

令和元年5月22日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：16H05453
研究課題名（和文）オーダーメイド医療を目指した思春期特発性側弯症の発症・進行予測モデルの確立

研究課題名（英文）Establishment of prediction model of onset and progression of adolescent idiopathic scoliosis for personalized medicine

研究代表者
松本 守雄（Matsumoto, Morio）
慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授

研究者番号：40209656
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、思春期特発性側弯症（以下、AIS）の遺伝的背景を明らかにするため、遺伝統計学的手法であるゲノムワイド相関解析（以下、GWAS）を用いて、AISの疾患感受性遺伝子の探索を行ってきた。これまでに、我々は合計3回のGWASを施行し、発症に関与する遺伝子を20個同定した。合計サンプル数は5000検体を超え、これは全世界的に最大規模の検体数である。さらに、層別化解析を行い、重症化に関わる遺伝子を1個、進行に関わる遺伝子を1個同定している。そして、海外の研究グループと共同国際メタ解析を行い、これら感受性遺伝子の他人種間での再現性を確認している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は世界に先駆けて、今まで不明であったAISの発症、重症化、進行に関与する遺伝子を明らかにした。これら遺伝子の機能を明らかにすることは、側弯症の病態解明につながり、学術的意義は大きい。また、これら遺伝情報とAISの環境的要因を総合的に評価し、AISの発症および重症化の予測モデルの確立を試みる予定である。発症、重症化を予防することができれば、現行の身体に負荷のかかる手術加療を回避することができる。その社会的意義は計り知れない。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the genetic background of adolescent idiopathic scoliosis (AIS), we have conducted genetic study for AIS by using genome-wide association study (GWAS) which is a genetic statistical method. We have performed a total of three GWASs and identified 20 AIS susceptibility genes. The total number of samples exceeds 5000 samples and this is the largest cohort worldwide. And we have also identified a gene involved in severity and a gene involved in progression by stratification analyses of GWAS. Furthermore, we have conducted international meta-analysis with American, Swedish and Chinese research groups using GWAS data and replicated these susceptibility genes among other races.

研究分野：整形外科学

キーワード：思春期特発性側弯症 多遺伝子疾患 遺伝因子 ゲノムワイド相関解析

1. 研究開始当初の背景

思春期特発性側弯症 (adolescent idiopathic scoliosis: AIS) は思春期(10歳~18歳)に診断される側弯症であり、その発症や進行の原因は不明である。側弯症には多くのタイプがあるが、AISは側弯症のうち最も頻度が高く、女性に多く発症し、その頻度は思春期の女性の1-2%と報告されている。以前より、AISには遺伝的要因の関係が報告されている一方、運動などの生活環境因子の関与も報告されている。このことから、AISは多因子遺伝疾患と考えられている。

2. 研究の目的

重度のAISに進行すると、拘束性肺機能障害、腰背部痛、整容面での問題等、様々な障害をきたすことが報告されている。そのため脊椎矯正固定手術で治療するが、その手術侵襲は非常に大きい。近年、側弯症の進行予防に使用されてきた矯正装具の有効性が、ランダム化比較試験で証明された。すなわち、矯正装具による治療は、有意に手術例への進行を減少させることが分かった。そのため、側弯症の早期発見、早期治療により側弯症の重症化を予防し、手術を回避する診療体制の確立が急務となっている。さらに、側弯症の発症や進行を予測する方法が確立されれば、より効率の良い側弯症の診療体制が確立できる。そこで本研究の目的は、AIS遺伝的背景を明らかに、疾患の発症・進行予測モデルを確立することである。

3. 研究の方法

AIS例の血液および唾液から抽出したDNAサンプルを使用し、AISの遺伝的要因の探索を行った。AISをcase、非AISをcontrolとして、それぞれのサンプルを解析した。主な方法として、ゲノム上に存在する一塩基多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) を手がかりとし、疾患感受性遺伝子座位を同定する手法、ゲノムワイド相関解析 (genome-wide association study: GWAS) を用いて、AISの疾患感受性遺伝子座または遺伝子の探索を試みた。そして、得られたGWASデータから、統計学的手法を用いてAISの病態を解析し、最終的に、AISの発症および進行に関する統計学的予測モデルの作成を行う予定である。

4. 研究成果

(1) 1st GWAS

Case 1254例、control 2979例を用い、GWASを施行した結果、rs1190870とrs6570507の2つのゲノムワイド優位水準を満たす遺伝子座位を世界に先駆けて同定した (Takahashi *et al.*, *Nat Genet*, 2011; Kou *et al.*, *Nat Genet*, 2014)。機能解析の結果、前者は*LBX1*、後者は*GPR126*という遺伝子に影響を与えていることがわかった。またゼブラフィッシュを用いた*in vivo*機能解析では、*GPR126*をノックダウンすると優位に脊椎の軟骨骨化が遅延することを同定し、AISの発症の病態の解明に貢献した(図1)¹。

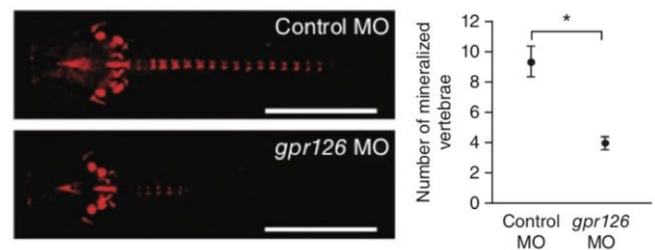


図1 *GPR126*の側弯ゼブラフィッシュモデル。
*GPR126*をノックアウトすると脊椎の軟骨の石灰化が障害される。

(2) 2nd GWAS

AIS感受性遺伝子座位を更に同定するために、case 819例、control 7653例を追加し2回目のGWASを行ない、1st GWAS結果とmeta解析した。結果、新たな遺伝子座位 (rs3904778) を同定した (Ogura *et al.*, *Am J Hum Genet*, 2015)。機能解析の結果、*BNC2*遺伝子との相関を明らかにした。更に、ゼブラフィッシュを用いた*in vivo*機能解析では、*Bnc2*を過剰発現させると用量に依存して側弯の変形も重症化することを明らかにし、AIS発症の新たな機序を同定した(図2)²。

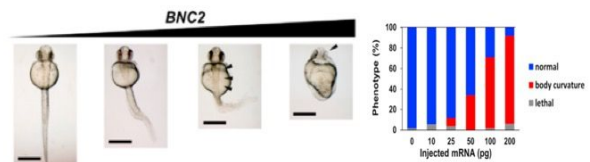


図2 *BNC2*の側弯ゼブラフィッシュモデル。発現量に応じて側弯の程度も重症になる。

(3) sub analyses

GWASに使用したタイピングデータを用いて、層別化解析も行なっている。まず、AIS重症例のみをcaseとして抽出しcontrol群と相関解析を行い、重症化因子としてrs12946942を同定した (Miyake *et al.*, *Plos One*, 2013)。そして、AISのcase内で、進行例、非進行例を抽出し、進行例と非進行例で相関解析を行なった。結果、AISの進行の因子としてrs35333564を同定した (Ogura *et al.*, *Hum Mol Genet*, 2017)。どちらも、AISの層別化解析として世界に先駆けて重症化、進行因子を報告している。

(4) International meta-analyses

上記で同定した AIS 感受性遺伝子座位の多人種間における再現性を確認するために、アメリカ、中国、香港の研究グループと国際メタ解析を施行した。国際メタ解析の結果、発症因子である rs119087、rs6570507 および rs3904778、重症化因子である rs12946942 は多人種間でも相関があることが証明された(Londono *et al.*, *J Med Genet*, 2014; Kou *et al.*, *Sci Rep*, 2018; Ogura *et al.*, *Sci Rep*, 2018; Takeda *et al.*, *J Hum Genet*, 2019)。また、新たな AIS 感受性遺伝子座位 rs6137473、rs4513093、rs697621 および rs1455114 を国際メタ解析により同定している(Sharma *et al.*, *Nat Commun*, 2015; Khanshour *et al.*, *Hum Mol Genet*, 2018)。多人種間で再現性を確認することで、遺伝子座位の信頼度をより高めることが可能になった。

(5) 3rd GWAS

2018 年に、さらなる疾患感受性遺伝子座位を同定するために AIS の case 約 3200 例、control 約 60000 例を追加の GWAS を施行した。そして、過去 2 回の GWAS 結果を統合し、case 5327 例、control 73884 例で meta 解析を行なった。これは、単一人種での AIS の GWAS では世界最大規模である。結果、20 のゲノムワイド有意水準を満たす遺伝子座位を同定した(図 3)³。その内、14 個は新規疾患感受性遺伝子座位であった。GWAS データを用いた統計学的手法による *in silico* 解析では、AIS は BMI と血清尿酸値と遺伝的に負の相関があることがわかった。また、各組織の細胞と AIS の遺伝的関係を解析した結果、循環器系、筋骨格系、結合組織および中心神経系の組織と優位に相関があることが判明した。一方で、AIS の発症に關与する経路を解析した結果、優位な疾患感受性経路は認めなかった。このことから、AIS は我々が考えている以上に不均一な集団である疾患である可能性が示唆された。現在上記結果をまとめ、論文投稿中である。

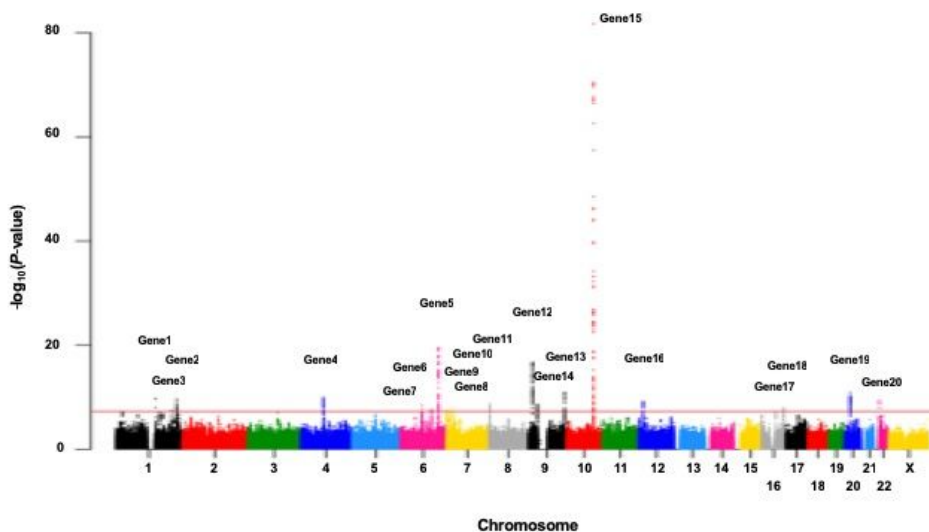


図3 3rd GWASのマンハッタンプロットの結果。

(6) Polygenic risk score

現在 Polygenic risk score(以下、PRS)という概念を用いて、AIS の発症および進行の統計学的予測モデルの確立を検討している。GWAS では約 4 百万個の SNP を検定しているが、PRS ではゲノムワイド有意水準を満たさなかった SNP も疾患の発症に關与しているという前提で、検定した SNP 全てを点数化し、予測に活用している。今回、3 つのコホートを使った 3 ステップの研究デザインを検討している。まず AIS の発症の PRS を作製する。その後、Validation セットで各パラメーターを、Test セットで PRS が機能しているかを検討する。最終的に作製した PRS がどの程度予測できるのかは AUC、Odds ratioなどを計算し評価する。次に、側弯の角度のパラメーターを用い、重症例も PRS で予測できるかを評価する。現在解析中である。

引用文献

1. Kou, I *et al.*, Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat. Genet.* 45, 2013, 676-679.
2. Ogura, Y. *et al.*, A functional SNP in BNC2 is associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 97, 2015, 337-342.
3. Kou, I & Otomo, N *et al.*, submitted.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Takeda K, (以下 10 名), Matsumoto M, (以下 3 名), Watanabe K, (以下 1 名). A multiethnic meta-analysis defined the association of rs12946942 with severe adolescent idiopathic scoliosis. *J Hum Genet.* 64, 査読あり, 2019, 493-498.
DOI: 10.1038/s10038-019-0575-7
2. Ogura Y, Matsumoto M, Ikegawa S, Watanabe K. Epigenetics for curve progression of adolescent idiopathic scoliosis. *ebiom.*, 37, 査読あり, 2018, 36-37.
DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.10.015
3. Khanshour, M.A, (以下 14 名), Watanabe K, (以下 9 名), Wise A.C. Genome-wide meta-analysis and replication studies in multiple ethnicities identify novel adolescent idiopathic scoliosis susceptibility loci. *Hum. Mol. Genet.* 27, 査読あり, 2018, 3986-3998.
DOI: 10.1093/hmg/ddy306
4. Kou I, Watanabe K, (以下 13 名), Matsumoto M, (以下 10 名), (以下 1 名). A multi-ethnic meta-analysis confirms the association of rs6570507 with adolescent idiopathic scoliosis. *Sci Rep.*, 8, 査読あり, 2018, 11575.
DOI: 10.1038/s41598-018-29011-7
5. Ogura Y, (以下 11 名), Matsumoto M, (以下 11 名), Watanabe K, (以下 1 名). An international meta-analysis confirms the association of BNC2 with adolescent idiopathic scoliosis. *Sci Rep.*, 8, 査読あり, 2018, 4730.
DOI:10.1038/s41598-018-22552-x
6. Ogura Y, (以下 25 名) Matsumoto M, Watanabe K, (以下 1 名). A functional variant in MIR4300HG, the host gene of microRNA MIR4300 is associated with progression of adolescent idiopathic scoliosis. *Hum Mol Genet.*, 26, 査読あり, 2017, 4086-4092.
DOI: 10.1093/hmg/ddx291
7. Sharma S, (以下 7 名), Matsumoto M, (以下 8 名), Wise A.C. A PAX1 enhancer locus is associated with susceptibility to idiopathic scoliosis in females. *Nat. Commun.*, 6, 査読あり, 2015, 6452.
DOI: 10.1038/ncomms7452
8. Ogura Y, (以下 19 名), Watanabe K, (以下 12 名), Matsumoto M, (以下 1 名). A functional SNP in BNC2 is associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Am. J. Hum. Genet.*, 97, 査読あり, 2015, 337-342.
DOI: 10.1016/j.ajhg.2015.06.012.
9. Londono D, (以下 6 名), Matsumoto M, (以下 20 名), Wise A.C. A meta-analysis identifies adolescent idiopathic scoliosis association with LBX1 locus in multiple ethnic groups. *J. Med. Genet.*, 51, 査読あり, 2014, 401-406.
DOI: 10.1136/jmedgenet-2013-102067
10. Miyak, A, (以下 25 名), Watanabe K, (以下 3 名), Matsumoto M, (以下 1 名). Identification of a susceptibility locus for severe adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 17q24.3. *PLoS One*, 8, 2013, 査読あり, e72802.
DOI: 10.1371/journal.pone.0072802
11. Kou I, (以下 28 名), Watanabe K, (以下 10 名), Matsumoto M, (以下 1 名). Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat. Genet.* 45, 2013, 査読あり, 676-679.
DOI:10.1038/ng.974
12. Takahashi Y, (以下 14 名), Watanabe K, (以下 6 名), Matsumoto M, (以下 1 名). A genome-wide association study identifies common variants near LBX1 associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nat. Genet.* 43, 2011, 査読あり, 1237-1240.
DOI: 10.1038/ng.974

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 小倉洋二、NC2 遺伝子は多人種で思春期特発性側弯症発症に関与する、第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、2018 年
2. 高橋洋平、s11190870 が思春期特発性側弯症の重症度に関与するかの検討、第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、2018 年
3. 武田和樹、RS12946942 は多人種間で思春期特発性側弯症の重症化に関与する、第 52 回日本側弯症学会学術集会、2018 年
4. 小倉洋二、BNC2 遺伝子は人種を超えて思春期特発性側弯症発症に関与する、第 47 回日本脊椎脊髄病学会、2018 年

5. 高橋洋平、RS11190870 と思春期特発性側弯症の重症化に関する検討、第 52 回日本側彎症学会学術集会、2018 年
6. 高橋洋平、思春期特発性側弯症の遺伝子解析、第 29 回日本小児整形外科学、2018 年
7. Kazuki Takeda, Association of degenerative lumbar scoliosis with the susceptibility genes for adolescent idiopathic scoliosis and disc degeneration. 45th ISSLS Annual Meeting, 2018
8. 武田和樹、腰椎変性側弯症の発生に関する思春期特発性側弯症および椎間板変性の遺伝的背景の影響、第 51 回日本側彎症学会学術集会、2017 年
9. 渡辺航太、思春期特発性側弯症の進行に関与する環境因子の同定、第 51 回日本側彎症学会学術集会、2017 年
10. 小倉洋二、思春期特発性側弯症進行の分子機構の解明、第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017 年
11. 小倉洋二、思春期特発性側弯症の進行に関与する遺伝子の発見、第 46 回日本脊椎脊髓病学会学術集会、2017 年
12. Anas M. Khanshour, Expanding AIS Gene Discovery: A Consortium-Based Meta-Analysis. 52nd Scoliosis Research Society Annual meeting & Course, 2017
13. 小倉洋二、BNC2 の過剰発現が思春期特発性側弯症の発症に関与する、第 45 回日本脊椎脊髓病学会、2016 年
14. 小倉洋二、思春期特発性側弯症の進行に関与する遺伝子の発見、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016 年
15. 小倉洋二、思春期特発性側弯症のゲノム解析、第 27 回日本小児整形外科学会、2016 年
16. Yoji Ogura, Identification of the First Genetic Locus Associated with Adolescent Idiopathic Scoliosis Curve Progression, 51st annual meeting of SRS, 2016
17. Kota Watanabe, Identification of life style factors affecting onset of adolescent idiopathic scoliosis. 43th ISSLS Annual Meeting, 2016
18. Kota Watanabe, Genome-wide association study for AIS in Japan, 43th ISSLS Annual Meeting, 2016

〔図書〕(計 2 件)

小倉洋二他、Clinical Calcium、Common disease の GWAS : 思春期特発性側弯症、2016 年、8

高橋洋平他、医療ジャーナル社、側弯症治療の最前線、2013 年、52-58

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：渡邊航太

ローマ字氏名：WATANABE, Kota

所属研究機関名：慶應義塾大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：60317170

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、研究者個人に帰属されます。