

Title	思春期特発性側弯症の進行予測モデルの確立
Sub Title	Predictive model for onset and progression of adolescent idiopathic scoliosis
Author	松本, 守雄(Matsumoto, Morio) 渡辺, 航太(Watanabe, Kota) 細金, 直文(Hosogane, Naobumi)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究は思春期特発性側弯症患者からDNAサンプルを収集し, 全ゲノム相関解析(genome wide association study, GWAS)を行い, 側弯の発症と重症化に関与する遺伝子を同定することを目的に行った。研究期間中に約3500名の思春期特発性側弯症患者のDNAサンプルを血液あるいは唾液から収集した。また全例X線を撮像した。GWASにより側弯症発症に関与する遺伝子を4つ, 進行に関与する遺伝子2つを同定した。</p> <p>This study was conducted to develop a predictive model for onset and progression of adolescent idiopathic scoliosis. During the study period, we collected approximately 3500 DNA samples. Using genome-wide association study, approximately 550 thousands of SNPs were investigated and we found 4 single nucleotide polymorphisms(SNP) that were related to the onset of scoliosis and 2 SNPs related to the progression of the curve. The 4 SNPs related to the onset of scoliosis were located closely to genes, LBX1, GPR 126, PAX1 and gene X. The 2 SNPs related to the progression of the curve were located closely to SOX9, KCNJ2, and Gene X. Using these genes, predictive models for the onset and progression of adolescent idiopathic scoliosis can be developed.</p>
Notes	<p>研究種目：基盤研究(B)</p> <p>研究期間：2012～2014</p> <p>課題番号：24390357</p> <p>研究分野：整形外科学</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24390357seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 2 7 年 5 月 2 8 日現在

機関番号： 3 2 6 1 2

研究種目： 基盤研究(B)

研究期間： 2012 ~ 2014

課題番号： 2 4 3 9 0 3 5 7

研究課題名 (和文) 思春期特発性側弯症の進行予測モデルの確立

研究課題名 (英文) Predictive Model for Onset and Progression of Adolescent Idiopathic Scoliosis

研究代表者

松本 守雄 (Matsumoto, Morio)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号： 4 0 2 0 9 6 5 6

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 14,000,000 円

研究成果の概要 (和文) : 本研究は思春期特発性側弯症患者からDNAサンプルを収集し、全ゲノム相関解析 (genome wide association study, GWAS) を行い、側弯の発症と重症化に關与する遺伝子を同定することを目的に行った。研究期間中に約3500名の思春期特発性側弯症患者のDNAサンプルを血液あるいは唾液から収集した。また全例X線を撮像した。GWASにより側弯症発症に關与する遺伝子を 4 つ、進行に關与する遺伝子 2 つを同定した。

研究成果の概要 (英文) : This study was conducted to develop a predictive model for onset and progression of adolescent idiopathic scoliosis. During the study period, we collected approximately 3500 DNA samples. Using genome-wide association study, approximately 550 thousands of SNPs were investigated and we found 4 single nucleotide polymorphisms (SNP) that were related to the onset of scoliosis and 2 SNPs related to the progression of the curve. The 4 SNPs related to the onset of scoliosis were located closely to genes, LBX1, GPR 126, PAX1 and gene X. The 2 SNPs related to the progression of the curve were located closely to SOX9, KCNJ2, and Gene X. Using these genes, predictive models for the onset and progression of adolescent idiopathic scoliosis can be developed.

研究分野： 整形外科学

キーワード： 特発性側弯症 遺伝子 進行予測

1. 研究開始当初の背景

思春期特発性側弯症は思春期児童の約2%の頻度で発症する疾患である。女性に多く発症する疾患であり、その発症・進行には遺伝的要因の関与が報告されているが、明らかな原因遺伝子の同定に至っていない。側弯症には進行性・非進行性の症例があり、進行性の症例では脊椎を広範囲に矯正固定する極めて侵襲の大きい手術を行わざるを得ない。したがって、進行性の側弯症例をより早期に同定し、より低侵襲の手術などで治療できれば患者への恩恵は多大である。

2. 研究の目的

日本人における思春期特発性側弯症の発症・進行に関与する遺伝子を明らかにし、遺伝子診断による進行予測モデルを開発し、側弯症の新たなオーダーメイド治療法の開発などに役立てることである。

発症・進行予測に基づくオーダーメイド医療



3. 研究の方法

10-18歳で思春期特発性側弯症と診断された患者を対象とした。対象の条件は1)立位全長X線写真でCobb角15度以上、2)先天性あるいは他疾患による側弯症ではないことが確認されたものとした。

本研究協力臨床施設でX線所見、臨床情報とともに唾液あるいは血液サンプルを採取し、DNAを抽出後、解析に用いた。

(1)発症の遺伝子の解析について、患者1033例、コントロール1473例を対象に全ゲノム相関解析(genome-wide association study: GWAS)を行い、約46万個の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)について遺伝子型を調べた。Genotypingはillumina human610k genotyping bead chipを用いた。これらのSNPについて、コクラン・アーミテージ法で相関解析を行った。ゲノムワイドの閾値、P値 $< 1.0 \times 10^{-8}$ を満たすSNPは1つあった。

さらに第二の遺伝子を同定するために、P値 $< 1.0 \times 10^{-8}$ を満たしていないものの、P値 $< 1.0 \times 10^{-5}$ を満たしたSNPについて、患者786例とコントロール24466例を用いてReplication Studyを行った。

1回目の解析の後に、さらに多くの遺伝子を同定するために、追加のGWASを行った。

サンプル数を1回目の約5倍にして、患者2109例、コントロール11140例で解析を行った。追加の解析は、illumina human omni express genotyping bead chipでGenotypingをおこなった。調べるSNPの数も増やすために、imputationを用いて、前回の約9倍となる、約400万個のSNPについて、相関を調べた。前回同様に、P値 $< 1.0 \times 10^{-5}$ を満たしたSNPについて、患者958例とコントロール3550例を用いてReplication Studyを行った。

さらに、アメリカで行われたGWASで発見されたSNPが、日本人でも相関が得られるか、replication studyを行って確認した。

(2)重症度に関する解析を行うために、まずは進行に関与する遺伝子の同定を目的として、海外の先行研究で同定されたSNPが日本人で再現されるか解析した。しかし、日本人で再現されるものがなかったため、サンプルを増やし、重症(コブ角40度以上)1105例と、軽症(成長が終了し、かつコブ角30度以下)832例でGWASを行った。P値 $< 1.0 \times 10^{-5}$ を満たしたSNPについて、重症323例と軽症283例を用いてReplication Studyを行った。重症例554例とコントロール1474例でGWASを行った。

いずれの解析も、ゲノムワイドの閾値、P値 $< 1.0 \times 10^{-8}$ を満たすSNPを有意なSNPとした。見つかったSNP、遺伝子について、in vivo、in vitroの機能解析を行った。SNPの影響を調べるために、SNP周囲の配列を組み込んだベクターを作成して、ルシフェラーゼアッセイを行った。次に、model animalとしてzebrafishを用いて、それぞれの遺伝子をknock-down、over-expressionし、phenotypeを観察した。

4. 研究成果

(1)発症に関与する遺伝子の解析:

ゲノムワイドの閾値を満たすSNP、rs11190870とrs6570507を発見した。rs11190870はLBX1遺伝子の下流にあるSNPである。LBX1は脊髄で高発現していた。

LBX1 expression in various human tissues by using RT-PCR



本SNPによる塩基変化がLBX1の脊髄での発現量に影響を及ぼすことで側弯症発症の一因になると推測された。rs11190870はその後の再現性解析で、白人と中国人でも相関を認めることが明らかとなった。

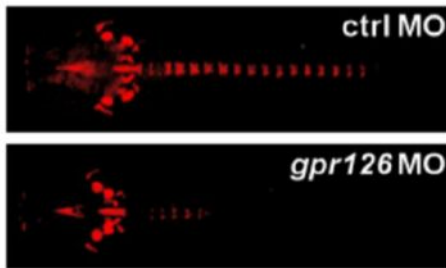
rs11190870の再現性

人種	対象数		リスク多型の頻度		P 値	オッズ比
	患者 vs 対照	患者群	対照群			
日本人	1,913 vs 13,145	0.670	0.562	2.90×10^{-30}	1.57	
中国人(香港)	300 vs 788	0.670	0.523	9.10×10^{-10}	1.85	
中国人(広州)	513 vs 440	0.620	0.490	1.17×10^{-8}	1.70	
中国人(南京)	949 vs 976	0.597	0.496	1.80×10^{-9}	1.51	

rs6570507 は GPR126 遺伝子内の intron に存在する SNP である。このことから、GPR126 の発現量に影響を及ぼしていると考えられる。GPR126 は軟骨で高発現していた。Zebrafish で GPR126 の knock-down を行ったところ、椎体の軟骨の骨化遅延とともに、体長の成長障害を認めた。

本遺伝子の解析から、軟骨の骨化障害が側弯症の発症の一因と考えられた。

また rs6570507 も中国人や白人や再現された。



Rs6570507

Population	Study	Risk allele frequency		P value	OR (95% CI)
		Case	Control		
Japanese	GWAS	0.491	0.422	1.37×10^{-6}	1.32 (1.18-1.48)
	Replication	0.483	0.430	3.02×10^{-5}	1.24 (1.12-1.37)
	Combined			2.25×10^{-10}	1.28 (1.18-1.38)
Chinese	Replication	0.391	0.345	3.36×10^{-3}	1.22 (1.06-1.39)
	Combined			3.90×10^{-12}	1.26 (1.18-1.35)
Caucasian	Replication	0.356	0.288	4.83×10^{-4}	1.37 (1.14-1.63)
	All combined			1.27×10^{-14}	1.27 (1.20-1.35)

追加 GWAS で、サンプル数を増やすことと、調べる SNP の数を増やすことで、さらに新規の SNP、疾患感受性遺伝子を同定した。本 SNP 周囲の配列を用いたルシフェラーゼアッセイを行うことで、この SNP は enhancer として作用することがわかった。本 SNP の存在で、当該遺伝子の発現が増え、神経や筋肉における本遺伝子の過剰発現が側弯症発症に関与していることが示唆された。実際に本遺伝子を zebrafish で過剰発現することで、zebrafish は側弯症をおこすことが分かった。さらに、本遺伝子は子宮・卵巣で高発現して

おり、側弯症の性差にかかわっている可能性がある。

さらに、アメリカで行われた思春期特発性側弯症の GWAS で rs6137473 が発見され、われわれのサンプルでも相関解析を行ったところ、相関の再現性が得られた。本 SNP は PAX1 遺伝子をコードしていた。同様に zebrafish で PAX1 遺伝子の knock-down を行ったところ、椎体の形成異常を認めた。

これまで、われわれは思春期特発性側弯症の発症に関与する 4 つの遺伝子を同定した。しかし、本疾患は多因子遺伝病であるため、さらに多くの疾患感受性遺伝子があるはずである。現在、サンプル数をさらに増やすこと、国際メタアナリシスを行うことで、新たな遺伝子の探索を行っている。

(2)重症度に関与する遺伝子の解析：

重症例とコントロールで GWAS を行うことで、重症側弯症に関与する SNP、rs12946942 を発見した。本 SNP は SOX9 の enhancer 領域に存在し、本 SNP の存在により、SOX9 の発現に変化が起こることが重症化に関与する可能性が示唆された。しかし、重症例と軽症例を比較することが真に進行に関与する遺伝子の同定には必要であるため、続いて重症例・軽症例の GWAS を行った。

進行に関与する遺伝子の解析：

アメリカの進行予測キットに使われている 53 個の SNP が日本人で再現されるか、解析を行ったが、1 つも再現されなかった。次に、より人種間の差が少ない中国人で進行に関与すると報告されている 5 個の SNP の再現性を調査した。しかし、いずれの SNP も日本人では再現されなかった。そこで、日本人の重症例と軽症例を用いた GWAS を行い、ゲノムワイドの閾値を満たす SNP を 1 つ同定した。これまでゲノムワイドの閾値、P 値 $< 1.0 \times 10^{-8}$ を満たす SNP は世界で 1 つも報告されていない。現在、他の人種で再現性が得られるか、解析が進行中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1) Swarkar Sharma, Douglas Londono, Walter Eckalbar, Xiaochong Gao, Dongping Zhang, Kristen Mauldin, Ikuyo Kou, Atsushi Takahashi, Morio Matsumoto, Nobuhiro Kamiya, Karl Murphy, Reuel Cornelia, John Herring, Dennis Burns, Nadav Ahituv, Shiro Ikegawa, Derek Gordon, Carol Wise A *PAX1* enhancer locus is associated with susceptibility to idiopathic scoliosis in females. *Nature Communications*(査読有り)6:6452, 2015 doi: 10.1038/ncomms7452

2) Londono D, Kou I, Johnson TA, Sharma S, Ogura Y, Tsunoda T, Takahashi A, Matsumoto M, Herring JA, Lam TP, Wang X, Tam EMS, Song

YQ, Fan YH, Chan D, Cheah KSE, Qiu X, Jiang H, Huang D, Japanese Scoliosis Clinical Research Group, TSRHC IS Clinical Group, the International Consortium for Scoliosis Genetics, Su P, Sham P, Cheung KMC, Luk KDK, Gordon D, Qiu Y, Cheng J, Tang N, Ikegawa S, Wise CA: A meta-analysis identifies adolescent idiopathic scoliosis association with LBX1 locus in multiple ethnic groups. *Journal of Medical Genetics* (査読有り) 51:401-406, 2014. doi: 10.1136/jmedgenet-2013-102067

3) Miyake A, Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Ogura Y, Dai J, Qiu X, Takahashi A, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Kubo M, Tsunoda T, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Qiu Y, Matsumoto M, Ikegawa S: Identification of a susceptibility locus for severe adolescent idiopathic scoliosis on chromosome 17q24.3. *PLoS One* (査読有り) 8: e72802, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0072802

4) Kou I, Takahashi Y, Johnson TA, Takahashi A, Guo L, Dai J, Qiu X, Sharma S, Takimoto A, Ogura Y, Jiang H, Yan H, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Hosono N, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Londono D, Gordon D, Herring JA, Watanabe K, Chiba K, Kamatani N, Jiang Q, Hiraki Y, Kubo M, Toyama Y, Tsunoda T, Wise CA, Qiu Y, Shukunami C, Matsumoto M, Ikegawa S: Genetic variants in GPR126 are associated with adolescent idiopathic scoliosis. *Nature Genetics* (査読有り) 45: 676-679, 2013 doi: 10.1038/ng.2639

5) Ogura Y, Takahashi Y, Kou I, Nakajima M, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Yonezawa I, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M, Ikegawa S. A replication study for association of 53 single nucleotide polymorphisms in a scoliosis prognostic test with progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese. *Spine (Phila Pa 1976)* (査読有り). 2013 Jul 15;38(16):1375-9. doi: 10.1097/BRS.0b013e3182947d21

6) Ogura Y, Takahashi Y, Kou I, Nakajima M, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Yonezawa I, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T,

Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Matsumoto M, Ikegawa S: A replication study for association of five single nucleotide polymorphisms with curve progression of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese patients. *Spine* 38 (査読有り): 571-575, 2013. doi: 10.1097/BRS.0b013e3182761535

〔学会発表〕(計 4 件)

1) Miyake A, Matsumoto M, Takahashi Y, Ogura Y, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Watanabe K, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Yonezawa I, Chiba K, Toyama Y, Ikegawa S: A genome-wide association study identified a novel susceptibility locus for severe adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis Research Society 49th Annual Meeting & Course* (2014. 9.10-13, Anchorage, USA)

2) Takahashi Y, Inaba I, Kono K, Kawakami N, Uno K, Ito M, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Yonezawa I, Ogura Y, Tsuji T, Suzuki T, Sudo H, Kotani T, Watanabe K, Toyama Y, Matsumoto M, Ikegawa S. rs11190870 is not associated with severity of adolescent idiopathic scoliosis in Japanese. *10th Meeting of the International Research Society of Spinal Deformities*. (2014.6.29-7.2, Sapporo, JAPAN)

3) Takahashi Y, Matsumoto M, Kono K, Kawakami N, Ito M, Uno K, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Watanabe K, Toyama Y, Ikegawa S: A genome-wide association study identifying a new susceptibility locus for adolescent idiopathic scoliosis. *50th Anniversary International Phillip Zorab Symposium* (2013. 6.20-21, London, UK)

4) Takahashi Y, Matsumoto M, Kono K, Kawakami N, Ito M, Uno K, Minami S, Yanagida H, Taneichi H, Watanabe K, Tsuji T, Sudo H, Suzuki T, Toyama Y, Ikegawa S: A genome-wide association study identified a new susceptibility locus for adolescent idiopathic scoliosis. *Scoliosis Research Society 47th Annual Meeting & Course* (2012. 9.5-8, Chicago, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

松本守雄 (MATSUMOTO MORIO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40209656

(2)研究分担者

渡辺航太 (WATANABE KOTA)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60317170

細金直文 (HOSOGANE NAOBUMI)

防衛医科大学校・病院整形外科・助教

研究者番号：10365306