

池川 志郎**

[整形外科 69 巻 6 号 : 502~508, 2018]

■ はじめに

後縦靱帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine : OPLL) は、脊椎の後縦靱帯の異所性骨化によって起こる疾患である。Common disease (頻度が高い疾患) で、日本人の有病率は 2~4% である。病因からみると、一次性 (特発性) と二次性 (症候性) に大別される¹⁾。低リン酸血症性くる病/骨軟化症などの単一遺伝子病 (monogenic disease) や、副甲状腺機能低下症や末端肥大症などの内分泌異常症には高頻度に OPLL が合併する。しかし、ほとんどの OPLL は、原因不明の特発性 OPLL である。

特発性 OPLL には遺伝的要因があることが知られている^{1,2)}。過去の疫学研究などから、特発性 OPLL は、複数の遺伝因子と環境因子の総合的な効果で発症する多因子遺伝病であると考えられている。遺伝因子は、複数の (多くの場合、100 以上の) 疾患感受性遺伝子によって規定される。

筆者の研究室では、ゲノム解析による特発性 OPLL の病因の解明を進めている。全ゲノム相関解析 (genome-wide association study : GWAS) を出発点に、疾患感受性遺伝子を発見し、そこから OPLL の病因・病態に切り込もうと考えている³⁾。OPLL では、発生部位によって遺伝的要因が異なると考えられるが、本稿では頸椎の OPLL の GWAS 研究について述べる。

I. OPLL の GWAS

GWAS の成功は患者サンプルの収集にかかっている。

サンプルの質と量の確保、すなわち、いかに「正しい診断、確かな臨床情報のついた症例をたくさん集めるか」が研究における最大の関門である。2011 年より、厚生労働省の難病研究班「脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班」(戸山芳昭班長)のもとに、慶應義塾大学整形外科の松本守雄准教授 (現慶應義塾大学整形外科教授)、辻崇准教授 (現藤田保健衛生大学整形外科准教授) を中心とする日本の脊椎外科医が、「All Japan」体制で GWAS のための頸椎 OPLL 患者の検体収集を開始した。1,500 例以上の患者 DNA が、臨床情報、X 線情報とともに収集された。このうちの 1,112 例について、筆者の研究室で、ゲノム全体をカバーする約 61 万個の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism : SNP) の遺伝子型を決定した。この OPLL 患者集団のゲノムデータとバイオバンク Japan (久保充明プロジェクトリーダー) の協力により得られた非患者 (対照)、6,810 例のデータを用いて、OPLL の発症と相関する SNP を探索した³⁾。その結果、全ゲノムレベルでの強い相関 ($p=5 \times 10^{-8}$) および、それに準ずるレベルでの相関 ($p=5 \times 10^{-7}$) を示す SNP をもつゲノムの領域を計 8 か所、発見した (図 1a)。

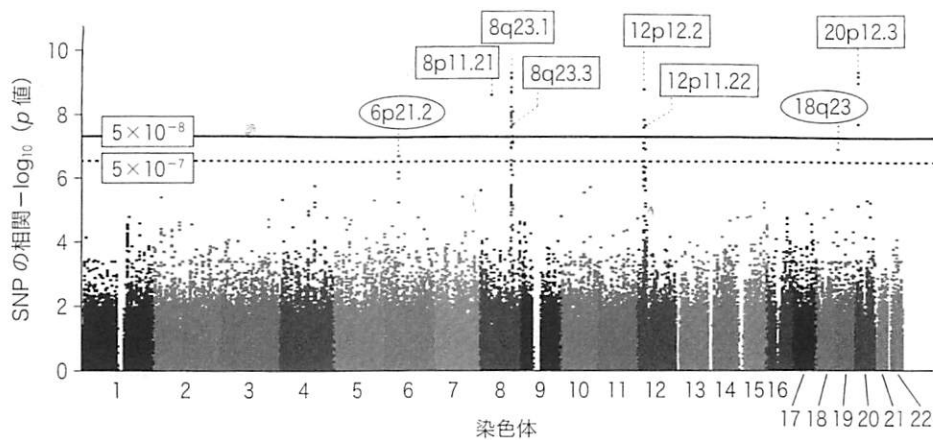
次に、上記とは別の日本人の OPLL 患者 548 例と 6,469 例の非患者の集団を用いて、GWAS で強い相関を示した SNP の相関の再現性を確認した。その結果、6 つのゲノム領域 (6p21.2, 8q23.1, 8q23.3, 12p11.22, 12p12.2, 20p12.3) が OPLL の発症と強く相関することが明らかになった。このうちの一つの 20p12.3 領域は、先に罹患同胞対法を用いた全ゲノム連鎖解析で発見されていた OPLL 連鎖領域⁴⁾と重複していた。

Key words : OPLL, genome analysis, GWAS, susceptibility gene, SNP

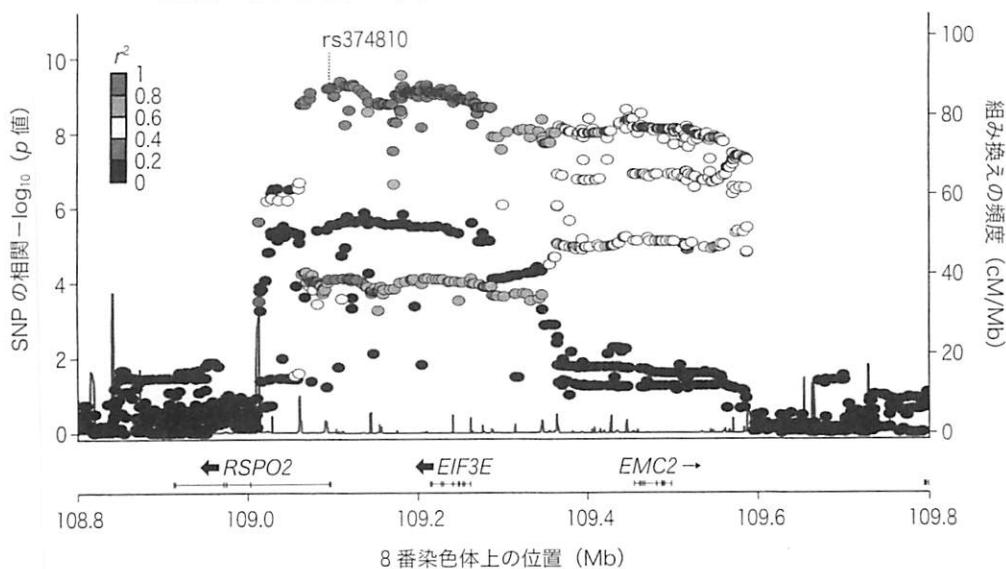
* Genome-wide association study (GWAS) of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL)

** S. Ikegawa (チームリーダー) : 理化学研究所生命医科学研究センター骨関節疾患研究チーム (Laboratory for Bone and Joint Diseases, RIKEN Center for Integrative Medical Sciences).

[利益相反 : あり。本研究に関する費用の一部は日本医療研究開発機構研究費によった。]



a. 頸椎 OPLL の GWAS の結果。横軸は染色体上の SNP の位置、縦軸は各 SNP の相関の強さを表す。全ゲノムレベルでの強い相関 ($p=5 \times 10^{-8}$: 実線, 囲み文字) を示す SNP をもつゲノムの領域を 6 カ所、それに準ずるレベルでの相関 ($p=5 \times 10^{-7}$: 点線, 丸囲み文字) を示す SNP をもつ領域を 2 カ所、発見した。



b. 8q23.1 の OPLL 相関領域。RSPO2, EIF3E, EMC2 の三つの遺伝子が存在する。遺伝子名の横の矢印は、遺伝子の向きを表す。

図 1. 相関解析

II. GWAS から遺伝子へ— 疾患感受性遺伝子の検索

前記の厚生労働省の難病研究班（戸山班）のゲノム研究は、日本医療研究開発機構（AMED）難治性疾患実用化研究事業の「後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究班」（慶應義塾大学整形外科・松本守雄班長）に引き継がれた。目下、班をあげて、GWAS により発見された遺伝子座からの疾患感受性遺伝子の同定に取り組んでいる。

Hypothesis-free の研究である GWAS は、しばしば思

いがけない疾患遺伝子を呈示する。6つの OPLL 遺伝子座内に存在する遺伝子は、ほとんどが OPLL や骨・軟骨代謝、異性骨化との関係が不明なものであった。そこで、まず遺伝子座内に存在する計63個の遺伝子すべてについて、トランスクリプトームのデータベースを参照し、線維芽細胞と骨芽細胞、骨化靭帯細胞と非骨化靭帯細胞で発現が異なる遺伝子を抽出し、発現差の有無を実験的に確かめた³⁾。また、間葉系幹細胞や試験管内で軟骨細胞の分化を再現できるモデルである ATDC5 細胞⁵⁾を用いて、軟骨分化に伴って発現が変化する遺伝子を探索した。その結果、いくつかの候補遺伝子が見つかった。

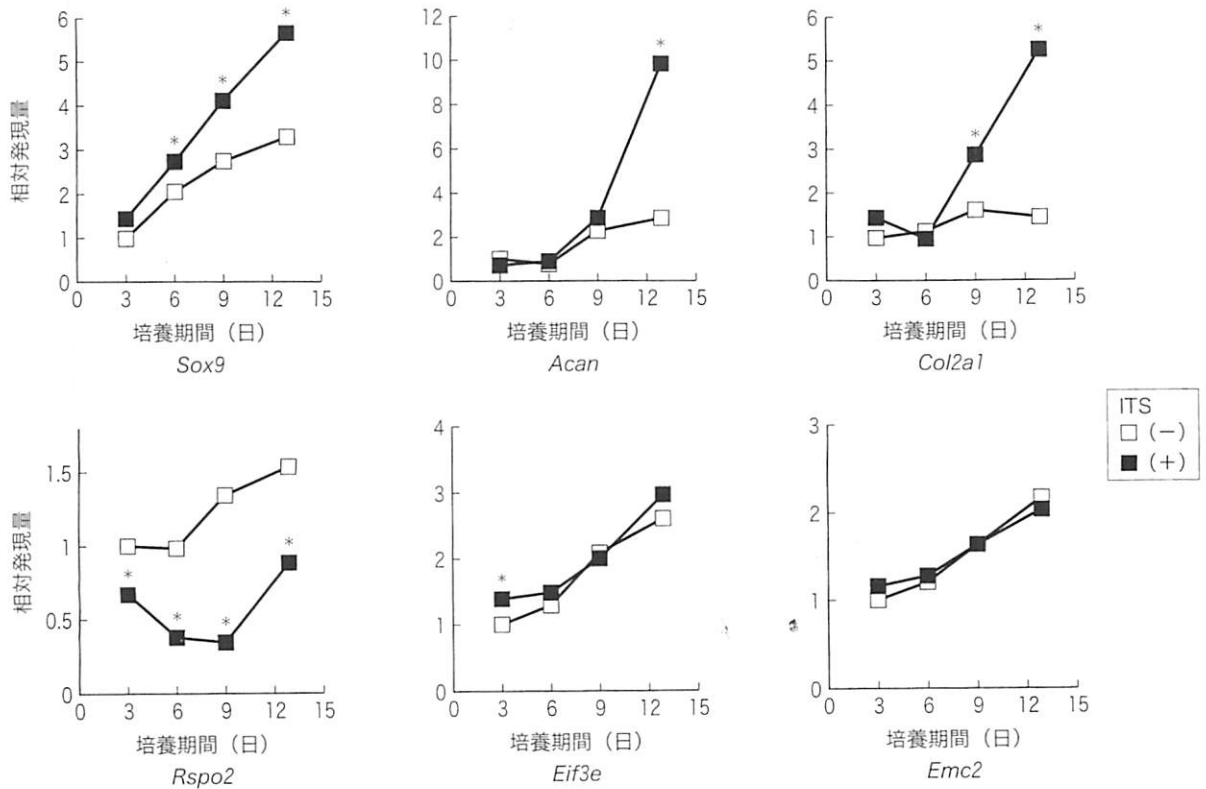


図 2. 8q23.1 の OPLL 候補遺伝子の発現. 軟骨細胞分化モデル ATDC5 細胞での軟骨初期分化過程における軟骨細胞の分化マーカー遺伝子 (上段: *Sox9*, *Acan*, *Col2a1*) と疾患感受性遺伝子の候補遺伝子 (下段: *Rspo2*, *Eif3e*, *Emc2*) の発現プロファイル. 相対発現量: 軟骨分化誘導開始後 3 日での, 未誘導 (白) での発現量に対する相対的遺伝子発現量. ITS: ATDC5 細胞の軟骨分化誘導剤. インスリン (I), トランスフェリン (T), セレン (S). *: 分化誘導の有無により, 有意な発現の差があった日. 軟骨初期分化過程で, *RSPO2* の発現は低下したが, ほかの二つには遺伝子の発現の変化はなかった (文献 5 より引用改変).

そのなかの一つが 8q23.1 の *RSPO2* (R-spondin 2) であった³⁾.

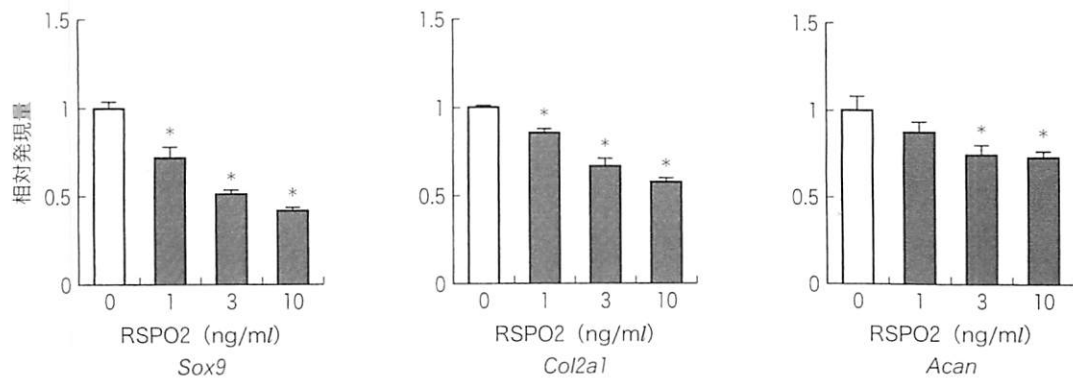
III. *RSPO2* の発見

8q23.1 の領域から疾患感受性 SNP の候補を絞り込み, SNP が発現量に影響を及ぼす可能性のある遺伝子を推定した. その結果, *RSPO2*, *EIF3E*, *EMC2* の三つが疾患感受性遺伝子の候補にあがった (図 1b)⁶⁾. *RSPO2* は, 靭帯, 軟骨, 骨に特異的に発現しており, OPLL の骨化メカニズムとして考えられている内軟骨性骨化の軟骨初期分化過程において発現が低下していた (図 2). 一方, *EIF3E*, *EMC2* には内軟骨性骨化における発現変化はなかった.

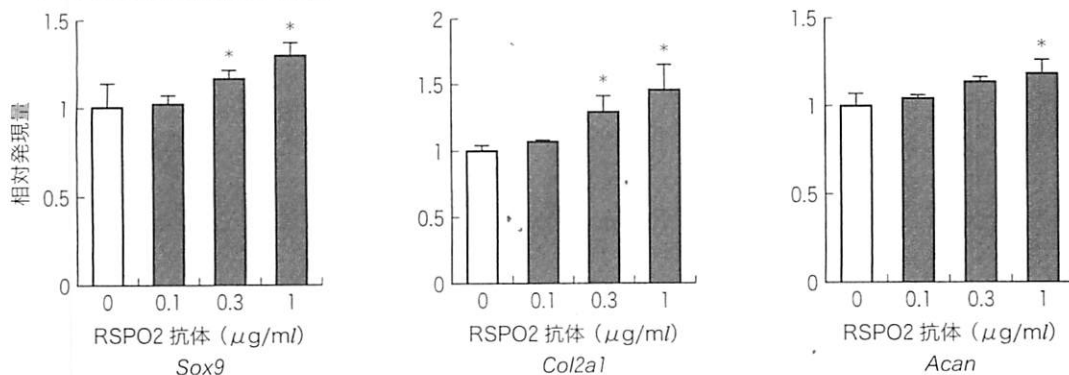
そこで, ATDC5 細胞を用いて, *RSPO2* の軟骨初期分化における機能を調べた. ATDC5 細胞が軟骨細胞に分化する条件で *RSPO2* 蛋白を加えて培養すると, *RSPO2* は *Sox9*, *Acan*, *Col2a1* など軟骨細胞の分化マーカー遺

伝子の発現を抑制した (図 3a). また, *Rspo2* 遺伝子の過剰発現でも, 軟骨細胞分化は抑制された. 逆に, *RSPO2* の働きを抑制する中和抗体を加えて培養すると, 軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現は亢進した (図 3b). siRNA による遺伝子ノックダウンでも, 軟骨細胞分化は促進された. これらの結果から, *RSPO2* は内軟骨性骨化の抑制因子であることがわかった⁶⁾.

次に, *RSPO2* の軟骨細胞分化の抑制メカニズムを調べた. *RSPO2* は, R-スポンジン (R-spondin) ファミリーに属する細胞外分泌蛋白で, WNT の co-activator として働き, Wnt/ β カテニンシグナルを増強する⁷⁻⁹⁾ (図 4a). 骨・軟骨では, 骨芽細胞の形成, 石灰化の促進, 軟骨形成の抑制などの機能が知られている^{10,11)}. β カテニン阻害剤の IWR-1 で, Wnt/ β カテニンシグナルを阻害すると *RSPO2* による軟骨分化が回復する (図 4b) ことから, *RSPO2* は Wnt/ β カテニンシグナルの活性化を介して, 間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化を抑制すると考えら



a. 組み換え RSPO2 蛋白の添加. RSPO2 は Sox9, Acan, Col2a1 など軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現を濃度依存的に抑制



b. RSPO2 中和抗体の添加. 軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現は亢進

図 3. ATDC5 細胞を用いた軟骨初期分化における RSPO2 の機能解析. * $p < 0.05$ (文献 5 より引用 改変)

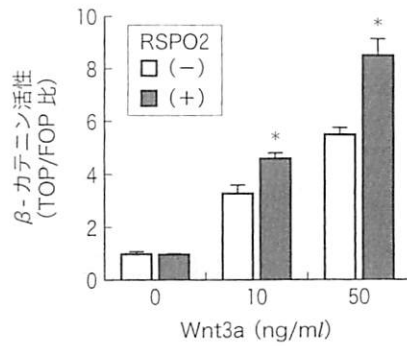
れた。

OPLL と関連する 8q23.1 領域の疾患感受性 SNP の候補 SNP の一つである rs374810 は、RSPO2 の遺伝子発現を制御しているプロモーター領域に存在した。In silico でのゲノム配列の解析の結果、この SNP を含むゲノム配列には C/EBPβ (CCAAT-enhancer-binding protein β) という転写因子が結合し、OPLL に罹りやすいタイプの SNP (リスク SNP) では C/EBPβ の結合が弱くなることが予測された。EMSA (electrophoretic mobility assay) によって、この予測が確かめられた。また、ルシフェラーゼアッセイにより、rs374810 を含むゲノム配列のプロモーター活性を調べると、リスク SNP をもつプロモーターでは、C/EBPβ を共発現させたときのプロモーター活性が低いことがわかった (図 5)。以上より、リスク SNP は C/EBPβ との結合が弱く、そのためプロモーター活性が低下し、RSPO2 の発現量が低下することが推測された。実際、ヒト由来の培養線維芽細胞で、この SNP と RSPO2 の発現量の関係調べてみると、SNP の

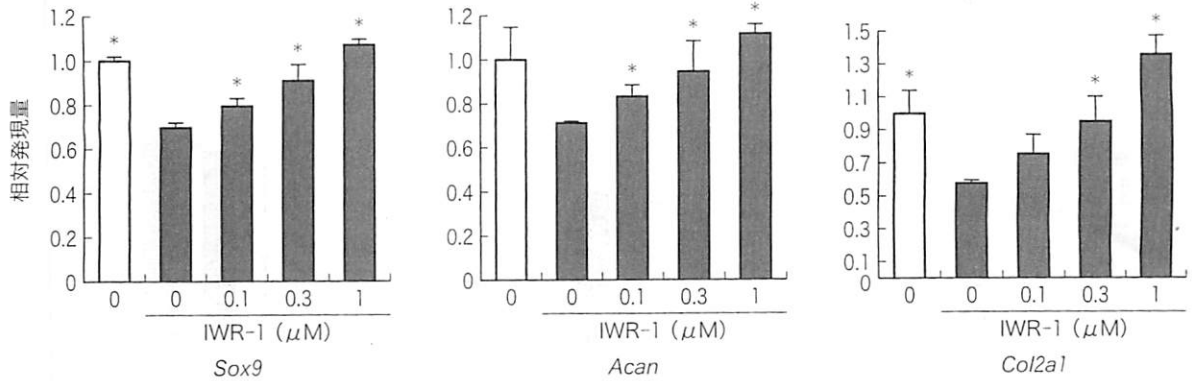
遺伝子型と RSPO2 発現量は強く相関し、リスク SNP をもつ人では RSPO2 の発現量が低下していた。RSPO2 発現量が低下した結果、Wnt/β カテニンシグナルによる間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化の抑制が弱まり、脊柱靭帯内の間葉系幹細胞が、靭帯細胞ではなく軟骨細胞へと分化し、内軟骨骨化を起こすことで、OPLL を発症すると考えられる (図 6)。

■ おわりに

GWAS で発見した遺伝子座の一つから、疾患感受性遺伝子 RSPO2 を発見し、それが関係する OPLL の分子病態の一端を明らかにした。しかし、現在発見されている 6 つの遺伝子座では、OPLL の遺伝性を十分に説明することはできない。OPLL 解明のためには、さらなる遺伝子・遺伝子座の発見が必要である。そのためには、サンプル数を増やし、相関解析のパワーを増加させるとともに、臨床データからの知見をもとにさまざまな層別化解析を行い、さらなる相関を発見するなど、多層的な解析



a. RSPO2 蛋白は Wnt/ β カテニンシグナルを亢進させる. * $p < 0.05$ (RSPO2 添加, 非添加間での比較)



b. IWR-1 により, 軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現低下は濃度依存性に回復する. * $p < 0.05$ [RSPO2 添加 (黒), IWR-1 非添加の場合との比較]

図 4. RSPO2 と Wnt/ β カテニンシグナル. RSPO2 添加 (黒), 非添加 (白) での, Wnt/ β カテニンシグナルへの Wnt3a の影響 (a) と, β カテニン阻害剤 (IWR-1) による軟骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現の変化 (b) (文献 5 より引用改変)

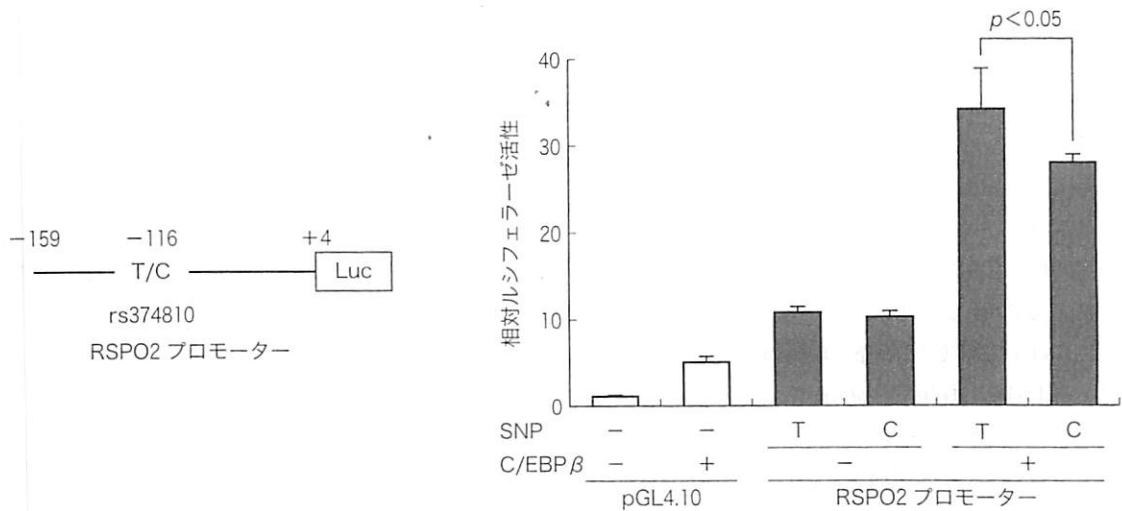


図 5. RSPO2 プロモーター (-159~+4) の転写活性に対する C/EBP β と rs374810 の影響. rs374810 を含むゲノム配列のプロモーター活性 (ルシフェラーゼアッセイによる). pGL4.74: コントロールベクター. リスク SNP (C) をもつプロモーターでは, C/EBP β を共発現させたときのプロモーター活性が低い (文献 5 より引用改変).

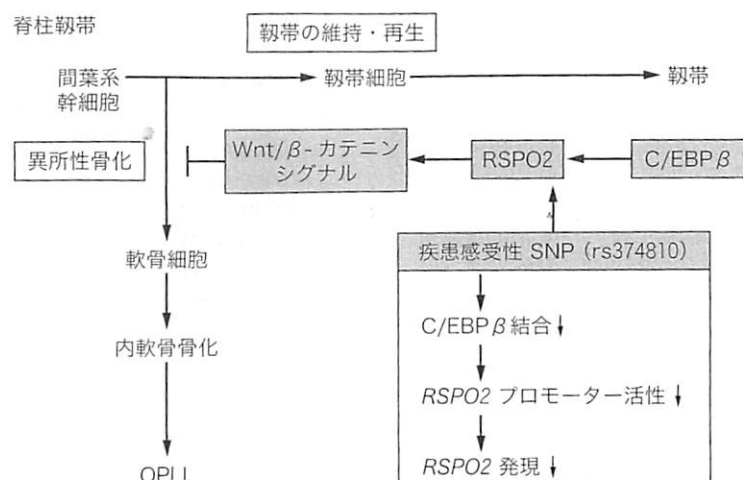


図 6. *RSPO2* を中心とする OPLL の病態モデル. *RSPO2* の発現は、転写因子 C/EBP β により正に制御されている. *RSPO2* は Wnt/ β カテニンシグナルを正に制御する. Wnt/ β カテニンシグナルは、靱帯の間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化を負に制御している. 疾患感受性遺伝 SNP, rs374810 のリスク SNP は C/EBP β との結合が弱く、そのため *RSPO2* のプロモーター活性が低下し、*RSPO2* の発現量が減少し、Wnt/ β カテニンシグナルが低下する. 椎状靱帯内の間葉系幹細胞が、靱帯細胞へと分化し、靱帯組織を維持、再生させる. Wnt/ β カテニンシグナルが低下すると、間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化の抑制が弱まり、靱帯内の間葉系幹細胞が、靱帯細胞ではなく軟骨細胞へと分化し、内軟骨骨化を起こすことで OPLL を発症する.

が必要である. これは、日本のみでは進まない. 大規模な国際共同研究が必要である. 国際共同研究による数万、数十万のサンプルを用いた大規模 GWAS による網羅的な関連遺伝子多型の同定と、それに続く、ビッグデータ解析による病因、病態の解明、創薬ターゲットへのアプローチが、目下のゲノム医学研究の主流である. 多くの common disease でその成功例が報告されている. たとえば、関節リウマチにおいては、日本のグループを中心とする国際共同研究により、それが可能になっている¹²⁾. しかし、OPLL では、そのようなアプローチを可能にする研究基盤がない. まずは比較的 OPLL 研究が進んでいる東アジアを手始めに、国際共同研究体制を確立することが今後の課題である.

本論文の作成、および本論文で取り上げた GWAS 研究については、平成 29 年度日本医療研究開発機構研究費 (難治性疾患実用化研究事業) 研究「後縦靱帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究」(班長 慶應義塾大学整形外科 松本守雄教授)、全国椎状靱帯骨化症患者家族連絡協議会 (増田靖子会長) の支援を受けた.

文献

- 1) Ikegawa S : Genomic study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **90** : 405-412, 2014
- 2) Okawa A, Nakamura I, Goto S et al : Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Nat Genet **19** : 271-273, 1998
- 3) Nakajima M, Takahashi A, Tsuji T et al : A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Nat Genet **46** : 1012-1016, 2014
- 4) Karasugi T, Nakajima M, Ikari K et al : A genome-wide sib-pair linkage analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. J Bone Miner Metab **31** : 136-143, 2013
- 5) Shukunami C, Shigeno C, Atsumi T et al : Chondrogenic differentiation of clonal mouse embryonic cell line ATDC5 in vitro : differentiation-dependent gene expression of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor. J Cell Biol **133** : 457-468, 1996
- 6) Nakajima M, Kou I, Ohashi H et al : Identification and functional characterization of *RSPO2* as a susceptibility gene for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Am J Hum Genet **99** : 202-207, 2016
- 7) de Lau W, Barker N, Low TY et al : *Lgr5* homologues

associate with Wnt receptors and mediate R-spondin signalling. *Nature* **476** : 293-297, 2011

- 8) Kazanskaya O, Glinka A, del Barco Barrantes I et al : R-Spondin2 is a secreted activator of Wnt/beta-catenin signaling and is required for *Xenopus* myogenesis. *Dev Cell* **7** : 525-534, 2004
- 9) Kim KA, Wagle M, Tran K et al : R-Spondin family members regulate the Wnt pathway by a common mechanism. *Mol Biol Cell* **19** : 2588-2596, 2008
- 10) Abed E, Chan TF, Delalandre A et al : R-spondins are

newly recognized players in osteoarthritis that regulate Wnt signaling in osteoblasts. *Arthritis Rheum* **63** : 3865-3875, 2011

- 11) Han XH, Jin YR, Seto M et al : A WNT/beta-catenin signaling activator, R-spondin, plays positive regulatory roles during skeletal myogenesis. *J Biol Chem* **286** : 10649-10659, 2011
- 12) Okada Y, Wu D, Trynka G et al : Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature* **506** : 376-381, 2014

*

*

*



脊椎脊髄外科専門医試験問題集

NANKODO 南江堂

●監修 日本脊椎脊髄病学会・日本脊髄外科学会 ●編集 脊椎脊髄外科専門医試験問題作成委員会

■B5判・122頁 2017.4.
ISBN978-4-524-25856-7
定価 (本体 5,500円+税)

日本脊椎脊髄病学会・日本脊髄外科学会が共同で整備を進めている、新しい「脊椎脊髄外科専門医制度」のための試験問題集。脳神経外科・整形外科領域の subspecialty である同専門医制度の始動に先駆けて刊行。専門医取得ならびに既存の指導医・認定医資格更新をめざす医師に必須の一冊。専門医試験受験申込票付き。