

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K10395

研究課題名(和文)先天性側弯症発症におけるAGBL5遺伝子の作用機序解析

研究課題名(英文)Examination of AGLB5 gene in congenital scoliosis

研究代表者

中村 幸男(Nakamura, Yukio)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：00549488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：先天性側弯症は出生2000人に対し1人の頻度で発症するが原因は不明である。今回本疾患患者において新規にAGBL5遺伝子上にde novo変異を同定した。本遺伝子は生物種を越えてその配列が高度に保存されており、その機能は非常に重要である。本事業では主にゼブラフィッシュを用いた。結果Whole-mount ISH法により脳、眼、胸鰭に本遺伝子の発現を認めた。また本遺伝子のノックダウンに伴い背側化促進現象をみると、AGBL5遺伝子がBMPシグナルを制御していることが明らかとなった。またマウス10T1/2細胞を用いた実験ではAGBL5遺伝子のトランスフェクションを行うとALP活性の低下をみとめた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ある病気の原因を同定し、その役割を明らかにすることができれば、病態の理解に繋がり、かつ将来的な新規の診断方法の確立や治療法の開発につながる。本研究成果により、これまで原因が不明であった先天性側弯症の新しい診断方法の確立や治療法の確立に繋がると期待でき、社会的な幅員ははかりしれない。

研究成果の概要(英文)：The etiology of congenital scoliosis, in which the occurrence is approximately 1 in 2000 birth, is largely unknown. This time, we newly identified the de novo mutation in the AGLB5 gene. Since this gene is highly conserved among the species, it is considered that its function is essential. In this study, we mainly used zebrafish model. Consequently, whole-mount ISH revealed that the expression was localized around head, eyes, and pectoral fins. Also, the morpholino-mediated knockdown showed the dorso-ventral patterning defects and the regulation of BMP signaling by AGLB5. In addition, mouse 10T1/2 cells showed that ALP activities were down-regulated by AGLB5 gene transfection.

研究分野：膝・股関節外科

キーワード：遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

先天性側弯症は、生来の脊椎椎体の発生・形成異常を特徴とする(図1)。出生 1,000 名に対し 1 名に発症する頻度の高い障害である。妊娠初期の脊椎発生段階における細胞分化障害により生じるとされているが、原

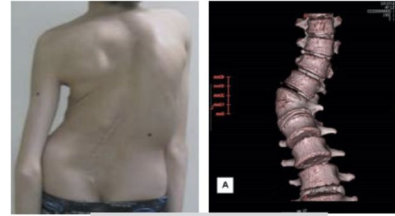


図1:先天性側弯症

因と発症機序は未だ解明されていない。疾患性差はなく他臓器の先天異常(肋骨癒合、腎奇形など)を合併することが多い。遺伝的に明らかな家族歴の報告はないため孤発性疾患と考えられている。孤発例発症に対する影響度の高い遺伝的要因は、突然変異(de novo 変異)と劣性ホモ変異(両親それぞれからヘテロ変異を受け継いだ変異)が多い。過去に先天性側弯症に対して次世代シーケンサーを用いて、網羅的遺伝子解析(全エクソン解析)を行った報告はない(図2)。



図2 次世代シーケンサー  
1ランで40億塩基を読み取ることが可能(AB社 SOLiD-3)

我々は、先天性側弯症が孤発性疾患であることに着目し、患者および患者と血縁関係にある両親(トリオとする)のゲノムDNAを用いた遺伝子解析を行った。結果、新規に *AGBL5* 遺伝子上に de novo 変異を同定した。本遺伝子は生物種を越えてその配列が高度に保存されており、その機能は非常に重要である。しかしながら *AGBL5* 遺伝子の機能は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本事業では *AGBL5* 遺伝子の遺伝学的、生物学的活性を調べることを複数のツールを用いて検証することを主目的とした。

## 3. 研究の方法

本事業では主にゼブラフィッシュと細胞株を用いた。Whole-mount in situ hybridization 法により脳、眼、胸鰭に本遺伝子の強発現を認めた。本遺伝子のノックダウンを行うため、複数のアンチセンスオリゴであるモルフォリノ(20 塩基程度のアンチセンスヌクレオチド)

を作成し、AGBL5 遺伝子ノックダウンゼブラフィッシュを作成した。結果、背側化促進現象をみとめ、AGBL5 遺伝子が BMP シグナルを制御していることが明らかとなった。またマウス 10T1/2 細胞を用いた実験では AGBL5 遺伝子のトランスフェクションを行うと ALP 活性の低下をみとめた。

#### 4 . 研究成果

AGBL5 遺伝子が骨の発生形成に重要な役割を果たすこと、BMP シグナルを介して先天性側弯症の病態に関与している可能性があること、が明らかとなった。

本研究により、先天性側弯症において AGBL5 を用いた早期遺伝子診断、罹患リスクの評価、発症および予後予測、が可能となり、これまで原因不明な先天性骨系統疾患を含めた骨関節の研究分野に大きなブレークスルーをもたらすことが期待される。

また研究報告者はヒト骨軟骨系統疾患の研究ツールとしてゼブラフィッシュモデルを確立しており、本研究を通じてより多くの手法、データの蓄積が期待でき、多くの骨軟骨分野研究に有益である。

本研究は、遺伝子を標的とした発症を抑制する分子学的治療方法の確立や外科的治療の選択を含めたオーダーメイド医療の開発を可能とし、罹患患者への福音は、非常に大きい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----