

## 胎児期ビタミンA-レチノール代謝系の機能維持と 先天性脊柱側弯症の発症予防

下川 哲 昭

高崎健康福祉大学 教授

### 緒 言

脊柱側弯症 (Congenital Scoliosis) は、脊椎が生理的弯曲を越えて弯曲する異常である。この側弯症は、先天性・特発性・症候性の三つに分類されている。特発性側弯症は一部原因遺伝子の探索が始まっているが、先天性側弯症ははまだ原因および原因遺伝子の検索さえも行われておらず、手術以外に根本的な治療法がない。先天性側弯症は、生まれつきの形態異常を来した椎体 (楔状椎、蝶形椎、半椎など) を有するが故に成長と共に側弯を来す疾患である。高度の側弯では胸郭が著しく変形し、そのために肺の機能が低下する。その結果、肺や心臓に重篤な合併症を引き起こす (図1)。脊椎の形態異常以外に他の身体的異常を認めないことが多く、疼痛などの自覚症状に乏しいため、姿勢異常を起こすまで気づかれないことが多い。もし早期に診断が可能になれば、早期の外科的治療により姿勢異常の増悪を予防できる可能性がある。我々は先天性脊柱側弯症の発症メカニズムを明らかにする目的で、先天性に腰椎の後側弯症を持つモデル動物である Ishibashi (IS) rat の形態学および遺伝子的解析を行ってきた。これまでに IS rat はヒトの先天性脊柱側弯と極めて類似した形態を示すことや、胎生期から1次骨化中心の癒合や変形がみられること、腰

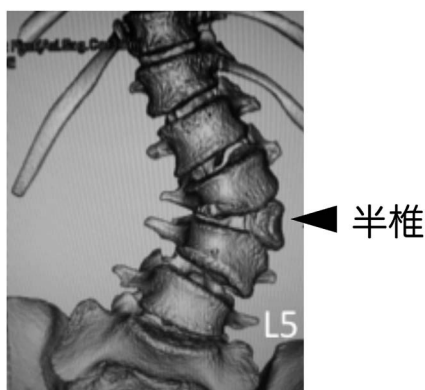


図1 共同研究者の執刀による腰椎に半椎 (hemivertebra) を認めた手術例。

仙椎移行部において *Hox* 遺伝子群の発現が有意に低下していることなどを発見した<sup>1)</sup>。

本研究の目的は、DNA microarray を用いて IS rat 椎骨における網羅的な遺伝子解析を行い、側弯症の発症に関わると考えられているビタミンA-レチノール代謝系について解析し側弯症の発症過程をより深く理解することにある。

### 実験方法

#### 1. 実験動物

先天性脊椎後側弯症のモデルラットである IS rat は京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設から供与された。野生型ラット (WT) としてウイスター (Wistar) rats を日本 SLC Inc. (静岡) から購入した。すべてのラットは温度・湿度、照明、餌、水の管理された施設で生育された。同型遺伝子同士の雌雄による交配により繁殖させ、仔が誕生した日を P0 とした。本研究のすべての動物実験は高崎健康福祉大学動物実験倫理委員会および群馬大学医学部動物実験倫理委員会の承認を受けて実施した。

#### 2. 遺伝子発現量のプロファイルの作成

DNA microarray を用いて IS で奇形が集中する椎骨局所における網羅的な遺伝子解析を試みた。生後4日齢 (P4) の IS rat の奇形が集中する第3から第5腰椎の脊椎試料から常法により mRNA を抽出し cDNA を合成後、緑色蛍光色素である Cy3 で、Wistar ラット同部位由来の cDNA を赤色蛍光色素である Cy5 で標識した。標識化した cDNA をラット全遺伝子型 DNA チップ (3D-gene、東レ社製) とハイブリダイゼーションさせた。蛍光値をスキャナーによって読み取り正規化した後、発現量として算出することでラット脊柱側弯症における遺伝子発現プロファイルを作製した。

### 3. 先天性脊柱側弯症発症におけるビタミンA-レチノール代謝系の関与

発現変動遺伝子群が情報伝達系のどのパスウェイに多く含まれていたかを調べる「パスウェイ解析」を行った。ビタミンA-レチノール代謝系の発現にとって重要な遺伝子を選択し、Real-time PCRにより遺伝子発現、Western blottingによりタンパク質発現、High performance liquid chromatography (HPLC) によりラット血中のレチノール濃度を測定した。

### 結 果

DNA microarray を用いたISで奇形が集中する椎骨局所における網羅的な遺伝子解析において、およそ2万個の遺伝子のうち野生型 Wistar ラットの当該部位と比較して発現が8倍以上上昇したものは90遺伝子であった。逆に発現が0.125 (1/8) 倍以下に低下したものは106遺伝子存在した (図2)。興味深いことにこのうち神経成長因子受容体であるTropomyosin receptor kinase (Trk) 遺伝子群は0.1倍程度の顕著な発現低下を認め、Real-time RT-PCRによるmRNA発現、抗Trk抗体を使ったWestern blottingや免疫染色によるタンパク質の発現においても有意な発現低下を確認した<sup>2)</sup>。

次に、発現変動遺伝子群が情報伝達系のどのパスウェイに多く含まれているかを調べる「パスウェイ解析」を行ったところ、発現低下遺伝子が最も多く含まれるのはビタミンA-レチノール代謝系に関するパスウェイであった。この代謝系は39遺伝子で構成され、このうちmicroarrayにて検出した33遺伝子中9遺伝子でISにお

いて顕著な発現低下がみられた。このうち、*Rbp1*, *Aldh1a2*, *Adh1*, *Rara*の遺伝子発現をReal-time PCRで確認したところWTに比べてISラットではすべて有意に減少していた ( $p < 0.01$ , 図3)。

さらに、WTおよびISラットの血中レチノール濃度をHPLCにより測定した。ISの血中レチノール濃度 ( $193 \pm 0.014$  ng/mL) はWT ( $125 \pm 0.005$  ng/mL) に比較して有意に高いことがわかった ( $p < 0.01$ , 図4)。

### 考 察

本研究結果は、神経成長因子受容体およびビタミンA-レチノール代謝系遺伝子群の発現低下は、先天性脊柱側弯症の原因の一つか少なくとも発症に影響を与えることを強く示唆している。これまでの研究では、骨折の

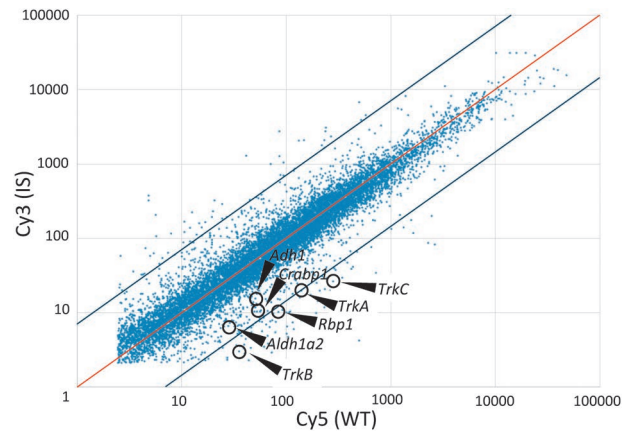


図2 DNA microarrayの結果のプロット。横軸はCy5で標識したWT由来の遺伝子。縦軸はCy3で標識したIS由来の遺伝子。

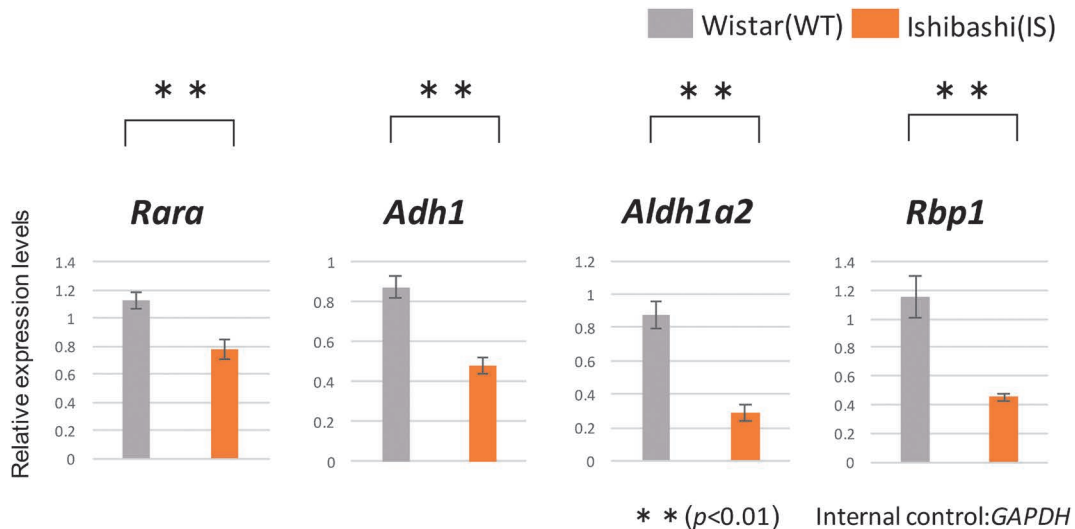


図3 *Rbp1*, *Rara*, *Adh1*, *Aldh1a2*の遺伝子発現。数値は平均±標準誤差で表示した。標本数はそれぞれn=7。平均値の差の検定はStudent's t-testで検定した。\*\*  $p < 0.01$ 。

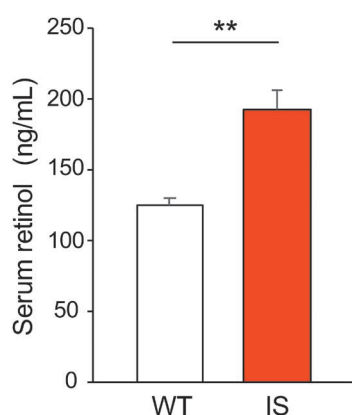


図4 野生型 (WT) と IS ラットの血清レチノール濃度。数値は平均±標準誤差で表示した。標本数はそれぞれ  $n=16$ 。平均値の差の検定は Welch's  $t$ -test で検定した。\*\* $p<0.01$ 。

修復過程で *Trk* の発現がみられる<sup>3)</sup>ことや、*TrkC* のリガンドである NT-3 が骨形成を促進するとの報告があるが<sup>4)</sup>、骨形成異常における神経成長因子受容体の関与についてその詳細は明らかでない。IS では、*Trk* の発現低下による神経成長因子の機能不全から骨芽細胞が十分に機能せず、不良な形態を示す可能性などが考えられる。一方、レチノイン酸はホメオティック遺伝子の転写活性を制御することが知られている<sup>5)</sup>。IS ではレチノール代謝に関する遺伝子群の発現低下によりレチノイン酸が正常に代謝されずホメオティック遺伝子の発現が抑制されて椎骨の正常な発生過程が障害されている可能性がある。また IS の血中レチノール濃度が上昇していたことから、腰椎骨におけるビタミン A-レチノールの利用障害やレチノール自体の過剰による代謝異常が体節形成機構を破綻させ側弯を発症させていると考えられる。

## 要 約

先天性脊柱側弯症は、脊椎が生理的彎曲を越えて彎曲

する異常である。現在、外科的治療以外に根本的な治療法のないこの疾患にとって、病因遺伝子の同定と発症メカニズムの解明は側弯症に対する早期の診断と遺伝子治療への第一歩である。本研究において我々は先天性脊柱後弯症モデルラット (IS ラット) において奇形が集中する椎骨局所における網羅的遺伝子解析から、神経成長因子受容体 (*TrkA, B, C*) およびビタミン A-レチノール代謝系の遺伝子群の発現が有意に低下していることを見出した。さらに IS ラットの血中レチノール濃度は野生型 (Wistar) ラットに比べて有意に上昇していた。これらの結果により、この疾患の原因の一つは腰椎骨におけるビタミン A-レチノールの代謝/利用障害である可能性が強く示唆された。今後、ビタミン A-レチノール代謝系の最終リガンドの投与による側弯の改善と本症のヒトにおける病態メカニズムについて解析する予定である。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり学術研究奨励金を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団に衷心より御礼申し上げます。先天性脊椎後側弯症のモデルラットである IS rat は京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設から供与されました。また、本研究は飯塚伯氏と角田大介氏 (群馬大学大学院医学系研究科整形外科学分野) ならびに鯉淵典之氏 (群馬大学大学院医学系研究科応用生理学分野) との共同研究で成されたものです。

## 文 献

- 1) T. Seki, et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, **312**, 193-199, 2008.
- 2) D. Tsunoda, et al.: *Mol. Cell. Biochem.*, **412**, 11-18, 2016.
- 3) K. Asaumi, et al.: *Bone*, **26**, 625-633, 2000.
- 4) T. Nakanishi, et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**, 1268-1274, 1994.
- 5) T. Suzuki, et al.: *Dev. Growth Differ.*, **41**, 143-152, 1999.