

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02931

研究課題名(和文) 思春期特発性側弯症の進行に關与する遺伝子の同定

研究課題名(英文) Genome-Wide Association study of Progression in Adolescent Idiopathic Scoliosis

研究代表者

稲葉 郁代 (Inaba, Ikuyo)

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・客員研究員

研究者番号：60415081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：思春期特発性側弯症(Adolescent idiopathic scoliosis: AIS)のゲノム解析を行った。以前同定したAISの進行・重症化に關与する遺伝子座位について、多人種サンプルを用いた国際メタ解析を行ない、感受性遺伝子座位の再現性を確認した。さらに、これまでに収集した約3,200例のAIS患者サンプルと約60,000例の非患者サンプルを用いて、新たなAISの全ゲノム關連解析(Genome-Wide Association Study: GWAS)を行なった。得られたデータを先に行なった2つのAISのGWASデータと統合したメタ解析を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AISは人口の2-4%に発症するcommon diseaseである。非成人の骨関節疾患で最も頻度が高い疾患で、法律によりその検診が義務付けられているほど、社会の大問題となっている。遺伝要因と環境要因の相互作用により発症する多因子遺伝病であると考えられており、その発症、進行には遺伝要因が深く關与することが明らかになっている。

AISは、側弯の進行度合いに応じて治療方法が異なり、進行すると治療が困難となるため、早期発見と進行予測が重要である。今回、AISの進行・重症化に關与する遺伝子を新たに同定したので、同定した遺伝子の機能解析研究を突破口に、AISの病態の分子レベルでの解明に繋げたい。

研究成果の概要(英文)：Adolescent idiopathic scoliosis (AIS) is the most common pediatric disease affecting spine. Large-scale genome analyses of AIS were performed. An international meta-analysis of previously identified gene loci associated with progression and aggravation of AIS was performed using multiracial samples to confirm the reproducibility of susceptibility gene loci. In addition, a new AIS Genome-Wide Association Study (GWAS) was performed using approximately 3,200 AIS patient samples and approximately 60,000 non-patient samples collected so far. A meta-analysis was performed in which the obtained data was integrated with the GWAS data of the two AISs performed earlier in my lab.

研究分野：整形外科学關連

キーワード：思春期特発性側弯症 全ゲノム關連解析 一塩基多型 多因子遺伝病 疾患感受性遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

AIS は、全世界で、人口の 2-4%に発症する common disease である。その成因はほとんど不明である。遺伝的要因と環境要因の相互作用により発症する多因子遺伝病であると考えられている。

AIS の遺伝的要因の解明の為に、相関解析による AIS の発症・成り易さに関連する遺伝子 (疾患感受性遺伝子) の探索が全世界で行なわれている。日本では、われわれのグループが、慶應義塾大学整形外科の松本守雄教授を中心とする日本を代表する側弯症治療の専門医集団、Japanese Scoliosis Clinical Research Group(JSCRG)と共に、2010 年より AIS の全ゲノム相関解析(Genome-Wide Association Study)に取り組んでいる。これとアメリカ、中国の計 4 グループが、それぞれの人種集団を用いた GWAS を行なっている。更に、われわれのグループとアメリカのグループ (TSRHC IS Clinical Group) の主導のもとに、International Consortium for Scoliosis Genetics (ICSG) が設立され、国際協力により人種の壁を越えた AIS 疾患感受性遺伝子の探索が行なわれており、2014 年には、メタ解析による最初の成功例 (Londono, Kou *et al.* J Med Genet.) が報告されている。

われわれの研究室では、AIS の遺伝的要因の解明を目指して、AIS の GWAS を世界に先駆けて行ない (Takahashi *et al.* Nat Genet 2011) これまでに 4 つの AIS の疾患感受性遺伝子の発見に成功している (Takahashi *et al.* Nat Genet. 2011; Kou *et al.* Nat Genet. 2013; Sharma *et al.* Nat Commun. 2015; Ogura *et al.* Am J Hum Genet. 2015) GWAS により AIS 疾患感受性遺伝子の遺伝子座位を同定し、SNP (Single Nucleotide Polymorphism) のデータとビッグデータを組み合わせた解析により、遺伝子座位内に存在する AIS 疾患感受性遺伝子を同定し、それに続く遺伝子機能解析により、AIS 疾患感受性遺伝子多型を同定することに成功している。同定した AIS 疾患感受性遺伝子のうちの 1 つ、*GPR126* では、*in vitro* の軟骨細胞の分化モデル、マウス、ゼブラフィッシュのモデルを用いて、*GPR126* の機能低下により、脊椎の内軟骨骨化に異常が起こることが、AIS の病態に関与することを明らかにしている (Kou *et al.* Nat Genet. 2013) また、同じく GWAS により同定した AIS 感受性遺伝子のうちの 1 つ、*LBX1* では、ゼブラフィッシュのモデルを用いた遺伝子とその疾患感受性遺伝子多型の機能解析を通じて、*LBX1* 遺伝子の過剰発現が側弯を引き起こすこと、並びに AIS の分子病態に non-canonical Wnt/planar cell polarity pathway が関与することを明らかにしている (Guo *et al.* PLoS Genet. 2016)

AIS の臨床上の大きな課題のひとつは、側弯のカーブの進行を予測し、重症化を予防することである。遺伝的要因は、AIS の発症だけでなく、その重症度や進行にも関与すると考えられている (Weinstein *et al.* Lancet. 2008) . 実際、われわれのグループは GWAS データを利用して、AIS の重症度に関係する遺伝子座位を発見することに成功している (Miyake *et al.* PLoS One. 2013) AIS の重症度、進行に関与する遺伝子の同定は、遺伝子・ゲノム情報を用いた予測モデルの作成、同定した遺伝子の機能解析研究を突破口とする病態の解明

を通じて、AISの早期発見、予防を可能にし、AIS患者に大きな福音をもたらすと期待できる。よって、その同定は、AIS疾患感受性遺伝子の発見と同じくらい重要である。しかし、現在までにAISの進行に関与する遺伝子は発見されていない。また、われわれのグループは、自分達がGWASにより同定したAIS疾患感受性遺伝子の重症化、進行に対する影響を調べたが、これら疾患感受性遺伝子は重症化、進行にはほとんど影響しないことが分かった。よって、AIS進行関連遺伝子は、AIS疾患感受性遺伝子とは別箇に検索する必要があると考えられた。

## 2．研究の目的

AISの側弯のカーブの進行に関与する遺伝子(AIS進行関連遺伝子)を同定する。先に行なったAISのGWASのデータを利用して、AISの側弯の進行に関する相関解析を行ない、AIS進行関連遺伝子が存在するゲノム上の領域(遺伝子座位)を同定する。相関解析のデータとビッグデータを組み合わせた解析により、相関解析で決定された遺伝子座位内に存在するAIS進行関連遺伝子を同定する。同定したAIS遺伝子とその疾患関連遺伝子多型(病因となっているゲノムのDNAの塩基配列の変化)の機能解析を通じて、AISの分子病態、側弯の進行のメカニズムを明らかにする。

## 3．研究の方法

90万個のSNPのデータが既に得られている2,200人のAIS患者の側弯の進行を評価し、進行群 vs 非進行群でGWASを行なう。得られた相関の再現性をGWASとは独立の患者(2,000-4,000人)のサンプルを用いて確認する。その結果ゲノムレベルでの有意な相関( $P < 5 \times 10^{-8}$ )の得られたSNPを出発点に、*in silico*解析で、AIS進行関連遺伝子の遺伝子座位と其中的候補遺伝子、候補遺伝子多型を決定する。これらを*in vitro*、*in vivo*の機能解析により検証することで、AIS進行関連遺伝子とその原因遺伝子多型を同定する。そして、その機能解析を通じてAISの進行・重症化のメカニズムを明らかにすることを目指す。具体的には、

- (1) 先に行なったAISのGWASデータを利用して相関解析を行ない、AISの重症度、カーブの進行に関与する遺伝子が存在するゲノム上の領域(遺伝子座位)を同定する。
- (2) 遺伝子座位のデータと、ウェブ上のSNP情報、転写やクロマチン構造等に関するビッグデータを組み合わせた解析により、GWASで決定された遺伝子座位内の遺伝子を評価し、候補遺伝子を選定する。
- (3) その結果得られた候補遺伝子を*in silico*、*in vitro*の機能解析により証明する。
- (4) 証明された遺伝子とその遺伝子多型の*in vitro*、*in vivo*の機能解析を行ない、AISの分子病態を探る。

## 4．研究成果

先に日本人サンプルを用いて同定した、重症 AIS と非常に強い関連を示す 17 番染色体上の SNP (Miyake *et al.* PLoS One. 2013) について、多人種 (日本人、中国人、スウェーデン人) からなる 4 つのコホートを用いた国際メタ解析を行なった。重症 AIS 患者サンプル約 2,000 例と非患者サンプル約 14,000 例について関連解析を行ない、再現性を確認した。17 番染色体上の遺伝子座位は、他の人種においても重症化に関連する AIS の強い重症化関連遺伝子座位であることを明らかにした (Takeda *et al.* J Hum Genet. 2019)。

さらに、これまでに収集した約 3,200 例の AIS 患者サンプルと約 60,000 例の非患者サンプルを用いて、新たな AIS の GWAS を行なった。得られたデータを先に行なった 2 つの AIS の GWAS データと統合したメタ解析を行ない、AIS の発症に関与する新たな疾患感受性遺伝子座位を複数同定した (Kou *et al.* Nat Commun. 2019)。

進行に関連する遺伝子座位が同定できなかったため、まずは発症に関連する遺伝子座位の解析を通じて AIS の分子病態解明を試みた。AIS の発症に関連する遺伝子座位に対し、相関値の大きさ、転写やクロマチン構造等に関するビッグデータをもとに、予測機能のアノテーションから関連遺伝子多型を推定した。推定した関連遺伝子多型のゲノム領域近傍に存在する遺伝子に対し、様々な遺伝子発現データベースを使用し、疾患に関わる可能性のある候補遺伝子を推定した。 *In silico* 解析の結果に基づき luciferase assay、electrophoretic mobility shift assay の *in vitro* 解析を行い、転写因子 *TBX1* の遺伝子内に存在する SNP のリスクアレルで *TBX1* 遺伝子の発現が低下することを明らかにした。さらに遺伝統計学的解析により AIS が 6 つの組織あるいは細胞種に関連すること、BMI や尿酸値と共通の遺伝的背景を持つことを明らかにした (Kou *et al.* Nat Commun. 2019)。この結果の一部は、Biobank Japan のデータ (Ishigaki *et al.* Nat Genet. 2020) との比較により、再現された。

現在、世界 5 カ国、7 施設との共同研究で、大規模国際 AIS GWAS メタ解析を行っている。最終的に、AIS 患者サンプル約 10,000 例、非患者サンプル約 100,000 例の GWAS となる予定である。目下、各 GWAS のデータの quality check を終了した。今後、メタ解析、更に post GWAS 解析を行う予定。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kou Ikuyo, Otomo Nao, Takeda Kazuki、(以下41名)、Terao Chikashi、Watanabe Kota、Ikegawa Shiro.	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome-wide association study identifies 14 previously unreported susceptibility loci for adolescent idiopathic scoliosis in Japanese	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11596-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takeda Kazuki, Kou Ikuyo, Otomo Nao、(以下11名) Gerdhem Paul、Watanabe Kota、Ikegawa Shiro.	4. 巻 64
2. 論文標題 A multiethnic meta-analysis defined the association of rs12946942 with severe adolescent idiopathic scoliosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 493 ~ 498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s10038-019-0575-7	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Kou Ikuyo, Watanabe Kota, Takahashi Yohei、(以下23名)、Su Peiqiang, Gerdhem Paul、Ikegawa Shiro.	4. 巻 8
2. 論文標題 A multi-ethnic meta-analysis confirms the association of rs6570507 with adolescent idiopathic scoliosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29011-7	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Khanshour M Anas, Kou Ikuyo, Fan Yanhui、(以下20名)、Song You-Qiang、Ikegawa Shiro、Wise A Carol.	4. 巻 27
2. 論文標題 Genome-wide meta-analysis and replication studies in multiple ethnicities identify novel adolescent idiopathic scoliosis susceptibility loci	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Molecular Genetics	6. 最初と最後の頁 3986 ~ 3998
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hmg/ddy306	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Takeda Kazuki, Kou Ikuyo, Hosogane Naobumi、(以下18名)、Matsumoto Morio、Ikegawa Shiro、Watanabe Kota.	4. 巻 44
2. 論文標題 Association of Susceptibility Genes for Adolescent Idiopathic Scoliosis and Intervertebral Disc Degeneration With Adult Spinal Deformity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 1623 ~ 1629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.00000000000003179	査読の有無 有
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 Ishigaki Kazuyoshi, Akiyama Masato, Kanai Masahiro、(以下27名)、Kou Ikuyo、(以下55名)、Kadowaki Takashi、Kubo Michiaki、Kamatani Yoichiro.	4. 巻 52
2. 論文標題 Large-scale genome-wide association study in a Japanese population identifies novel susceptibility loci across different diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Genetics	6. 最初と最後の頁 669 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41588-020-0640-3	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大伴直央, 黄 郁代, 武田和樹, 小倉洋二, 高橋洋平, 南 昌平, 宇野耕吉, 川上紀明, 伊東 学, 米澤郁穂, 中村雅也, 松本守雄, 渡邊航太, 池川志郎
2. 発表標題 思春期特発性側弯症の遺伝子研究
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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