

令和元年6月12日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10809

研究課題名(和文) ヒト先天性脊柱側弯症における発症機序の解明と遺伝子診断法の確立

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of gene expression in congenital scoliosis

研究代表者

飯塚 伯 (IIZUKA, HAKU)

群馬大学・大学院医学系研究科・研究員

研究者番号：90334119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：先天性脊柱側弯症は、椎骨の先天的な形態異常により側弯変形をきたす疾患であり、その原因遺伝子や病態の詳細は未だ明らかではなく、手術治療以外に根本的な治療のないこの疾患にとって、疾患関連遺伝子の同定と病態の解明は、早期診断、進行の予防、治療成績の向上などに寄与すると考えられる。本申請者らはこれまで、先天性脊柱後側弯症モデル動物の解析から、疾患関連遺伝子候補としてHox, Trkなどの遺伝子を同定し、さらに今回の研究において疾患関連遺伝子候補としてレチノール代謝関連遺伝子群(Adh1, Aldh1a2, Rar)やBMP-2を、また、後側弯変形の進行に関わる因子としてmiR-182を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性脊柱後側弯症モデル動物である Ishibashi rat の遺伝子発現解析の報告は本申請者らのグループによる報告が最初であり、本研究結果を元に解析を進めることで先天性脊柱側弯症の疾患関連遺伝子や発症メカニズムなどの病態が解明されれば、疾患の早期診断や進行の予防、治療成績の向上が期待出来ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although congenital scoliosis is defined as a genetic disease characterized by a congenital and abnormal curvature of the spinal vertebrae, our knowledge of the genetic underpinnings of the disease is insufficient. Surgery is the only radical treatment, but often causes complications such as paralysis or infection. The functional prognosis depends on whether or not the operation is performed before the progression of the deformity. Thus, an early diagnosis is extremely important. To detect the disease early in its course and prevent progression, it is necessary to detect the genes associated with congenital scoliosis. In previous animal study of congenital kyphoscoliosis model rat, we identified Hox and Trk as gene candidate associated with congenital scoliosis. In this study, we also identified Adh1, Aldh1a2, Rar as candidate genes, and miR-182 may be associated with kyphoscoliotic deformity progression.

研究分野：整形外科

キーワード：先天性脊柱側弯症 Ishibashi rat 疾患関連遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊柱側弯症は脊椎が冠状面で生理的弯曲を越えて側方に弯曲する異常であり、大まかに先天性・特発性・症候性の三つに分類され、このうち先天性脊柱側弯症は、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)により側弯変形を来す疾患と定義される。その症状は姿勢異常をはじめとして多岐にわたり、側弯の程度が高度になると胸郭が著しく変形するために肺機能が低下し、その結果肺や心臓に重篤な合併症を引き起こす。新生児～乳児期と学童期～思春期にかけての成長期に主に姿勢異常が悪化することが多く、さらに形態異常が複雑な場合や、複数の椎体に形態異常がある場合には側弯が急速に進行することがある。治療は変形が軽度の場合は進行の予防目的に装具療法が行われるが、変形が進行し中等度から高度の場合は手術加療が行われる。側弯変形が高度に進行する前に手術を行う方が治療成績がよいとされているが、手術に伴う麻痺や感染等の合併症は少なくなく、また成長期に治療を行うが故に複数回の手術を要する場合もある。根治的治療が手術加療しかないこの疾患にとって、疾患関連遺伝子や発症メカニズムなどの病態の解明は、早期診断や進行の予防、適切な治療時期の選択において非常に有用であると考えられるが、脊柱側弯症のうち最も多数を占める特発性側弯症はその疾患関連遺伝子の探索が進んでいる一方で、先天性側弯症に関しては原因及び疾患関連遺伝子の検索は未だごく一部しかなされていない状況である。

我々は先天性脊柱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的解析を行い、IS はヒトの先天性脊柱側弯と極めて類似した形態を示すことや胎生期から1次骨化中心の癒合や変形がみられること、腰仙椎移行部において 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 (Seki T, Iizuka H, et al., Mol. Cell. Biochem., 2008)。さらに、DNA microarray を用い、IS において奇形が集中する下位腰椎局所における網羅的な遺伝子解析を試みた。解析したおよそ2万個の遺伝子のうち、野生型ラットの当該部位と比較して発現が8倍以上上昇したものは90遺伝子であり、逆に発現が0.125(1/8)倍以下に低下したものは106遺伝子存在した。このうち神経成長因子受容体である Tropomyosin receptor kinase (Trk) 遺伝子群は0.1倍程度の顕著な発現低下を認め、Real-time PCR による mRNA 発現、抗 Trk 抗体を使った Western blotting や免疫染色によるタンパク質の発現においても有意な発現低下を確認した (Tsunoda D, Iizuka H, et al., Mol. Cell. Biochem., 2015)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、先天性脊柱後側弯症モデル動物 (Ishibashi rat: IS) を用い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する/過剰となることによって脊柱側弯が生じるのかを明らかにすることにある。

3. 研究の方法

先行研究の DNA microarray において発現変動遺伝子群が情報伝達系のどのパスウェイに多く含まれていたかを調べる「パスウェイ解析」において、発現低下遺伝子が最も多く含まれたレチノール代謝経路の遺伝子群のうち、代謝の際に働く酵素の Adh1, Aldh1a2, 経路下流の代謝産物であるレチノイン酸の核内受容体の Rar に関して、生後4日齢の IS の下位腰椎 (L3-5) サンプルでの Western blotting, Real-time PCR による解析を行った。また、下位腰椎サンプルを採取した IS の血清レチノール濃度の測定を行った。さらに、Trk と Rar により発現が制御される BMP-2 に関して、下位腰椎サンプルでの Real-time PCR による解析を行い、Rar と BMP-2 に関しては下位腰椎サンプルでの免疫染色を行った。また、脊柱後側弯の進行に関わる因子の解析を目的として、IS の脊柱変形進行の時期の観察と、下位腰椎サンプルにおける miRNA array を行った。コントロールとしては同齢同姓の Wistar rat (WT) の同部位を用いた。

4. 研究成果

IS の下位腰椎における Adh1, Aldh1a2, Rar の mRNA 発現は、WT の同部位、及び IS の比較的変形の少ない下位胸椎に比べ有意に低下していた。IS の下位腰椎における Adh1, Aldh1a2, Rar のタンパク発現は WT の同部位に比べ有意に低下していた。IS の血清レチノール濃度は WT に比べ有意に高値だった。IS の下位腰椎における BMP-2 の mRNA 発現は WT の同部位に比べ有意に低下していた。IS の下位腰椎の一次骨端核における Rar⁺、BMP-2 陽性細胞数は WT に比べ少なかった。これらの結果から、IS の下位腰椎においては、レチノール代謝経路のダウンレギュレーションに伴うレチノールの利用障害から Hox 遺伝子の発現が低下し椎骨の形態異常が生じている可能性や、レチノール代謝関連遺伝子群 (Adh1, Aldh1a2, Rar⁺) と TrkC の発現の減少によって BMP-2 の産生が抑制され椎骨の形態異常を生じている可能性が考えられた。これらの研究成果は「The retinol-retinoic acid metabolic pathway is impaired in the lumbar spine of a rat model of congenital kyphoscoliosis」として Journal of Cellular Biochemistry に掲載予定である。

一方、IS の下位腰椎に Alcian blue, Alizarin red 染色を行い脊柱の形態を確認したところ、4日、1週時点では一次骨化中心の癒合と分裂、2週から4週時点では輪状骨端核の癒合と側弯変形の進行、6週時点では癒合椎の完成を確認した。IS の下位腰椎の miRNA array による解析

では、miR-224-5p がWT の2倍以上の発現上昇、miR-194-3p, miR-9a-5p, miR-96-5p, miR-182 が0.5倍以下の発現低下をしており、このうち骨、軟骨に関わる miR-182 に関してパスウェイ解析を行ったところ、破骨細胞の分化に関わる MITF, 軟骨細胞分化を阻害する Smad7, 骨芽細胞の増殖と分化を促進する Smad1 の3経路を阻害することがわかった。まとめると、IS においては miR-182 の発現異常により正常な骨成長が妨げられている可能性が考えられ、このことから miR-182 が脊柱後側弯変形の進行に関与している可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Sonoda H, Iizuka H, Ishiwata S, Shimokawa N, et al. The retinol-retinoic acid metabolic pathway is impaired in the lumbar spine of a rat model of congenital kyphoscoliosis Journal of Cellular Biochemistry in press 2019 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 園田裕之 先天性脊柱側弯症とレチノール代謝系の関連-モデルラットの腰椎における遺伝子発現解析から- 第45回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2016年
2. 園田裕之 レチノール代謝系は先天性脊柱側弯症の発症に関与する-モデルラットの腰椎における遺伝子発現解析- 第50回日本側弯症学会 2016年
3. 下川哲昭 先天性脊柱側弯症ラットの腰椎における遺伝子発現の網羅的解析 第94回日本生理学会大会 2017年
4. 園田裕之 レチノール代謝系は先天性脊柱側弯症の発症に関与する-モデルラットの腰椎における遺伝子発現解析- 第46回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2017年
5. 石綿翔 先天性脊柱後側弯症の発症に関わる microRNA 発現 第51回日本側弯症学会 2017年
6. 園田裕之 レチノール代謝系は先天性脊柱側弯症の発症に関与する-モデルラットの腰椎における遺伝子発現解析- 第32回日本整形外科学会基礎学術集会 2017年
7. 石綿翔 先天性脊柱後側弯症進行に関わる microRNA 発現 第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会 2018年
8. 園田裕之 レチノール代謝系は先天性脊柱側弯症の発症に関与する-モデルラットの腰椎における遺伝子発現解析- 第91回日本整形外科学会学術総会 2018年
9. 石綿翔 先天性後側弯症ラットの癒合椎はどのように成長するか-microRNA との関連- 第91回日本整形外科学会学術総会 2018年
10. 園田裕之 先天性高側弯症モデルラットの腰椎におけるレチノール-レチノイン酸代謝経路の障害 第52回日本側弯症学会 2018年

〔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：
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：
国内外の別：

〔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：下川 哲昭

ローマ字氏名：Shimokawa Noriaki

所属研究機関名：高崎健康福祉大学

部局名：健康福祉学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：90235680

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。