

Title	脊柱側弯症の新規疾患感受性遺伝子UNCXのin vitro解析
Sub Title	Identification of a functional susceptibility variant for adolescent idiopathic scoliosis that upregulates EGRI-mediated UNCX expression
Author	渡邊, 航太(Watanabe, Kota)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2023
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2021. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>思春期特発性側弯症 (AIS)のGenome-wide association study (GWAS)により得られた、Chr.7p22.3の領域についてin vitro解析を行なった。この領域ではlinkage disequilibrium &gt;0.8の28個のAISに関連すると考えられるSNPを確認した。まずこれをin silico解析により、AISの発症と有意に関連するゲノム領域内のバリエーション3つに絞り込んだ。その3つのバリエーションが影響与えると考えられる同領域の遺伝子の発現への影響をCRISPR-dCas9-KRABの系にて調べた。これによりrs78148157周辺配列がUNCXの発現に影響を与えることが分かった。同バリエーションに対しEMSAにて、アレル間の結合の強さの差の解析、およびアレルに結合する転写因子の同定を行った。この解析により、rs78148157のAISリスクバリエーションを含む配列には、EGR1という転写因子が結合することが分かった。このAISリスクバリエーション周辺配列がUNCX遺伝子のプロモーター活性へ与える影響を神経系細胞であるA172を使用したレポーターアッセイにて解析し、AISリスクバリエーションはUNCX遺伝子の発現を上昇させることが判明した。(p=0.027) 更に、EGR1をこの系で共発現させると、UNCX遺伝子の発現量の差はリスクアレルとノンリスクアレルで更に増強した。このことから、AISのGWAS関連ゲノム領域のバリエーションが、転写因子EGR1を介してUNCXの発現を調整していることが明らかとなった。</p> <p>In vitro実験にて、AISのリスクバリエーションではUNCX遺伝子の発現量が上昇していることが期待されたため、In vivoの実験を計画した。ゼブラフィッシュ胚に対してUNCXの発現量が上昇するようにmRNAのマイクロインジェクションを行なった。するとUNCX mRNAを投与されたゼブラフィッシュでは、その投与量依存性に脊椎の奇形、体軸の曲がりを確認した。UNCXの発現上昇はゼブラフィッシュで体軸形成不全を生じた。</p> <p>In vitro analysis was performed on the region of Chr.7p22.3 obtained by the Genome-wide association study (GWAS) of idiopathic adolescent scoliosis (AIS). In this region, 28 SNPs with linkage disequilibrium &gt; 0.8 were candidates SNPs thought to be related to AIS pathogenicity. First, in silico analysis narrowed down the candidate variants into three variants in the genomic region. The effects of the three variants on the expression of genes in the region were investigated using the CRISPR-dCas9-KRAB system. This analysis revealed sequence around rs78148157 affects the UNCX expression. For the rs78148157, EMSA was used to analyze the difference in binding strength between alleles and identified transcription factors that bind to alleles. In this assay, a transcription factor EGR1 bind to the AIS risk variant of rs78148157. The effect of the AIS risk variant on the promoter activity of the UNCX gene was analyzed by a reporter assay using A172, which is a nervous tissue cell. The AIS risk variant increased the expression of the UNCX gene. (p = 0.027) Furthermore, when EGR1 was co-expressed in this system, the difference in the promoter activity of the UNCX gene was further enhanced between the risk allele and the non-risk allele. This revealed that a variant of the GWAS-related genomic region of AIS regulates UNCX expression via the transcription factor EGR1.</p> <p>In vivo experiment was performed using zebrafish embryo since the expression level of the UNCX thought to be increased in the AIS patient. Microinjection of UNCX mRNA was performed on zebrafish embryos so that the expression level of UNCX was increased. In the zebrafish with UNCX mRNA was administered, spinal malformation and body axis bending were confirmed in dose dependent manner. The increased expression of UNCX resulted body axis deformation in zebrafish.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210004">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2021000003-20210004</a>

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	准教授	補助額	300 (A) 千円
	氏名	渡邊 航太	氏名 (英語)	Kota Watanabe		
研究課題 (日本語)						
脊柱側弯症の新規疾患感受性遺伝子 UNCX の in vitro 解析						
研究課題 (英訳)						
Identification of a functional susceptibility variant for adolescent idiopathic scoliosis that upregulates EGR1-mediated UNCX expression						
1. 研究成果実績の概要						
<p>思春期特発性側弯症 (AIS)の Genome-wide association study (GWAS)により得られた、Chr.7p22.3 の領域について in vitro 解析を行った。この領域では linkage disequilibrium &gt; 0.8 の 28 個の AIS に関連すると考えられる SNP を確認した。まずこれを in silico 解析により、AIS の発症と有意に関連するゲノム領域内のバリエーション3つに絞り込んだ。その3つのバリエーションが影響を与えると考えられる同領域の遺伝子の発現への影響を CRISPR-dCas9-KRAB の系にて調べた。これにより rs78148157 周辺配列が UNCX の発現に影響を与えることが分かった。同バリエーションに対し EMSA にて、アレルの間の結合の強さの差の解析、およびアレルに結合する転写因子の同定を行った。この解析により、rs7814815 の AIS リスクバリエーションを含む配列には、EGR1 という転写因子が結合することが分かった。この AIS リスクバリエーション周辺配列が UNCX 遺伝子のプロモーター活性へ与える影響を神経系細胞である A172 を使用したレポーターアッセイにて解析し、AIS リスクバリエーションは UNCX 遺伝子の発現を上昇させることが判明した。(p=0.027) 更に、EGR1 をこの系で共発現させると、UNCX 遺伝子の発現量の差はリスクアレルとノンリスクアレルで更に増強した。このことから、AIS の GWAS 関連ゲノム領域のバリエーションが、転写因子 EGR1 を介して UNCX の発現を調整していることが明らかとなった。</p> <p>In vitro 実験にて、AIS のリスクバリエーションでは UNCX 遺伝子の発現量が上昇していることが期待されたため、In vivo の実験を計画した。ゼブラフィッシュ胚に対して UNCX の発現量が上昇するように mRNA のマイクロインジェクションを行った。すると UNCX mRNA を投与されたゼブラフィッシュでは、その投与量依存性に脊椎の奇形、体軸の曲がりを確認した。UNCX の発現上昇はゼブラフィッシュで体軸形成不全を生じた。</p>						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
<p>In vitro analysis was performed on the region of Chr.7p22.3 obtained by the Genome-wide association study (GWAS) of idiopathic adolescent scoliosis (AIS). In this region, 28 SNPs with linkage disequilibrium &gt; 0.8 were candidate SNPs thought to be related to AIS pathogenicity. First, in silico analysis narrowed down the candidate variants into three variants in the genomic region. The effects of the three variants on the expression of genes in the region were investigated using the CRISPR-dCas9-KRAB system. This analysis revealed sequence around rs78148157 affects the UNCX expression. For the rs78148157, EMSA was used to analyze the difference in binding strength between alleles and identified transcription factors that bind to alleles. In this assay, a transcription factor EGR1 bind to the AIS risk variant of rs7814815. The effect of the AIS risk variant on the promoter activity of the UNCX gene was analyzed by a reporter assay using A172, which is a nervous tissue cell. The AIS risk variant increased the expression of the UNCX gene. (p = 0.027) Furthermore, when EGR1 was co-expressed in this system, the difference in the promoter activity of the UNCX gene was further enhanced between the risk allele and the non-risk allele. This revealed that a variant of the GWAS-related genomic region of AIS regulates UNCX expression via the transcription factor EGR1.</p> <p>In vivo experiment was performed using zebrafish embryo since the expression level of the UNCX thought be increased in the AIS patient. Microinjection of UNCX mRNA was performed on zebrafish embryos so that the expression level of UNCX was increased. In the zebrafish with UNCX mRNA was administered, spinal malformation and body axis bending were confirmed in dose dependent manner. The increased expression of UNCX resulted body axis deformation in zebrafish.</p>						
3. 本研究課題に関する発表						
発表者氏名 (著者・講演者)	発表課題名 (著書名・演題)	発表学術誌名 (著書発行所・講演学会)	学術誌発行年月 (著書発行年月・講演年月)			
米澤嘉朗	思春期特発性側弯症の GWAS より同定したリスクバリエーションが与える UNCX 遺伝子の発現 上昇について	第 55 回 日本側弯症学会	2021 年 11 月 5 日			