺伝子内の一塩基多型（SNP: single nucleotide polymorphism）rs16924573が、椎間板ヘルニアの発症と強く関連する事を発見した。この相関は、独立した日本人の椎間板ヘルニアの集団、フィンランド人の椎間板ヘルニアの集団でも再現された。

2) 椎間板ヘルニア患者約500人を用いたGWASの結果、いくつかの非常に高い相関を示すSNPマーカーを発見した。そのうちのひとつは、軟骨特異的なプロテオグリカン代謝酵素の遺伝子の遺伝子領域中にあった。このSNPの相関は、独立した日本人椎間板ヘルニア集団で確認された。患者ゲノムDNAを用いたこの遺伝子のre-sequencingとデータベース解析により、この遺伝子領域のcommon SNP（一般集団において頻度の高いSNP）をカタログ化し、連鎖不平衡マッピングの手法を用いて、最も相関の強いcommon SNPを遺伝子の転写調節領域内に同定した（論文投稿中）。このSNPの相関は、独立し

た2つのフィンランド人の椎間板ヘルニア集団、北京周辺の中国人の椎間板ヘルニア集団、及び香港人の椎間板変成症集団を用いた相関解析でも、すべて再現性された(論文投稿中)。メタ解析により、これらの結果を統合すると、このSNPの相関は、ゲノムレベルでの優位水準($P=5 \times 10^{-8}$)を越えていた。更に、*in vitro*、*in vivo*の機能解析によって、このSNPはmicro RNAの結合性に関係する事を発見した。SNPによる結合性の変化により、酵素の発現量が低下し、椎間板のプロテオグリカン代謝に異常が起こり、椎間板変性が起こる可能性がある事を示した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. 池川志郎. 一塩基多型を用いた大規模症例・対照相関解析による腰椎椎間板ヘルニアの原因遺伝子解析. *Journal of Spine Research*, 2(9), 2011年9月, 別刷
2. 池川志郎. TGF- β ファミリーと骨・関節疾患. *実験医学* 29, 2010, 883-887
3. Karasugi T, Semba K, Hirose Y, Kelempisioti A, Nakajima M, Miyake A, Furuichi T, Kawaguchi Y, Mikami Y, Chiba K, Kamata M, Ozaki K, Takahashi A, Mäkelä P, Karppinen J, Kimura T, Kubo T, Toyama Y, Yamamura K, Männikkö M, Mizuta H, Ikegawa S. Association of the tag SNPs in the human SKT Gene (KIAA1217) with lumbar disc herniation. *J Bone Miner Res* 24 (9) , 2009, 1537-1543

[学会発表] (計18件)

(招待講演のみを記載)

1. Ikegawa S. Next steps for genetic study of skeletal diseases - problems and solutions from 10 years' experience. Symposium on Developmental Genomics and Genetics Disorders, Jan. 17, 2012, Hong Kong, China
2. 池川志郎. ゲノム科学による疾患研究. 早稲田大学講義 先端生命医科学特論 イノベーティブディスカバリー, 2012年1月13日, 早稲田大学 生命医科学センター (東京都)
3. 池川志郎. 疾患遺伝子研究の現状と未

来:骨・関節疾患を例に. 徳島大学「次世代シーケンサーを用いた最先端研究」講演会, 2011年8月26日, 徳島大学医学部 (徳島県)

4. 池川志郎. ゲノムから医療へ、創薬へ: 相関解析により同定された骨・関節の生活習慣病の原因遺伝子 (疾患感受性遺伝子) に関する知見・知財の臨床応用に向けての課題の克服. 次世代医療システム産業化フォーラム 招待講演, 2011年7月8日, シティプラザ大阪 (大阪府)
5. Ikegawa S. Genomic analysis of osteoarthritis-From patient to gene, from genome to molecular pathogenesis. 1st Symposium of the Asia Pacific League of Associations for Rheumatology. Apr 16, 2011, Taipei, Taiwan
6. Ikegawa S. Genomic study of Bone and Joint Diseases using human and mouse genetics. 10th Annual meeting of the EAUHG (East Asian Union of Human Genetics Societies), Oct. 8, 2010, Jinan, China
7. Ikegawa S. From genome to skeletal diseases- recent advances in the association study of osteoarthritis and lumbar disc herniation. 1st OARSI China Forum, Oct. 5, 2010, Nanjing, China
8. 池川志郎. ゲノムから疾患へ—ヒト遺伝学 (Human Genetics) を出発点とする疾患遺伝子と分子病態の解明. 京都大学再生医科学研究所 第1回生命医科学セミナー, 2010年9月7日, 京都
9. 池川志郎. ヒト遺伝学を出発点とする運動器疾患研究. 第11回運動器科学研究会, 2010年9月1日, 軽井沢, 長野
10. Ikegawa S. From genome to skeletal diseases- recent advances in the association study of osteoarthritis and lumbar disc herniation and its association with ECM biology. Gordon Conference (Proteoglycan), Jul. 14, 2010, New Hampshire, USA
11. 池川志郎. 遺伝学を用いた骨・関節疾患へのアプローチ. 第5回 Skeletal Research Meeting, 2010年6月12日, 京都
12. Ikegawa S. Genomic Analysis of Bone and Joint Diseases-Integrated Approach of Human & Mouse Genetics Toward Disease Genes & Molecular Pathogenesis of the Diseases. The Fourth Margaret River Region Forum, Apr. 29, 2010, Dunsborough, Australia

13. Ikegawa S. Genetic study of lumbar disc diseases. The 3rd Jishuitan Orthopedics Forum, Apr. 24, 2010, Beijing, China
14. 池川志郎. 骨・関節疾患のゲノム解析. 日本人類遺伝学会 第 54 回大会, 2009 年 9 月 24 日, 東京
15. Ikegawa S. Common polymorphisms and risk for degenerative joint diseases in human populations. 9th Biennial Meeting of International Skeletal Dysplasia Society, Jul. 19, 2009, Boston, USA
16. Ikegawa S. From Mouse to Human, from Monogenic to Polygenic Disease. Gordon Research Conference Cartilage Biology & Pathology, Jun. 8, 2009, Les Diablerets, Switzerland
17. Ikegawa S. Integrated Approach toward Bone and Joint Diseases using Human and Mouse Genetics, Yokosuka Science Festa 2009 (Joint Conference of 8th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium (PPCTSS), 41st Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR), and 56th Annual Meeting of the Japan Matrix Club (JMC) Concurrent Meeting: Yokosuka International Conference on Cancer Microenvironments (YICCM)). Jun. 4, 2009, Yokosuka, Japan
18. 池川志郎. 骨関節疾患のゲノム解析-融合遺伝学アプローチによる疾患遺伝子の解明. 第 14 回 Bone Research Joint Meeting, 2009 年 5 月 26 日, 大阪

[その他]

ホームページ:

<http://www.riken.jp/lab-www/OA-team/>,

<http://www.riken.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池川 志郎 (IKEGAWA SHIRO)

独立行政法人理化学研究所・骨関節疾患研究
チーム・チームリーダー

研究者番号：30272496

(2) 研究分担者

古市 達哉 (FURUICHI TATSUYA)

独立行政法人理化学研究所・骨関節疾患研究
チーム・上級研究員

研究者番号：30392103

稲葉 郁代 (INABA IKUYO)

独立行政法人理化学研究所・骨関節疾患研究

チーム・特別研究員

研究者番号：60415081

(3) 連携研究者

なし