

19990582

厚生省特定疾患対策研究事業

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

平成11年度研究報告書

平成12年3月

主任研究者 原 田 征 行

厚生省特定疾患対策研究事業

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

平成11年度研究報告書

主任研究者 原 田 征 行

目 次

班員構成

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究	1
-----------------------	---

総括研究報告書

主任研究者 原田征行	3
------------------	---

分担研究報告書

1. 遺伝子解析

脊柱後縦靱帯骨化症の相関解析：ヒト第6染色体MHC領域の

マイクロサテライトマーカーによる原因遺伝子探索	5
-------------------------------	---

東海大学医学部分子生命科学2

山形 哲司, 猪子 英俊

信州大学医学部法医学教室

太田 正穂

信州大学病院薬剤部

勝山 善彦

鹿児島大学医学部ウイルス学

屋敷 伸治, 園田 俊郎

鹿児島大学医学部整形外科

古賀 公明, 松永 俊二, 武富 栄二, 酒匂 崇

SNP(single nucleotide polymorphism)によるハプロタイプの作成	11
---	----

愛媛大学医学部老年医学講座

三木 哲郎

脊柱靱帯骨化前駆病変におけるオステオポンチン遺伝子の発現と局在

—twyマウスを用いた解析—	13
----------------------	----

千葉大学医学部整形外科

相庭 温臣, 山崎 正志, 大河 昭彦, 茂手木博之, 中島 新, 守屋 秀繁

脊柱靱帯骨化症におけるレプチン受容体遺伝子多型の解析	18
----------------------------------	----

千葉大学整形外科

大河 昭彦, 山崎 正志, 相庭 温臣, 池田 義和, 後藤 澄雄, 守屋 秀繁

後縦靱帯骨化症のゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析

—ヒト21番染色体への局在同定—	21
------------------------	----

弘前大学整形外科

猪狩 勝則, 古島 弘三, 原田 征行

鹿児島大学整形外科

前田 真吾, 古賀 公明, 小宮 節郎

群馬大学生体調節研究所

井ノ上逸朗

SNPsを用いたOPLL散発症例における

コラーゲン11 α 2遺伝子の疾患感受性に関する解析	24
---	----

徳島大学医学部整形外科

酒井 紀典, 井形 高明, 加藤 真介, 西良 浩一

徳島大学医学部分子栄養学講座

田中 知里, 片島 るみ, 吉本 勝彦

徳島大学ゲノム機能研究センター遺伝情報分野

板倉光夫

II. 骨形成因子

Zucker Fatty Ratの異所性石灰化アキレス腱における 石灰化関連因子の遺伝子発現及び病理学的検討	27
東京医科大学整形外科 今給黎篤弘, 渡辺 健, 西野 誠一, 正岡 利紀, 山本 謙吾	
Zucker Fatty Ratの異所性石灰化アキレス腱における 分化増殖因子の検討	31
東京医科大学整形外科 西野 誠一, 今給黎篤弘, 山本 謙吾, 渡辺 健	
脊柱靭帯骨化におけるMatrix Gla Proteinの関与	34
山口大学整形外科 白倉 祥晴, 田中 浩, 坪根 徹, 市原 和彦, 杉山 聡宏, 森信 謙一, 脇阪 敦彦, 田口 敏彦, 河合 伸也	
年齢・肥満度と独立したインスリン反応性とOPLL骨化傾向	37
東京大学医学部整形外科 中村 耕三, 阿久根 徹, 緒方 直史, 川口 浩, 星地重都司, 大西五三男	
IRS-1, -2の骨代謝調節機構の解明 —ノックアウトマウスを用いた解析—	39
東京大学医学部整形外科 中村 耕三, 緒方 直史, 川口 浩, 阿久根 徹, 星地重都司, 大西五三男	
TWYマウス原因遺伝子NPPSのOPLLへの関与	43
鹿児島大学医学部整形外科学教室 前田 真吾 弘前大学医学部整形外科学教室, 群馬大学生体調節研究所調節機構部門遺伝情報分野 猪狩 勝則, 古島 弘三 弘前大学医学部整形外科学教室 原田 征行 鹿児島大学医学部整形外科学教室 古賀 公明, 松永 俊二, 小宮 節郎 群馬大学生体調節研究所調節機構部門遺伝情報分野 井ノ上逸朗	
レプチン受容体 (OB-Rb) 欠損マウス・db/dbマウスにおける 脊柱靭帯の形態的観察 (第2報)	47
千葉大学医学部整形外科 中島 新, 山崎 正志, 相庭 温臣, 清水 純人, 大河 昭彦, 守屋 秀繁 良性骨芽細胞腫に隣接して生じた黄色靭帯骨化症の検討 —骨形成因子の関与—	50
大阪大学整形外科 奥田 真也, 和田 英路, 有賀 健太, 中瀬 尚長, 米延 策雄 大阪警察病院整形外科 宮本 紳平	
後縦靭帯骨化の発生・進展における軟骨由来成長因子CTGF/Hcs24の役割	52
弘前大学整形外科 山本 祐司, 植山 和正, 丹野 雅彦, 赤石 孝一, 原田 征行 弘前大学薬理学 古川 賢一 岡山大学歯学部口腔生化学 中西 徹, 滝川 正春	

ttwマウスの脊柱靭帯骨化に対するEtidronate(EHDP)の効果について(第1報)	56
弘前大学整形外科	
平川 均, 原田 征行, 植山 和正, 岡田 晶博	
四肢短縮型小人症における脊柱靭帯骨化症の解析	58
東京医科歯科大学整形外科	
河内 敏行, 高橋 誠, 小森 博達, 四宮 謙一	
マウス関節症モデルでの靭帯付着部骨化過程におけるpro α 2(XI)collagenの発現	61
九州大学整形外科	
岡崎 賢, 神宮司誠也, 占部 憲, 坂井 宏旭, 平田 剛, 岩本 幸英	
肥大軟骨細胞由来の成長因子Hes24/CTGFの内軟骨性骨化促進作用	63
岡山大学歯学部口腔生化学中央研究施設	
滝川 正春	
岡山大学歯学部口腔生化学	
中西 徹	
岡山大学歯学部中央研究施設	
西田 崇	
ヒストン蛋白脱アセチル化酵素阻害剤による骨分化マーカーに与える影響	68
和歌山県立医科大学整形外科教室	
南 晋司, 坂田 亮介, 玉置 哲也	
脊柱靭帯骨化症の成因に関する研究 —内軟骨性骨化過程に発現する新規因子の探索— ...	70
東京慈恵会医科大学整形外科	
小谷野康彦, 藤井 克之	

Ⅲ. 軟骨基質

ヒト黄色靭帯小型プロテオグリカンの構造解析	73
弘前大学医学部整形外科	
湯川 昌広, 原田 征行, 植山 和正, 板橋 泰斗	
ヒト黄色靭帯プロテオグリカンの特性とエラスチンとの親和性	77
弘前大学整形外科	
板橋 泰斗, 原田 征行, 植山 和正, 湯川 昌弘	
弘前大学第一生化学	
高垣 啓一, 遠藤 正彦	

Ⅳ. 細胞とメカニカルストレス

メカニカルストレスに起因する骨棘形成過程における骨形成因子および	
レセプター遺伝子の発現様式 —マウス脊椎症モデルを用いた解析—	81
大阪大学整形外科	
中瀬 尚長, 有賀 健太, 奥田 真也, 米延 策雄	
大阪労災病院整形外科	
岩崎 幹季	
大阪警察病院整形外科	
宮本 紳平	
メカニカルストレスに起因する骨棘形成過程における軟骨性コラーゲン遺伝子の発現様式	
—マウス脊椎症モデルを用いた解析—	83
大阪大学整形外科	
有賀 健太, 中瀬 尚長, 奥田 真也, 米延 策雄	
大阪労災病院整形外科	
岩崎 幹季	
大阪警察病院整形外科	
宮本 紳平	

後縦靭帯骨化症の骨化の発生・進展におけるメカニカルストレスの影響	85
弘前大学医学部整形外科	
丹野 雅彦, 植山 和正, 原田 征行	
弘前大学医学部薬理学	
古川 賢一, 元村 成	

V. 脊髄の可塑性と脊髄機能

脊髄, 白質, 灰白質の力学特性	89
山口大学整形外科	
市原 和彦, 河合 伸也	
後縦靭帯骨化症実験モデル(twy/twy)における脊髄内軸索再生 および組織修復に関する統合的研究	90
福井医科大学医学部整形外科	
内田 研造, 馬場 久敏, 前沢 靖久, 久保田 力, 吉澤今日子	
岐阜薬科大学分子生物学	
古川 昭栄	
慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)における脊髄細胞のアポトーシスと脊髄変性の進展	93
鹿児島大学医学部整形外科教室	
米 和徳, 中原 真二, 山浦 一郎, 石堂 康弘, 小宮 節郎, 松永 俊二	
圧迫性脊髄損傷におけるBDNF, TrkBの発現, 局在とその役割	95
千葉大学医学部整形外科	
池田 修, 山崎 正志, 村上 正純, 国府田正雄, 守屋 秀繁	
脳脊髄液中のヒアルロン酸濃度について	102
弘前大学医学部整形外科	
菊池 明, 原田 征行, 植山 和正	
頸椎後縦靭帯骨化症における髄液中Nitric oxide(NO)濃度の検討	105
国立岡山病院整形外科	
弓手 康正, 中原進之介, 田中 雅人	

VI. OPLL患者のQOLと骨髄症機能評価

健康関連QOL測定による頸髄症患者の術後評価	107
福井医科大学医学部整形外科	
前沢 靖久, 内田 研造, 古澤 修章, 小久保安朗, 久保田 力, 吉澤今日子, 馬場 久敏	
頸椎OPLL患者における上位頸椎異常可動性について	109
鹿児島大学整形外科	
瀬戸口啓夫, 井尻 幸成, 松永 俊二, 小宮 節郎	
脊髄誘発電位を用いた脊柱靭帯骨化症例の術前責任高位診断	111
千葉大学整形外科	
米田みのり, 山崎 正志, 中島 秀之, 相庭 温臣, 田村 晋, 村上 正純, 守屋 秀繁	
国立静岡病院整形外科	
南 徳彦	
胸椎後縦靭帯骨化症例に対する後方除圧固定術の成績と適応	115
千葉大学医学部整形外科	
山崎 正志, 池田 義和, 大河 昭彦, 中島 秀之, 国府田正雄, 米田みのり, 相庭 温臣, 天野 景治, 田村 晋, 後藤 澄雄, 守屋 秀繁	

胸椎後縦靱帯骨化症の手術的治療 —特に骨化形態別の治療成績場—	119
名古屋大学医学部整形外科学教室	
松山 幸弘, 岩田 久	
青森県内の頸椎OPLL患者のQOL調査について	121
弘前大学整形外科	
黒川 智子, 原田 征行, 植山 和正, 岡田 晶博, 横山 徹	
胸椎後縦靱帯骨化症に対する後方手術例の追跡調査	129
北海道大学大学院医学研究科機能回復医学講座運動器再建医学分野整形外科	
鏡 邦芳, 須田 浩太, 金田 清志	
後縦靱帯骨化症に対する頸椎en bloc laminoplastyの検討	
—術後の骨化巣の推移と臨床症状との関連—	131
富山医科薬科大学医学部整形外科	
川口 善治, 金森 昌彦, 石原 裕和, 大森 一生, 中村 宏, 杉森 一仁, 木村 友厚	
頸椎後縦靱帯骨化症に対する頸部脊柱管拡大術のX線学的検討	
—頸椎アライメントと可動域との相関について—	134
九州大学整形外科	
前田 健, 有菌 剛, 齋藤 太一, 神宮司誠也, 岩本 幸英	
頸椎後縦靱帯骨化症患者の経頭蓋電気刺激脊髄誘発電位術中変化と 予後の関連について	137
和歌山県立医科大学整形外科	
岩崎 博, 玉置 哲也, 野村 和教, 筒井 俊二, 高見 正成	
頸椎前方除圧固定術後の骨癒合過程の検討 —頸椎症と後縦靱帯骨化症の比較—	141
京都大学整形外科	
松下 睦, 根尾 昌志, 中村 孝志	
急性頸髄損傷をきたした頸椎後縦靱帯骨化症の検討	
：特に先天的脊椎管狭窄の関与について	144
北海道大学脳神経外科	
小柳 泉, 飛驒 一利, 岩崎 喜信, 阿部 弘	
胸椎部脊柱管内靱帯骨化症の多数回手術例の検討	149
慶應義塾大学整形外科	
藤村 祥一, 松本 守雄, 戸山 芳昭	
頸椎後縦靱帯骨化症に対する椎弓形成術の手術成績とQOL	152
慶應義塾大学整形外科	
藤村 祥一	
名古屋市立大学看護学部	
藤原奈佳子	
弘前大学整形外科	
原田 征行, 植山 和正	

VII. 疫学調査

中国における頸椎後縦靱帯骨化症の疫学調査	157
弘前大学整形外科	
植山 和正, 原田 征行, 岡田 晶博, 越後谷直樹, 横山 徹, 李 勤	
北京医科大学第4臨床医学院積水澤医院	
田 偉, 榮 國威, 賈 佑民	
北京医科大学第3医学院	白求恩医科大学
党 耕町	劉 世文
広州軍区流花橋医院	成都軍区昆明慈医院
劉 少喻	周 中英

後縦靭帯骨化症の疫学的研究 ―日常生活動作能力(ADL)と健康関連QOL尺度(SF-36)の
 関連および社会資源利用状況について― 161

名古屋市立大学看護学部 藤原奈佳子	山口大学医学部整形外科 河合 伸也
弘前大学整形外科 原田 征行, 植山 和正	徳島大学医学部整形外科 井形 高明
東京医科大学整形外科 今給黎 篤弘	名古屋大学医学部整形外科 岩田 久
東邦大学医学部整形外科 岡島 行一	北海道大学医学部整形外科 金田 清志
富山医科薬科大学整形外科 木村 友厚	東京医科歯科大学整形外科 四宮 謙一
九州大学医学部整形外科 神宮司誠也	和歌山県立医科大学整形外科 玉置 哲也
国立岡山病院整形外科 中原進之介	東京大学医学部整形外科 中村 耕三
京都大学医学部整形外科 中村 孝志	福井医科大学整形外科 馬場 久敏
北海道大学医学部脳神経外科 飛驒 一利	東京慈恵会医科大学整形外科 藤井 克之
慶應義塾大学医学部整形外科 藤村 祥一	鹿児島大学医学部整形外科 松永 俊二
千葉大学医学部整形外科 守屋 秀繁	大阪大学医学部整形外科 米延 策雄

研究成果の刊行に関する一覧表165

参考：平成11年度班会議プログラム171

班 員 構 成

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	原田 征行	弘前大学医学部整形外科	教 授
分担研究者	猪子 英俊 今給黎篤弘 河合 伸也 中村 耕三 馬場 久敏 松永 俊二 三木 哲郎 守屋 秀繁 米延 策雄 井ノ上逸朗	東海大学医学部分子生命科学2 東京医科大学整形外科 山口大学医学部整形外科 東京大学医学部整形外科 福井医科大学整形外科 鹿児島大学医学部整形外科 愛媛大学医学部老年医学 千葉大学医学部整形外科 大阪大学医学部整形外科 群馬大学生体調整研究所調節機構部門遺伝情報分野	教 授 〃 〃 〃 〃 講 師 教 授 〃 助 教 授 〃
研究協力者	井形 高明 岩田 久 植山 和正 遠藤 正彦 岡島 行一 金田 清志 木村 友厚 四宮 謙一 神宮司誠也 滝川 正春 玉置 哲也 中原進之介 中村 孝志 飛驒 一利 藤村 祥一 藤原奈佳子 藤井 克之 元村 成	徳島大学医学部整形外科 名古屋大学医学部整形外科 弘前大学医学部整形外科 弘前大学医学部生化学第一 東邦大学医学部整形外科 北海道大学医学部整形外科 富山医科薬科大学整形外科 東京医科歯科大学整形外科 九州大学医学部整形外科 岡山大学歯学部口腔生化学 和歌山県立医科大学整形外科 国立岡山病院整形外科 京都大学医学部整形外科 北海道大学医学部脳神経外科 慶應義塾大学医学部整形外科 名古屋市立大学看護学部 東京慈恵会医科大学整形外科 弘前大学医学部薬理学	教 授 〃 講 師 教 授 〃 〃 〃 〃 助 教 授 教 授 〃 部 長 教 授 講 師 助 教 授 〃 教 授 〃
(事務局) 経理事務連絡 担当責任者	原田 征行	弘前大学医学部整形外科 〒036-8562 青森県弘前市在府町5 TEL：0172-39-5083 FAX：0172-36-3826	教 授

総括研究報告書

総括研究報告書

主任研究者 原田 征行

研究目的：

脊柱靱帯骨化症の発症原因は不明である。脊柱靱帯の異常骨化の原因を追及するために種々のアプローチで検討してきた。日本人、アジア系人種に多く見られることから、遺伝子解析を行い多因子遺伝形式であることが判明していることから原因遺伝子の同定を行う。異常骨化における骨形成因子について、全身的要因、局所的要因について明らかにする。

実験動物、靱帯細胞培養などの手法を用いて細胞生物学的、分子細胞学的に各種骨形成サイトカイン、蛋白、軟骨基質の分析、細胞へメカニカルストレスと骨形成能を検討する事を目的とした。臨床的検討では、骨化によって慢性圧迫を受けた脊髄変形と、機能回復について脊髄可塑性について検討する。臨床症状をJOAスコアに基づき5段階に分析したが、更に実状に見合った評価法を確立し、Evidens Based Medicineの臨床評価を行うことを目的とした。治療後、及び経過観察中も含めて、患者の高齢化と患者のQOL、AOLの向上、改善を図る。班員、協力員及び全国の脊椎外科医の協力でOPLL患者の全国的調査を行う。また患者・家族の会とも密接な関係を持ちながら社会資源利用状況調査と生涯の適正な評価・支援体制を確立する。これまで中国の疫学調査を行ってきたが、中国全土に亘る発生状況を調査する。

研究方法：

研究内容により、遺伝子解析、骨形成因子、軟骨基質、細胞とメカニカルストレス、脊髄の可塑性について、QOL、AOL調査及び疫学調査の研究グループで、班員、協力員をそれぞれのグループに配属し情報交換、サンプルの融通などで共同研究体制で行ってきた。グループ研究テーマ以外でもそれぞれの研究テーマについて研究を進めた。その成果は分科会、総会で発表した。遺伝子解析は井上を中心に、原因遺伝子解析を行った。他因子遺伝子形式とされているが、これまでに第6染色体上のコラーゲン11A2とその近傍にRetinoinn X Receptor β (RXR-b)を同定した。更に第21染色体p22.1領域に強い連鎖を見いだして分析した。ゲノム全域を網羅する遺伝カーカーを使い連鎖解析をおこなった。骨形成因子の全身因子、局所因子について、動物実験、靱帯培養細胞について、各種サイトカインの添加、あるいは遺伝子発現について検討した。全身的要因として特に中村（耕）はインスリンの作用について検討しその他、レプチン、ビタミンAと靱帯骨化について検討した。局所因子とした、BMP、TGF-b、b-FGF、IGF-1などの骨形成サイトカインについて添加実験、及び遺伝子発現を検討した。靱帯培養細胞の手法が確立され、細胞生物学的、分子細胞学的研究が行われた。また局所的因子として靱帯付着部での骨化形態を原田、中村（孝）は局所にかかるメカニカルストレスとの関係について検討した。これまで細胞の形態、変化が検討されてきたが、細胞基質についての研究が遅れていた事から、藤井、原田は軟骨細胞基質におけるプロテオグリカンの加齢変化、コラーゲンについて解析した。慢性圧迫を脊髄の変形と脊髄機能について、馬場、米は脊髄の可塑性の動物実験、免疫組織学的検討を行った。原田は脊髄保護作用を有するとされる、脊髄液中のヒアルロンサンの変化について検討した。脊髄症の機能評価はこれまでJOAスコアで評価されてきたが、必ずしも的確な評価方では無いことから、河合、藤村、藤原を中心に班員、協力員、及び全国の脊椎外科の協力を得て主治医及びOPLL患者のアンケート調査を行った。また患者、家族の会とも密接な関係を取りながら、疾患の啓蒙・医療相談・研究班の研究成果などを公表する事で、社会資源の利用状況調査と障害の評価・支援体制を確立しようとした。中国内の疫学調査は、原田、植山が中国内医師の協力と理解でこれまで7年間に亘り、中国内、北の長春から内モンゴル、赤峰、北京、海南島で調査を行ってきた。8年目の1999年昆明の調査でほぼ中国全土に亘るピンポイント調査が完成した。

結果と考察：

これまで原因遺伝子として第6染色体上にコラーゲン11A2とその近傍にビタミンA受容体である Retinoic acid X Receptor- β (RXR- β) 遺伝子を同定した。第6染色体MHC領域のマイクロサテライトマーカーによる原因遺伝子の検索を行った。また第21染色体上にも強い連鎖反応がみられ他の遺伝子を分析中である。

IRS-1マウス（インスリン受容体マウス）による実験で骨代謝回転維持に重要な役割があることが判明した。

全身的因子としてインスリンの作用が骨化とは密接な関連が推察された。

靭帯培養細胞から各種サイトカインの骨形成能が証明された。サイトカインの遺伝子発現から骨化形態を研究した。軟骨細胞層にCTGF- β (Connective Tissue TGF- β) を検出したことから、靭帯骨化は内軟骨性骨化形態を取ることが証明された。

軟骨基質の分析でプロテオグリカンの加齢的变化から、新しいデコリンを抽出した。デコリンは細胞の増殖・分化・脱分化、あるいは基質合成に対するシグナルが、基質蛋白との接触によって調節を受けるという、いわゆる cell-matrix interaction が骨化のトリガーとなることが示唆された。新しいデコリンの分子構造を解析中である。

メカニカルストレスが細胞に与える影響は、正常靭帯と骨化靭帯培養細胞では進展刺激で骨形成遺伝子発現が異なった。このことから進展刺激が骨化形成に何らかの関係があると推察された。脊髄可塑性について、慢性圧迫された脊髄灰白質内で、軸索再生、修復機転の発生が示唆された。

頸椎OPLL患者の全国調査から患者のQOL, AOLを如何に向上、維持するかが課題である。高齢化するOPLL患者の増加に対し、脊髄症評価の見直しを検討中でEvidens Based Medicineに基づいた評価で、社会資源利用状況に反映する。

中国での疫学調査では開始して8年後の本年で中国全体の地域性のピックアップ調査を完了した。即ち東北部の長春、内モンゴルの赤峰、ウランホット、中心部に近い北京、南部の海南島、西方の昆明で、漢民族を中心に各民族を調査した。中国全体の発生率は本邦とほぼ同様であった、中国内ではモンゴル民族に多く、地域性では東北で多く南方では少ない傾向であった。

結 論

本研究班の最も大きな目標であった原因遺伝子解析は進行している。第6染色体上のコラーゲン11A2とその近傍にビタミンA受容体遺伝子RXR- β を同定した。しかしさらに第21染色体上でも強い連鎖反応みているので、関連遺伝子として検索を進める。骨形成因子とその遺伝子発現については各種サイトカインの発現、タンパクの作用、全身的因子などの関与が明らかとなった。細胞基質の解析が進み、加齢に伴う変化と骨化は密接な関連があることが証明された。細胞とメカニカルストレスは全く新しい分野の研究であり、培養細胞を使用して積極的に研究を進めたが、これまでには明らかな骨化との関係は見いだせなかった。脊髄機能回復機序について脊髄可塑性の基礎的研究が進展しつつある。臨床的研究は患者のQOL, AOL向上を目指し、治療法の開発、治療成績の新しい評価法を作成中である。これらの成果を元にEvidens Based Medicineに基づいた社会資源の効果的な再利用を図る。年度計画は着実に実行され成果をあげた。

分担研究報告書

I

遺伝子解析

脊柱後縦靭帯骨化症の相関解析：ヒト第6染色体MHC領域のマイクロサテライトマーカーによる原因遺伝子探索

山形 哲司（東海大学医学部・分子生命科学2），猪子 英俊（東海大学医学部・分子生命科学2），
太田 正穂（信州大学医学部・法医学教室），勝山 善彦（信州大学病院・薬剤部），
屋敷 伸治（鹿児島大学医学部・ウイルス学），園田 俊郎（鹿児島大学医学部・ウイルス学），
古賀 公明（鹿児島大学医学部・整形外科学），松永 俊二（鹿児島大学医学部・整形外科学），
武富 栄二（鹿児島大学医学部・整形外科学），酒匂 崇（鹿児島大学医学部・整形外科学）

【研究要旨】

脊柱後縦靭帯骨化症（OPLL）原因遺伝子は、OPLL患者家系を用いた連鎖解析からヒト第6染色体のMHC（HLA）領域の近傍に存在することが示唆された。特に、連鎖解析と相関解析からクラスII領域の近傍に位置するコラーゲン（COL11A2）遺伝子の関与が注目されている。さらに現在では、我々や国外の研究グループによる大規模なゲノムシーケンシングにより、MHC領域を完全にカバーした約3.6Mbの塩基配列情報が利用できることから、原因遺伝子の局在についてより詳細な絞り込みが期待される。これまでに我々は、塩基配列を決定した領域から独自に設定したマイクロサテライトマーカーと、既知のマーカーを計20個用いて、OPLL疾患感受性についての相関解析を行った。現時点での我々の解析ではHLA領域の内外には、OPLLとの相関を示す遺伝子マーカーは見い出されなかった。

A. 研究目的

我々は脊椎後縦靭帯骨化症（OPLL）の発症機序を遺伝子レベルで解明することは、予防と治療の可能性につながると考えており、複数の存在が予想される原因遺伝子の中で、特に第6染色体短腕に位置する原因遺伝子の同定を試みた。既に複数の報告によりヒト第6染色体p21.3のMHC（HLA）領域とOPLLとの相関が報告され、特にHLAクラスII領域の近傍に位置するコラーゲン11A2遺伝子（COL11A2）が原因遺伝子の一つとして注目されている。COL11A2に観察される特定の多型とOPLLには有為な相関があり、マイクロサテライトマーカーへの連鎖などからもHLA領域の近傍に原因遺伝子座が位置すると推定されていた。しかしながら、コラーゲン11A2遺伝子の変異のみでは、疾患の発症を証明できない。我々と英国や米国の研究グループは、共同ゲノムシーケンシング・プロジェクトによってHLA領域の全塩基配列（約3.6Mb）を決定した。この成果により、既に利用可能なクラスI領域の多型性マーカーに加え、より広範囲に効率良くマイクロサテライトマーカーを検索して多型性を示すマーカーを設計することが可能になった。本研究ではそれらのマーカーを利用して、HLA領域内を詳細に解析して新たなOPLL原因遺伝子が存在

する可能性を検討した。

B. 研究方法

マイクロサテライト多型解析に用いたOPLL患者のDNAは鹿児島大学医学部より供与されたものを用いた（50人）。健常人DNAは血縁関係のない日本人76人から得られたものを用いた。クラスI領域の解析には、HLA-B、-C、-Eを含む1kBL遺伝子からHLA-92までの約1.3Mbの領域内に見出した7個の多型性を有するマイクロサテライトを用いた。また、COL11A2遺伝子のセントロメア側には2箇所の新規のマーカーを設定した。その他にも合計11個の既知マイクロサテライトマーカー（MICA, MIB, D6S439, D6S1560, D6S276, D6S1680, CADQ, T16, TNFA, TNFD, D6S273）を使用した。

PCRは50ngのgenomicDNAに各10pmolPrimer, 10xPCRバッファー, 0.2mM dNTP, 2.5U Taq polymeraseを加えて20ulの反応系で行った。温度サイクル94℃で5分間の変性後に、94℃で45秒変性、56℃で45秒アニーリング、72℃で60秒の伸長を1回のサイクルとして、30サイクル行った。産物の電気泳動には、ABI automated DNA sequencerを用い、アليلはGeneScan672 softwareによって解析した。統計学的な解析にはGenepop software⁵を用いた。

また、アレルの遺伝子頻度は検査したサンプル集団より得られた実数より求めた。遺伝子頻度の有意性は、 χ^2 検定と Pvalue testにより検査した。

(倫理面への配慮)

多型性のマイクロサテライトを用いた相関解析では、健常人と OPLL 患者の 2 群より DNA を採取する必要があり、サンプル提供者の遺伝的個人情報を守ることに注意が為された。我々が用いる相関解析では、各サンプル DNA を個々のサンプルではなく集団として処理するため、結果がサンプル提供者の本疾患以外の遺伝的素因に及ばない。また、実験者がサンプル提供者を特定することがないように、我々が相関解析に用いた DNA は、同意を得た OPLL 患者から採取した血液より抽出したものを他大学の共同研究者から入手した。よって本研究では、解析法と資料の取り扱い段階で倫理面に配慮したものになっている。

C. 研究結果

相関解析には、多型性を示すマイクロサテライトマーカーの設定が不可欠である。我々は、HLA 領域でのゲノムシーケンシングにより、500 以上のマイクロサテライトを独自に取得することが出来た。この HLA クラス I 領域の 2 塩基から 5 塩基のくり返し配列より、26 種について日本人集団における、各座位の Hardy-Weinberg 平衡について検討した結果、23 種の座位が平衡を満たした。我々が確立したこのマーカーセットの特徴は、各マーカー間の物理的な距離が明らかな点と非常に高密度に設定されている点である。本研究での解析には、新規マーカー 9 個を選択し、さらに 11 個の既知マーカーを加えて HLA 領域をカバーした (図 1)。

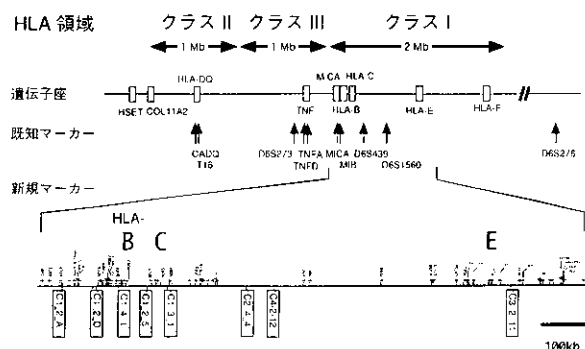


図 1. 相関解析に用いたマイクロサテライトの位置
D6S276 は、HLA-F から約 6Mb テロメア側に位置している。新規マーカーは、クラス I 領域のみを示す。

図 2. COLL11A2 付近 (200kb) の遺伝子群

矢印はテロメア側からセントロメア側へ方向を示している。灰色の遺伝子は偽遺伝子で、灰色の囲みは COLL11A2 遺伝子から 100kb の範囲を示している。

Gene name	Product
COLL11A2	Collagen
RXRβ	Class I transcription factor
RING5	
RING2	
RING1	
ZNF4L	
PAT-SF1-L	
HSACM2L	
RPS18	40S ribosomal protein S18
B3GALT4	Beta 3-galactosyl-transferase T4
BING5	
BING4	Unknown
HKE2	Unknown
RGL2	
TAPBP	
BING1	Unknown
DAXX	
BING3	
rPL35A-L	
rPL12-L	
HSET	

これらのマーカーによって相関解析を行った結果、上記の各マーカーと OPLL の有意な相関は示されなかった。OPLL の解析に際して、HLA 領域に注目する理由は、OPLL が HLA 領域に近接した D6S276 マーカーに連鎖し、COLL11A2 の変異と相関が認められている為である。我々の相関解析では D6S276 マーカーに有意差は認められなかった。慢性関節リウマチやベーチェット病、尋常性乾癬に対して我々が行った相関解析では、候補領域が 50kb まで限定され、マイクロサテライトによる相関の検出範囲が、責任遺伝子を含む約 200kb 以内であることが示された。したがって、今回の結果では OPLL の責任遺伝子は D6S276 マーカーによる検出範囲外に位置していると推測される。一方、COLL11A2 遺伝子の位置から 200kb 以内の領域には COLL11A2 や RXRβ 以外に 3 つの機能不明の遺伝子を含む 20 個の遺伝子が見出されている (図 2)。我々の解析では、COLL11A2 の近傍に位置付けられた D6S1680 マーカーによっても有意な相関が示されなかった為、HLA 塩基配列を用いてマーカーの詳細な位置を調べたところ、D6S1680 は実際には第 5 染色体に位置することが判明した。そこで、COLL11A2 付近の

領域での相関を検討するための新たなマーカーを2箇所に設定した。各マーカーは、RXRB遺伝子から約5kbと45kbセントロメア側に位置している。しかしながら、この新規の2マーカーによる解析の結果でも有為な結果は得られなかった。

D. 考察

現在までの結果では、有力候補であったD6S276及びCOL11A2遺伝子座ではOPLLとの有意な相関は見い出されなかった。D6S276に関しては、その位置がHLAクラスI遺伝子のHLA-F遺伝子より約6Mbテロメア側に離れており、OPLLの原因遺伝子座が、我々の手法による検出感度の上限(200kb)を超えて位置している可能性が残されている。OPLLと連鎖しないD6S299は、D6S276からテロメア側1.2Mb以内に位置しており、D6S276に連鎖している原因遺伝子座は、D6S299とHLA領域の約8Mbの間と推定される。

また、最近OPLLの責任遺伝子の一つと考えられているCOL11A2遺伝子の変異が、遺伝性の難聴の原因である事が報告された。2つの異なる疾患の原因が同一遺伝子の変異であれば、どちらかの患者群で他方の発症率が高くなる事が予想される。我々の解析では、COL11A2遺伝子や付近の遺伝子群とOPLLの相関を見出すことは出来なかったが、COL11A2遺伝子の関与を改めて検討するためにもより多くの遺伝マーカーを用いた調査が必要と思われる。

E. 結論

現在までOPLLの解析によって、疾患の原因が多因子である可能性が示されている。我々はHLA領域の相関解析の結果から、OPLLはHLA領域内には、有意な相関を示す遺伝子マーカーを見出すことが出来なかった。従って、改めて原因遺伝子座を限定する必要が生じた。今後、ゲノムワイドなマイクロサテライトの収集を開始する予定であり、相関解析を進めることにより原因遺伝子座を同定したいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yabuki K, Ota M, Goto K, Kimura M, Nomura E, Ohno S, Mizuki N, Katsuyama Y, Makysymowych WP, Bahram S, Kimura M, Inoko H: Triplet repeat polymorphism in

the MICA gene in HLA-B27 positive and negative Caucasian patients with ankylosing spondylitis. *Hum. Immunol.* 60: 83-86, 1999.

Ando A, Kikuti YY, Abe K, Shigenari A, Kawata H, Ikemura T, Kimura M, Inoko H: cDNA cloning, Northern hybridization and mapping of a putative GDS (guanine nucleotide dissociation stimulator of G proteins)-related protein gene at the centromeric ends of the human and mouse MHC regions. *Immunogenetics* 49: 354-356, 1999.

Ozawa A, Iwashita K, Miyahara M, Sugai J, Iimuka M, Kawakubo Y, Ohkido M, Naruse T, Anzai T, Takashige N, Ando A, Inoko H: HLA-A33 and -B44 and susceptibility to postherpetic neuralgia (PHN). *Tissue Antigens* 53: 263-268, 1999.

Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Inoko H: Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunological Reviews* 167: 193-199, 1999.

Yamazaki M, Tateno Y, Inoko H: Genome organization around the centromeric end of the HLA class I region; large-scale sequencing analysis. *J. Mol. Evol.* 48: 317-327, 1999.

Shiina T, Shimizu C, Oka A, Teraoka Y, Imanishi T, Gojobori T, Hanzawa K, Watanabe S, Inoko H: Gene organization of the quail major histocompatibility complex (MhcCoja) class I gene region. *Immunogenetics* 49: 384-394, 1999.

Naruse KN, Kawata H, Anzai T, Takashige N, Kagiya M, Nose Y, Nabeya N, Isshiki G, Tatsumi N, Inoko H: Limited polymorphism in the HLA-DOA gene. *Tissue Antigens* 53: 359-365, 1999.

- Ota M, Mizuki N, Katsuyama Y, Tamiya G, Shiina T, Oka A, Ando H, Kimura M, Goto K, Yabuki K, Ohno S, Inoko H : The critical region for Behcet's disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46 kb segment centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsattelite mapping. *Am J Hum Genet* 64: 1406-1410, 1999.
- Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Ikehara Y, Nishihara S, Nakagawa S, Sasaki K, Shiina T, Inoko H, Saitou N, Narimatsu H : α 1,3-Fucosyltransferase IX (Fuc-TIX) is very highly conserved between human and mouse; molecular cloning, characterization and tissue distribution of human Fuc-TIX. *FEBS letters* 452: 237-242, 1999.
- Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ, Ohno S, Inoko H, Ota O, Mizuki N, Yabuki K, Stephens HA, Kondiatis E, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR, Vaughan RW : Association of MICA alleles with Behcet's disease. *Immunogenetics* 49: 613-617, 1999.
- Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T : Polymorphism of MICA in Japanese and a MICA-MICB null haplotype. *Immunogenetics* 49: 620-628, 1999.
- Moribe T, Kaneshige T, Inoko H : Rapid HLA class I DNA typing using microtiter plate-reverse hybridization assay (MRHA) by simple thermoregulation : High resolution subtyping of HLA-A2 and -B40 alleles. *Hum Immunol* 60: 539-549, 1999.
- Adra K, MAO XO, Kawada H, Gao PS, Korzycka B, Shaldon SR, Coull P, Dubowitz M, Enomoto T, Ozawa A, Donato JL, Syed A, Horiuchi T, Khan R, Lin SR, Roberts MH, Flinter F, Beales P, Hagihara A, Inoko H, Shirakawa T, Hopkins M : Chromosome11q13 and atopic asthma. *Clinical Genetics* 55: 431-437, 1999.
- Anzai T, Naruse TN, Tokunga K, Honma T, Baba H, Akazawa T, Inoko H : HLA genotyping of 5,000 and 6,000-year old ancient bones in Japan. *Tissue Antigens* 54: 53-58 1999.
- Maeda F, Nagatsuka Y, Ihara S, Aotsuka S, Ono Y, Inoko H, Takekoshi M : Bacterial expression of a human recombinant monoclonal antibody Fab fragment against hepatitis B surfaceantigen. *J Medical Virology* 58: 338-345, 1999.
- Kulski, JK, Gaudieri S, Inoko H, Dawkins RL : Comparison between two HERV-rich regions within the major histocompatibility complex. *J. Mol. Evolution* 48: 675-683, 1999.
- Baba T, Ando A, Inoko H : Isolation and characterization of the swine MHC SLA-DNA cDNA clones. *Immunogenetics* 49: 915-917, 1999.
- Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuki N, Kera J, Bahram S, Nose Y, Inoko H : Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons 2 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54: 178-184, 1999.
- Takashige N, Naruse T, Inoko H : Genetic polymorphisms at the tumor necrosis factor loci (TNFA and TNFB) in cardiac sarcoidosis. *Tissue Antigens* 54: 191-193, 1999.
- Yabuki K, Ohno S, Mizuki N, Ando H, Tabbara KF, Goto K, Nomura E, Nakamura S, Ito N, Ota M, Katsuyama Y, Inoko H : HLA class I and II typing of the patients with Behcet's disease in Saudi Arabia. *Tissue Antigens* 54: 273-277, 1999.

- Tamiya G, Shiina T, Oka A, Ota M, Kastuyama Y, Tomizawa M, Yoshitome M, Ohtsuka M, Kimura M, Inoko H : New microsatellite markers in the human MHC class I region. *Tissue Antigens* 54: 221-228, 1999.
- Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kakalamani E, Inoko H, Ohno S. Association of MICA gene and HLAB*5101 with Behcet's disease in Greek. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40: 1921-1926, 1999.
- Mizuki N, Ohno S, Ando H, Chen L, Sato T, Imanishi T, Gojobori T, Ishihara M, Mizuki N, Geng Z, Geng L, Li G, Inoko H : Association analysis between the MICA and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. *Arthritis & Rheumatism* 42: 1961-1966, 1999.
- Miyagawa S, Amagai M, Niizeki H, Yamashina Y, Kaneshige T, Nishikawa T, Shirai T, Inoko H : HLA-DRB1 polymorphisms and autoimmune responses to desmogleins in Japanese patients with pemphigus. *Tissue Antigens* 54: 333-340, 1999.
- Nakanishi K, Kobayashi T, Murase T, Naruse T, Nose Y, Inoko H : Human Leukocyte Antigen-A24 and -DQA1*0301 in Japanese insulin-dependent diabetes mellitus : Independent contributions to susceptibility to the disease and additive contributions to acceleration of b-cell destruction. *J Clinical Endocrinology and Metabolism* 84: 3721-3725, 1999.
- The MHC sequencing consortium (Aguado B, Bahram S, Beck S, Campbell RD, Forbes S, Geraghty D, Guillaudeux T, Hood L, Horton R, Inoko H, Janer M, Jasoni C, Madan A, Milne S, Neville M, Oka A, Qin S, Ribas-Despuig G, Rogers J, Rowen L, Shiina T, Spies T, Tamiya G, Tashiro H, Trowsdale J, Vu Q, Williams L, Yamazaki M. Complete structure and gene map of a human major histocompatibility complex (MHC). *Nature* 401: 921-923, 1999.
- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara C, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S, Inoko H : Molecular dynamics of MHC genesis unraveled by sequencing analysis of the 1,796,938 bp HLA class I region. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13282-13287, 1999.
- Oka A, Tamiya G, Ota M, Kastuyama Y, Shiina T, Tomizawa M, Yoshitome M, Sugai J, Ozawa A, Ohkido M, Kimura M, Bahram S, Inoko H : Association analysis using refined microsatellite markers localizes a susceptible locus for psoriasis vulgaris within a 111 kb segment telomeric of the HLA-C gene. *Hum. Mol. Genetics* 8: 2165-2170, 1999.
- Kaneko M, Kudo T, Iwasaki H, Shiina T, Inoko H, Kozaki T, Saitou N, Narimatsu H : Assignment of the human α 1,3-fucosyltransferase IX gene (FUT9) to chromosome band 6q16 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 86: 329-330, 1999.
- Kera J, Mizuki N, Ota M, Kastuyama P, Pivetti-Pezzi P, Ohno S, Inoko H : Significant associations of HLA-B*5101 and B*5108 and lack of association of class II alleles with Behcet's disease in Italian patients. *Tissue Antigens* 54: 565-571, 1999.
- Ohtsuka M, Makino S, Yoda K, Wada H,

Naruse K, Mitani H, Shima A, Ozato K, Kimura M, Inoko H : Construction of a linkage map of the medaka (*Oryzias latipes*) and mapping of the Da mutant defective in dorsal-ventral patterning. *Genomic Research* 9: 1277-1287, 1999.

Shiina T, Bahram S, Inoko H : The beta 1,3-galactosyltransferase-4 (B3GALT4) gene is located in the centromeric segment of the human MHC class II region. *Immunogenetics* 51: 75-78, 2000.

Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Verity D, Goto K, Kimura T, Nomura E, Madanat W, Katsuyama Y, Kimura M, Stanford M, Inoko H, Ohno S : A strong association between MICA gene and Behcet's disease in Jordanian. *J. Ophthalmology* in press

Teraoka Y, Naruse T, Oka A, Matsuzawa Y, Shiina T, Iizuka M, Iwashita K, Ozawa A, Inoko H : Genetic polymorphisms in the cell growth regulated gene, SC1 telomeric of the HLA-C gene and lack of association with psoriasis vulgaris. *Tissue Antigens* in press

Kawamura K, Yamamura T, Yokoyama K, Chui DH, Fukui Y, Sasazuki T, Inoko H, David CS, Tabira T : Induction of autoimmune encephalitis by proteolipid protein 95-116-specific T cells from HLA-DR2 (DRB1*1502) transgenic mice. *J Clinical Investigation* in press

2. 学会発表

脊柱後縦靭帯骨化症の相関解析：ヒト第6染色体MHC領域のマイクロサテライトマーカーによる原因遺伝子探索，山形哲司，猪子英俊，太田正穂，勝山善彦，屋敷伸治，園田俊郎，古賀公明，松永俊二，武富栄二，酒匂 崇，平成11年度脊柱靭帯骨化症に関する調査研究第1回班会議 シンポジウム，1999