

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

三木 哲郎 (愛媛大学医学部老年医学講座)

【研究要旨】

後縦靭帯骨化症のような多因子病の病因解析において、遺伝因子からのアプローチは方法論が困難である。今回、SNP (single nucleotide polymorphism) の同定法と、SNP から HAPLO プログラムにより、ハプロタイプを類推する方法について検討した。いずれの方法も利用できることを確認したが、今後の発展が期待できた。

A. 研究目的

多因子病の責任遺伝子の同定に必要な対象集団は、罹患家系と患者集団に大別できる。また、遺伝子マーカーの種類としては、ミニサテライトマーカー、マイクロサテライトマーカーと、最近では SNP (single nucleotide polymorphism) が注目されている。SNP のタイピングはマイクロサテライトマーカーに比べ対立遺伝子数は少ないが、タイピングが簡便であり、全ゲノム上の絶対数も多いという利点がある。ある遺伝子の上でタイピングした SNP のデータから、ハプロタイプを作成し、症例-対照研究における関連解析に利用する方法が再認識されている。本研究では、後縦靭帯骨化症の責任遺伝子を同定する過程で必要な SNP のタイピング法とハプロタイプの作成法について検討した。

B. 研究方法

解析のモデルとした遺伝子はアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 遺伝子であり、心筋梗塞を始めとする各種循環器疾患や糖尿病性腎症の発症との連鎖が報告されている。今回、ACE 遺伝子の中の 10 種の SNP についてタイピングした。5' 上流から順に、T-5991 C, A-5466 C, T-3892 C, A-240 T, T-93C, T 1237C, G 2215 A, I/D (insertion/deletion), G 2350A と 4656(CT)_{3/2} 多型である。

SNP のタイピングは、自動核酸測定装置であるハイブリジーンを用いた。原理は、ある SNP 領域を含むオリゴマーをマイクロプレートに結合させる。ある領域を増幅させた PCR 産物をアビジンで末端を標識し、ハイブリダイゼーションし、洗浄後、アニーリングの有無を発光で検出する方法である。1 つの SNP を確認するために、2 つの対立遺伝子のオリ

ゴマーを作成し、2 つのマイクロプレートを使用した。

解析した集団は血縁関係のない 100 名であり、SNP のタイピングの後、コンピュータープログラムである HAPLO (Yale 大学, Kidd 研究室) を利用して、ACE 遺伝子のハプロタイプを作成した。倫理面での配慮については、遺伝子解析や研究の目的、プライバシーの厳守などを記載した文書で被験者の同意書を取得した。また、本研究は、愛媛大学医学部の「臨床倫理委員会」による審査で承認を得た。

C. 研究結果

SNP の種類により、ハイブリジーンにおける解析がうまくいかない場合があった。すなわち、Bound (B)/Free (F) 分離がうまくゆかず、補足された標的が多い場合と少ない場合があった。この場合、困難であるのは、ヘテロ接合性の評価であった。反応系がうまく進むと、一度の多数の検体が処理できた。日本人での上位 9 位までのハプロタイプは、以下に示す。

TATATTGIA3=0.427, CCCTCCADG2=0.277,
TATATTGIA2=0.041, TATATCGIA2=0.031,
TATATTAIA3=0.021, TATATTGDA3=0.016,
CCCTTCADG2=0.016, CCCTTCGDG2=0.016,
TACATCGIA3=0.011

5% 以上のハプロタイプは 2 種類のみであり、英国人に 5% 以上の頻度で認められた TATATCADG2 (英国人で 9%) や TACATCADG2 (同 7%) は、日本人では認められなかった。

D. 考察

多因子病の責任遺伝子の同定には、罹患した集団

の均一性と、用いる多型性遺伝子マーカーの種類が問題となる。理想的には、候補遺伝子を少なくとも100種前後選びだし、それぞれの遺伝子について既知のSNPを調べる。SNPの有無について報告のない遺伝子については、独自に探し出す。次に、SNPのタイピングを簡易、正確、迅速で大量に行える方法を開発する。目的の領域をPCRで増幅した後、遺伝子産物をSSCP法調べる方法、プライマー伸長法 (primer extension)、目的のオリゴに特異的なハイブリダイゼーションを行う方法 (ASO allele specific oligonucleotide)、DNAチップの原理を応用する方法、直接塩基配列決定法などを利用する。1個のSNPに関して、少なくとも2種の方法でタイピングを行い、タイピングエラーをなくすことも必要である。今回は、ASOの変法であるハイブリジーンを用いたが、大量にサンプルを処理できた、タイピングエラーについても最小限であったと考えられる。

10種のSNPからハプロタイプを類推するHAPLOプログラムも使用できることを確認した。ハプロタイプを作成する方法は、家系のタイピングから推測する方法、長い領域のPCRを行う方法などが存在するが、血縁関係のない個人から、ハプロタイプを作成する方法は、今後のゲノム解析には有用であると考えられる。

E. 結論

ACE遺伝子のハプロタイプをハイブリジーンで決定した。B/F分離が最も重要であったが、ほとんどのSNPのタイピングは可能であった。HAPLOによるハプロタイプの作成により、日本人のACEのハプロタイプにおいて、イギリスでは報告されていない頻度の高いものを認めた。本法は、後縦靭帯骨化症の責任遺伝子解析に応用できるものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表
無し。
2. 学会発表
無し。

G. 知的所有権の取得状況

無し。

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 —

相庭 温臣 (千葉大学医学部整形外科), 山崎 正志 (千葉大学医学部整形外科),
大河 昭彦 (千葉大学医学部整形外科), 茂手木博之 (千葉大学医学部整形外科),
中島 新 (千葉大学医学部整形外科), 守屋 秀繁 (千葉大学医学部整形外科)

KEYWORD=spinal hyperostosis, ossification of posterior longitudinal ligament, twy mouse, osteopontin

【研究要旨】

【目的】 twy マウス脊柱靱帯骨化過程におけるオステオポンチン (OPN) の関与の解明。

【方法】 twy マウスとコントロールを生後2, 4, 8, 12および16週で屍殺, 灌流固定, 脱灰後, 脊椎の矢状断切片を作成した。In situ hybridization法にてOPN遺伝子発現を, 免疫組織染色によりOPN蛋白の局在を観察した。また, 2週齢と16週齢のtwyマウスおよびコントロールの全脊椎からRNAを抽出し, Northern blotting法にてOPNとX型コラーゲンのmRNA量を定量した。【結果】 twyマウスでは4週齢以降, 椎間板線維輪外側の細胞および脊柱靱帯細胞にOPNの過剰発現を認めた。Northern blottingにて16週齢twyマウス脊椎にOPN過剰発現を認めたが, X型コラーゲンの発現は認められなかった。【結論】 twy脊柱靱帯骨化過程においてオステオポンチンが過剰発現しており, X型コラーゲンの発現を伴わないことから内軟骨性骨化と異なる骨化機序が示唆された。

A. 研究目的

twy マウスは歩容異常により見いだされた, ICR系を母体とする疾患モデル動物である。骨膜や靱帯のenthesism部に骨形成が生じ, 四肢関節・体幹の骨性強直に陥り, 骨性強直に陥ることで生後3週齢過ぎから尖足位歩行を呈し, 徐々に進行する¹⁾。全身の骨組織において骨代謝が亢進しており, 高回転型骨粗鬆症のモデル動物としても注目されている²⁾。脊椎の病変としては頸椎の変化が最もはやく始まり, 生後4週より椎間板線維輪に異所性石灰化を生じ, また11週で骨性架橋を形成する³⁾。

我々はこれら異常の原因がNpps (nucleotide pyrophosphatase) 遺伝子の nonsense mutationであることを同定し既に報告した⁴⁾。遺伝子が同定されたことにより遺伝学的手法を用いて発症前に病変の観察が可能となり, 脊椎病変の成因に関して, より詳細な検討が可能となった。

オステオポンチン (OPN) は非コラーゲン性骨基質タンパク質のひとつで細胞間や基質への接着を介して骨形成あるいは改変に関与しているとされる物質⁵⁾であり, 骨組織や腎臓等の組織に分布している。石灰化を伴う病変部位に高度にその遺伝子が発現⁶⁾, また骨芽細胞, 骨細胞, 肥大軟骨細胞や破骨細胞に局在⁷⁾し, 骨形成, 骨吸収双方への関与が考えられ

ている。

これまでの研究で我々は, 脊柱靱帯骨化症の病態を明らかにするため類似する病態を示すtwyマウスに注目し解析を進めてきた^{3, 4, 8-10)}。本年度はこれらに引き続いて, twyマウス脊柱靱帯骨化過程におけるOPNの関与を明らかにすることを目的としてtwyマウス脊椎におけるOPN遺伝子の発現とOPN蛋白の局在を解析し, さらに遺伝子発現の定量化を行った。

B. 研究方法

1. twy マウス

4, 8, 12, 16週齢の雄のtwyマウス各4匹とコントロールとして同週齢の雄のICRマウスを用いた。また, ヘテロ個体同士の交配により生まれた同腹のマウスを生後2週にて屍殺し, 尻尾より抽出したDNAから大河らの方法¹¹⁾に準じて遺伝子型を決定し, その内の雄個体を用いた。

2. 免疫組織染色/In situ hybridization

生後2, 4, 8, 12および16週齢のtwyマウスとそのコントロールを, 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定後, 脊椎を摘出した。4%パラホルムアルデヒドにて4℃, 24時間

固定し、20%EDTAにて4℃、4-7日間脱灰した後、矢状断切片を作成した。抗OPN抗体による染色によりOPN蛋白の局在を解析し、マウスOPNcDNA (1.2kb, 野村慎太郎博士より供与)¹⁵⁾よりDIGラベルcRNAプローブを作製し、In situ hybridization法(ISH)にてOPN遺伝子発現を確認した。

3. Northern blotting

2週齢および16週齢のtwyマウスおよびコントロールの全脊椎からTotal RNAを抽出した。マウスOPNcDNAおよびマウス $\alpha 1$ 鎖cDNAより32Pラベルプローブを作製し、Northern blotting法にてOPNと $\alpha 1$ 鎖cDNAのmRNA定量を行った。

C. 研究結果

1. In situ hybridization

OPNmRNAの発現は2週齢のtwyマウスおよびコントロールの脊椎で認められ、両者とも主として軟骨終板領域の細胞にその発現が観察された。4週齢になるとコントロール脊椎では軟骨終板領域の細胞と海綿骨の骨芽細胞にのみOPNの発現が認められるのに対し、twyマウス脊椎ではさらに脊柱靭帯細胞および椎間板外側線維輪内の細胞に発現を認めた(図1)。週齢を経るごとにこの傾向はより明らかとなり、16週齢twyマウス脊椎では肥厚した脊柱靭帯内の細胞にOPNの強い発現を認めた。強拡大では、OPN発現は椎間板外側線維輪の軟骨様細胞と脊柱靭帯細胞に認められ、前者はトルイジンブルーにてやや異染性を呈した(図2)。

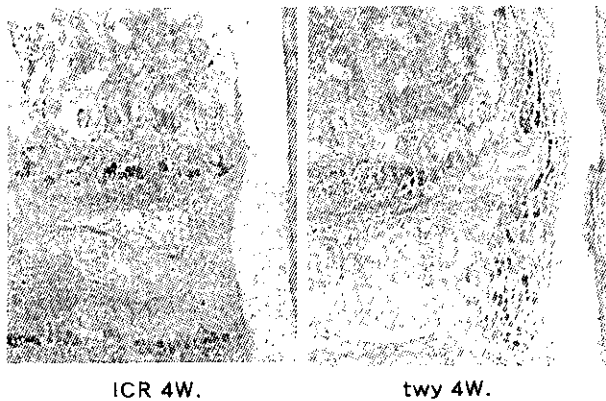


図1 コントロールおよびtwyマウス4週齢脊椎におけるOPN発現

コントロール脊椎では軟骨終板領域の細胞と海綿骨の骨芽細胞にのみOPNの発現が認められるのに対し、twyマウス脊椎ではさらに脊柱靭帯細胞および椎間板外側線維輪内の細胞に発現を認めた。

この領域は山崎らが \cdot, \cdot, \cdot 型コラーゲンの局在を証明した領域に一致¹⁶⁾し、また、隣接する領域ではHE像にてエオジン好性をしめす骨化初期の像が観察された。これに対し、コントロールではむしろ週齢を経るごとにOPN遺伝子発現の減弱を認めた。

2. 免疫組織染色

2週齢においてコントロールと異なり、twy椎間板では外側線維輪内に円形を呈すOPN陽性細胞を認めた(図3)。4-16週齢では、In situ hybridizationで発現の認められた脊柱靭帯細胞および椎間板外側線維輪内の細胞に一致してOPN蛋白の局在を認めた(図4)。

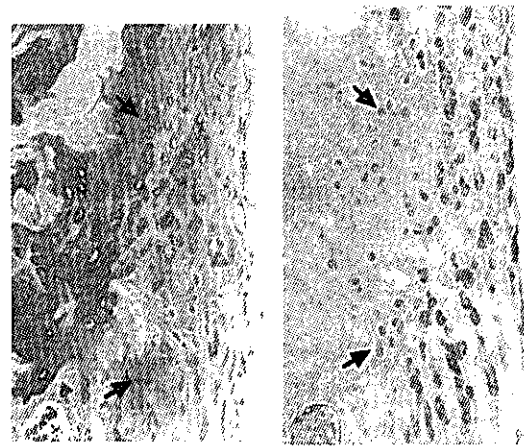


図2 twy16週齢脊椎後方部分におけるOPN発現
OPN発現は椎間板外側線維輪の軟骨様細胞(矢印)と脊柱靭帯細胞に認められ、前者はトルイジンブルー(TB)にてやや異染性を呈した。

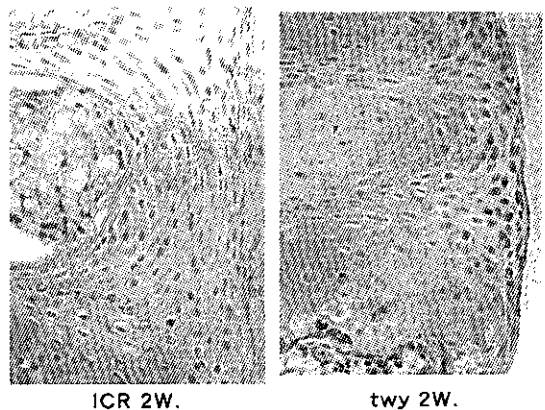


図3 コントロールおよびtwyマウス2週齢脊椎におけるOPN蛋白の局在

2週齢においてコントロールと異なり、twy椎間板では外側線維輪内に円形を呈すOPN陽性細胞を認めた。

3. Northern blotting

全脊椎におけるOPN (mOPN) 遺伝子発現は、2週齢では各表現型に有意な差を認めず、16週齢ではコントロールに対しtwyマウスで著しい過剰発現を認めた。X型コラーゲン (mCOL1A1) 遺伝子発現は、2週齢では各表現型に有意な差を認めず、16週齢ではコントロール、twyマウスとも明らかな発現を認めなかった (図5)。

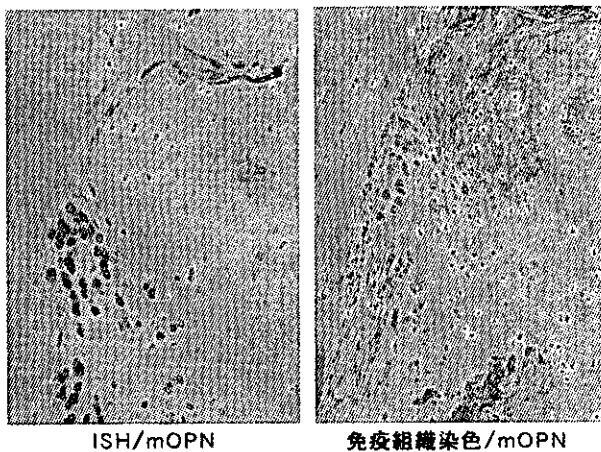


図4 twy16週齢脊椎前方部分におけるOPN発現およびOPN蛋白の局在

In situ hybridizationでOPN発現の認められた脊柱靭帯細胞および椎間板外側線維輪内の細胞に一致してOPN蛋白の局在を認めた。

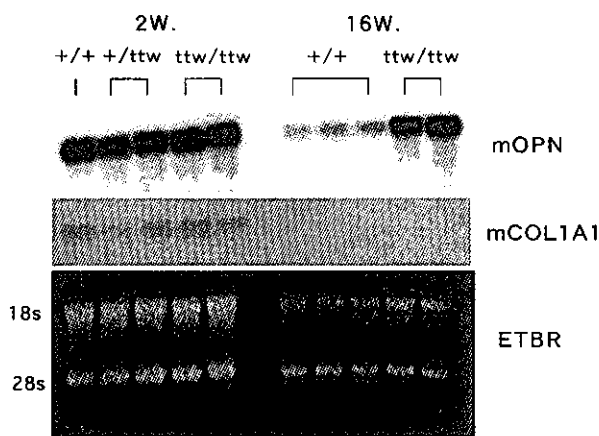


図5 OPN遺伝子およびX型コラーゲン発現定量 (Northern blotting)

OPN (mOPN) 遺伝子発現は、2週齢では各表現型に有意な差を認めず、16週齢ではコントロールに対しtwyマウスで著しい過剰発現を認めた。X型コラーゲン (mCOL1A1) 遺伝子発現は、2週齢では各表現型に有意な差を認めず、16週齢ではコントロール、twyマウスとも明らかな発現を認めなかった。

D. 考察

twyマウス脊椎の病変は、生後4週より椎間板線維輪に異所性石灰化を生じ、また11週で骨性架橋を形成する³⁾。硬組織学的検討ではenthesis領域に膜性骨化過程が観察される^{3,11)}が、脱灰標本による検討では軟骨様細胞を伴う骨化であり、骨化過程について分子生物学的手法による詳細な検討が求められる。

オステオポンチン (OPN) は非コラーゲン性骨基質タンパク質のひとつで細胞間や基質への接着を介して骨形成あるいは改変に関与しているとされる物質⁵⁾である。発見当初は骨に特異的と考えられていたが、骨組織だけでなく腎臓等の組織に分布している。石灰化を伴う病変部位に高度にその遺伝子が発現⁶⁾、また骨芽細胞、骨細胞、肥大軟骨細胞や破骨細胞に局在⁷⁾することから、骨形成、骨吸収双方への関与が考えられている。しかし、その役割についてはまだ十分に明らかにされていない。我々は石灰化のマーカーとしてOPNに注目し、twyマウス脊柱靭帯骨化前駆病変の解析を行った。

twyマウス脊椎においてOPN発現は終板の肥大軟骨細胞、椎間板線維輪外側の細胞および脊柱靭帯細胞と海綿骨の骨芽細胞に認められた。このうち、椎間板線維輪外側の細胞および脊柱靭帯細胞における発現はコントロールで明らかでないのに対し、twyマウスで4週齢以降、亢進しているのが確認された。特に線維輪外側の細胞はトルイジンブルーにて異染性を示し軟骨細胞としての性質を持つことが示唆された。同領域は、山崎らが $\cdot\cdot\cdot$ 型コラーゲンの局在を証明した領域に一致⁸⁾し、また隣接する領域ではHE像にてエオジン好性をしめず骨化初期の像が観察され、軟骨を介した骨化過程が推測された。しかし、内軟骨性骨化過程ではOPNに伴いX型コラーゲンの発現が認められる¹⁶⁾のに対し、今回の検討でtwy脊柱靭帯骨化過程においてX型コラーゲンの発現は認められず、内軟骨性骨化とは異なる機序が示唆された。

twyマウスではNPPS遺伝子の異常により石灰化を抑制するピロリン酸の働きが低下していると考えられている¹⁾。このことは、twyマウスの骨増殖性変化をある程度説明していると思われる。しかし、twyマウスの脊椎病変は椎間板線維輪の破綻や脊柱靭帯の肥厚を伴っており、石灰化亢進のみでは説明できない病像を呈する⁹⁾。寺門らはtwyマウスの頭蓋骨由来の骨細胞を継代培養し、コントロールの骨細胞に比し増殖性が高くPTHに対する応答性が

亢進していることを証明している^{10,11)}。これらを含めて考えるとtwyマウスには骨軟骨細胞の増殖能を亢進させる経路が存在し、オステオポンチンがその中で重要な役割を果たしていることが示唆される。twyマウス脊椎病変がヒトASH(ankylosing spinal hyperostosis)と類似していることから、ヒト脊柱靭帯骨化過程においてもオステオポンチンが重要な役割を果たしていることが推察される。

E. 結論

twy脊柱靭帯骨化過程においてオステオポンチンが過剰発現しており、またX型コラーゲンの発現を伴わないことから、内軟骨性骨化と異なる骨化機序が示唆された。

[参考文献]

- 1) Hosoda, Y., Yoshimura, Y., Higaki, S.: A new breed of mouse showing multiple osteochondral lesions-twy mouse. *Ryumachi*. 21 (suppl): 157-164, 1981.
- 2) Kobayashi, Y., Goto, S., Tanno, T., Yamazaki, M., Moriya, H.: Regional variations in the progression of bone loss in two different mouse osteopenia models. *Calcif Tissue Int*. 62: 426-436, 1998.
- 3) 丹野隆明: 遺伝性骨軟骨異常マウス (twy/twyマウス) 脊椎病変の進展およびEthane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate (EHDP) による進展抑制効果に関する実験的研究—脊柱靭帯骨化の発生病態に関連して—。日整会誌 66: 1073-1083, 1992.
- 4) Okawa, A., Nakamura, I., Goto, S., Moriya, H., Nakamura, Y., Ikegawa, S.: Mutation in Npps in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet*. 19(3): 271-273, 1998.
- 5) Oldberg, A., Franzen, A., Heinegard, D.: Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83(23): 8819-8823, 1986.
- 6) Hirota, S., Imakita, M., Kohri, K., Ito, A., Morii, E., Adachi, S., Kim, H.M., Kitamura, Y., Yutani, C., Nomura, S.: Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in atherosclerotic plaques. A possible association with calcification. *Am J Pathol*. 143(4): 1003-1008, 1993.
- 7) Mark, M.P., Prince, C.W., Oosawa, T., Gay, S., Bronckers, A.L., Butler, W.T.: Immunohistochemical demonstration of a 44-KD phosphoprotein in developing rat bones. *J Histochem Cytochem*. 35(7): 707-715, 1987.
- 8) Yamazaki, M., Moriya, H., Goto, S., Saitoh, Y., Arai, K., Nagai, Y.: Increased type I collagen expression in the spinal hyperostotic mouse(twy/twy). *Calcif Tissue Int*. 48: 182-189, 1991.
- 9) 山崎正志, 後藤澄雄, 齊藤康文, 望月真人, 丹野隆明, 小林康正, 寺門 淳, 守屋秀繁: twyマウスにおける脊柱靭帯骨化. 整形外科 44: 1114-1119, 1993.
- 10) Yamazaki, M., Goto, S., Kobayashi, Y., Terakado, A., Moriya, H., Nagai, Y.: Bone cells from hyperostotic mouse(twy/twy) maintain elevated levels of collagen production in vitro. *J Bone Miner Met*. 12: 57-63, 1994.
- 11) Terakado, A., Tagawa, M., Goto, S., Yamazaki, M., Moriya, H., Fujimura, S.: Elevation of alkaline phosphatase activity induced by parathyroid hormone in osteoblast-like cells from the spinal hyperostotic mouse TWY(twy/twy). *Calcif Tissue Int*. 56: 135-139, 1995.
- 12) Okawa, A., Goto, S., Moriya, H.: Calcitonin simultaneously regulates both periosteal hyperostosis and trabecular osteopenia in the spinal hyperostotic mouse(twy/twy) in vivo. *Calcif Tissue Int*. 64: 239-247, 1999.
- 13) 山崎正志, 中島文毅, 小笠原明, 茂手木博之, 山中 一, 大河昭彦, 後藤澄雄, 守屋秀繁: twyマウスにおけるオステオネクチン遺伝子の発現: in situ hybridization による検討. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成8年度研究報告書 20-22, 1997.
- 14) 山崎正志, 中島文毅, 小笠原明, 後藤憲一郎, 茂手木博之, 金 民世, 後藤澄雄, 守屋秀繁: twyマウスにおけるオステオポンチン遺伝子の発現: in situ hybridization による検討. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成9年度研究報告書 15-18, 1998.
- 15) Nomura, S., Wills, A.J., Edwards, D.R., Heath,

- J.K., Hogan, B.L.M. : Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARC (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. *J Cell Biol.* 106 : 441-450, 1988.
- 16) Schmid, T.M., Linsenmayer, T.F. : Developmental acquisition of type X collagen in the embryonic chick tibiotarsus. *Develop Biol.* 107 : 373-381, 1985.

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

大河 昭彦 (千葉大学整形外科), 山崎 正志 (千葉大学整形外科),
相庭 温臣 (千葉大学整形外科), 池田 義和 (千葉大学整形外科),
後藤 澄雄 (千葉大学整形外科), 守屋 秀繁 (千葉大学整形外科)

KEYWORDS = ossification of the spinal ligaments, leptin receptor, polymorphism

【研究要旨】

【目的】レプチン-レプチン受容体系の遺伝子レベルでの脊柱靱帯骨化症への関与を検討するため、レプチン受容体遺伝子の遺伝子多型を用いた case-control study による相関解析を行った。【方法】脊柱靱帯骨化症症例：157例と、control として非骨化症症例：92例から genomic DNA を抽出し、レプチン受容体遺伝子の coding 領域 5 カ所の多型について、SSCP, ASO, RFLP を用いて、各症例の genotype を決定し、genotype の頻度、allele 頻度と脊柱靱帯骨化の有無について、カイ二乗検定により相関を検討した。【結果】これら 5 カ所の多型において両群間の allele 頻度に有意な差はみられず、レプチン受容体遺伝子多型と脊柱靱帯骨化の有無について有意な相関はみられなかった。

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症の成因には、多因子の遺伝的要因と、局所のメカニカルファクターや代謝などの環境要因の双方が関わると考えられるが、詳細は未だ不明である。

Zucker fatty rat (fa/fa) は遺伝性に耐糖能異常、肥満を呈するラットであるが、脊柱靱帯の肥厚、軟骨増殖、骨化が生じることが明らかにされており¹⁾、脊柱靱帯骨化症のモデル動物であると認識されている。本ラットの原因はレプチン受容体遺伝子のミスセンス変異であり²⁾³⁾、その結果レプチン受容体に対するリガンドの結合能が低下し、レプチンのシグナル伝達が障害されている⁴⁾。レプチン受容体のリガンドであるレプチンは、脂肪組織において産生されるホルモンで、主に糖代謝、脂質代謝等のエネルギー代謝を調節する因子である。

脊柱靱帯骨化症に耐糖能異常、肥満の合併が多いこと、レプチンのシグナル伝達障害のラットが脊柱靱帯骨化を呈することから、レプチン-レプチン受容体系の異常が脊柱靱帯骨化の発生に関与する可能性が考えられる。我々は、これまで、臨床症例での血清レプチン値の測定、脊柱靱帯組織および培養細胞でのレプチン受容体遺伝子発現の確認を行い、レプチン-レプチン受容体系と脊柱靱帯骨化の発生進展との関わりについて研究を行ってきた。その結果、脊柱靱帯骨化症女性症例では血清レプチン値が有意

に高く脊柱靱帯骨化の発生進展に高レプチン血症が関与する可能性のあること⁵⁾、レプチン受容体遺伝子が脊柱靱帯組織に発現しておりレプチンが脊柱靱帯組織に対して直接の作用を有すること⁶⁾、培養脊柱靱帯細胞においてもレプチン受容体遺伝子が発現しておりこの細胞の IGF-1 添加による増殖促進に対しレプチンが促進的にはたらくこと⁷⁾、を明らかにした。

本年度の研究では、レプチン-レプチン受容体系の遺伝子レベルでの脊柱靱帯骨化症への関与を検討するため、レプチン受容体遺伝子の遺伝子多型を用いた case-control study による相関解析を行った。

B. 研究方法

脊柱靱帯骨化症症例：157例と、コントロールとして非骨化症症例：92例を用いて解析を行った。非骨化症症例は、OPLL 発症年齢に達しているが脊柱靱帯骨化のないことが X-P にて確認されたものとした。これらの症例の末梢血から genomic DNA を抽出し、解析に用いた。

レプチン受容体遺伝子多型のうち、1997年の Matsuoka らの報告⁸⁾により日本人に存在することが確認されている coding 領域 5 カ所の common polymorphism について、PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), ASO (allele specific oligonucleotide hybridization)⁹⁾ または

表1 Sequences of primer pairs for PCR

exon 4	Forward	5-AATTCGAATGGACATTATGA-3'
(G 519 A)	Reverse	5-GTATCAAAGAATTAAAAACATTGTTC-3'
exon 6	Forward	5-GTGTTCATGAATGTTGTGAAT-3'
(G 861 A)	Reverse	5-AGCTAGCAAATATTTTGTAGCAAT-3'
exon 9	Forward	5-CAGAATGTTTGTCTTCATCTGATATCC-3'
(T 1222 C)	Reverse	5-AGTACACTGCATCATAGGTAAACT-3'
exon 14	Forward	5-GCATAAGTGTGTGCTTCAAATATGG-3'
(G 2161 C)	Reverse	5-CGAAGATTAATAACAGGATTATGGACC-3'
exon 20	Forward	5-GAAACTGGTGAAGAACAAGGGCTTATAAAT-3'
(A 3250 G)	Reverse	5-CCATGAGCTATTAGAGAAAGAATCCGTCAA -3'

表2 レプチン受容体遺伝子多型の解析結果

exon	4	6	9	14	20
nucleotide	G 519 A	G 861 A	T 1222 C	G 2161 C	A 3250 G
codon	Lys 109 Arg	Gln 223 Arg	Ser 343 Ser	Lys 656 Asn	Pro 1019 Pro
解析法	ASO	RFLP	SSCP	SSCP	RFLP
genotype	GG GA AA	GG GA AA	TT TC CC	GG GC CC	AA AG GG
OSL (n=157)	91 61 5	114 37 6	126 31 0	123 31 3	112 40 5
non-OSL (n=92)	49 37 6	58 32 2	71 21 0	65 26 1	64 27 1
allele	G A	G A	T C	G C	A G
OSL (n=314)	243 71	265 49	283 31	277 37	264 50
non-OSL (n=184)	135 49	148 36	163 21	156 28	155 29
p value	0.3114	0.2569	0.5674	0.2772	0.9617

PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) を用いて解析した。各変異部分を増幅する primer は、Matsuoka⁸⁾, Clement¹⁰⁾, Echwald¹¹⁾らの方法に従い、表1に示すものを用いた。エクソン4のG519A多型におけるASOには、Gallele: 5'-TGAAGGAAGGACATTTG-3', A allele: 5'-TGAAGGAAAGACATTTG-3'のオリゴヌクレオチドプローブを用いた。エクソン6のG861A多型におけるRFLPでは、PCRproductを制限酵素MspIにて切断し、3%アガロースゲルにて電気泳動した。エクソン20のA3250G多型におけるRFLPでは、PCR productを制限酵素HincIIにて切断し、3%アガロースゲルにて電気泳動した。以上の方法により、各症例のgenotypeを決定し、genotypeの頻度、allele頻度と脊柱靭帯骨化の有無について、カイ二乗検定により相関を検討した。

C. 研究結果

各多型における脊柱靭帯骨化症および非骨化症症例のgenotypeの頻度、allele頻度、およびallele頻度の検定結果を表1に示す。これら5カ所の多型において両群間のallele頻度に有意な差はみられなかった。

エクソン6のG861A多型については、GG:GA+AAの比率は、骨化症114:43, 非骨化症58:34,

と骨化症にGGのタイプが多い傾向にあったが統計学的に有意ではなかった (p=0.1207)。

D. 考察

今回の研究結果では、レプチン受容体遺伝子多型と脊柱靭帯骨化の有無について、有意な相関はみられなかった。したがって、レプチン受容体が遺伝子レベルで脊柱靭帯骨化症の発生に関わるという結果は得られなかった。今後症例を増やして解析を続けるとともに、骨化の形態、程度などとの関連について解析を進めたい。

Zucker fatty ratが高率に脊柱靭帯骨化を呈し、コントロールのラットでは靭帯骨化がみられないことから、レプチンのシグナル伝達障害によって引き起こされた異常がZucker fatty ratにおける脊柱靭帯骨化の成因となっていることは間違いない。ヒト脊柱靭帯骨化症には高インスリン血症の合併が多く、糖代謝異常との関連については以前から指摘されてきた。Zucker fatty ratではインスリン抵抗性、高インスリン血症が存在すること、インスリンがIGF受容体を介して骨形成促進作用を有すること¹²⁾から、ヒト脊柱靭帯骨化症においても高インスリン血症がひとつの成因となっている可能性が考えられる。今回の研究では、遺伝子レベルでのレプチン受容体遺伝子のヒト脊柱靭帯骨化症への関与は否定的であり、むしろ代謝異常としての関与が考えられる。

E. 結論

レプチン受容体遺伝子多型と脊柱靭帯骨化の有無について、有意な相関はみられなかった。

[参考文献]

- 1) 田中恵: Zucker fatty ratによる実験的脊柱靭帯骨化に関する研究. 東医大誌 52:19-32, 1994.
- 2) Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K: Substitution at codon 269 (glutamine-proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. Biochem Biophys Res Commun 224:597-604, 1996.
- 3) Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Nakao K: Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs: identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. Biochem Biophys

- Res Commun 225:75-83, 1996.
- 4) Yamashita T, Murakami T, Iida M, Kuwajima M, Shima K : Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes* 46:1077-1080, 1997.
- 5) 池田義和 山崎正志 後藤澄雄 中島文毅 池田修 小笠原明 後藤憲一郎 守屋秀繁 : 後縦靭帯骨化症における血清レプチン値の検討. 厚生省特定疾患 骨・関節系疾患調査研究班 平成9年度研究報告書
- 6) 相庭温臣 山崎正志 池田義和 池田修 小笠原明 後藤澄雄 守屋秀繁 : 脊柱靭帯骨化症例における血清レプチン濃度およびレプチン受容体遺伝子発現. 厚生省特定疾患 骨・関節系疾患調査研究班 平成10年度研究報告書
- 7) 山崎正志 相庭温臣 池田修 小笠原明 国府田正雄 後藤憲一郎 金民世 守屋秀繁 : 培養脊柱靭帯細胞のレプチン濃度に対する応答性. 厚生省特定疾患 骨・関節系疾患調査研究班 平成10年度研究報告書
- 8) Matsuoka N, Ogawa Y, Hosoda K, Matsuda J, Masuzaki H, Miyawaki T, Azuma N, Natsui K, Nishimura H, Yoshimasa Y, Nishi S, Thompson D, Nakao K : Human leptin receptor gene in obese Japanese subjects: evidence against either obesity-causing mutations or association of sequence variants with obesity. *Diabetologia* 40: 1204-1210, 1997.
- 9) 江見充 : リポ蛋白代謝異常のDNA解析. 実験医学 Vol.8 No.9 126-129, 1990
- 10) Clement K, Vaisse C, Lahlou N, Carbril S, Pelloux V, Cassuto D, Gormelen M, Dina C, Chambaz J, Lacorte J, Basdevant A, Bougneres P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B: A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398-401, 1998
- 11) Echwald S, Sorensen T. D, Sorensen T. I, Hansen A, Andersen T, Chung W, Leibel R, Pedersen O : Amino acid variants in the human leptin receptor : Lack of association to juvenile onset obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 248-252, 1997.
- 12) Yano H, Ohya K, Amagasa T : Effects of insulin in vitro bone formation in fetal rat parietalbone. *Endocrine Journal* 41(3): 293-300, 1994.

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—

猪狩 勝則 (弘前大学整形外科), 古島 弘三 (弘前大学整形外科),
原田 征行 (弘前大学整形外科), 前田 真吾 (鹿児島大学整形外科),
古賀 公明 (鹿児島大学整形外科), 小宮 節郎 (鹿児島大学整形外科),
井ノ上逸朗 (群馬大学生体調節研究所)

【研究要旨】

OPLLは高齢発症疾患にもかかわらず遺伝背景が比較的強いことが知られている。遺伝背景が認められる場合、疾患の成因およびそのメカニズムを知るには責任遺伝子同定が重要な鍵である。これまでも候補遺伝子解析からコラーゲン11A2遺伝子の関与があきらかとなっている。しかしながら他因子疾患であるOPLLの責任遺伝子は多数存在すると予想された。ひきつづきすべての責任遺伝子を同定すべく、ゲノム全域での連鎖解析により、疾患遺伝子座の体系的な解析を完遂した。鹿児島大学と弘前大学を中心としてインフォームドコンセントを得て収集された140組の罹患同胞対をもちい、日本人に最適化させた406組の蛍光色素マーカーを使用して解析を行った。タイピングはGENESCANおよびGenotyperを用いて半自動化作業の下に行い、連鎖の検定にはノンパラメトリック解析のSIBPALおよびGENEHUNTERプログラムを使用した。その結果既知の領域である6pを含めいくつかの領域で強い連鎖 ($P < 0.01$) を認めた。その中で最も強い連鎖 (最大LOD=3.4, $P < 0.000009$) を21q22領域のD21S63近傍に特定できており、Dense Mappingによる確認もできている。現在その領域でマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖不平行マッピングを試みている。

A. 研究目的

OPLLは日本人を始め東洋人に頻度が高く、50歳以上の3-4%が罹患している、いわゆるCommon Diseaseに位置する。OPLLは高齢発症疾患にもかかわらず遺伝背景が比較的強いことが知られている。遺伝要因の強さの指標である λ_s は10である。遺伝背景が認められる場合、疾患の成因およびそのメカニズムを知るには責任遺伝子同定が重要な鍵であり、新たな治療法の開発や環境要因の解明にもつながる。これまでも候補領域連鎖解析により、染色体6番のHLA領域の遺伝マーカーで強い連鎖を認め、候補遺伝子解析からコラーゲン11A2遺伝子の関与があきらかとなった。またコラーゲン11A2遺伝子変異 (イントロン6の-4変異) がスプライシング変化をきたすことを見出している。しかしながら典型的な多因子疾患であるOPLLの責任遺伝子は多数存在すると予想された。ひきつづきすべての責任遺伝子を同定すべく、ゲノム全域での連鎖解析により、疾患遺伝子座の体系的な解析を完遂した。

B. 研究方法

OPLLは高齢発症なので、世代を隔てた大きな家系を収集することは不可能であり、かつ単一遺伝で

はなく複雑な遺伝要因が存在すると予想された。このような疾患では罹患同胞対を用いたノンパラメトリック連鎖解析が有効である。そこで、弘前大学と鹿児島大学を中心とした共同研究に加え、他の施設の協力もあり、140組の罹患同胞対がインフォームドコンセントを得て収集された。はじめに市販の400組のマイクロサテライトマーカーセット (Linkage mapping set version II, PE Biosystems) を基礎に日本人ではヘテロ接合性の低いマーカー (ほぼ10%) を差し替えるなどして人種に最適化させた406の蛍光色素マーカーを使用した。遺伝子タイピングはGENESCANおよびGenotyper (PE Biosystems) を用いて半自動化作業の下に行い、連鎖の検定にはノンパラメトリック解析のSIBPALおよびGENEHUNTERプログラムを使用した。連鎖を認めた領域についてはマーカー数を増やしDense Mappingを行った。

(倫理面への配慮)

全ての血液サンプルは口頭及び文書による十分な説明の後、文書による同意を得て採取した。あわせて頸胸腰椎レントゲン撮影によるOPLLの有無の確認を行った。本研究は弘前大学医学部倫理委員会および鹿児島大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果および

D. 考察

OPLLのゲノム全域解析により既知の領域である6pを含めいくつかの領域で $P=0.01$ より強い連鎖を認めている(図1)。その中で最も強い連鎖(最大 $LOD=3.4$, $P=0.000009$)を21q22領域のD21S263近傍に特定できており, Dense Mappingによる確認もできている(図2-3)。

今後21q22.1領域に存在するOPLL責任遺伝子のポジショナルクローニングを目指す(図4)。この目的にOPLL患者251例, 非OPLLコントロール173例を収集している。

SNPによる解析:現時点でSNP計画は始まったばかりで解析できるSNPの数は少ないため, 必要に応じて独自に開発する必要があるだろう。幸いにもこの染色体領域は本研究領域代表の榊らによりゲノム配列がほぼ終了しており, 配列が公開されていたため,

このゲノム配列と既知のEST配列との比較により, データベース上でのSNP獲得を試みた。D21S263領域5センチモルガンで20個ほどのSNPを得ることができている。しかしながらそのいくつかでSNP頻度を直接シーケンスで調べたところ, その多くは多型性がなく, おそらくESTの配列エラーによるものと推定された。すなわち信頼度の欠けるSNP検索であった。現時点でひとつの研究室で大規模SNP開発は無理なことから, 共同研究によるSNP開発を模索中である。

マイクロサテライトによる解析:先述したように, 21q22領域は榊らによりゲノムシーケンスがほぼ完了しており, その情報が公開されている。塩基配列情報から直接マイクロサテライトを得ることが可能であり, 多型性のある遺伝マーカーとして利用できる。実際には2塩基リピート(10回以上のリピート)マイクロサテライトを検索した。10回以下のリ

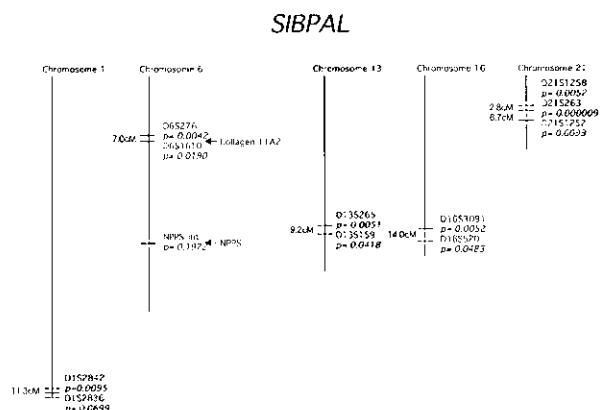


図1. SIBPALによるゲノム全域の罹患同胞対連鎖解析の結果。隣接したマーカーで有意な差を示したマーカーのみを記載している。

Chromosome 21			
Locus	P-value	Mean	
D21S1904	0.5769	0.4953	
D21S1256	0.0709	0.5370	
D21S1899	0.4696	0.5017	
D21S1884	0.1545	0.5232	
D21S1896	0.1746	0.5162	
D21S1258	0.0052	0.5649	
D21S1516	0.0488	0.5412	
D21S263	0.000009	0.6114	
D21S1888	0.0773	0.5319	
D21S262	0.0229	0.5466	
D21S1252	0.0099	0.5603	
D21S270	0.1283	0.5297	
D21S1900	0.0533	0.5459	
D21S1891	0.0337	0.5260	
D21S1623	0.0257	0.5402	
D21S263	0.000009	0.5368	
D21S1889	0.0937	0.5368	
D21S1903	0.0076	0.5680	

図2. 21q22を中心として行ったDense Mapping。D21S263で最大 $LOD=3.4$, $P=0.000009$ を得た。

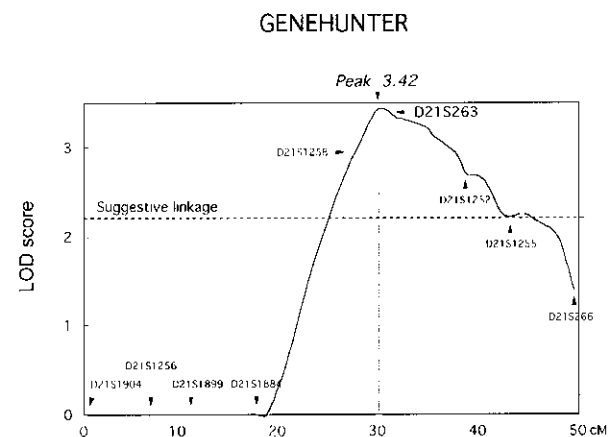


図3. GENEHUNTERによるマルチポイント解析の結果。D21S263のセントロメア側からテロメアにかけて非常に幅広い範囲で連鎖を認めている。

OPLLの感受性遺伝子解析

ゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析

遺伝子座の特定

関連解析(患者・対照研究)

マイクロサテライトマーカー, SNPsを用いたスクリーニング

位置的候補遺伝子検索

機能解析

原因遺伝子の同定 成因説明

図4. OPLL感受性遺伝子解析の道のり

ピートは多型性に乏しく、実際まったく多型性のないものもあった。マイクロサテライトの利点のひとつは、タイピングがそのサイズ（リピートの数）の差でおこなえるので、簡便であることである。一方、短所として、多型性がありすぎ、患者・対照関連解析における検定力の低下もある。D21S263前後の5センチモルガンでマイクロサテライトをさがしたところ140個同定できている。それらを患者・対照関連解析にもちい非常にゆるやかな統計的条件でマッピングをこころみているところである。ここまできくつかD21S263近傍マーカーで有意な関連を χ^2 検定により認めており、さらに詳細な検討および統計的に厳しい有意検定をおこなっている。

E. 結論

ゲノム全域で罹患同胞対連鎖解析を行い、21q22.1からテロメアにかけて非常に強い連鎖を認めた。

現在その領域でマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖不平衡マッピングを試みている。

[参考文献]

- 1) Numasawa, T., Koga, H., Ueyama, K., Maeda, S., Sakou, T., Harata, S., Leppert, M., and Inoue, I. 1999. Human retinoic receptor (α): complete genomic sequence and mutation search for ossification of posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Miner. Res.* 14, 500-508.
- 2) Koga, H., Sakou, T., Taketomi, E., Hayashi, K., Numasawa, T., Harata, S., Yone, K., Matsunaga, S., Otterud, B., Inoue, I., and Leppert, M. 1998. Genetic mapping of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1460-1467.

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

酒井 紀典 (徳島大学医学部整形外科), 井形 高明 (徳島大学医学部整形外科)
加藤 真介 (徳島大学医学部整形外科), 西良 浩一 (徳島大学医学部整形外科)
田中 知里 (徳島大学医学部分子栄養学講座), 片島 るみ (徳島大学医学部分子栄養学講座)
吉本 勝彦 (徳島大学医学部分子栄養学講座)
板倉光夫 (徳島大学ゲノム機能研究センター遺伝情報分野)

A. 研究目的

これまで脊椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) は, Koga et al.による91対の罹患同胞を用いたcandidate gene approachにより, ヒト第6染色体p21.3のCOL11A2遺伝子の多型との相関関係が報告されており¹⁾, HLA領域の近傍に原因遺伝子あるいは疾患感受性遺伝子が存在すると推定されている。しかしながら, OPLLは多因子疾患であることや, COL11A2遺伝子多型の関与は男性患者群のみ強く, 女性患者群では別の遺伝子座が関与している可能性²⁾などが示唆されている。そこでわれわれの目的はOPLL散発症例を対象とし, すでに報告されているCOL11A2遺伝子のSNPs (single nucleotide polymorphisms)に加え, 新たにCOL11A2遺伝子の3'側の領域のSNPsについて解析し, 患者対照研究 (case-control study)を行った。

B. 研究方法

徳島県全域のOPLL患者81名 (男性49名, 女性32名), 非OPLL患者76名 (男性37名, 女性39名)よりインフォームド Consentのもと末梢血10mlを採取し, 末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出した。まず罹患同胞で有意差が示されているCOL11A2遺伝子の5箇所 (Promoter, Exon 6, Intron 6, Exon 43, Exon 46)とCOL11A2遺伝子の3'側の下流領域にPrimerを設定し多蛍光PCR-SSCP (MF-PCR-SSCP)法³⁾にて多型のscreeningを行い, χ^2 検定にて有意差の検討を行った。移動度の異なるバンドの認められた領域については, SNPを塩基配列決定により確認した。なお以前の報告と塩基置換の頻度が逆転していたExon 438 (+24)についてはPCR-PIRA (Primer Introduced Restriction Analysis)法⁴⁾⁵⁾にて塩基置換頻度を再確認した。

C. 研究結果

COL11A2遺伝子の5箇所のSNPsについては, Exon6 (+28), Intron6 (-4), Exon 43 (+24)の3箇所でOPLL患者群と非OPLL患者群の間に有意差を認めた。しかしこれらは過去の報告とは異なる有意差の分布を示し, また異なる塩基置換を示す部位も認められた (表1)。COL11A2遺伝子3'側の約10kb下流領域の数ヶ所のSNPsを検索したところ, OPLL群-非OPLL群で有意差を示すSNPを見出した。また, このSNPに関して男女別に検討したところ, 男性患者群 ($p=0.01314$), 女性患者群 ($p=0.00791$)とそれぞれ有意差を認めた。

D. 考察

今回の散発症例におけるCOL11A2遺伝子上の5箇所のSNPsに関する結果は, COL11A2遺伝子が疾患感受性遺伝子であるという以前の報告を支持するものであった。また男女別に検討した結果においても女性群に関しては有意差が減少する傾向にあり, 男性患者群のみCOL11A2遺伝子が疾患感受性遺伝子として働くことを支持するものであった。

さらに今回COL11A2遺伝子より約10kb下流領域 (テロメア側)においてOPLL群-非OPLL群で有意差 ($p=0.00022$)を認める新規SNPを見出し, さらにこのSNPは, 男女別での検討においても有意差が認められた。この結果はマイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析からCOL11A2遺伝子近傍の3'領域に位置するCADQマーカーに強い有意差を認めたとの山形らの報告⁶⁾とも符合する。またこのSNPが認められる領域はMHCのExtended class・領域とClassical class・領域の境界領域であり, COL11A2遺伝子とHLA-DPA3 (ψ)遺伝子の間に位置する⁷⁾。またこの領域はnon-coding領域であり, Alu repeat配列が存在する領域である

(図1)。このSNPはAlu Jb repeat 配列上であるが、Alu repeat 配列の機能は現在のところ不明である。またこれまでAlu repeat 配列上におけるSNPsの疾患感受性に関する報告はないが、このAlu repeat 配列は特定の領域に集中して存在し、不等交差による組み換えを促進することから疾患の発生に関与することが報告されている⁸⁾。これらのことよりnon-coding領域であるAlu Jb repeat上のSNPがOPLLに関与している可能性やCOL11A2遺伝子が近傍にあるために非常に強い相関が認められた可能性が考えられる。山形らはCADQマーカーに強い有意差を認めたのはCOL11A2遺伝子が近傍にあるため現れた結果と推論しているが、男女別での検討ではなく、さらに今回男女別における検討においても非常に高い有意差が認められたことを考えるとCOL11A2遺伝子より3'下流領域(テロメア側)に他のOPLL感受性遺伝子、少なくとも女性患者群における感受性遺伝子が存在することが示唆される。

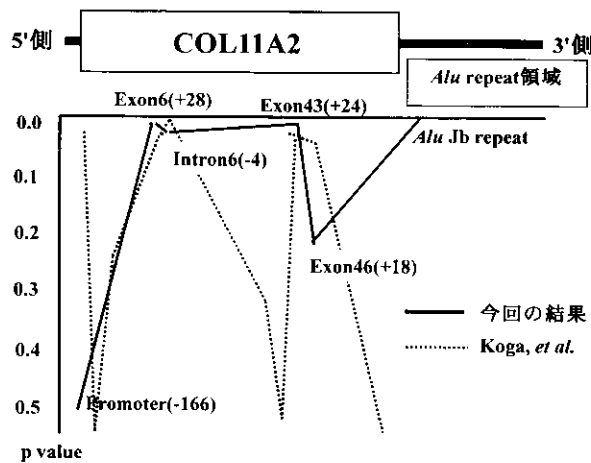


図1 SNPNsのゲノム上の位置とp valueの関係

	SNP(Koga's)	p value(Koga's)	SNP	p value(total)	p value(male)	p value(female)
Promoter(-182)	A>C	0.094				
Promoter(-166)			C>A	0.51429	0.52601	0.57157
Exon1(+24)		0.8825				
Intron1(+1910)		0.239				
Exon6(+28)	G>A	0.0042		0.0015	0.03054	0.02753
Intron6(+353)						
Intron6(+608)						
Intron6(-4)	T>A	0.0004	T>A	0.01937	0.11208	0.12771
Intron9(-10)						
Exon20(-21)						
Intron20(+32)						
Intron22(+70)						
Exon27(+21)		0.305				
Exon32(+36)						
Exon32(-42)		0.523				
Intron35(+3)						
Exon36(-42)		0.787				
Exon43(+24)	A>G	0.021	G>A	0.00149	0.00149	0.07185
Exon46(+18)	C>T	0.0333	C>T	0.21983	0.08725	0.10965
Exon54(+40)						
Exon54(-149)		0.5788				
AluJb repeat			G>A	0.00022	0.01314	0.00791

表1 COL11A2および3'下流領域におけるSNPsとp valueの関係

以上のことより今後、COL11A2遺伝子3'下流領域からAlu repeat周辺にかけてのさらなる詳細なSNPsの検討とAlu repeat配列などnon-coding領域の上におけるSNPsの意義ならびにCOL11A2遺伝子機能への関与の検討が必要と考えられる。

[参考文献]

- 1) Koga H, Sakou T, Taketomi E, et al. : Genetic mapping of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Am J Hum Genet 1998; 62: 1460-1467.
- 2) 酒匂 崇, 他 : OPLL患者の性差による遺伝的背景の相違について 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班, 平成10年度研究報告書 1999: 11-12
- 3) Iwahana H, Yoshimoto K, Itakura M. : Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis. BioTechniques 1994; 16(2): 296-305
- 4) Haliassos A, Chomels J.C., Kitzis A. : Detection of minority point mutations by modified PCR technique.: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. Nucl. Acids. Res 1989; 17 :8093-8099
- 5) Yoshimoto K, Iwahana H, Itakura M. : Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. Cancer 1993 : 72(4): 1386-1393
- 6) 山形 哲司, 他 : ヒト第6染色体p21. 3-22領域の構造解析: D6S276マーカーと脊柱靭帯骨化症の相関に基づく解析と物理地図の作成 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班, 平成10年度研究報告書 1999: 13-16
- 7) The MHC sequencing consortium : Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. Nature 1999; 401: 921-923
- 8) Hobbs HH, Russell DW, Goldstein JL : The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia : mutational analysis of a membrane protein. Annu Rev Genet 1990 : 24: 133-170

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

今給黎篤弘 (東京医科大学整形外科), 渡辺 健 (東京医科大学整形外科),
西野 誠一 (東京医科大学整形外科), 正岡 利紀 (東京医科大学整形外科),
山本 謙吾 (東京医科大学整形外科)

【研究要旨】

【目的】 脊柱靭帯骨化モデルであるZucker Fatty Rat (ZFR) のアキレス腱に異所性石灰化が発生することに着目し, その石灰化が発生するメカニズムにつき遺伝子学的及び病理組織学的に検討した。【方法】 3ヶ月齢~14ヶ月齢までのZFR25匹50肢, 及び, 対照群としてNon Fatty Rat (NFR) 28匹56肢を用い, ①血清Ca値測定, ②アキレス腱を露出し軟X線撮影, ③RT-PCR法を用いBMP2, BMP4, オステオカルシン (OC), オステオポンチン (OP) の遺伝子発現を検索④アキレス腱組織切片をHE染色, von Kossa染色, 並びに, 抗BMP2/4抗体, 抗オステオポンチン抗体による免疫染色施行した。【結果及び考察】 ZFRでは血清Ca高値, 3ヶ月齢以降全例にアキレス腱異所性石灰化が出現し, 経月齢にて石灰化の増大を認めた。又, 石灰化部の組織には軟骨様細胞が出現し, その組織の増殖, 肥大化が石灰化の増大を導く。そしてこの細胞の増殖にはBMP2,4が関与することが示唆され極めて内軟骨性骨化の一過程に類似すると思われた。

A. 研究目的

脊柱靭帯骨化は未だ原因不明であるが, 骨化の成立には明らかに全身的因子と局所的因子を要し, 全身的には内分泌異常・糖代謝異常・肥満・遺伝的素因子が背景となっており, 更に局所的因子として解剖学的特徴, 持続的メカニカルストレス, 及びBone morphogenetic proteinをはじめとする骨形成因子の関与が示唆されている。当教室においては, 以前より脊柱靭帯骨化の病態解明を目的としてZucker fatty rat (ZFR) を実験モデルとして研究を行なってきた。又, 以前に当教室の米田らは, そのアキレス腱に高頻度に異所性石灰化が発生することを本研究会にて報告している。近年, 異所性石灰化の発生機序には従来考えられていたような単なる変性・壊死過程に発生するものではなく, 骨組織の石灰化過程と同様に能動的かつ種々の因子により調節されているものがあることが明らかにされてきている。今回我々は, 局所的骨化素因の解明の一助として, 同ラットのアキレス腱石灰化に関連する遺伝子発現を検索し, 又, 病理組織学的所見と比較検討した。

B. 対象と方法

生後3ヶ月齢~14ヶ月齢までのZFR25匹50肢, 及び, 対照群としてNon fatty rat (NFR) 28匹56肢

の計53匹106肢のアキレス腱を用い, 以下の項目につき3ヶ月齢ごとに比較検討した。

1. 血清カルシウム値測定

ジエチルエーテルにて吸入麻酔後開胸し, 左心室より採血施行し血清カルシウム値を測定した。

2. X線学的検索

屠殺後, 後肢を切断し, 周囲の軟部組織を取り除き, アキレス腱を露出して軟X線撮影した。撮影にはSoftex type ESMを用い, Fuji X-ray filmを使用した。20KVp, 2mA, 40秒の一定条件下に撮影した。

3. 遺伝子学的検索

摘出した一側肢のアキレス腱組織より, 直ちにPromega社製Series 9600 m-RNA isolation system使用下, ダイナビーズを用いm-RNAのみを精製。RT反応施行後, C-DNAを作製し, これを鋳型としてBMP2, BMP4, オステオカルシン (OC), オステオポンチン (OP) に対するpolymerase chain reaction (PCR) を30サイクル行ない, 内部コントロールにはglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) を用いた。PCR産物は, 3%アガロースゲルにて電気泳動後, ethidium bromide染色にて各々の遺伝子発現を検出した。

4. 病理組織学的及び免疫組織学的検索

摘出したもう一側肢のアキレス腱組織は、10%中性ホルマリンにて24時間固定。その後、10% EDTAにて72時間脱灰しパラフィン包埋により4 μ mの連続矢状断切片を作製し、HE、及び、免疫染色施行した。又、6ヶ月齢以降の一部ラットにては、脱灰せず、樹脂包埋とし、切片作製後、von Kossa 染色施行した。免疫染色はサンタクルズ社製BMP2/4、及びLSL社製osteopontinの一次抗体をover-nightで反応させ、ABC法にて行なった。

(倫理面への配慮)

東京医科大学動物実験倫理委員会の規定に基づき実験を施行した。

C. 研究結果

1. 血清カルシウム値はZFRで3ヶ月齢にてNFRの約1.5倍の高値を示したが、その後減少傾向を認めた。(表1)
2. 軟X線撮影にて、ZFRでは3ヶ月齢よりすでにアキレス腱踵骨付着部近位腹側に小石灰化陰影を全例に認め、月例を増すごとに増大傾向を認めた。NFRでは3ヶ月齢時に石灰化陰影を認めず、6~9ヶ月齢以降にて点状の小石灰化陰影を認めるのみでその後もわずかに増大傾向を認めるのみであった。(図1 A, B, C)
3. RT-PCR法にては、ZFR, NFRいずれにおいても、BMP2.4及び、OPの遺伝子発現を認めたが、OCの遺伝子発現は認められなかった。(図2)

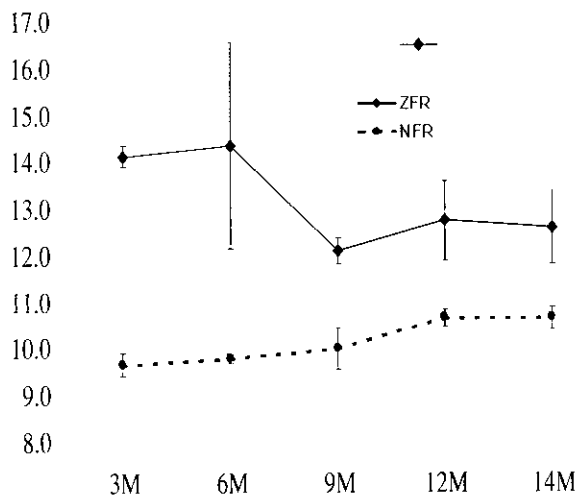


表1 血清Ca値の経月齢による変化 (ZFRとNFRの対比)

図1 A NFR 3ヶ月齢(石灰化認めず)



図1 B ZFR 3ヶ月齢(点状小石灰化を認める)



図1 C ZFR 12ヶ月齢(石灰化部の増大を認める)



図2 石灰化関連因子の遺伝子発現 (RT-PCR)
(ZFR12ヶ月齢)

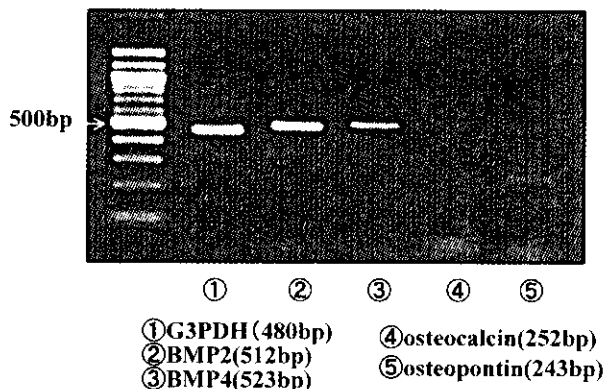


図3 B ZFR 9ヶ月齢 (HE染色)



図3 A NFR 9ヶ月齢 (HE染色)

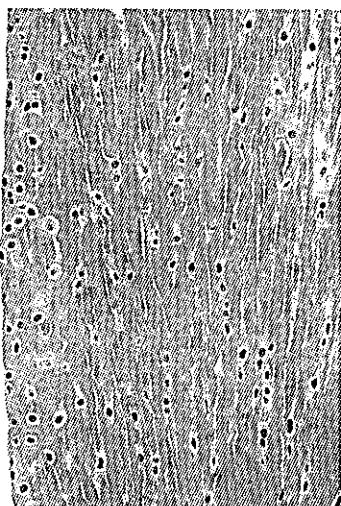


図4 A NFR 9ヶ月齢 (BMP2/4免疫染色)

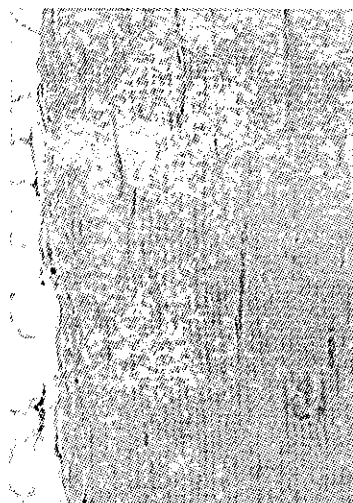
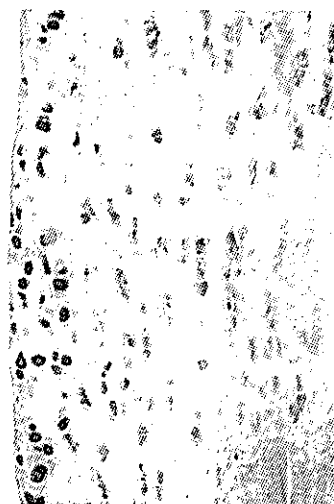


図4 B ZFR 9ヶ月齢 (BMP2/4免疫染色)



4. 病理組織学的に、HE染色にて、3ヶ月齢では、アキレス腱腫瘍骨付着 (enthesis) 部近位腹側に軟骨様細胞の出現を認め、同細胞はZFRにて数を多く認め、肥大化を認めた。9ヶ月齢ではNFRにて腱線維は平行に走行を認めたが、ZFRでは腱線維配列の乱れ、及び、軟骨様細胞周囲にエオジン好性領域を認めた。14ヶ月齢では、腱線維配列の乱れ及び粗造化が強くなり、エオジン好性領域はZFRにて広範囲に認めた。(図3 A,B)

HE染色にてエオジン好性を呈する部分を von Kossa 染色したところ、陽性反応が認められ、同部が石灰化部位と判断された。

BMP2/4による免疫染色にては、同軟骨様細胞の細胞室内に高い染色性を示し、経月齢により、その染色性は強くなる傾向を認めた。(図4 A, B) Osteopontinによる免疫染色にてはNFR, ZFR共に、肥大化した軟骨様細胞に高い染色性を認めた。(図4)

D. 考察

従来、異所性石灰化は血中のカルシウム値を基準として2種類に分類されており、一つは血中カルシウム高値のため全身の様々な組織に石灰沈着をきたすmetastatic calcification, もう一つは血中カルシウム値は正常だが組織の変性・壊死部に石灰沈着をきたすdystrophic calcificationがある。しかし、近年の動脈硬化組織の研究等にはそのどちらにも属さず、種々の因子により調節された骨形成過程に類似している異所性石灰化形成が認められるというデータが集積されつつある。今回の我々の研究では、ZFRはNFRに比し高カルシウム血症を呈した。しかし、そのアキレス腱石灰化部には明らかに正常の腱組織には認められない、軟骨様細胞の出現を踵骨付着entheses腹側に若齢期より認め、その細胞の増加・肥大化に伴い石灰化の増大が認められたことは、この石灰化もmetastatic又はdystrophicなcalcificationとは単純に言えないものと思われる。今回の我々の研究では、ZFRの異所性石灰化アキレス腱組織より、成熟骨芽細胞由来のオステオカルシンの遺伝子発現は認められなかったが、BMP2, 4の発現が認められ、石灰化アキレス腱組織中の軟骨様細胞の分化・増殖がBMPにより調節を受けていたものとする、この石灰化様式は、極めて、内軟骨性骨化の一過程に類似したものと推測された。

E. 結論

ZFRのアキレス腱異所性石灰化部位には軟骨様細胞が出現し、同細胞の増殖が石灰化の増大を導く。又、同細胞の増殖にはBMP2,4及びオステオポンチンが関与しており極めて内軟骨性骨化の一過程に類似した石灰化と判断された。

F. 研究発表

学会発表：第39回関東整形災害外科学会にて発表。

[参考文献]

- 1) Zucker, L.M. et al: Fatty a nex mutation in the rat. J.Hered. 52: 275-278, 1961
- 2) Niepel, G.A. : Enthesopathy. Acta. Rheum. Balneologica. Pistiniana 1: 1-64, 1966
- 3) 三浦幸雄ほか: Zucker fatty ratにおける脊柱靭帯骨化. 整形外科 44: 1107-1113, 1993
- 4) 古橋照之: 骨形成因子を用いた異所性骨形成に関する実験的研究. 東京医科大学雑誌. 1995;

53(4): 468-478

- 5) Urist,MR:Bone formation by autoinduction. Science 150: 893-899, 1965
- 6) Kawaguchi, H et al : Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth facto- β in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. Spine17:S33-S36,1992
- 7) 米田知二: Zucker fatty rat の石灰化アキレス腱基質の病態に関する実験的研究. 東京医科大学雑誌. 1993; 51(3) :300-310
- 8) 廣田誠一: 石灰化病変におけるオステオポンチンの発現. 病理と臨床 1996 vol.14 臨時増刊号 259-263
- 9) Bostrom K et al : Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest 91: 1800-1809, 1993
- 10) 塩井淳: 血管石灰化の分子機構—血管平滑筋細胞の形質変換—. CLINICAL CALCIUM vol.9, No.2: 9-13, 1999