

長寿医療研究開発費 平成30年度 総括研究報告

脊柱管狭窄症の個別化医療基盤の形成（30-2）

主任研究者 渡辺 研 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部（室長）

研究要旨

腰部脊柱管狭窄症は狭窄要因による Sakai 分類をはじめ、いくつかの病型に分類される症候群であり、その病因も様々であると考えられる。しかしながら、本症の治療には、短期的効果や疼痛緩和の対症療法と、手術による狭窄圧の除去など、エビデンスに支持される治療法の選択肢は非常に限られている。本年度は本症の個別化医療基盤の形成の一環として、ゲノム医療シーズの開発と臨床パラメータとの相関についての検討を行った。

主任研究者

渡辺 研 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部（室長）

分担研究者

酒井義人 国立長寿医療研究センター 整形外科部（部長）

細山 徹 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部（室長）

重水大智 国立長寿医療研究センター 臨床ゲノム解析推進部（ユニット長）

A. 研究目的

腰部脊柱管狭窄症は、臀部から下肢の疼痛やしびれを伴い、その約 90%に歩行障害が認められる運動器疾患である。本症は高齢者に好発し、年々増加傾向にあり、わが国の患者数は 300～600 万人に上ると推定されている。また、疼痛を伴う歩行障害は、高齢者の ADL を低下させるだけでなく社会参加を阻み、QOL の低下とさらには精神的な障害をも招き、介護予防の大きな課題となっている。しかしながら、本症の治療には、短期的効果や疼痛緩和の対症療法と、手術による狭窄圧の除去など、エビデンスに支持される治療法の選択肢は非常に限られている。その上で、新規診断・治療法の開発に資する病態の基礎的な情報が乏しい状況である。本研究の目的は、本症が症候群という位置付けから、ゲノム情報をはじめとした患者個々の特性や臨床情報をもとに層別化・個別化した医療を目指すことにおいて、1) ゲノム医療シーズならびに病態解明の礎となる遺伝要因の同定、2) 鞠

帯性狭窄の原因とされる黄色靭帯変性肥厚の分子メカニズムの解明と新規治療法の開発、
3) サルコペニア等加齢に伴う変化と脊柱管狭窄症等の腰椎疾患における臨床的意義の検証
を各サブテーマの目的とする。

B. 研究方法

脊柱管狭窄症が家族内集積症例のゲノム解析：倫理・利益相反委員会の承認、ならびに参加者の同意のもと、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターに来院・通院されている方を発端者として、家族内協力者を得た。発端者ならびに協力者にはバイオバンク登録にも同意いただき、バイオバンクから試料提供をうけて全ゲノム解析、全エクソーム解析を行った。多型・変異の抽出には、Ingenuity Variant Analysis もしくは、重水らの構築したパイプラインを用いた。in vitro での検証実験では、抽出遺伝子の野生型ならびにゲノム解析で抽出した変異体を用い、レポーター遺伝子アッセイを用い、シグナリングについて検討した。モデルマウスの作出には CRISPR/Cas9 法を用い、変異を導入したオリゴ DNA、標的配列を含む gRNA、Cas9 タンパク質をマウス受精卵に注入し、得られた産仔よ gDNA を抽出、サンガー法により編集を確認した。

成因・進行に関与する老化関連因子に関する研究：酒井らが構築している腰部脊柱管狭窄症データベースを用い、各種パラメータについて多変量解析を行い、黄色靭帯肥厚と各種パラメータの検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」ならびに「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター倫理・利益相反委員会の承認を得て、個人情報の保護を徹底し行われた。また動物実験は、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターの動物実験指針等に則り、動物実験倫理委員会の承認を得て、動物愛護上の配慮に留意して行った。

C. 研究結果

腰部脊柱管狭窄症は、国内の推定患者数が数百万人にのぼるとされており、いわゆる Common Disease との認識があるが、最近の twin study による遺伝関与の解析では 66.9%という相当な遺伝率 (hereditary index) を示すことが報告されている。しかしながら、先天性広範脊柱管狭窄症以外では、ゲノム解析がなされた例はほとんどない。そこで、倫理・利益相反委員会の承認、ならびに参加者の同意のもと、国立研究開発法人国立

長寿医療研究センターに来院・通院されている方を発端者として、家族内協力者を得た。発端者ならびに協力者にはバイオバンク登録にも同意いただき、バイオバンクから試料提供をうけて全ゲノム解析を行った。バリエーションフィルタリングの結果、家系内の罹患に相関し、公開ゲノム DB に登録されていないもの、もしくは **minor allele frequency** が 1% 未満のレアバリエーションを抽出し、そのうち、コードするタンパク質に機能異常が推測されるもので、タンパク質機能への有害性が上位 0.1%に入る、**Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)**スコア > 30 のものを抽出した。最も CADD スコアが高く、酵素の機能に重要なモチーフ内で生物種・分子ファミリー間を問わず高度に保存されているアミノ酸の置換を伴うバリエーションを見出した。既存の公開ゲノム DB においては検出されず、新規のバリエーションと考えられた。Sanger 法で確認後、同置換を伴った遺伝子と野生型遺伝子を発現させ、酵素活性の生化学的解析、ならびに luciferase assay などの *in vitro* の機能解析を行ったところ、その機能を完全に失っている機能喪失型変異であることがわかった。また、東北大学との共同研究でバリエーションをもつタンパク質の動力学シミュレーションを行ったところ、バリエーションによる 1 アミノ酸置換で活性領域に顕著な差異を生じており、構造生物学的にも支持された。そこで、ゲノム編集法をもちい、マウスにおいてヒトと高い相同性を有すオーソログに同じ点変異を導入し、変異マウスを作出した。現在、その表現型の解析を進めている。

腰部脊柱管狭窄症データベースを用いた研究では、457 例（平均年齢 75.3±7.2 歳、41-91 歳、男性 233 例、女性 224 例）の解析で、黄色靭帯肥厚とインスリン抵抗性について有意な関連が指摘し得た。この解析については、動脈硬化の指標である ABI や TBI といった因子と黄色靭帯肥厚との関連は認められなかったことから、腰椎における黄色靭帯肥厚が動脈硬化に至る以前に既に始まっていることを示唆するものである。そこで、トランスクリプトームを元にパスウェイ解析を行ったところ、サーチュインパスウェイが最上位に抽出され ($p = 7.45 \times 10^{-4}$)、この経路の低下がインスリン抵抗性と黄色靭帯肥厚に関与している可能性が示された。これらの因果関係に関して検証する動物モデルなどを検討中である。また 127 例（手術治療 71 例、保存治療 56 例、男性 79 例、女性 48 例、平均 73.0±7.2 歳、37-92 歳）におけるビタミン D (25 OH) との関連についての解析では、25-OH ビタミン D 値と黄色靭帯/脊柱管面積比は有意な負の相関を示した。ビタミン D には靭帯組織におけるサイトカインを介した炎症の軽減作用があることが近年報告されており、我々の過去の解析による黄色靭帯変性過程での慢性炎症の介在から、ビタミン D 欠乏の関与と治療への期待が示唆された。

D. 考察と結論

腰部脊柱管狭窄症の家族内集積例のゲノム解析により、同症の発症と関連するレアバリエントを抽出した。黄色靭帯肥厚とインスリン抵抗性ならびに血中 25-OH ビタミン D 値に相関を見出し、黄色靭帯肥厚に対するメカニズムの解析を開始した。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murasawa Y, Nakamura H, Watanabe K, Kanoh H, Koyama E, Fujii S, Kimata K, Zako M, Yoneda M, Isogai Z. The versican G1 fragment and serum-derived hyaluronan-associated proteins interact and form a complex in granulation tissue of pressure ulcers. *Am. J. Pathol.* 188, 432-449, 2018.
- 2) Nomoto K, Itaya Y, Watanabe K, Yamashita T, Okazaki T, Tokudome Y. Epidermal permeability barrier function and sphingolipid content in the skin of sphingomyelin synthase 2 deficient mice. *Exp. Dermatol.* 27, 827-832, 2018
- 3) Hanamastu H, Mitsutake S, Sakai S, Okazaki T, Watanabe K, Igarashi Y, Yuyama K. Multiple roles of Sms2 in white and brown adipose tissues from diet-induced obese mice. *J. Metabolic Syndr.* 7:2, 2018.
- 4) 渡辺 研 プレシジョン・メディシンの運動器疾患への応用 医療革命プレシジョン・メディシン研究最前線 p344-352, 2018
- 5) Ito T, Sakai Y, Igarashi K, Nishio R, Yamazaki K, Sato N, Morita Y. Proprioceptive weighting ratio for balance control in static standing is reduced in elderly patient with low back pain. *Spine* 43, 1704-1709, 2018.
- 6) Sakai Y, Matsui H, Ito S, Hida T, Ito K, Koshimizu H, Harada A. Electrophysiological function of the lumbar multifidus and erector spinae muscles in elderly patients with chronic low back pain. *Clin Spine Surg.* 32, E13-E19, 2019.
- 7) Koshimizu H, Sakai Y, Harada A, Ito S, Ito K, Hida T. The impact of sarcopenia on cervical spine sagittal alignment after cervical laminoplasty. *Clin Spine Surg.* 31, E342-346, 2018
- 8) Kobayashi K, Ando K, Kato F, Kanemura T, Sato K, Hachiya Y, Matsubara Y,

- Kamiya M, Sakai Y, Shinjo R, Nishida Y, Ishiguro N, Imagama S. Reoperation within 2 years after lumbar interbody fusion: a multicenter study. *Eur Spine J.* 27, 1972-1980, 2018
- 9) Iida H, Sakai Y, Watanabe T, Matsui H, Takemura M, Matsui Y, Harada A, Hida T, Ito K, Ito S. Sarcopenia affects Conservative Treatment of Osteoporotic Vertebral Fracture. *Osteoporosis and Sarcopenia*, 4, 114-117, 2018.
- 1 0) 酒井義人、原田 敦、伊藤定之、小清水宏行、伊藤研悠、飛田哲朗 サルコペニアは腰部脊柱管狭窄症の手術成績に影響する。 *J Spine Res* 9: p43-49, 2018
- 1 1) 中尾寛宙、酒井義人、渡邊 剛、竹村真里枝、松井寛樹、飯田浩貴、松井康素、原田 敦 骨粗鬆症整椎体骨折保存治療における回復期リハビリテーション病棟および地域包括ケア病棟での治療成績。 *臨床整形外科* 53(7), 613-619, 2018
- 1 2) 酒井義人、松井寛樹 筋肉の測定と定量化 二重エネルギーX線吸収法 (DXA)、生体電気インピーダンス法 (BIA) 脊椎脊髄ジャーナル 31(9), p819-823, 2018
- 1 3) 酒井義人 サルコペニアと慢性痛 *Loco Cure* Vol.4 No.2. p42-47, 2018
- 1 4) Yamaguchi-Kabata Y, Morihara T, Ohara T, Ninomiya T, Takahashi A, Akatsu H, Hashizume Y, Hayashi N, Shigemizu D, Boroevich KA, Ikeda M, Kubo M, Takeda M, and Tsunoda T. Integrated analysis of human genetic association study and mouse transcriptome suggests LBH and SHF genes as novel susceptible genes for amyloid- β accumulation in Alzheimer's disease. *Hum Genet*, 137, 521-533, 2018.
- 1 5) López Y, Kamola PJ, Sharma R, Shigemizu D, Tsunoda T, and Sharma A. Computational pipelines and workflows in Bioinformatics. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*, 2018
- 1 6) 重水大智 エクソーム解析による疾患ゲノム研究 *細胞* 5月号 2018
- 1 7) Nishino J, Kochi Y, Shigemizu D, Kato M, Ikari K, Ochi H, Noma H, Matsui K, Morizono T, Boroevich K, Tsunoda T, and Matsui S. Empirical Bayes estimation of semi-parametric hierarchical mixture models for unbiased characterization of polygenic disease architectures. *Front Genet* 9,115, 2018.
- 1 8) Shigemizu D, Miya F, Akiyama S, Okuda S, Boroevich K, Fujimoto A, Nakagawa H, Ozaki K, Niida S, Kanemura Y, Okamoto N, Saitoh S, Kato M, Yamasaki M, Matsunaga T, Mutai H, Kosaki K, and Tsunoda T. IMSindel: An accurate intermediate-size indel detection tool incorporating de novo assembly and gapped global-local alignment with split read analysis. *Sci Rep* 8,5608, 2018

2. 学会発表

- 1) 酒井義人、松井寛樹、原田 敦、小清水宏行、伊藤定之、伊藤研悠、飛田哲朗 歩行速度と腰部脊柱管狭窄症手術成績 第 47 回日本脊椎脊髄病学会 2018.4.12. 神戸
- 2) 酒井義人、松井寛樹、原田 敦、小清水宏行、伊藤定之、伊藤研悠、飛田哲朗 骨粗鬆症性椎体骨折に対する積極的入院保存治療-骨粗鬆症とサルコペニアが治療に及ぼす影響- 第 47 回日本脊椎脊髄病学会 2018.4.12. 神戸
- 3) 酒井義人 高齢者の慢性腰痛とサルコペニア 第 130 回中部日本整形外科災害外科学会 2018.4.20. 松山
- 4) 酒井義人 加齢と慢性疼痛-高齢者慢性腰痛におけるサルコペニア 第 91 回日本整形外科学会学術集会 2018.5.27. 神戸
- 5) 酒井義人、原田 敦 歩行速度とサルコペニアの腰部脊柱管狭窄症手術成績に及ぼす影響 第 55 回日本リハビリテーション医学会 2018.6.30. 福岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし