

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03811

研究課題名（和文）脊椎後縦靭帯骨化症の疾患感受性遺伝子の同定

研究課題名（英文）Identification of susceptibility genes for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine

研究代表者

中島 正宏（NAKAJIMA, Masahiro）

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・研究員

研究者番号：10338692

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、これまでに脊椎後縦靭帯骨化症（OPLL）のゲノムワイド関連解析（GWAS）を行い、OPLLの発症と関連する14個のゲノム領域を発見している。本研究では、GWASで発見した領域の一つからOPLL発症に関わる遺伝子CCDC91を同定した。そして、CCDC91遺伝子の組織特異的な転写産物が、靭帯で非翻訳RNAとして働き、マイクロRNAの一つであるMIR890と結合することで、骨形成に関係する遺伝子を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OPLLは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いるが、その成因、遺伝要因には不明の点が多く、その解明は医学上の大きな課題となっている。今回の結果は、靭帯細胞に特異的に発現する非翻訳RNAのネットワークが、骨形成の制御を通じて、OPLLの発症・進展に重要な役割を担うことを示している。今後、CCDC91-MIR890経路の骨形成における役割を詳しく調べることで、OPLLの病態の理解が進み、新しいタイプの治療薬が開発されると期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have previously performed a genome-wide association study (GWAS) of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL) and identified 14 genomic regions associated with the pathogenesis of OPLL. In this study, we identified CCDC91, a gene involved in the pathogenesis of OPLL, from one of the regions determined by GWAS. We then showed that the tissue-specific transcript of CCDC91 acts as a non-coding RNA in the ligament and binds to a microRNA called MIR890, which regulates genes related to bone formation.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：後縦靭帯骨化症 OPLL 疾患感受性遺伝子 CCDC91

1. 研究開始当初の背景

脊椎後縦靭帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine: OPLL) は、脊椎の後面を縦走する後縦靭帯が骨化する原因不明の疾患である。骨化によって肥大した靭帯は脊髄や神経根を圧迫し、感覚障害や運動障害、膀胱・直腸障害を起こして、日常生活に不自由をもたらす。OPLL は日本人をはじめとするアジア人に好発し、日本での頻度は人口の約 3% である。OPLL は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いるが、その成因、遺伝要因には不明の点が多く、その解明は医学上の大きな課題となっている。OPLL の発症メカニズムの理解と治療法の開発に重要な OPLL の遺伝要因 (疾患感受性遺伝子) の探索はわが国を中心に行われてきた。しかし、いずれの研究もサンプル数が少ないため、再現性に乏しく、信頼性が低いものばかりであった。

我々は、2014 年に厚生労働省の難病研究班「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班」および文部科学省バイオバンク・ジャパンなどで収集した日本人の OPLL 患者および非患者、計 8,000 人のゲノム DNA について、全ゲノム関連解析 (genome-wide association study: GWAS) を行い、6 つのゲノム領域 (6p21.1、8q23.1、8q23.3、12p11.22、12p12.2、20p12.3) の一塩基多型 (SNP) が OPLL の発症と有意に関連している (P 値 = 10^{-13} ~ 10^{-8}) ことを明らかにした (Nakajima et al. Nat Genet 2014)。この GWAS で見いだされた 6 つのゲノム領域内の遺伝子は、OPLL や骨・軟骨代謝との関係が未知のものばかりであった。申請者は、データベース解析や *in vitro* の骨・軟骨細胞分化系での発現解析により、GWAS で見いだされた 6 つのゲノム領域から疾患感受性候補遺伝子を絞り込み、絞り込んだ疾患感受性候補遺伝子について内軟骨骨化に対する影響などの機能解析を行うことにより、1 つのゲノム領域から疾患感受性遺伝子として R-spondin 2 (*RSP02*) を同定した (Nakajima et al. Am J Hum Genet 2016)。

これまで様々な疾患で GWAS が行われ、疾患に関連する多くのゲノム領域が発見されているが、その後続くべき疾患感受性遺伝子の同定に成功した例は少ない。また、上記の 6 つの OPLL 関連ゲノム領域のなかには、遺伝子多型が存在するゲノム上に既知の遺伝子が存在しないものもあり、これらの遺伝子多型がどの遺伝子に影響を与えて OPLL の発症、進展に関与しているか予測困難であった。しかし近年、エピゲノムやトランスクリプトームに関するデータベースが充実し、これら多様なデータベースを利用したビッグデータ解析により、上述の *RSP02* のように遺伝子多型が影響を及ぼす疾患感受性遺伝子を推定し、機能解析により証明することが可能となりつつある。本研究は、上記のようなゲノム医科学研究、OPLL 研究の背景のもと、*RSP02* に続く OPLL の疾患感受性遺伝子の同定を目指すものである。

2. 研究の目的

OPLL の発症に関与する疾患感受性遺伝子を同定し、同定した遺伝子の機能解析研究を突破口に、OPLL の病態を分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

OPLL の疾患感受性遺伝子とその発現量を制御する疾患感受性遺伝子多型を同定するため、OPLL の発症と関連する 14 個の GWAS 領域の遺伝子多型とその近傍 100 kb の FANTOM5 CAGE タグの発現量との関係について、機械学習を応用した *in silico* mutagenesis (Koido et al. Nat. Biomed. Eng. 2022) による予測を行った。CAGE タグ p4@CCDC91 を転写開始点とする *CCDC91* の新しいスプライスアイソフォームの全長配列は、RT-PCR および 3' -RACE 法により同定した。新しいアイソフォームの転写への rs35098487 の影響を調べるため、luciferase assay、electrophoretic mobility shift assay および allele-specific qPCR を行った。新しいアイソフォームの骨化に対する影響を調べるため、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cell: MSC) で、新しいアイソフォームをノックダウンあるいは過剰発現させ、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現量を qPCR で解析した。また、アルカリフォスファターゼ活性および石灰化を染色法により解析した。新しいアイソフォームに結合する microRNA を RNA22 V2、microRNA のターゲット遺伝子を miRDB により予測した。*MIR890* と新しいアイソフォームおよび *RUNX2* の 3' -UTR との結合は、luciferase assay により評価した。

4. 研究成果

in silico mutagenesis の結果、MSC、骨芽細胞や軟骨細胞といった OPLL に関係する細胞において、12 番染色体の遺伝子多型 (rs35098487) が *CCDC91* の一つの CAGE タグ (p4@CCDC91) の発現と関連するという予測を得た。この CAGE タグを転写開始点とする転写物はゲノムデータベースに登録されていなかったため、RT-PCR や 3' -RACE を行い、*CCDC91* の新たな転写物 (スプライスアイソフォーム) を同定した。この新しいアイソフォームは、*CCDC91* の既知のアイソフォームと翻訳領域を共有するが、翻訳領域の途中でポリアデニル化が起こり、停止コドンが存在しない non-stop mRNA であることがわかった。一般に、non-stop mRNA は non-stop decay により分解されるが、新しいアイソフォームは腱や靭帯などの組織で発現していた。rs35098487 のリスク

アレルは、非リスクアレルに比べてより強く核内タンパク質と結合し、強い転写活性を示した。新しいアイソフォームの組織や細胞での発現様式から骨芽細胞分化への関与が考えられた。MSCを骨芽細胞に分化誘導すると、新しいアイソフォームはアルカリフォスファターゼやオステオカルシンなどの骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現に先立って上昇した。MSCや骨芽細胞株 MG-63 で、新しいアイソフォームをノックダウンすると、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現および石灰化は抑制された（図1）。一方、新しいアイソフォームを過剰発現させると、骨芽細胞分化マーカーの発現および石灰化は促進された。このことから、新しいアイソフォームは骨芽細胞分化を促進することで OPLL の骨化に関与することが示唆された。新しいアイソフォームに結合する microRNA を *in silico* 予測したところ、骨芽細胞分化に関わる遺伝子をターゲットとする microRNA がいくつか見つかった。その中でも *MIR890* は、骨芽細胞分化に必須な転写因子である *RUNX2* をターゲットとすると予測された。*MIR890* と新しいアイソフォームおよび *RUNX2* の 3'-UTR は直接結合した。以上の結果から、新しいアイソフォームは *MIR890* と結合し、*MIR890* の *RUNX2* 抑制活性を調節する competing endogenous RNA としての機能を持つことが示唆された。

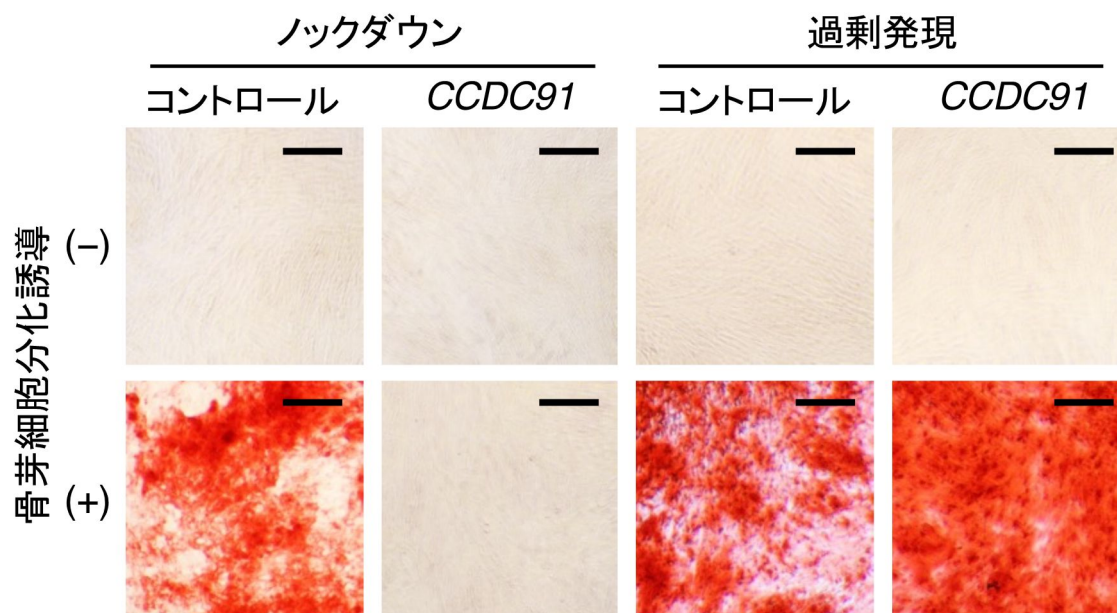


図1 *CCDC91* の新しいアイソフォームは、MSC の石灰化を促進する

CCDC91 の新しいアイソフォームのノックダウンまたは過剰発現が、MSC の骨芽細胞分化におけるミネラル化に及ぼす影響。アリザリンレッド染色。スケールバーの長さは 0.2 mm。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yonezawa Yoshiro, Guo Long, Kakinuma Hisaya, Otomo Nao, Yoshino Soichiro, Takeda Kazuki, Nakajima Masahiro, 他42名	4. 巻 38
2. 論文標題 Identification of a Functional Susceptibility Variant for Adolescent Idiopathic Scoliosis that Upregulates Early Growth Response 1 (EGR1) Mediated <scp> <i>UNCX</i></scp> Expression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 144 ~ 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4738	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 Koike Yoshinao, Takahata Masahiko, Nakajima Masahiro, 他48名	4. 巻 -
2. 論文標題 Genetic insights into ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 medRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.06.16.22276152	査読の有無 無
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 Nakajima Masahiro, Koido Masaru, Guo Long, Terao Chikashi, Ikegawa Shiro	4. 巻 110
2. 論文標題 A novel CCDC91 isoform associated with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine works as a non-coding RNA to regulate osteogenic genes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 638 ~ 647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2023.03.004	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 Jokoji Go, Maeda Shingo, Oishi Kazuki, Ijuin Toshiro, Nakajima Masahiro, Tawaratsumida Hiroki, Kawamura Ichiro, Tominaga Hiroyuki, Taketomi Eiji, Ikegawa Shiro, Taniguchi Noboru	4. 巻 297
2. 論文標題 CDC5L promotes early chondrocyte differentiation and proliferation by modulating pre-mRNA splicing of SOX9, COL2A1, and WEE1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100994 ~ 100994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100994	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 Otomo Nao et al.	4. 巻 36
2. 論文標題 Polygenic Risk Score of Adolescent Idiopathic Scoliosis for Potential Clinical Use	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1481 ~ 1491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jbmr.4324	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

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 城光寺豪, 前田真吾, 中島正宏, 河村一郎, 八尋雄平, 富永博之, 武富榮二, 池川志郎, 谷口昇
2. 発表標題 脊椎後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子CDC5Lは初期軟骨細胞分化を促進する
3. 学会等名 第35回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城光寺豪, 前田真吾, 中島正宏, 河村一郎, 八尋雄平, 富永博之, 武富榮二, 池川志郎, 谷口昇
2. 発表標題 脊椎後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子CDC5Lは骨芽細胞分化を抑制し、初期軟骨細胞分化を促進する
3. 学会等名 第33回 日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2021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
---------	---------