

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462286

研究課題名(和文) ヒト先天性側弯症の原因遺伝子の同定と発症機序の解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of gene expression in the spine of congenital kyphoscoliosis obtained using DNA microarrays

研究代表者

飯塚 伯 (Iizuka, Haku)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90334119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：先天性側弯では椎骨形成異常や脊椎分節異常がみられるが、病因は不明である。動物モデルを用い、病巣部位における遺伝子発現解析を行うことで、疾患関連遺伝子の同定を本研究の目的とした。

DNAマイクロアレイから、神経成長因子受容体遺伝子(Trk)群およびレチノイン酸代謝関連遺伝子群が特に強く発症に関わると考えられた。Trkについては、リアルタイムPCRによりモデルラットで発現低下していることを確認し、さらにタンパクレベルにおいても有意に発現低下していたことから疾患に大いに関与している可能性を裏付けた。さらに、レチノイン酸代謝関連遺伝子群においても、モデルラットで発現が低下していることを確認できた。

研究成果の概要(英文)：The genes related to congenital scoliosis are still unknown. We herein report the results of a comprehensive analysis of gene expression in the spines from a rat model of congenital kyphoscoliosis obtained using DNA microarrays. The model rats (IS) showed decreased expression levels of genes associated with bone formation, such as those associated with retinol metabolism and type I collagen. Interestingly, the flexion sites of the IS rats showed low expression levels of tropomyosin receptor kinases (Trks: TrkA, TrkB and TrkC), which belong to the neurotrophic receptor tyrosine kinase family. Moreover, this phenomenon was observed only in the flexion sites of the spine, and the expression levels of Trks in other parts of the spine in these rats were normal. The decreased expression levels of Trks were observed at both the mRNA and protein levels. We also observed that the number of Trk-immunopositive cells in the lumbar spine in the IS rats was lower than that in wild-type rats.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：先天性側弯症 遺伝子解析 Ishibashi rat Kyphoscoliosis rat

1. 研究開始当初の背景

脊椎側弯症は、脊椎が生理的彎曲を越えて彎曲する異常である。この側弯症は、大まかに先天性・特発性・症候性の三つに分類されている。特発性側弯症は一部原因遺伝子の探索が始まっているが、先天性側弯症は未だ原因及び原因遺伝子の探索さえも行われておらず、手術以外に根本的な治療法がない。先天性側弯症は、生まれつきの形態異常を来した椎体(楔状椎、蝶形椎、半椎など)を有するが故に成長と共に側弯を来す疾患である。高度の側弯では胸郭が著しく変形し、そのために肺の機能が低下する。その結果、肺や心臓に重篤な合併症を引き起こす。先天性側弯症において姿勢異常が悪化するのには、新生児～乳児期と学童期～思春期にかけての時期である。脊椎の形態異常以外に他の身体的異常を認めない事が多く、疼痛などの自覚症状に乏しいため、第二次性徴期に姿勢異常を起こすまで気づかれない事が多い。もし早期に診断が可能になれば、早期の外科的治療により姿勢異常の増悪を予防出来る可能性がある。

我々は、先天性脊椎側弯症の発症メカニズムを明らかにする目的で、先天性に腰椎の後側弯症を持つモデル動物である Ishibashi rat (IS)の形態学および遺伝子の解析を行った。ISは野生型ラットと比較して、側弯後弯を来していた。さらに個体発生における側弯症の発症メカニズムを解明するために、胎生期のISの腰椎を形態学的に解析するとともに、発現している遺伝子をスクリーニングしプロファイリングを行った。その結果、ISの腰仙移行部において、体節(somite)から硬節(sclerotome)への分化に異常を認めた。すなわち、複数の骨化中心の変形や片側のみ骨化中心の形成が認められた。さらにこの分化を担うHox遺伝子群の発現が有意に低下していることを発見した。

2. 研究の目的

以上の先行研究を終えての本研究の目的は、

(1) 先天性脊椎側弯症の発症メカニズムを、モデル動物を用いて疾患関連遺伝子の詳細な解析を行う

(2) ヒト脊椎側弯症の患者から提供された遺伝子の解析によって、原因遺伝子を同定する

以上を目指した。

3. 研究の方法

(1) 先天性脊椎側弯症の発症メカニズムの解明

先天性後側弯症モデル動物(IS)を使って、骨形成および形態形成関連遺伝子の発現動態と脊椎の構造異常との関係性を胎生初期から発症まで詳細に検討し、どの遺伝子がどの時期に発現低下/過剰することによって、側弯症が発症するのかについて明らかにする。

この解析は試料の摘出時や部位が限られているヒト試料では系統的な解析が不可能なため、先天性後側弯症モデル動物(IS)を用いる。

ISラットの形態異常の発生時期を確認するために、組織学的検討を行う。胎生期の軟骨形成が終了する胎生12日を目安に、胎生8日、10日、12日、14日、16日で胎仔を採取し、脊椎標本を作製後、組織学的検討(HE染色、アリザリンレッド・アルシヤンブルー染色)を行う。

形態異常の発生時期に合わせmRNAを抽出し、上記マイクロアレイシステムを用いてISラットと野生型ラットの間で発現量に有意差のある遺伝子群を検索する。

ISラットが先天的に形態異常を伴う事を考えると、発生の初期～胎生後期の段階で、何らかの異常が発生していると考えられる。また、その形態異常が腰椎に限局していることを考えると、全身性に影響を及ぼす遺伝子の異常は考え難い。これらをふまえて、現在までの我々の解析および文献等から先天性側弯症の原因遺伝子の候補として、以下の遺伝子群をリストに挙げた。これらの遺伝子について、その発現動態と脊椎の異常発生に焦点を絞って、系統・網羅的に解析を行う。

1) 間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell)から体節(somite)への分化に必要な遺伝子群

Wnt, Notch 1, Dll, FGFR-1, Shh など

2) 体節(somite)から硬節(sclerotome)への分化に必要な遺伝子群

Hox, MESP, Tbx, Meox, Pax-1,3,9, Pte, Gli など

3) 硬節(sclerotome)からの軟骨形成(chondrogenesis)に必要な遺伝子群

Sox-9, Bapx-1, Runx2, Pax-1,9 など

(2) ヒト脊椎側弯症の原因遺伝子の同定と遺伝子診断法の確立

ヒト先天性脊椎側弯症の手術例において、通常奇形椎は摘出される。提供された摘出骨・軟骨組織から、DNAマイクロアレイ技術を用いて遺伝子発現量のプロファイルを作成する。患者ゲノムDNAから発現異常が発見された遺伝子領域の塩基配列を同定する。同時に複数の健常人由来の遺伝子においても、同様に塩基配列を同定し両者を詳細に比較・検討する。変異を同定できたプライマーセットと解析法を「ヒト脊椎側弯症の遺伝子診断法」のプロトコールとする。

4. 研究成果

モデル動物から摘出した試料のDNAマイクロアレイを用いたスクリーニングから、神経成長因子受容体遺伝子(Trk)群およびレチノイン酸代謝関連遺伝子群が特に強く発症に関わると考え(図1)、リアルタイムPCRやウエスタンブロット、免疫染色などによる多方面からの解析を行った。Trkについては、リアルタイムPCRによりモデルラットで発現

低下していることを確認し、さらにタンパクレベルにおいても有意に発現低下していたことから疾患に大いに関与している可能性を裏付けた(表1、図2)。さらに、レチノイン酸代謝関連遺伝子群においても、モデルラットで発現が低下していることをリアルタイムPCRにて確認できた。また、脊椎の免疫染色にてTrk発現細胞を調べたところ、モデルラットでは肥大軟骨細胞周囲にて陽性細胞数が有意に少ないことがわかった。

図1

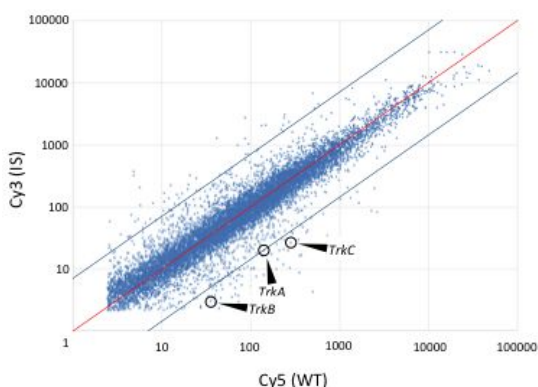


表1

奇形椎におけるTrk免疫陽性細胞の密度

	TrkA	TrkB	TrkC
Wt	++++	++	++++
IS	++	+	++

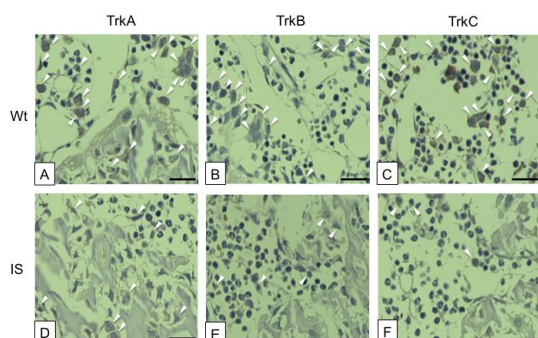
Wt: Wister rat

IS: Ishibashi rat (モデル動物)

Trk免疫陽性細胞数:

+ <25, ++ 26-50, +++ 51-75, ++++ >76

図2



Trkの全身における動態を調べるため、代表的な腹腔内臓器である肝臓での遺伝子発現をリアルタイムPCRにより調査し、疾患群と正常群の間で有意な差がないとの結果を得た。すなわちモデルラットの疾患発症は全身的な遺伝子発現異常ではなく病変部位に局在的な遺伝子発現異常が関与していることが示唆された。

ヒトから提供された試料からの遺伝子解析は、手術症例数が十分ではなく、今後の検討課題となった。

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2件)

角田大介、下川哲昭、飯塚 伯、一ノ瀬剛、飯塚陽一、三枝徳栄、鯉淵典之、高岸憲二

先天性脊柱後側弯症モデルラットにおける遺伝子発現の網羅的解析

J Spine Res 査読有 6, 2015,157-160

Daisuke Tsunoda, Haku Iizuka,

Tsuyoshi Ichinose, Yoichi Iizuka,

Tokue Mieda, Noriaki Shimokawa, Kenji

Takagishi, Noriyuki Koibuchi.

The Trk family of neurotrophin receptors is downregulated in the lumbar spines of rats with congenital kyphoscoliosis.

Mol Cell Biochem., 査読有 412, 2016, 11-18.

DOI:10.1007/s11010-015-2603-z

〔学会発表〕(計7件)

角田大介、下川哲昭、飯塚 伯、飯塚陽一、三枝徳栄、鯉淵典之、高岸憲二

先天性脊柱後側弯症モデルラットにおける網羅的遺伝子解析

第43回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2014,4,17-19 国立京都国際会館(京都府京都市)

角田大介、下川哲昭、飯塚 伯、一ノ瀬剛、飯塚陽一、三枝徳栄、鯉淵典之、高岸憲二

先天性脊柱後側弯症のモデル動物を用いた網羅的遺伝子発現解析

第29回日本整形外科学会基礎学術集会 2014,10,9-10 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

角田大介、飯塚 伯、飯塚陽一、三枝徳栄、高岸憲二

先天性脊柱後側弯症のモデルラットの腰椎における網羅的遺伝子発現解析

第48回日本側弯症学会 2014,10,30-11,1 盛岡市民文化ホール(岩手県盛岡市)

角田大介、飯塚 伯、飯塚陽一、三枝徳栄、高岸憲二

先天性側弯の発症に神経成長因子受容体遺伝子発現低下とレチノール代謝異常が関与する可能性がある—モデルラットの遺伝子発現解析による検討—

第44回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2015,4,16-18 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

園田裕之、角田大介、飯塚 伯、一ノ瀬

剛、飯塚陽一、三枝徳栄、高岸憲二
先天性脊柱後側弯症の発症に対するレチノール代謝系の関与-モデルラットの網羅的遺伝子発現解析-
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会
2015, 10, 22-23 富山国際会議場(富山県富山市)
角田大介、飯塚 伯、一ノ瀬剛、飯塚陽一、三枝徳栄、園田裕之、高岸憲二
先天性脊柱後側弯症の発症に Trk 遺伝子群の局所的な発現低下が関わる
第 49 回日本側弯症学会 2015, 11, 5-6
りゅーとぴあ(新潟県新潟市)
園田裕之、角田大介、飯塚 伯、一ノ瀬剛、飯塚陽一、三枝徳栄、高岸憲二
先天性脊柱後側弯症の発症とレチノール代謝系の関連-モデルラットの網羅的遺伝子発現解析-
第 49 回日本側弯症学会 2015, 11, 5-6
りゅーとぴあ(新潟県新潟市)

研究者番号：

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯塚 伯 (IIZUKA Haku)
群馬大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：90334119

(2) 研究分担者

下川哲昭 (SHIMOKAWA Noriaki)
高崎健康福祉大学・健康栄養学科・教授
研究者番号：90235680

(3) 連携研究者

()