

学 位 論 文

Doctoral Thesis

候補遺伝子アプローチによる *SKT* (*KIAA1217*) と
腰椎椎間板ヘルニアとの相関解析

(Association analysis of the human *SKT* gene (*KIAA1217*) with
lumbar disc herniation using a candidate gene approach)

唐杉 樹

Tatsuki Karasugi

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

指導教員

水田 博志 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻運動骨格病態学

2010年3月

学 位 論 文

Doctoral Thesis

候補遺伝子アプローチによる *SKT* (*KIAA1217*) と
腰椎椎間板ヘルニアとの相関解析

(Association analysis of the human *SKT* gene (*KIAA1217*) with
lumbar disc herniation using a candidate gene approach)

著者名 :

唐杉 樹

Tatsuki Karasugi

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻運動骨格病態学
水田 博志 教授

審査委員名 :

公衆衛生・医療科学分野担当教授
病態情報解析学分野担当教授
脳神経外科学分野担当教授
分子遺伝学分野担当准教授

加藤 貴彦
安東 由喜雄
倉津 純一
寺田 和豊

2010年3月

目次

1. 要旨	3
2. 学位論文の骨格となる参考論文	7
3. 謝辞	8
4. 略語一覧	9
5. 研究の背景と目的	
1) Single nucleotide polymorphism (SNP) による遺伝子解析の背景	11
1. SNP	11
2. SNP による疾患感受性遺伝子の探索	12
3. ハプロタイプ	13
4. 国際ハップマップ計画 (International HapMap Project)	13
2) 腰椎椎間板ヘルニア (Lumbar disc herniation; LDH) に対する遺伝子解析の背景	15
1. common disease としての LDH	15
2. LDH の遺伝的要因	16
3. LDH の疾患感受性遺伝子	17
3) LDH 疾患感受性遺伝子の候補遺伝子	19
1. B6;CB- <i>Skt</i> ^{GtAyu8021MEG} マウス (<i>Skt</i> ^{Gt} マウス)	19
2. 疾患感受性遺伝子の候補遺伝子としての <i>SKT</i>	21

4) 本研究の目的	21
6. 実験方法	
1) 対象	23
2) 定量的 real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)	24
3) SNP のゲノタイピング	25
4) 統計解析	26
7. 実験結果	
1) 日本人 LDH のケース・コントロール集団の背景	28
2) ヒト組織における <i>SKT</i> mRNA の real-time PCR による発現解析	28
3) <i>SKT</i> の連鎖不平衡ブロック (Linkage disequilibrium block; LD block) とタグ SNP の選択	29
4) 日本人 LDH ケース・コントロール集団に対する相関解析	30
5) フィンランド人 LDH ケース・コントロール集団に対する相関解析	35
8. 考察	
1) LDH 疾患感受性遺伝子の候補遺伝子としての <i>SKT</i>	37
2) LDH に対する <i>SKT</i> の疾患関連 SNP	37
3) 異人種間における再現研究	39
4) 椎間板組織における <i>SKT</i> の機能	40
9. 結語	42
10. 参考文献	43

1. 要旨

【目的】腰椎椎間板ヘルニア (Lumbar disc herniation; LDH) は整形外科領域で最もよく認められる筋・骨格系の common disease の一つであるが、その病因・発症機序は未だ明らかになっていない。近年の疫学的研究や遺伝学的研究により、LDH はその原因として遺伝要因を有していることが明らかになりつつあり、いくつかの疾患感受性遺伝子の同定が成された。しかし、LDH の発症にはさらに多くの遺伝子が関与すると考えられおり、それらの同定が必要である。B6;CB-*Skt*^{GtAyu8021IMEG} マウス (*Skt*^{Gt} マウス) は胚性幹細胞を用いた遺伝子トラップ法によって作り出された *Sickle tail* 遺伝子 (*Skt*) のノックアウトマウスである。そのホモ接合体は尾椎椎間板の進行性の椎間板変性を呈し、成熟マウスは尾椎の変形を示す等、LDH 様の表現型を呈する。*Skt* のヒトホモログである *KIAA1217* (*SKT*) を LDH の疾患感受性遺伝子の候補遺伝子と考え、ケース・コントロール相関解析を行うことにより、*SKT* が LDH の疾患感受性遺伝子である可能性を明らかにする事を目的とした。

【方法】*SKT* のヒト組織での発現解析のために、complementary DNA (cDNA) を用いた定量的 real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) を行った。国際ハップマップデータベース (<http://www.hapmap.org>) の情報を用いて、*SKT* 領域を網羅する 68 のタグ single nucleotide polymorphism (タグ SNP) を選出し、日本人

A 群 (A) 、日本人 B 群 (B) 、フィンランド人群 (F) より成る LDH の 3 つの独立したケース・コントロール集団 (A : ケース 525 例 コントロール 564 例) 、(B : ケース 337 例 コントロール 332 例) 、(F : ケース 257 例 コントロール 249 例) を用い 4 つのモデルについて相関を調べて、*SKT* の LDH に対する相関解析を行った。

【結果】 定量的 real-time PCR の結果、*SKT* は椎間板組織に特異的に発現していた。ケース・コントロール相関解析の結果、*SKT* のイントロン 2 に存在する SNP、rs16924573 はアレルモデルにおいて、日本人 A 群に対して p 値 = 0.027、日本人 B 群に対して p 値 = 0.021 という相関を各々が示した。Mantel-Haenszel meta-analysis により 2 群の結果を統合すると日本人集団全体では p 値 = 0.0015 の相関を示した。この SNP はフィンランド人群に対して p 値 = 0.026 と有意な相関を示し、相関の再現性が得られた。これら 3 群の相関解析の結果を Mantel-Haenszel meta-analysis により統合すると、 p 値 = 0.00040 (オッズ比 = 1.34) という有意な相関を示した。

【考察】 *Skt^{Gt}* マウスが LDH 様の表現型を呈すること、*SKT* が椎間板組織に特異的に発現していること、*SKT* のタグ SNP が LDH の 3 つの独立したケース・コントロール集団に対する相関解析にてそれぞれ相関を示した事より、*SKT* は LDH

の発症に関わっている事が示唆された。しかしながら、*SKT*はその機能が未知の遺伝子であり、またイントロン2に存在するSNPが*SKT*の機能に対してどのような影響を与えているのかは不明である。今後、さらに独立したケース・コントロール集団に対する相関解析や、*Skt^{Gt}*マウスを用いた解析を行うことにより、*SKT*の機能の解明や、LDHの発症メカニズムの解明が期待される。

【結論】 LDHの新たな疾患感受性遺伝子として*SKT*が同定された。

ABSTRACT

Lumbar disc herniation (LDH) is one of the most common musculo-skeletal diseases. Recent studies have indicated that LDH has strong genetic determinants, and several susceptibility genes have been reported to associate with LDH; however, its etiology and pathogenesis still remain unclear. *KIAA1217* (alias *SKT*, the human homolog of murine *Skf* [*Sickle tail*]) is a good candidate for an LDH susceptibility gene because *SKT* is specifically expressed in nucleus pulposa of intervertebral discs (IVDs) in humans and mice, and because *Skf*^{Gt} mice, which are established through a large-scale gene-trap mutagenesis, exhibit progressive, postnatal onset abnormality of the IVDs. Here, we report the association of *SKT* with LDH. Using tag SNPs, we examined the association in two independent Japanese case-control populations and found a significant association with *SKT* rs16924573 in the allele frequency model ($p = 0.0015$). The association was replicated in a Finnish case-control population ($p = 0.026$). The combined p value of the two population by meta-analysis is 0.00040 (OR, 1.34; 95% CI, 1.14–1.58). Our data indicate that *SKT* is involved in the etiology of LDH.

2. 学位論文の骨格となる参考論文

関連論文

1 編 1 冊

1. Tatsuki Karasugi, Kei Semba, Yuichiro Hirose, Anthi Kelempisioti, Masahiro Nakajima, Atsushi Miyake, Tatsuya Furuichi, Yoshiharu Kawaguchi, Yasuo Mikami, Kazuhiro Chiba, Michihiro Kamata, Kouichi Ozaki, Atsushi Takahashi, Pirkka Mäkelä, Jaro Karppinen, Tomoatsu Kimura, Toshikazu Kubo, Yoshiaki Toyama, Ken-ichi Yamamura, Minna Männikkö, Hiroshi Mizuta, and Shiro Ikegawa.
Association of the Tag SNPs in the Human *SKT* Gene (*KIAA1217*) With Lumbar Disc Herniation.
JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH. 24: 1537-1543, 2009.

その他の論文

1 編 1 冊

1. Yuichiro Hirose, Kazuhiro Chiba, Tatsuki Karasugi, Masahiro Nakajima, Yoshiharu Kawaguchi, Yasuo Mikami, Tatsuya Furuichi, Futoshi Mio, Atsushi Miyake, Takeshi Miyamoto, Kouichi Ozaki, Atsushi Takahashi, Hiroshi Mizuta, Toshikazu Kubo, Tomoatsu Kimura, Toshihiro Tanaka, Yoshiaki Toyama, and Shiro Ikegawa.
A Functional Polymorphism in *THBS2* that Affects Alternative Splicing and MMP Binding Is Associated with Lumbar-Disc Herniation.
The American Journal of Human Genetics. 82: 1122-1129, 2008

3. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的に御指導、御支援下さいました熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻運動骨格病態学分野 水田博志教授に深甚なる謝意を表します。

本研究における SNP を用いたケース・コントロール相関解析に関しまして御指導を頂きました独立行政法人理化学研究所ゲノム医科学研究センター骨関節疾患研究チーム 池川志郎チームリーダーに深く感謝の意を表します。

本研究における実験マウスに関しまして御指導を頂きました熊本大学発生医学研究所器官構築部門個体発生担当 山村研一教授、熊本大学医学部附属病院整形外科 仙波圭先生に心より感謝いたします。

本研究におけるサンプル収集につきまして、慶應義塾大学医学部整形外科学教室 戸山芳昭教授、千葉一裕准教授、富山大学医学部整形外科 木村友厚教授、川口善治准教授、京都府立医科大学大学院運動器機能再生外科学 久保俊一教授、三上靖夫講師をはじめといたしまして、関連病院の多くの先生方に心より感謝申し上げます。

本研究におけるフィンランドでの再現研究につきまして、Oulu Center for Cell-Matrix Research, Department of Medical Biochemistry and Molecular Biology, Biocenter Oulu, University of Oulu の Minna Männikkö 教授、Department of Physical and Rehabilitation Medicine, University of Oulu の Jaro Karppinen 教授に深くお礼を申し上げます。

4. 略語一覽

DNA : Deoxyribonucleic acid

A : Adenine

T : Thymine

G : Guanine

C : Cytosine

RFLP : Restriction fragment length polymorphism

VNTR : Variable number of tandem repeat

STRP : Short tandem repeat polymorphism

SNP : Single nucleotide polymorphism

CNV : Copy number variation

LDH : Lumbar disc herniation

MRI : Magnetic resonance imaging

CILP : Cartilage intermediate layer protein

COL11A1 : Collagen, type XI, alpha-1

ASPN : Asporin

THBS2 : Thrombospondin 2

MMP9 : Matrix metalloproteinase 9

TGF- β 1 : Transforming growth factor-beta1

Ile : Isoleucine

Thr : Threonine

XP : X-ray photograph

RNA : Ribonucleic acid

mRNA : Messenger ribonucleic acid

MMP2 : Matrix metalloproteinase 2

IVS : Intervening sequence

Gln : Glutamine

Arg : Arginine

Skt : Sickle tail

E : Embryonic day

PCR : Polymerase chain reaction

MPCR : Multiplex polymerase chain reaction

BMI : Body mass index

cDNA : Complementary DNA

ACTB : β -actin

LD : Linkage disequilibrium

Da : Dalton

5. 研究の背景と目的

1) Single nucleotide polymorphism (SNP) による遺伝子解析の背景

1. SNP

DNA (Deoxyribonucleic acid) は、Adenine (A) 、 Thymine (T) 、 Guanine (G) 、 Cytosine (C) という 4 種類の塩基からなっている。DNA は二本の鎖が A と T、G と C で相補的に結びつき、二重らせん構造をつくっているが、この DNA の一部に、タンパク質をつくるなど様々な生体の機能に関する情報が書かれた遺伝子が存在している。ヒトのゲノムは約 30 億塩基対からなっている。このヒトゲノムには遺伝子多型 (polymorphism) と呼ばれるものが存在し、ヒトゲノムを個人間で比べると多くの部位で異なっている。遺伝子多型はこれまでに様々なものが報告されており、研究の場でゲノムを解析するツールとして利用されてきた。遺伝子多型を分類すると、古いものから

1. RFLP (restriction fragment length polymorphism)

2. minisatellite または VNTR (variable number of tandem repeat)

3. microsatellite または STRP (short tandem repeat polymorphism)

4. SNP

5. CNV (copy number variation)

の 5 種類に分けられる。遺伝子多型の中で、SNP はゲノムを構成する塩基が他

の3種類の塩基のいずれかに置換されているものである。ヒトゲノム上に存在する最も単純で、最も数が多い。ゲノムの数百 bp から 1 kbp に一ヶ所の頻度で存在し、ゲノム全体では数百万ヶ所に及んでいるとされる。

2. SNP による疾患感受性遺伝子の探索

1990年に始まったヒトゲノム計画は2003年4月、国際共同チームによるヒトゲノムの全塩基配列決定完了の宣言によって終止符が打たれ、生命科学はポストゲノム時代へと突入した。判明した塩基配列の情報を有益なものにするためには、遺伝子やタンパクの機能を知り、またそれらが疾患に関連している分子機構を明らかにしなくてはならない。疾患の原因には遺伝的要因と環境要因とがあり、それらの相互作用で発症する。近年、生活習慣病などの「ありふれた疾患 (common Disease)」という疾患の概念が現れた。これは、臨床的に患者数が多く、「複数の強くない遺伝的要因」と「環境要因」とが複雑に関わり合って発症する多因子疾患であると考えられている。SNPは2000年頃より多型マーカーとして用いられてきたが、**common disease**の疾患感受性遺伝子(原因遺伝子)を探索するための有用な指標として用いられるようになった。その過程で、SNPは多型マーカーとして有用であるだけでなく、SNPそのものが生活習慣病の発症に関わっていることが明らかになった。すなわち、SNPによって遺伝子の機能に変化がもたらされる事が証明されるようになった。SNPの数は膨大であるため、その解析については、調べるSNPの数を出来る限り少なくすることが

研究の効率化につながる。このためには、染色体上のある領域におけるヒトの SNP の並び方のパターンである、ハプロタイプを知ることが非常に重要である。

3. ハプロタイプ

ハプロタイプとは、連鎖する複数の座位のアレルのうち 1 つの配偶子に存在するものの組み合わせである。減数分裂の際の組み換え、及び組み換えのホットスポットという現象で生じると考えられる。減数分裂は精子や卵がつくられる際の細胞分裂に特徴的な現象である。減数分裂時には相同染色体間で複雑に組み換えが起こり、キメラ染色体として子に伝わる。組み換えは一回の減数分裂時に約 30 ヶ所で起こるとされているが、この確率は染色体上のゲノムの塩基数により定義される、物理的距離に基本的には比例する。ある相同染色体上に存在する 2 つの SNP を考えた場合、物理的距離が小さいほど相同組み換えが起こる確率は低く、この場合 2 つの SNP には連鎖関係が存在しており連鎖不平衡の関係が成立している。また、ゲノム上には組み換えの起こりやすいホットスポットの存在がある。これら二つの現象により、ゲノム上のある小さな領域内に存在する SNP 群をみると、染色体上のアレルの並びが限られてくるため、ハプロタイプが成立する。

4. 国際ハップマップ計画 (International HapMap Project)

国際ハップマップ計画は 2002 年 10 月末に日本、中国、米国、英国、カナダ、

ナイジェリアの六ヶ国の国際協力により開始された。この計画の目標はヒトの遺伝子多型のパターンを把握し、全ゲノムに対するハプロタイプの地図を作成することであった。この計画のためにアジア人 90 人 (東京在住日本人 45 人 (略称 JPT) と北京在住漢民族系中国人 45 人 (略称 CHB))、ヨーロッパ系白人 90 人 (略称 CEU)、アフリカ人 (ナイジェリア在住のヨルバ族の 90 人 (略称 YRI)) に対する解析が第 1 期と第 2 期に渡って行われ、最終的にはそれぞれの民族集団に対して全ゲノムに渡る、580 万以上の SNP の解析が行われた (1, 2)。この国際ハップマップ計画からは様々な知見が得られた。遺伝子多型のパターンであるハプロタイプの構造がそれぞれの民族集団に対して明らかになった事、SNP の頻度などが (アジア) — (ヨーロッパ) — (アフリカ) の民族集団間ではそれぞれ大きく異なっている事、全ゲノムを網羅するために必要な SNP 数がアジア人とヨーロッパ系白人では 50 万 SNP 程度であるのに対してアフリカ人では 100 万 SNP 程度である事、またヒトゲノム上では相同染色体組み換えの起こりやすい場所 (ホットスポット) が存在している事などであった。調べたいゲノムの領域のハプロタイプが明らかになることで、ゲノム解析の効率が飛躍的に上昇した。すなわち同一染色体上のある狭い領域に存在する SNP 群は連鎖しているため、限られたアレルの並びを示している。そのアレルの並びを代表する事ができるタグ SNP をハップマップデータベースから選択し、そのタグ SNP のアレルだけを調べることにより、その他の SNP を調べなくてもその領域に存在する SNP 群のアレルを決定することが出来るようになった (図 1)。国際ハップマ

年期であり、その症状は社会的にも労働生産性の低下などの問題を引き起こす(3)。LDHの10%以上の患者が、増悪する下肢痛や背部痛のために外科的治療を要する(4)。厚生労働省による平成19年度国民生活基礎調査の概況によると、日本国民で自覚症状のあるものは人口千人あたり327.6人(有訴者率)であり、その症状のうち「腰痛」が占める順位は、性別にみた場合男性では一位(有訴者率87.4)、女性では二位(有訴者率131.1)であった。腰痛は日本人にとって国民的なcommon diseaseである。LDHは腰痛を引き起こす大きな原因の一つであり、個別疾患としての罹患率も高いことより、同様にcommon diseaseであると考えられる。LDHは病因や発症機序が未だに明らかではない疾患であり、それらの解明が急務である。

2. LDHの遺伝的要因

近年の疫学的研究により、LDHの発症には遺伝的要因が存在していることが示唆されている。21歳以下でLDHの手術を行った63例と対照群を比較した報告では、約5倍の頻度で若年者のLDHにおいて家族性の素因を有していた(5)。また、18歳以下でLDHの手術を行った40例と120例の対照群を比較した報告では、若年者のLDHにおいて家族内での罹患率が高かった(6)。また、椎間板変性の発症にも遺伝的要因が関与している事が示唆されている。20組の男性の双子に対して調査した報告では、腰椎椎間板のMRI上、終板の変化、椎間板膨隆、椎間板間隙、シグナル強度などの所見に対する影響は、双子であることが

喫煙や年齢の 10 倍影響を与えていた (7) 。また、腰椎変性疾患で手術を行った 65 例と、脊椎以外の疾患で手術を行った 67 例を対照にした報告では、腰椎変性疾患で手術を行った群の方が腰椎変性疾患の家族歴を有していた (8) 。また、172 人の一卵性双生児と 154 人の二卵性双生児を対象にした報告では、腰椎 MRI を撮影し、椎間板間隙、シグナル変化、椎間板膨隆、前方骨棘の 4 項目について比較検討したところ、これらの遺伝率は 74%であった (9) 。LDH は椎間板の変性を背景とした疾患と考えられるため、これら椎間板変性に対する報告は、LDH に遺伝的要因が関与していることを支持するものである。

3. LDH の疾患感受性遺伝子

これまでに LDH を多因子が関わって発症する common disease としてとらえ、その疾患感受性遺伝子の探索として候補遺伝アプローチによるケース・コントロール相関解析が行われてきた。その結果 *CILP*、*COL11A1*、*ASPN*、*THBS2*、*MMP9* などの疾患感受性遺伝子が同定され、また *CILP*、*COL11A1*、*THBS2* に関してはその遺伝子の機能の一部が解析された (10-13) 。

CILP は cartilage intermediate layer protein をコードする遺伝子である。椎間板に存在する基質タンパクの中から LDH の候補遺伝子として *CILP* を含む 20 の遺伝子が選ばれ、それぞれの遺伝子多型に対する相関解析が行われた。その結果、*CILP* の SNP、rs2073711; c.1184C>T (Ile395Thr) が LDH と有意な相関をもつことが判明した ($p=0.0000068$ 、odds ratio=1.61) 。また、*CILP* は TGF- β 1 に結合

し、その結合能力に Ile アレルと Thr アレルで差が生じ、LDH の患者に多い Thr アレルの方が強く TGF- β 1 を抑制するためにアグリカンやII型コラーゲンの発現を抑制することで LDH になりやすくなる事が報告された (10)。*COL11A1* は XI 型コラーゲンの α 1 鎖をコードする遺伝子であり、椎間板組織に多く発現している。また XI 型コラーゲンの変異は椎間板組織や脊椎の変形をもたらす Stickler syndrome type II (OMIM#604841)、Marshall syndrome (OMIM#154780)、oto-spondylo-megaepiphyseal dysplasia (OMIM#215150) などの疾患の原因となっていることから、LDH の候補遺伝子として選ばれ相関解析が行われた。その結果、SNP、rs1676486; c.4603C>T が LDH と有意な相関をもつことが判明した ($p=0.0000033$ 、odds ratio=1.42)。*COL11A1* は LDH の患者では椎間板の変性の重症度に伴いその発現が減少していた。LDH の患者に多い T アレルでは *COL11A1* の mRNA が不安定となり、その結果 mRNA 量が減少することで *COL11A1* の量が減少することから、LDH になりやすくなる事が報告された (11)。*THBS2* は細胞外基質である thrombospondin 2 をコードする遺伝子であるが、細胞外基質分解酵素の MMP2/9 と結合しその活性を抑制する。*THBS2* は椎間板組織に特異的に発現しており、その knock-out mouse が脊椎に異常な表現型を呈することから、LDH の候補遺伝子として選ばれ相関解析が行われた。その結果、SNP、rs9406328; IVS10-8C>T が LDH と有意な相関をもつことが判明した ($p=0.0000028$ 、odds ratio=1.38)。この SNP は MMP2/9 との結合領域を規定する *THBS2* の mRNA のエクソン 11 のスプライシングに関与しており、LDH の患者に多い T アレルでは

エクソン 11 が欠損した mRNA が多く産生され、THBS2 と MMP2/9 との結合が低下する結果 MMP2/9 の活性を抑制出来なくなり、LDH になりやすくなる事が報告された。また、MMP9 の SNP、rs17576; c.836A>G (Gln279Arg) も LDH と有意な相関をもつことが判明した ($p=0.00049$ 、odds ratio=1.29)。THBS2、MMP9 両遺伝子に疾患感受性アレルを持つ場合の odds ratio は 3.03 となることが同時に報告された (13)。

3) LDH 疾患感受性遺伝子の候補遺伝子

1. B6;CB-*Sk^t*^{GtAyu8021IMEG} マウス (*Sk^t*^{Gt} マウス)

Sk^t^{Gt} マウス (*sickle tail*; 鎌状尻尾) は胚性幹細胞を用いた遺伝子トラップ法により得られた変異マウスラインである (14)。トラップベクターは *Sk^t* の第 14 番イントロンに挿入されていた。*Sk^t* の発現パターンは *Sk^t* の制御領域により制御されたレポーター遺伝子 β -*geo* の発現により Xgal 染色にてモニタリングすることが出来る。*Sk^t* は胚性期 E8.5 より脊索細胞で初めてその発現を認め、新生仔、成体マウスでは椎間板髄核でその発現が持続していた。*Sk^t* タンパクは野生型マウスの椎間板髄核で発現していたが *Sk^t*^{Gt} マウスのホモ接合体変異マウスではその発現が認められなかった。*Sk^t*^{Gt} マウスのホモ接合体変異マウスでは胚性期 E16.5 まで脊椎、椎間板における異常所見は認められないが、胚性期 E17.5 になって初めて尾椎の一部で椎間板髄核組織の圧壊所見や、圧壊した髄核が周辺へ

脱出する所見を示した。野生型マウスの椎間板髄核組織は生後骨格とともに成長し脊椎を形成するが、*Sk1^{Gt}* マウスのホモ接合体変異マウスでは生後、椎間板髄核組織は成長せず更なる圧壊や、周辺への脱出といった進行性の異常を示し、出生後2週間より捻じれた尾椎という表現型を呈した (図2)。ただし、全身の X-ray photograph (XP) 検査において、尾椎以外の骨格に異常は認められなかった。このため *Sk1* はマウス椎間板髄核にて特異的に機能を有し、胎生期の後期段階以降でその成長や肥大化といった働きに関与していることが示唆された。



図2 *Sk1^{Gt}* mice の表現型 (尾椎)

Semba, et al. *Genetics*; 2006

2. 疾患感受性遺伝子の候補遺伝子としての *SKT*

椎間板は中心部の髄核と、それを取り囲むように存在する線維輪とから成る組織である。椎間板ヘルニアは、椎間板の変性を背景として発症するが、髄核が線維輪を押し上げるようにして発症するもの (突出: protrusion) と、髄核が線維輪を破って脊柱管内に出て発症するもの (脱出: extrusion) に分けられる。*Skt^{Gt}* マウスのホモ接合体変異マウスにおける *Skt* の発現パターン、椎間板髄核組織の観察、及び成体マウスの表現型の観察により、*Skt^{Gt}* マウスはヒトの LDH のモデル動物に成り得る事が考えられた。KIAA1217 (accession no. AB033043、別名 SKT) は *Skt* cDNA と 80.6% のホモロジーを有する未知のタンパクである。Skt に対して、進化的に保存されたタンパクは他に認められないことより、10 番染色体の約 338.7 kbp の遺伝子、*KIAA1217* (accession number NM019590、別名 SKT) は *Skt* のヒトホモログであると考えられる (14)。そこで、我々は SKT を LDH の疾患感受性遺伝子の候補遺伝子として考えた。

4) 本研究の目的

LDH は多因子が関わって発症する common disease であり、いくつかの疾患感受性遺伝子は明らかになっているものの、未だその病因や発症機序は明らかになっていない。効果的な予防法や画期的な治療法の開発のためには、疾患感受性遺伝子の更なる探索、またはその遺伝子の機能を知ることが必要である。本

研究の目的は *SKT* を LDH の疾患感受性遺伝子の候補遺伝子としてケース・コントロール相関解析を行い、*SKT* が LDH の発症に関わっているかどうかを調べることである。

6. 実験方法

1) 対象

はじめに二群の独立した日本人集団がLDHの相関解析に対して用いられた。まず1次スクリーニングのために、525人のケース及び564人のコントロールからなるサンプル集団が用いられた (Japanese A群とした)。次に、再現性を確認するために337人のケース及び332人のコントロールからなるサンプル集団が用いられた (Japanese B群とした)。ケースサンプルは2001年11月から2007年4月までの間に20の共同研究施設より集められた。すべてのLDHのケースに対して腰椎のMagnetic resonance imaging (MRI) の矢状断像および冠状断像が1.5 T imaging systemによって撮影され、評価された。日本人集団のLDHの診断基準は次の三項目であった。

- (1) MRIによりLDHの診断がなされている
- (2) 整形外科医により一年間以上の治療が行われている
- (3) 背部から大腿神経もしくは坐骨神経に沿って神経根の皮膚分節にまで放散する三か月以上の片側下肢痛が持続している

滑液嚢胞、脊髄腫瘍、脊椎すべり症、変形性脊椎症、外傷、炎症性疾患の単独発症例・および合併症例はLDHのケース集団から除外された。LDHのケース 862人中、826人が後方腰椎椎間板ヘルニア切除術、腰椎前方固定術、内視鏡下腰椎椎間板ヘルニア摘出術、経皮的髄核摘出術などの、LDHに対する手術を受けて

いた。全ての患者から理化学研究所ゲノム医科学研究センター及び共同研究施設（臨床施設）の倫理委員会に則ったインフォームドコンセントが得られた。フィンランド人に対する相関解析に対して、257人のケース及び249人のコントロールから成るサンプル集団が用いられた (15)。フィンランド人のLDHの診断基準は次の二項目であった。

- (1) MRI により LDH の診断がなされている
- (2) 背部から膝窩部まで放散する片側下肢痛を有する

2) 定量的real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

total RNAを抽出するために正常椎間板組織 (3検体) が特発性脊柱側弯症の手術サンプルより、正常関節軟骨組織 (8検体) が大腿骨頸部骨折の手術サンプルより得られた。正常椎間板と正常関節軟骨のtotal RNAはRNeasy Lipid Tissue Kit (Qiagen) を用いて抽出された。正常椎間板と正常関節軟骨以外のcDNA (心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、膵臓、脾臓、胸腺、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸、白血球) はMultiple Tissue cDNA Panel (Clontech) から用いられた。正常椎間板と正常関節軟骨のcDNAは抽出されたtotal RNAからMultiscribe reverse transcriptaseとoligo-dT primer (Applied Biosystems) を使用して合成された。定量的real-time PCRおよびデータ解析は96 well plate、総量20 µlの系にてABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems) を用いて行われた。2 µlのcDNA、10 µlのQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (QIAGEN) 、300 nM

の*SKT*または*ACTB* (*ACTIN BETA*) のプライマーがそれぞれ使用され、20 μ lに希釈された。*SKT*と*ACTB*のそれぞれのプライマーとして、*SKT* センスプライマー (5'-GCTGGAAATCAGTGGCAAAG-3')、*SKT* アンチセンスプライマー (5'-CAAAACAAGATGCGAGCCAT-3')、*ACTB* センスプライマー (5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3')、*ACTB* アンチセンスプライマー (5'-TGCTATCCCTGTACGCCTCT-3') が用いられた。PCRの反応条件は95°C15分の後に94°C30秒、57°C30秒、72°C30秒の40サイクルにて行われた。その後標準曲線が作成され、データは*ACTB*にて平均化され解析された。

3) SNP のゲノタイピング

日本人のサンプル集団に対してインフォームドコンセントが得られたLDHの患者群、およびコントロール群より末梢血が7 ml採取され、血液中の白血球より標準的な手法を用いてDNAが抽出された。SNPのゲノタイピングはインベーター法を用いて行われ、タックマン法、またはシーケンス法によるゲノタイピングが補助的に行われた。インベーター法は、二段階からなるSNPのゲノタイピング法である(16)。第一段階として、SNPを含む複数のDNA配列を同時に複数組のPCRプライマーによって増幅するマルチプレックスPCR法(MPCR)が行われた。反応は94°C2分の後に、95°C15秒、58-64°C45秒、72°C3分の37サイクルにて行われた。第二段階として、その増幅産物に対してインベータープローブを用いることにより、インベーター反応が行われた。総量5 μ l

にて 384 ウェルのプレートが使用され、反応は 95°C5 分、63°C30 分にて行われた。インベーター法に使用された全てのインベータープローブセットは Third Wave Technologies 社により合成された。タックマン法は、1 つの SNP、rs10828663 に対して行われた。TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、10 ng の DNA、900 nM の primer、200 nM のプローブを使用し、総量 5 µl にて 384 ウェルのプレートを用いた PCR が行われた。反応は 50°C2 分、95°C10 分の後に、95°C15 秒、60°C1 分の 40 サイクルにて行われた。タックマンプローブセットは全て Applied Biosystems 社により合成された。インベーター法およびタックマン法の反応後の 384 ウェルプレートは ABI PRISM 7900HT sequence detection system によって測定された。ダイレクトシーケンスは Big Dye terminator v3.1 cycle sequencing kit を用いた標準的な手法によって行われ、ABI 3700 DNA analyzers を用いて決定された。フィンランド人のゲノタイピングは SNaPshot Multiplex System を用いた標準的なプロトコールに従って行われ、解析は ABI PRISM 3100 genetic analyzer により行われた。

4) 統計解析

タグSNPはInternational Hapmap Project database (release 21a) の情報に対して、Haploview software 4.0のpairwise tagging modeを用いることによって選択された。ハプロタイプ頻度とハプロタイプ相関はexpectation-maximizationアルゴリズムを用いて解析された (17) 。 相関、ハプロタイプ頻度、Hardy-Weinberg平衡、連

鎖不平衡などの統計学的な解析はHaploview software 4.0、またはMicrosoft Excelを用いて行われた (10,18)。日本人集団の臨床データ（年齢、性別、BMI）とゲノタイプの結果に対する評価には、ロジスティック回帰テストとカイ二乗テストが用いられた。メタ解析は、heterogeneity test (異質性検定) 及びMantel-Haenszelメタ解析を用いて行われた (19-21)。

7. 実験結果

1) 日本人の LDH のケース・コントロール集団の背景

研究対象となった Japanese A 群、Japanese B 群のそれぞれの性別、年齢、BMI を表 1 に示す。

表 1 日本人 LDH のケース・コントロール集団の背景

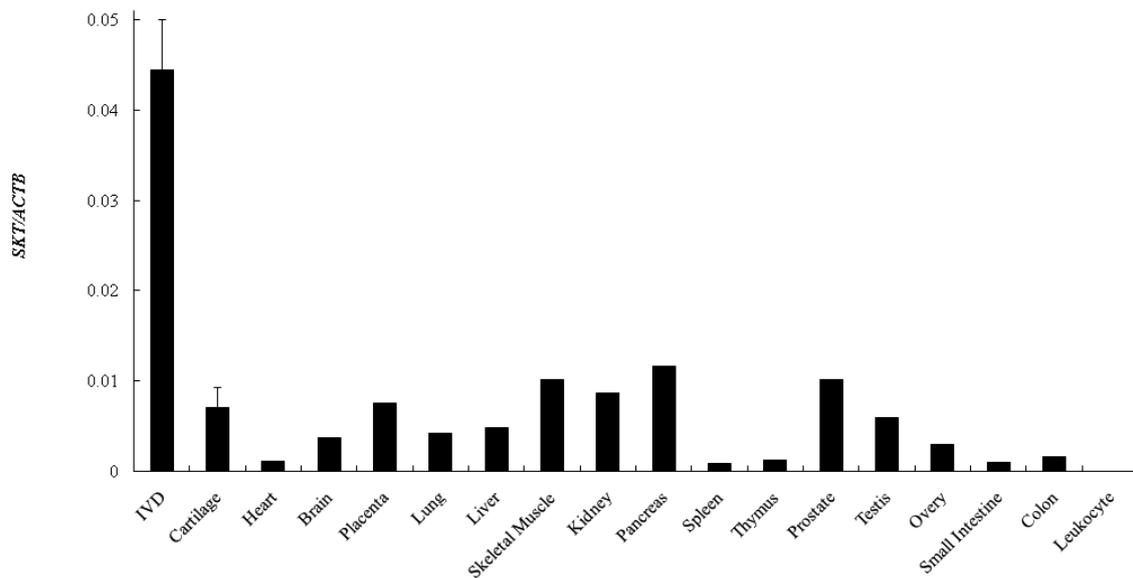
	集団			
	Japanese A群		Japanese B群	
	ケース	コントロール	ケース	コントロール
サンプル数	525	564	337	332
性別 (% 女性)	34.9	42.4	36.2	36.4
年齢 (才)	41.5 ± 15.0	62.4 ± 9.9	36.0 ± 15.2	60.9 ± 14.1
BMI	23.0 ± 3.2	23.6 ± 3.3	22.6 ± 3.5	23.4 ± 2.9

BMI: body mass index.

年齢、BMI については平均値±標準偏差 (mean ± SD) にて表示した。

2) ヒト組織における *SKT* mRNA の real-time PCR による発現解析

様々なヒト組織における *SKT* の発現を real-time PCR 法にて調べた。*SKT* は椎間板組織において特異的に発現していた (図 3)。*SKT* を LDH の疾患感受性遺伝子の候補遺伝子に挙げることを支持する結果であった。



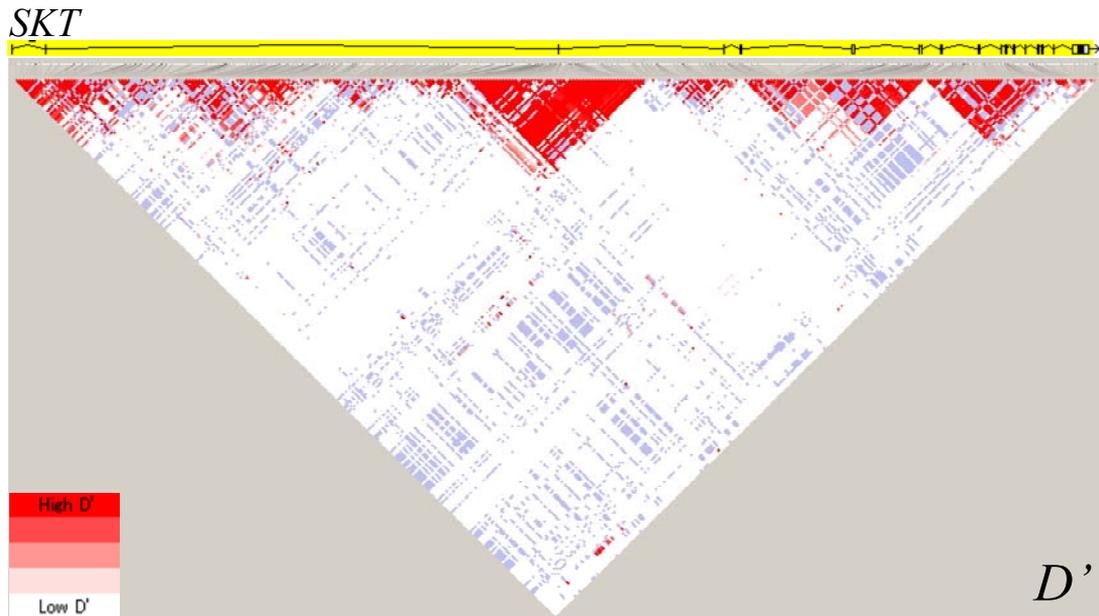
*SKT*は椎間板組織 (IVD) に特異的に発現していた。値は β -actin (*ACTB*) mRNA に対する *SKT* mRNA の割合を示す。Error bars は平均値 \pm 標準誤差を表す (n=3)。

図3 様々なヒト組織における *SKT* mRNA の real-time PCR による発現解析

3) *SKT* の連鎖不平衡ブロック (Linkage disequilibrium block; LD block) と

タグ SNP の選択

タグ SNP を選択するために、International Hapmap Project database (release 21a) より、*SKT* の遺伝子領域に存在する SNP の LD の情報を得た (図4)。*SKT* のハプロタイプを網羅できるように Haploview software 4.0 を使用しマイナーアレル頻度が 10%以上の SNP を選んだところ、339 SNP が存在した。ゲノタイピングの効率化のため pairwise tagging mode にて $r^2 > 0.80$ のタグ SNP を選んだところ、135 タグ SNP が選択された。このうち、*SKT* の遺伝子領域の 78.5%をカバーすることができる、68 タグ SNP を選択した。



SKTの領域には複数の連鎖不平衡ブロック(Linkage disequilibrium block; LD block)が存在していた。 D' は連鎖不平衡尺度を示す。

図4 SKTの連鎖不平衡ブロック

4) 日本人LDH ケース・コントロール集団に対する相関解析

相関解析として、まずLDH 188 サンプルとコントロール 188 サンプルを用いた解析を行った。それぞれのサンプルのゲノタイピングを行い、genotype モデル、dominant モデル、recessive モデル、allele frequency モデルの4モデルに対してカイ二乗検定を行ったところ、6 タグ SNP がいずれかの4つのモデルにおいてLDH に対して p 値 < 0.05 という相関を示した (表2)。

表2 LDHに対するSKTの68タグSNPの相関

dbSNP	SNPの位置	LDH				コントロール				p値 ^a			
		11	12	22	合計	11	12	22	合計	Genotype	Dominant	Recessive	Allele
rs11013977	IVS1	57	100	31	188	65	88	35	188	0.465	0.588	0.378	0.768
rs7072944	IVS2	105	69	14	188	99	78	11	188	0.581	0.535	0.535	0.804
rs16924404	IVS2	107	71	10	188	112	63	13	188	0.612	0.601	0.519	0.864
rs12414014	IVS2	52	96	40	188	55	96	36	187	0.864	0.626	0.707	0.604
rs10508672	IVS2	135	46	7	188	120	59	7	186	0.289	0.984	0.130	0.190
rs6482377	IVS2	82	86	20	188	96	71	20	187	0.282	0.134	0.986	0.259
rs2280172	IVS2	98	76	14	188	103	67	17	187	0.613	0.563	0.566	0.841
rs7913854	IVS2	93	70	25	188	89	81	17	187	0.230	0.196	0.716	0.731
rs12782581	IVS2	93	71	24	188	89	82	17	188	0.355	0.680	0.247	0.813
rs1336188	IVS2	83	79	26	188	78	90	18	186	0.314	0.213	0.666	0.780
rs11014002	IVS2	123	62	3	188	111	70	7	188	0.259	0.200	0.202	0.146
rs10764458 *	IVS2	105	75	8	188	119	53	16	188	0.026	0.091	0.141	0.605
rs220361	IVS2	131	54	3	188	147	37	4	188	0.120	0.702	0.060	0.115
rs16924466	IVS2	128	54	5	187	134	47	6	187	0.700	0.760	0.498	0.622
rs17383345	IVS2	91	81	16	188	93	82	13	188	0.844	0.562	0.837	0.689
rs11014010	IVS2	122	62	4	188	119	62	7	188	0.652	0.359	0.747	0.580
rs220366	IVS2	43	106	39	188	53	86	49	188	0.119	0.223	0.237	1.000
rs727269	IVS2	53	104	31	188	61	85	41	187	0.145	0.181	0.351	0.890
rs10828624 *	IVS2	71	96	21	188	82	73	33	188	0.037	0.078	0.248	0.940
rs7917252	IVS2	144	43	1	188	146	38	4	188	0.346	0.177	0.806	0.911
rs16924573 *	IVS2	130	56	2	188	115	61	12	188	0.016	0.006	0.104	0.021
rs2285592 *	IVS2	135	51	2	188	117	60	11	188	0.016	0.011	0.048	0.010
rs7911355	IVS2	71	91	26	188	86	81	21	188	0.280	0.436	0.117	0.127
rs7087182	IVS2	137	48	3	188	142	42	4	188	0.729	0.703	0.556	0.673
rs17469499 *	IVS2	143	44	1	188	128	52	7	187	0.050	0.031	0.100	0.038
rs720431	IVS2	127	59	2	188	117	62	7	186	0.197	0.345	0.089	0.196
rs428364	IVS2	85	82	19	186	99	78	11	188	0.193	0.120	0.178	0.089
rs7091189	IVS2	140	43	3	186	138	44	5	187	0.770	0.479	0.744	0.616
rs11014052	IVS2	77	84	27	188	69	83	35	187	0.479	0.256	0.420	0.237
rs2428307	IVS2	42	97	49	188	54	87	44	185	0.318	0.611	0.130	0.214
rs11014068	IVS2	106	67	15	188	106	71	10	187	0.573	0.307	0.953	0.643
rs7087699	IVS2	134	47	7	188	141	45	2	188	0.223	0.091	0.415	0.216
rs16924711	IVS2	152	36	0	188	147	39	2	188	0.332	0.156	0.523	0.405
rs11014072	IVS2	73	88	27	188	79	86	22	187	0.681	0.456	0.500	0.392
rs1932592	IVS2	57	90	41	188	51	91	44	186	0.252	0.208	0.147	0.093
rs7081094	IVS3	87	77	24	188	91	80	17	188	0.511	0.247	0.679	0.389
rs7902724	IVS3	100	76	12	188	111	68	9	188	0.485	0.500	0.253	0.237
rs6482390	IVS3	55	95	38	188	65	91	28	184	0.302	0.207	0.210	0.127
rs7912789	IVS3	92	80	16	188	99	77	11	187	0.539	0.325	0.438	0.312
rs991580	IVS3	135	49	4	188	125	48	10	183	0.235	0.092	0.461	0.213
rs7096689	IVS3	154	32	2	188	162	23	2	187	0.433	0.996	0.210	0.245
rs12412510	IVS3	159	26	3	188	157	30	1	188	0.522	0.315	0.778	1.000
rs3847376	IVS3	83	81	24	188	81	83	24	188	0.976	1.000	0.835	0.878
rs3858220	IVS3	116	60	12	188	113	65	9	187	0.712	0.800	0.508	0.961
rs12411459	IVS3	150	34	4	188	149	34	3	186	0.934	0.713	0.938	0.855
rs17514203	IVS3	137	48	3	188	133	48	6	187	0.590	0.308	0.706	0.521
rs7087652	IVS3	103	73	12	188	99	72	17	188	0.622	0.679	0.334	0.460
rs3762085	IVS3	93	79	16	188	91	78	17	186	0.976	0.830	0.916	0.861
rs1331291	IVS4	57	101	29	187	70	89	28	187	0.349	0.156	0.886	0.297
rs16924760	IVS4	133	50	4	187	129	52	7	188	0.633	0.363	0.597	0.451
rs10764472	IVS5	78	87	20	185	85	77	26	188	0.434	0.375	0.553	0.996
rs16924796	IVS5	147	37	4	188	139	45	3	187	0.564	0.708	0.380	0.494
rs16924809	IVS5	148	38	2	188	144	42	2	188	0.880	1.000	0.620	0.650
rs3748215	exon 6	147	39	1	187	142	44	2	188	0.698	0.565	0.478	0.445
rs12767522	IVS6	75	90	22	187	82	87	19	188	0.748	0.607	0.491	0.457
rs4586050	IVS6	40	101	47	188	50	90	48	188	0.416	0.906	0.227	0.512
rs2183696	IVS9	82	84	22	188	71	89	27	187	0.486	0.432	0.266	0.232
rs12221235	IVS9	150	36	2	188	144	41	2	187	0.801	0.996	0.513	0.547
rs7904115	IVS9	126	57	4	187	128	54	5	187	0.901	0.736	0.825	0.923
rs7078849	IVS10	127	57	4	188	131	52	5	188	0.818	0.657	0.734	0.770
rs3748217	IVS10	150	36	2	188	143	41	2	186	0.786	0.991	0.495	0.530
rs2297330	IVS11	154	29	4	187	150	36	1	187	0.272	0.177	0.596	0.903
rs2297328	exon 13	152	33	2	187	152	31	2	185	0.974	0.991	0.826	0.841
rs10828663	exon 13	159	25	4	188	153	34	1	188	0.193	0.410	0.177	0.768
rs11014141 *	IVS13	95	70	23	188	74	93	21	188	0.051	0.748	0.029	0.142
rs867040	IVS17	147	36	5	188	138	49	1	188	0.085	0.100	0.279	0.586
rs3748218	exon 19	82	84	22	188	67	102	16	185	0.124	0.330	0.145	0.534
rs1888656	IVS19	104	72	12	188	89	82	14	185	0.378	0.653	0.163	0.200

Allele1 及び Allele2 はそれぞれメジャーアレルとマイナーアレルを示す。

^a p 値は genotype、dominant、recessive と allele frequency の 4 モデルに対するカイ二乗検定の結果を示す。

* 4 モデルのうち、いずれかのモデルで p 値 < 0.05 を示した SNP を示す。

次に、その 6 タグ SNP について、LDH 337 サンプルとコントロール 376 サンプルを用いて追加ゲノタイピングを行った。合計 LDH 525 サンプルとコントロール 564 サンプルからなるサンプル集団 (Japanese A 群) の相関解析を行った。相関解析の結果、SKT の 3 タグ SNP が LDH に対して p 値 < 0.05 の相関を示した (表 3)。

表 3 LDH に対する SKT の 6 タグ SNP の相関

dbSNP	SNPの位置	LDH				コントロール				Allele Frequencyモデルの評価	
		11	12	22	合計	11	12	22	合計	p 値	オッズ比 ^a (95% 信頼区間)
rs10764458	IVS2	322	181	21	524	331	198	34	563	0.191	1.14 (0.94-1.40)
rs10828624	IVS2	214	243	68	525	228	243	93	564	0.350	1.08 (0.91-1.29)
rs16924573	IVS2	358	150	17	525	351	186	27	564	0.027	1.27 (1.03-1.58)
rs2285592	IVS2	369	141	15	525	360	184	20	564	0.031	1.27 (1.02-1.59)
rs17469499	IVS2	396	117	12	525	388	161	15	564	0.023	1.31 (1.04-1.66)
rs11014141	IVS13	233	219	73	525	223	273	68	564	0.466	1.07 (0.90-1.27)

Allele1 及び Allele2 はそれぞれメジャーアレルとマイナーアレルを示す。

^a オッズ比は Allele1 vs. Allele2 にて示す。

日本人集団において LDH と最も相関のあるタグ SNP を決定するために、3 タグ SNP に対して独立した日本人の LDH 337 サンプルとコントロール 332 サンプルからなるサンプル集団 (Japanese B 群) の相関解析を行った。SKT の 2 つのタグ SNP が LDH に対して p 値 < 0.05 の相関を示した (表 4)。

表 4 LDH に対する SKT の 3 タグ SNP の相関

dbSNP	SNPの位置	LDH				コントロール				Allele Frequencyモデルの評価	
		11	12	22	合計	11	12	22	合計	<i>p</i> 値	オッズ比 ^a (95% 信頼区間)
rs16924573	IVS2	231	92	14	337	198	116	18	332	0.021	1.37 (1.05-1.79)
rs2285592	IVS2	236	88	13	337	206	111	15	332	0.044	1.32 (1.01-1.74)
rs17469499	IVS2	240	89	8	337	235	85	12	332	0.713	1.06 (0.79-1.42)

Allele1 及び Allele2 はそれぞれメジャーアレルとマイナーアレルを示す。

^a オッズ比は Allele1 vs. Allele2 にて示す。

このうちの一つの SNP、rs16924573 の相関解析に対して Japanese A 群と Japanese B 群の異質性検定を行った。それぞれのサンプル集団間の異質性は認められなかったため (*p* 値 = 0.67) 、それぞれの相関解析の結果を Mantel-Haenszel メタ解析にて統合した。rs16924573 は allele frequency モデルにおいて最も低い *p* 値を示した (カイ二乗値 = 10.04, *p* 値 = 0.0015; オッズ比 = 1.31; 95%信頼区間, 1.11–1.55; allele frequency モデルでの比較; 表 5) 。

表 5 LDH に対する SKT の 3 タグ SNP の相関

dbSNP	SNPの位置	集団	LDH			コントロール			Allele Frequencyモデルの評価	
			1	2	合計	1	2	合計	Pooledオッズ比 ^a (95%信頼区間)	Pooled <i>p</i> 値
rs16924573	IVS2	Japanese A	866	184	1050	888	240	1128	1.31 (1.11-1.55)	0.0015
		Japanese B	554	120	674	512	152	664		
rs2285592	IVS2	Japanese A	879	171	1050	904	224	1128	1.29 (1.09-1.53)	0.0032
		Japanese B	560	114	674	523	141	664		
rs17469499	IVS2	Japanese A	909	141	1050	937	191	1128	1.21 (1.01-1.45)	0.042
		Japanese B	569	105	674	555	109	664		

Allele1 及び Allele2 はそれぞれメジャーアレルとマイナーアレルの数を示す。

^a Mantel-Haenszel メタ解析による Pooled オッズ比と 95%信頼区間は Allele1 vs. Allele2 にて示す。

SKT の遺伝子領域の連鎖不平衡 (Linkage disequilibrium; LD) の D' 値、 Δ 値を Japanese A 群のコントロール 564 サンプルのゲノタイピングの結果を用いて計算した。Japanese A 群で相関を認めた 3 タグ SNP である rs16924573、rs2285592、そして rs17469499 はそれぞれ $D' > 0.80$ の連鎖不平衡の関係にあり、3 タグ SNP は連鎖不平衡ブロックを形成していた (図 5)。

	rs16924573	0.99	0.92	
Δ	0.94	rs2285592	0.80	D'
	0.80	0.73	rs17469499	

SKT の 3 タグ SNP は連鎖不平衡ブロックを形成していた。 D' は連鎖不平衡尺度、 Δ は連鎖不平衡パラメータを表す。

図 5 SKT の 3 タグ SNP による連鎖不平衡ブロック

rs16924573、rs2285592、そして rs17469499 の 3 タグ SNP 対して日本人集団における、ハプロタイプに基づいた解析を行った。1%以上の頻度で存在する 5 つのハプロタイプにて LDH、コントロール共に 99%以上のサンプルをカバーしていた。LDH、コントロールともに最も共通したハプロタイプは GTT (LDH 80.9%、コントロール 76.9%) であり、このハプロタイプが最も低い p 値を示した (p 値 = 0.004)。しかし、この p 値は単独の SNP、rs16924573 の p 値よりも高い値を示した (表 6)。

表 6 LDH に対する SKT の 3 タグ SNP によるハプロタイプの相関

dbSNP			ハプロタイプ頻度		p 値
rs16924573	rs2285592	rs17469499	LDH	コントロール	
G	T	T	0.809	0.769	0.004
A	C	C	0.118	0.142	0.030
A	C	T	0.046	0.060	0.080
G	T	C	0.013	0.010	0.373
A	T	C	0.012	0.014	0.460

5) フィンランド人 LDH ケース・コントロール集団に対する相関解析

SNP 、rs16924573 の LDH に対する相関をフィンランド人のケース・コントロール集団に関して調べたところ、相関の再現性が得られた (p 値 = 0.026; オッズ比 = 2.81; 95%信頼区間, 1.09–7.24; allele frequency モデルでの比較; 表 7)。

表 7 フィンランド人の LDH に対する SKT の SNP rs16924573 の相関

LDH				コントロール				Allele Frequencyモデルの評価	
11	12	22	合計	11	12	22	合計	p 値	オッズ比 ^a (95% 信頼区間)
251	6	0	257	233	16	0	249	0.026	2.81 (1.09-7.24)

Allele1 及び Allele2 はそれぞれメジャーアレルとマイナーアレルを示す。

^a オッズ比は Allele1 vs. Allele2 にて示す。

SNP 、rs16924573 の相関解析に対して日本人集団とフィンランド人集団の間の異質性検定を行った。異質性は認められなかったため (p 値 = 0.27) 、それぞれの相関解析の結果を Mantel-Haenszel メタ解析にて統合した。最終的に異なる人種間において SNP 、rs16924573 は LDH に対する相関解析において有意な p

値を示す事が判明した (カイ二乗値 = 12.52, p 値 = 0.00040; オッズ比 = 1.34; 95%信頼区間, 1.14–1.58; allele frequency モデルによる比較; 表 8) 。

表 8 LDH に対する SKT の SNP rs16924573 の相関

集団	LDH				コントロール				Allele Frequencyモデルの評価	
	G	A	合計	Allele A頻度	G	A	合計	Allele A頻度	Pooledオッズ比 ^a (95% CI)	Pooled p 値
日本人 A	866	184	1050	0.175	888	240	1128	0.213		
日本人 B	554	120	674	0.178	512	152	664	0.229	1.34 (1.14-1.58)	0.00040
フィンランド	508	6	514	0.012	482	16	498	0.032		

Allele1 及び Allele2 はそれぞれメジャーアレルとマイナーアレルの数を示す。

^aMantel-Haenszel メタ解析による Pooled オッズ比と 95%信頼区間は Allele1 vs. Allele2 にて示す。

8. 考察

1) LDH 疾患感受性遺伝子の候補遺伝子としての *SKT*

Skt^{Gt}マウスのホモ接合体変異マウスにおいて、成長に伴う椎間板髄核組織の異常所見、成体マウスの尾椎に認められる表現型 (鎌状尻尾) 、そして*Skt*遺伝子及び*Skt*タンパクの発現パターンに基づき、*Skt*^{Gt}マウスをLDHの疾患モデル動物と考え、*Skt*のヒトホモログである*SKT*をLDHの感受性遺伝子の候補遺伝子とした、合計2,200人以上のLDHのケース・コントロール集団に対する相関解析を行った。相関解析に先立ち行われた、様々なヒト組織における*SKT* mRNAの発現パターンの解析では、*SKT* mRNAは椎間板組織に特異的に発現していた。mRNAの発現パターンの解析については、椎間板組織に特異的に、もしくは豊富に発現している遺伝子がLDHの疾患感受性遺伝子であることが判明した報告が複数存在する(10,11,13) 。このことから*SKT*の組織発現パターンは、*SKT*がLDHの感受性遺伝子の候補遺伝子となる仮説を支持するものであった。

2) LDHに対する*SKT*の疾患関連SNP

*SKT*の遺伝子領域のハプロタイプを網羅するタグSNPを用いたLDHのケース・コントロール相関解析により、*SKT*が異なる人種間においてもLDHに対して関連している事が明らかになった。我々は研究の効率化のために、最小限の数のSNPで*SKT*の遺伝子領域のハプロタイプを最大限に網羅しようと試みた。

International Hapmap Project database (release 21a) の情報から選択された139タグ SNPの中から、1 SNPあたりの情報量が少ないと考えられる他のSNPとの連鎖が無いsingleton SNPを省略し、68タグSNPを選択した。その結果、SKTの遺伝子領域における $r^2 > 0.80$ のタグSNPのうち、約20%を網羅することが出来なかった。そのため、解析が出来なかった領域にLDHに対して真に関連するSNP (疾患関連SNP) が存在している可能性がある。しかしながら、

1. 独立した二つの日本人集団でのケース・コントロール相関解析にてそれぞれの集団で相関が認められた事
2. 単点のSNP、rs16924573の相関解析の結果がハプロタイプの相関解析の結果より低い p 値を示したため、より相関を持つ他のSNPが存在する可能性が低い事
3. フィンランド人集団でのケース・コントロール相関解析にて再現性が得られた事

以上の三点より、SKTの遺伝子領域の中に存在するタグSNP、rs16924573がLDHと最も有意に相関していることが示唆された。一方、限られた領域のSNPは連鎖している。そのため、疾患関連SNPがrs16924573の他に存在する場合、rs16924573はその疾患関連SNPと連鎖しているために有意な p 値を示したマーカーSNPであるに過ぎない、という可能性も否定はできない。今後、SNP rs16924573が疾患関連SNPである事を明らかにするためには、SKTの遺伝子領域の中に存在する全てのタグSNPに対する網羅的な解析、さらにはInternational Hapmap Project database上には登録されていないがSKTの遺伝子領域に存在している未知のSNPをゲノ

ムシークエンスにより探索し、その解析を行う事などが必要になると考えられる。SNP rs16924573がLDHに対する疾患関連SNPであることが証明された後は、イントロンに存在するSNPがどのようにしてSKTの機能を損なわせているのか新たな研究を進めることにより、SKTの機能やLDHの発症機序などが解明されることが期待される。

3) 異人種間における再現研究

相関解析において疾患感受性遺伝子の存在を確実に証明するためには、いくつかの独立したケース・コントロール集団で再現研究が行われ、それぞれの集団で再現性が得られることが非常に重要である。また、独立したケース・コントロール集団を再現研究に用いる際には、それぞれの集団が作成される際の診断基準が統一化されている必要がある。LDHに対する相関解析において、異人種間の再現研究で再現性が得られなかった報告では、その原因として

1. LDHという疾患に対して明確な定義が存在しないため、それぞれのケース・コントロール集団の間に疾患の異質性が存在したため

2. SNPにおける異人種間のアレル頻度の相違が存在したため

と述べられている (15,22) 。本研究における日本とフィンランドのケース・コントロール集団のケースサンプルに対する診断基準は基本的に同一であった。どちらのケースサンプルもMRIによりLDHが確認されており、椎間板由来の片側下肢痛 (坐骨神経痛) を有していた。日本人集団で認められたSKTのタグSNP、

rs16924573のLDHに対する相関がフィンランド人でも再現性が得られ、メタ解析の結果有意な p 値を示した事で、*SKT*が多人種に渡ってLDHの発症に関与している事が示唆された。ただし、日本とフィンランドにおいて、SNP rs16924573のアレル頻度やオッズ比における人種間の相違は大きかった。今後は*SKT*の遺伝子領域に存在するSNPの重要性やその全人類的な影響を更に調べるために、他の人種におけるケース・コントロール相関解析や、LDHに対する*SKT*の分子的機序の解析が必要となる。

4) 椎間板組織における*SKT*の機能

椎間板は恒常的に機械的なストレスを受けており、そのストレスに耐えるために高度に構造化された細胞外マトリックスを有し、脊椎の衝撃吸収機構として機能している。細胞外マトリックスでは高度に構成された線維性コラーゲンなどの構造化タンパクが張力に対する強さを呈する一方で、高度に水を含んだ凝集したプロテオグリカンが全体的なストレスを吸収する (23, 24)。椎間板髄核細胞の細胞骨格や細胞外マトリックスの構造的な整合性、または椎間板髄核細胞や細胞外マトリックスにおける様々なタンパク同士の生理的な相互作用などが椎間板の機能の維持には必須と考えられる。

*SKT*は1,264アミノ酸から成る分子量137 kDaと推定されるタンパクであり、coiled-coilドメインとproline-rich領域を有する。*SKT*の椎間板における特異的な機能や、LDHの病因・発症機序に対して果たす役割は明らかではない。*SKT*のア

ミノ酸配列はBLASTサーチにてSNIP (SNAP-25-interacting protein) タンパクと42.2%のアミノ酸の相同性を有している。SNIP は分子量145 kDaの親水性のタンパクで、2つのcoiled-coilドメインと2つの高電荷な領域、そして2つのproline-rich領域を有する。SNIPは脳の細胞骨格と強固に結合しているが、神経伝達物質の放出や神経突起の伸長に関わるSNAP-25タンパクとcoiled-coilメカニズムを通じて結合する。SNIPは脳細胞およびSNAP-25との相互作用を通じて、神経分泌の制御に関わっている事が示唆されている (25) 。SKTと相同性が高いSNIPタンパクの機能を考慮すると、正常な機能を失ったSKT が椎間板髄核細胞の細胞骨格複合体を形成することが出来なくなることや、他のタンパクと結合できなくなり、椎間板の機能維持に必要な他のタンパクとの相互作用が出来なくなことは予測される。そのようなSKTの機能不全は椎間板髄核細胞の機能不全を通して、LDHの発症へとつながる事も考えられる。*Skt^{Gt}*マウスは今後、in vivoにおけるSKTの作用機序やLDHの発症機序などを明らかにする非常に有用なツールとなることが期待される。

9. 結語

本研究では、*Skf* ノックアウトマウスの表現型、及び *Skf* のヒトホモログである *SKT* のヒト組織における発現パターンをもとに、*SKT* を LDH の疾患感受性遺伝子の候補遺伝子と考え、日本人およびフィンランド人から成る独立した 3 群の LDH のケース・コントロール集団に対して、*SKT* のケース・コントロール相関解析を行った。*SKT* のイントロン 2 に存在する SNP、rs16924573 が有意な相関を示した事より、LDH の発症に *SKT* が関与していることが強く示唆された。

10. 参考文献

1. The International HapMap Consortium 2005 A haplotype map of the human genome. Nature 437, 1299-1320
2. The International HapMap Consortium 2007 A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. Nature 449,851-861
3. Anderson GB 1999 Epidemiological features of chronic lowback pain. Lancet 354:581–585.
4. Saal JA, Saal JS 1989 Nonsurgical treatment of herniated lumbar intervertebral disc with radiculopathy. An outcome study. Spine 14:431–437.
5. Varlotta GP, Brown MD, Kelsey JL, Golden AL 1991 Familial predisposition for herniation of a lumbar disc in patients who are less than twenty-one years old. J Bone Joint Surg Am 73:124-128.
6. Matsui H, Kanamori M, Ishihara H, Yudoh K, Naruse Y, Tsuji H 1998 Familial predisposition for lumbar degenerative disc disease. A case-control study. Spine 23:1029-1034.
7. Battie MC, Haynor DR, Fisher LD, Gill K, Gibbons LE, Videman T 1995 Similarities in degenerative findings on magnetic resonance images of the lumbar spines of identical twins. J Bone Joint Surg Am 77:1662–1670.
8. Simmons ED Jr, Guntupalli M, Kowalski JM, Braun F, Seidel T 1996 Familial

- predisposition for degenerative disc disease. A case-control study. *Spine* 21:1527-1529.
9. Sambrook PN, MacGregor AJ, Spector TD 1999 Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: A magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum* 42:366–372.
 10. Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, Mikami Y, Kizawa H, Oya T, Mio F, Mori M, Miyamoto Y, Masuda I, Tsunoda T, Kamata M, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Nakamura Y, Ikegawa S 2005 A functional SNP in *CILP*, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nat Genet* 37:607–612.
 11. Mio F, Chiba K, Hirose Y, Kawaguchi Y, Mikami Y, Oya T, Mori M, Kamata M, Matsumoto M, Ozaki K, Tanaka T, Takahashi A, Kubo T, Kimura T, Toyama Y, Ikegawa S 2007 A functional polymorphism in *COL11A1*, which encodes the $\alpha 1$ chain of type XI collagen, is associated with susceptibility to lumbar disc herniation. *Am J Hum Genet* 81:1271–1277.
 12. Song YQ, Cheung KM, Ho DW, Poon SC, Chiba K, Kawaguchi Y, Hirose Y, Alini M, Grad S, Yee AF, Leong JC, Luk KD, Yip SP, Karppinen J, Cheah KS, Sham P, Ikegawa S, Chan D 2008 Association of the asporin D14 allele with lumbar-disc degeneration in Asians. *Am J Hum Genet* 82:744–747.
 13. Hirose Y, Chiba K, Karasugi T, Nakajima M, Kawaguchi Y, Mikami Y, Furuichi T,

- Mio F, Miyake A, Miyamoto T, Ozaki K, Takahashi A, Mizuta H, Kubo T, Kimura T, Tanaka T, Toyama Y, Ikegawa S 2008 A functional polymorphism in *THBS2* that affects alternative splicing and MMP binding is associated with lumbar-disc herniation. *Am J Hum Genet* 82:1122–1129.
14. Semba K, Araki K, Li Z, Matsumoto K, Suzuki M, Nakagata N, Takagi K, Takeya M, Yoshinobu K, Araki M, Imai K, Abe K, Yamamura K 2006 A novel murine gene, *Sickle tail*, linked to the *Danforth's short tail* locus, is required for normal development of the intervertebral disc. *Genetics* 172:445–456.
15. Virtanen IM, Song YQ, Cheung KM, Ala-Kokko L, Karppinen J, Ho DW, Luk KD, Yip SP, Leong JC, Cheah KS, Sham P, Chan D 2007 Phenotypic and population differences in the association between *CILP* and lumbar disc disease. *J Med Genet* 44:285–288.
16. Ohnishi Y, Tanaka T, Ozaki K, Yamada R, Suzuki H, Nakamura Y 2001 A high-throughput SNP typing system for genomewide association studies. *J Hum Genet* 46:471–477.
17. Excoffier L, Slatkin M 1995 Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 12:921–927.
18. Miyamoto Y, Shi D, Nakajima M, Ozaki K, Sudo A, Kotani A, Uchida A, Tanaka T, Fukui N, Tsunoda T, Takahashi A, Nakamura Y, Jiang Q, Ikegawa S 2008 Common variants in *DVWA* on chromosome 3p24.3 are associated with

- susceptibility to knee osteoarthritis. *Nat Genet* 40:994–998.
19. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN 2003 Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 33:177–182.
20. Woolson RF, Bean JA 1982 Mantel-Haenszel statistics and direct standardization. *Stat Med* 1:37-39
21. Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, Ortmann WA, Koeuth T, Gonzalez Escribano MF 2006 A common haplotype of interferon regulatory factor5 (*IRF5*) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet* 38:550–555.
22. Seki S, Kawaguchi Y, Mori M, Mio F, Chiba K, Mikami Y, Tsunoda T, Kubo T, Toyama Y, Kimura T, Ikegawa S 2006 Association study of *COL9A2* with lumbar disc disease in the Japanese population. *J Hum Genet* 51:1063–1067.
23. Kempson GE, Muir H, Pollard C, Tuke M 1973 The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* 28:456–472.
24. Schmidt MD, Mow VC, Chun LE, Eyre DR 1990 Effects of proteoglycan extraction on the tensile behavior of articular cartilage. *J Orthop Res* 8:353–363.
25. Chin LS, Nugent RD, Raynor MC, Vavalle JP, Li L 2000 SNIP, a novel

SNAP-25-interacting protein implicated in regulated exocytosis. *J Biol Chem*

275:1191–1200.