

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

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

【研究要旨】

当教室ではZucker Fatty Rat（以下，ZFR）を用いた脊柱靭帯骨化症（以下，OPLL）の解明において，分化増殖因子であるTGF- β ，BMPなどの因子が骨化の前段階に与える影響について注目してきた。今回はZFRがほぼ全例にアキレス腱の異所性石灰化を発症するという事実から，アキレス腱組織における病理組織学的観察および同部のTGF- β のリガンドおよびリセプターの発現をRT-PCR法にて観察し，検討を加えた。

その結果，リガンドがI型リセプターと結合せずに細胞内に進入するオルタネートパスウェイが存在する可能性と，他の因子が惹起する異所性石灰化にパラクリンの作用する可能性が示唆された。

また，この異所性石灰化は骨化へ進展する前段階としての石灰化であるのかどうかを見極めるためにさらに高月齢のモデルを対象とした研究が今後の課題とされる。

A. 研究目的

当教室ではZucker Fatty Rat（以下，ZFR）を用いた脊柱靭帯骨化症（以下，OPLL）の解明において，分化増殖因子であるTGF- β ，BMPなどの因子が骨化の前段階に与える影響について注目してきた。

一般的に，BMPは未分化な間葉系細胞，骨原生細胞，前骨芽細胞を骨芽細胞に分化させる作用と骨芽細胞における骨形成を促進させる作用とをともに有する因子であり，TGF- β は後者のみを有する因子であると解釈されている。また，TGF- β は骨化においては細胞の分化段階や濃度や条件により促進的にも抑制的にも作用する。しかしBMPと異なり，単独作用時には異所性骨誘導作用はないとされ，他の骨誘導物質と協調して骨軟骨の分化を促進すると考えられている。

そこで，今回はZFRがほぼ全例にアキレス腱の異所性石灰化を発症するという事実から，アキレス腱組織における病理組織学的観察および同部のTGF- β のリガンドおよびリセプターの遺伝子発現を観察し，検討を加えた。

B. 研究方法

OPLLの実験動物として確立したZFRは自然発症的に人の分節型OPLLに類似した病態像を呈することからこれを実験対象とし，3ヶ月齢7匹，6ヶ月齢7匹，9ヶ月齢6匹，12ヶ月齢6匹，15ヶ

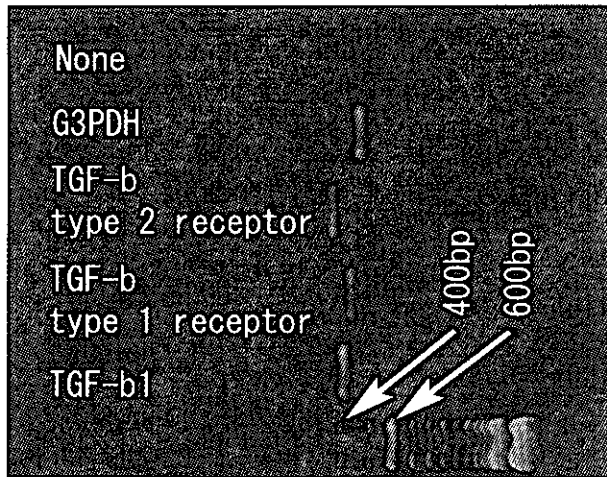
月齢1匹，計27匹，54肢を用いた。また，対照として同月齢のNon Fatty Rat（以下，NFR）を計27匹，54肢を使用した。病理組織学的観察方法として，ジエチルエーテル吸入麻酔後，後肢を切断し周囲の軟部組織を取り除きアキレス腱を露出させて軟X線写真を撮影した。アキレス腱組織を摘出した後に10%中性ホルマリンに固定し，パラフィン包埋にて4マイクロメートルの矢状断連続切片を作成した。染色はHE染色，アルシアンブルー染色，コッサ染色を施行した。RT-PCR法としては，反対側アキレス腱組織のみを踵骨付着部より筋腱以降部まで摘出した後に，ニッポンジーン製アイソジェンを用いAGPC法に準じてRNAを抽出した。その後，逆転写反応を施行しcDNAを作成し，これを鋳型として40サイクルのPCR反応を行った。プライマーはTGF- β ，TGF- β I型リセプター，TGF- β II型リセプターを標的とした。

（倫理面への配慮）

本研究の対象動物はすべて東京医科大学動物実験センターにて系統維持から繁殖まで管理されたものであり，本研究も東京医科大学動物実験倫理委員会にて許可されたものである。

C. 研究結果

軟X線撮影においては，ZFRのアキレス腱では3ヶ月齢で点状石灰化を，以降各月齢ともに増大傾向を伴った石灰化を認めるが，NFRでは6ヶ月齢



以降の一部に小石灰化を認めるにとどまった。いずれも、石灰化は踵骨付着部近傍であった。病理組織学的観察においては、ZFRではアキレス腱の石灰化を各月齢とも認め、以降増大傾向を確認できた。一方、NFRでは一部の6ヶ月齢以降のものに小石灰化を認めるにとどまった。いずれも、石灰化は踵骨付着部近傍腹側であった。しかしZFRにおける石灰化は骨芽細胞は認めないものの、軟骨細胞様小円形細胞が集積し分化傾向を示すという内軟骨性骨化に近い石灰化であった。RT-PCR法においては、TGF- β は3ヶ月齢以降において、ZFR、NFRとも全例に発現を認めた。TGF- β II型リセプターはZFRにおいて、3ヶ月齢のものですでに発現を認めるが、NFRで9ヶ月齢以降にのみ発現を認め、ZFRはNFRに比してその発現頻度の差が明らかに高かった。TGF- β I型リセプターはZFRの9ヶ月齢以降にのみ全例で発現を認め、NFRでは発現を認めなかった。尚、PCR産物はサブクローニングでシーケンスを確認している。

D. 考察

TGF- β のリガンドは発現において月齢差やZFR、NFR群間に差はなかった。TGF- β が細胞内で作用するには、II型リセプターと結合して複合体を形成した後にI型リセプターと結合することが必須であるが、今回の実験結果からはI型リセプターの発現のない異所性石灰化群が存在することがわかった。上述の実験結果より考察すると、TGF- β が異所性石灰化に直接的に関与しているのであれば、I型リセプターのサブタイプの存在する可能性や未知の複雑なTGF- β リガンドリセプターシステム構築するなどのI型リセプターを介さずに細胞内に進入するオルタネートパスウェイが存在する

可能性が示唆される。また、TGF- β が異所性石灰化に間接的に関与しているのであれば、BMPなどの他因子が直接的に関与し、TGF- β はパラクリン的に作用し、異所性石灰化を調節する役割を演じている可能性が推察された。

E. 結論

OPLLモデルを使用して異所性石灰化におけるTGF- β のリガンドリセプターシステムについて検討した結果、リガンドがI型リセプターと結合せずに細胞内に進入するオルタネートパスウェイが存在する可能性と、他の因子が惹起する異所性石灰化にパラクリン的に作用する可能性が示唆された。

また、この異所性石灰化は骨化へ進展する前段階としての石灰化であるのかどうかを見極めるためにさらに高月齢のモデルを対象とした研究が今後の課題とされる。

F. 研究発表

1. 論文発表

特になし

2. 学会発表

平成11年11月27日関東整形外科災害外科学会

平成12年2月5日厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班報告会

G. 知的所有権の取得状況

特になし

[参考文献]

- 1) 三浦幸雄ら, Zucker Fatty Ratにみられた実験的脊柱靭帯骨化. 脊柱靭帯骨化症調査研究班昭和59年度研究報告書. 143-146. 1985
- 2) 三浦幸雄ら, Zucker Fatty Ratにおける石灰化アキレス腱基質の生化学的変化の検討. 脊柱靭帯骨化症調査研究班平成2年度研究報告書. 120-123. 1991
- 3) 稲葉浩二ら, 後縦靭帯骨化症患者の脊柱靭帯培養細胞におけるTGF- β の細胞生物学的検討. 脊柱靭帯骨化症調査研究班平成4年度研究報告書. 51-53. 1993
- 4) 金民世ら, 脊柱靭帯培養細胞に対するTGF- β 1, BMP-2の作用. 脊柱靭帯骨化症調査研究班平成5年度研究報告書. 55-58. 1994
- 5) 米盛公治ら, 培養脊柱靭帯細胞におけるTGF

- β 1 の細胞内情報伝達. 脊柱靱帯骨化症調査研究班平成 6 年度研究報告書. 76—79. 1995
- 6) 米田知二ら, Zucker Fatty Rat における石灰化アキレス腱基質の生化学的分析. 脊柱靱帯骨化症調査研究班平成 7 年度研究報告書. 133—135. 1996
- 7) 飛驒一利ら, O P L L 靱帯細胞における T G F — β 関連遺伝子発現の研究. 脊柱靱帯骨化症調査研究班平成 8 年度研究報告書. 35—38. 1997
- 8) 根本敏成ら, Zucker Fatty Rat の後縦靱帯からの分離培養細胞における免疫学的検討. 脊柱靱帯骨化症調査研究班平成 8 年度研究報告書. 77—80. 1997

脊柱靱帯骨化における Matrix Gla Protein の関与

白倉 祥晴 (山口大学整形外科), 田中 浩 (山口大学整形外科),
坪根 徹 (山口大学整形外科), 市原 和彦 (山口大学整形外科),
杉山 聡宏 (山口大学整形外科), 森信 謙一 (山口大学整形外科),
脇阪 敦彦 (山口大学整形外科), 田口 敏彦 (山口大学整形外科),
河合 伸也 (山口大学整形外科)

【研究要旨】

【方法】 1) ヒト腰椎黄色靱帯における MGP mRNA 発現の加齢による変化を検討した。2) ヒト腰椎黄色靱帯から培養細胞を調整し, メナテロン (以下 MK-4) を添加して, MGP mRNA 発現に対する効果を検討した。3) Zucker Fatty Rat に MK-4 を経口投与して, その脊柱靱帯骨化抑制効果を *in vivo* で検討した。

【結果】 1) 腰椎黄色靱帯における MGP mRNA の発現は若年群に比べて老年群では有意に減少していた。2) 靱帯由来培養細胞に MK-4 を添加した群では Control 群に比し MGP mRNA 発現量が増加する傾向を認めた。3) MK-4 を投与した群では Control 群に比し 11, 14 ヶ月齢とも前縦靱帯骨化を抑制する効果が認められた。

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症は, 本来は線維性組織からなる脊柱の靱帯が, 異所性に骨化して脊髄を圧迫することによりしばしば重篤な脊髄麻痺を来す原因不明の疾患である。

骨の非コラーゲン蛋白の一つである Matrix Gla Protein (以下 MGP) の遺伝子をノックアウトしたマウスにおいて, 成長軟骨の石灰化が著明に充進し骨の長軸方向への成長が障害されると同時に, 大動脈およびその分枝に広範な異所性石灰化が生じることが報告された¹⁾。そこで, 同じく線維性組織の異所性骨化である脊柱靱帯骨化における MGP の関与について検討した。また MGP の Gla 化補酵素である MK-4 の MGP 発現ならびに脊柱靱帯骨化に対する効果を検討した。

B. 研究方法

1. ヒト腰椎黄色靱帯における MGP mRNA 発現の加齢による変化を検討した。腰椎椎管拡大術あるいは偏側骨形成的椎弓切除術の際に患者より切除した腰椎黄色靱帯から, AGPC 法にて RNA を抽出し cDNA を作成, semiquantitative PCR 法にて MGP mRNA を増幅, 電気泳動後, ゲルを CCD カメラで撮影し, NIH image1.59 にて解析した。発現の比較は若年群 7 名 (19~35 歳) と老年群 7

名 (69~83 歳) との間で行った。

2. 腰椎椎管拡大術時に切除した腰椎黄色靱帯から培養細胞を調整し (n=5), MK-4 を添加して, MGP mRNA 発現に対する効果を semiquantitative PCR 法にて検討した。

3. 脊柱靱帯骨化症の動物モデルである Zucker Fatty Rat に, 骨化の発生する 8 ヶ月齢から 14 ヶ月齢まで MK-4 を 50mg/kg/day で経口投与して軟 X 線撮影および組織学的検討を行い, MK-4 の脊柱靱帯骨化抑制効果を *in vivo* で検討した。(倫理面への配慮)

ヒト腰椎黄色靱帯の採取に際しては, 術前に患者へ本実験の内容, 意義について十分に説明し, 切除する腰椎黄色靱帯の提供について同意を得た。

動物実験に関しては, 実施前に山口大学医学部動物実験委員会の審査を受け, 承認を得た。

C. 研究結果

1. 腰椎黄色靱帯における MGP mRNA の発現は若年群に比べて老年群では有意に減少していた (図 1)。

2. 靱帯由来培養細胞に MK-4 を添加した群では Control 群に比し MGP mRNA 発現量が増加する傾向を認めたが, 統計学的有意差はなかった (図 2)。

3. Control群では11, 14ヶ月齢とも軟X線写真で5例中4例に前縦靭帯骨化を認め(図39), 組織像ではX-Pに一致する前縦靭帯内に, 線維芽細胞とは形状の異なる円形細胞の出現を認めた(図4)。トルイジンブルー染色を行うと, メタクロマジー

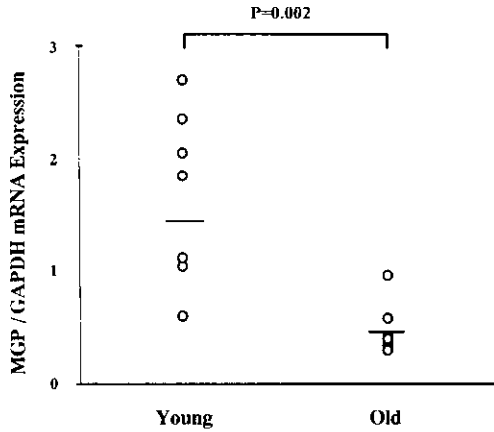


図1 腰椎黄色靭帯におけるMGP mRNA発現の加齢性変化

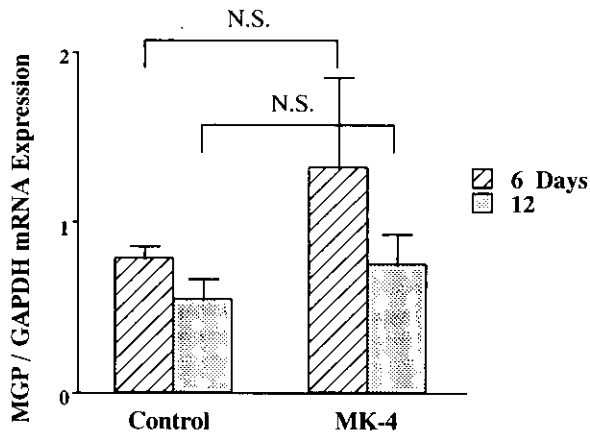


図2. 靭帯由来培養細胞のMGP発現に対するMK-4の効果

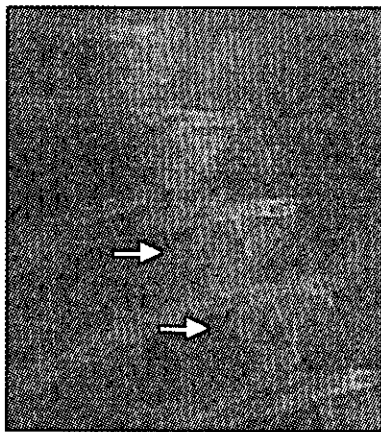


図3 Control群14ヶ月齢軟X線写真前縦靭帯骨化を認めた(→)

を示し, 軟骨様細胞が出現している事が確認された(図5)。MK-4を投与した群では11, 14ヶ月齢とも軟X線写真で5例中4例に前縦靭帯骨化を抑制する効果が認められた(図6)。



図4 Control群14ヶ月齢HE染色(×40)椎体前縁に円形細胞の出現を認めた

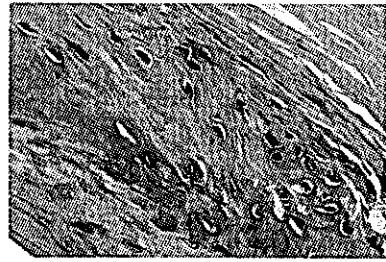


図5 Control群14ヶ月齢TB染色(×200)メタクロマジーを示す軟骨様細胞が出現していた



図6 MK-4投与群14ヶ月齢軟X線写真前縦靭帯骨化はなく, MK-4による抑制効果が認められた

D. 考察

MGPは79~83のアミノ酸からなる分子量約10000の蛋白で, 5個のGla残基を持つことによりカルシウムとの結合が可能である。MGPは骨, 軟骨, 血管, 肺, 心臓, 腎臓など広く発現しており, 石灰化や骨化の抑制因子であると考えられている^{2,3)}。またMGPのGla化補酵素であるMK-4などのVitamin Kによる石灰化抑制効果も指摘されている^{4,5)}。今回の検討で, 脊柱靭帯においてMGPが発現しており,

これが加齢によって減少することが靭帯骨化に関与している可能性が示唆された。また Zucker Fatty Rat への MK-4 経口投与の結果より、脊柱靭帯骨化を Vitamin K 投与によって予防できる可能性も確認された。これらの結果から、脊柱靭帯において、以前より報告されている BMP や IGF-I、インスリンなどが骨化促進因子として作用するのに対して、MGP は骨化抑制因子として働いており、それらのバランスが破綻することが靭帯骨化を発生させる一因であると考えられる。

E. 結論

ヒト腰椎黄色靭帯において、MGP mRNA の発現が加齢により減少していた。また、Zucker Fatty Rat に MK-4 を経口投与することによりその脊柱靭帯骨化を抑制する効果が確認できた。

[参考文献]

- 1) Luo G., et al.: Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *nature* 1997 Mar 386(6620): 78-81
- 2) Mori K., et al.: Expression of matrix GLA protein (MGP) in an in vitro model of vascular calcification. *FEBS Lett.* 1998 Aug 433(1-2): 19-22
- 3) Lawton DM., et al.: Expression of the gene encoding the matrix gla protein by mature osteoblasts in human fracture non-unions. *Mol. Pathol.* 1999 Apr 52(2): 92-96
- 4) Seyama Y., et al.: Effect of vitamin K2 on experimental calcinosis induced by vitamin D2 in rat soft tissue. *Int J Vitam Nutr Res.* 1996; 66 (1): 36-38
- 5) Seyama Y., et al.: Comparative effects of vitamin K2 and vitamin E on experimental arteriosclerosis. *Int J Vitam Nutr Res.* 1999 Jan 69 (1): 23-26

年齢・肥満度と独立したインスリン反応性と OPLL 骨化傾向

中村 耕三 (東京大学医学部整形外科), 阿久根 徹 (東京大学医学部整形外科),
緒方 直史 (東京大学医学部整形外科), 川口 浩 (東京大学医学部整形外科),
星地並都司 (東京大学医学部整形外科), 大西五三男 (東京大学医学部整形外科)

【研究要旨】

後縦靭帯骨化 (OPLL) と糖代謝異常との関連を検討するため OPLL 手術目的で入院した 52 例に 75g 経口糖負荷試験を施行し, 空腹時血糖値およびインスリン値, ヘモグロビン A1c を測定した。また, 負荷後 30 分間の血糖値上昇分とインスリン値上昇分の比をとってインスリン反応性インデックスとした。OPLL 骨化傾向の指標として術直前のレントゲン側面像より OPLL 罹患椎体数を計測した。更に, 年齢および肥満度の影響を排するため, 52 例のうちで年齢と肥満度がともに平均 $\pm 1SD$ 以内である群を対象とし, 各因子の相関性を検討した。その結果, 同程度の年齢および肥満度の群の中でも, インスリン分泌反応性が高いほど OPLL 骨化椎体数が多いことが明らかとなった。年齢・肥満度とは独立してインスリン反応性の亢進が, OPLL の発現・進展に関与している。

A. 研究目的

脊椎後縦靭帯骨化 (OPLL) は, 耐糖能異常を有する者においてその発生頻度が高いことが知られており, 糖代謝異常が OPLL の発現および進展に関与している可能性が指摘されてきた。本研究では, OPLL 患者における OPLL 骨化傾向に対する糖代謝異常の関与を検討する目的で, 各種糖代謝関連因子の血中マーカーと OPLL の骨化の程度との相関性について検討した。

B. 研究方法

対象は, 手術目的で当科に入院した OPLL 患者 52 例 (男性 47, 女性 5) である。手術時年齢は 32 歳 ~ 78 歳 (平均 57 歳) であった。全例十分な説明のもとに informed consent を得た。術前 75g 経口糖負荷試験をおこない, 糖代謝の指標として, 空腹時血糖値およびインスリン値, ヘモグロビン A1c を測定し, また, インスリン反応性インデックスを, (負荷後 30 分インスリン値 - 空腹時インスリン値) / (負荷後 30 分血糖値 - 空腹時血糖値) により算出した。OPLL の骨化傾向の指標としては, 術直前の, 頸椎, 胸椎, 腰椎の単純レントゲン像における OPLL 罹患椎体数を計測した。なお, 下位頸椎および上位胸椎で椎体が読影できない箇所については断層撮影を追加した。上記各指標値間の相関係数を計算し, Fischer の Z 変換をおこない検定した。

さらに, 年齢および肥満度による影響を排除する

ために, OPLL 患者 52 例の平均年齢および Body Mass Index の両者とも平均値 $\pm 1SD$ 以内の条件を満たす群を選んだところ, この条件を満たすものは 28 例であった。同様に, 上記各指標値間の相関係数を計算し有意差検定をおこなった。

C. 研究結果

52 例の検討の検討結果は以下の通りであった。

1. 糖代謝の指標のうち, 空腹時血糖値とヘモグロビン A1c 値は, OPLL 罹患椎体数と有意な相関性を示さなかった。
2. 空腹時インスリン値は, OPLL 罹患椎体数と有意な正の相関性を示した ($r=0.35, P<0.05$)。また, インスリン反応性インデックスも, OPLL 罹患椎体数と有意な正の相関を示した ($r=$

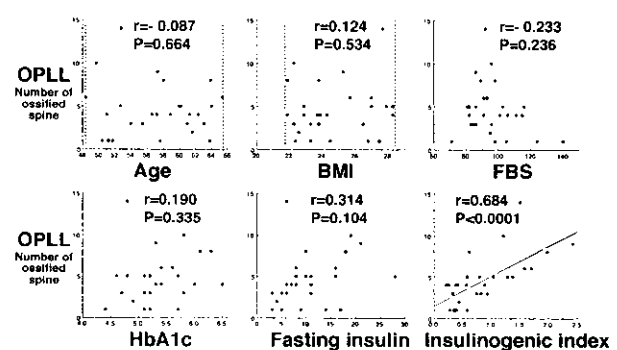


図 年齢・BMIとも 1SD 以内の 28 例における各因子と OPLL 罹患椎体数との関係

0.67, $P < 0.0001$)。

3. 年齢および肥満度もOPLL罹患椎体数と有意な相関を示した ($r = -0.52$, $P < 0.0001$ および $r = 0.57$, $P < 0.0001$)。

28例の検討結果は以下の通りであった。

4. 5年齢と肥満度のどちらもOPLL罹患椎体数と有意な相関は示さなかった。
5. 空腹時血糖値とヘモグロビンA1c値もまた、OPLL罹患椎体数と有意な相関性を示さなかった。
6. 空腹時インスリン値も、OPLL罹患椎体数と有意な正の相関性を示さなかった。
7. インスリン反応性インデックスのみが、OPLL罹患椎体数と有意な正の相関を示した ($r = 0.68$, $P < 0.0001$)。

D. 考察

今回の検討の結果、糖代謝関連因子のうち、年齢や肥満度の影響を排してもOPLLの骨化傾向に関与しているものは、インスリンの分泌反応性の亢進であることが明らかとなった。血糖値の上昇に比してインスリン値の上昇が有意に上回っていた事実は、OPLL患者において、糖代謝におけるインスリンの主たる標的臓器である肝臓や筋肉における細胞レベルでのインスリン反応性が低下している可能性を示唆するものと言える。インスリン分泌の亢進により、高濃度の血中インスリンが靭帯細胞に作用する可能性が考えられる。高濃度のインスリンは、骨形成促進因子である insulin-like growth factor-I (IGF-I) の受容体を介して IGF-I 作用を発現することが知られており、またインスリン自身にも骨形成促進作用がある可能性が示唆されている。これらメカニズムの検討、およびOPLL患者におけるインスリン反応性の遺伝子レベルでの検討を進めることによって、OPLLの発症機序の解明を更に進めたいと考えている。

E. 結論

インスリン分泌の亢進は、後縦靭帯骨化の発現・進展に関与している。

F. 研究発表

本論旨は、平成11年度脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班総会にて発表した。

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

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—

中村 耕三 (東京大学医学部整形外科), 緒方 直史 (東京大学医学部整形外科),
川口 浩 (東京大学医学部整形外科), 阿久根 徹 (東京大学医学部整形外科),
星地亜都司 (東京大学医学部整形外科), 大西五三男 (東京大学医学部整形外科)

【研究要旨】

インスリンおよびIGF-Iは、糖代謝や成長因子、様々な細胞の増殖・分化の調節因子としてに不可欠な因子であり、骨代謝においてもその強力な骨形成促進作用が知られている。後縦靭帯骨化症 (OPLL) の発症および骨化の伸展においてもインスリン、IGF-Iの関与が指摘されている。一方で、インスリン、Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) の作用伝達のための最も重要なタンパク質と考えられているインスリン受容体基質(IRS-1)をノックアウトしたマウスが作製され、高インスリン血症を呈し、インスリン非依存型糖尿病(NIDDM)のモデルマウスとなりうることが明らかとなった。本ノックアウトマウスの骨組織のin vivoでの解析により、強力な骨量減少を呈することが明らかとなった。さらに、in vivo, in vitroでの検討を進め、IRS-1を介するシグナルが、骨芽細胞自身の増殖・分化のみならず、前駆細胞からの破骨細胞形成の支持に重要であることが明らかとなり、IRS-1を介するシグナルは正常な骨代謝の維持に中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。

A. 研究背景および目的

インスリンおよびIGF-Iは重要な骨・軟骨代謝調節因子であり、臨床的にも糖尿病患者やIGF-I欠損症であるLaron型小人症患者では骨量が減少していること、OPLL患者は高インスリン血症を示すことが報告されている。また、インスリンおよびIGF-Iの細胞内情報伝達に必須の分子として、両者の受容体キナーゼの共通の基質であるインスリン受容体基質 (IRS-1およびIRS-2) が知られている。本研究の目的は、近年作製されたIRS-1ノックアウトマウス (Nature 372: 182)の骨組織のin vivoおよびin vitroの解析により、IRS-1を介するシグナルの骨代謝における役割を解明することである。

B. 研究方法および

C. その結果

1. In vivoでの骨の解析

IRS-1ノックアウト (*IRS-1*^{-/-})マウス (4, 8, 12, 16週齢)の骨密度 (DEXA)は、野生型 (WT)マウスに比べて、大腿骨全体で27.3%、脛骨全体で20.7%低下しており、各週齢において同程度に骨密度が低下していた (図1-a)。8週齢における長軸方向に20分割したどの分面の骨密度も、*IRS-1*^{-/-}マウスにおいて同程度の低下がみられ部位による差は認められなかった

(図1-b)。3次元マイクロCT画像でも、骨幹端部における海綿骨梁の減少と骨幹部における皮質骨の菲薄化が著明に認められた (図2)。骨組織形態計測では、*IRS-1*^{-/-}マウスにおいて骨形成および骨吸収の指標が共に減少していたが、骨形成の低下 (BFR/BSで92.0%減)が骨吸収の低下 (ES/BSで45.0%減)を上回り、低回転型骨粗鬆症の所見を呈していた (表1)。

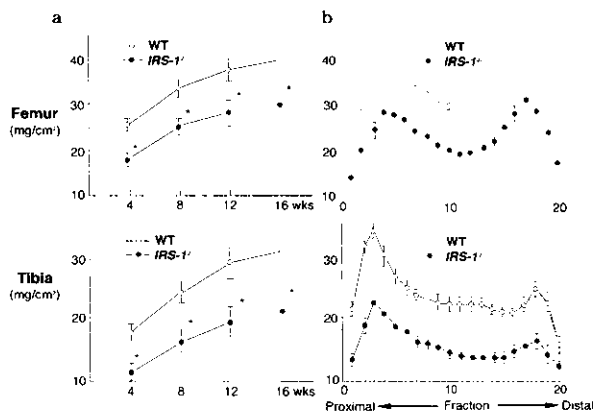


図1 a 4, 8, 12, 16週齢におけるIRS-1ノックアウトマウス (*IRS-1*^{-/-})および野生型マウス (WT)の大腿骨 (上段)、脛骨 (下段)の骨密度 (DEXA)

図1 b 8週齢のIRS-1ノックアウトマウス (*IRS-1*^{-/-})および野生型マウス (WT)の長管骨を長軸方向に20分割した各分面の骨密度

表1 IRS-1ノックアウトマウス(*IRS-1^{-/-}*)と野生型マウス(WT)の脛骨における海綿骨、皮質骨の骨組織形態計測

	BV/TV (%)	Tb.Th (μm)	Ob.S/BS (%)	BFR/BS (mm ³ /cm ² year)	OS/BS (%)	Oc.N/B.Pm (cells/10cm)	Oc.S/BS (%)	ES/BS (%)	C.Th (X 10 ⁻¹ mm)	MAR (μm/day)
WT	8.96 ± 0.24	30.44 ± 1.98	7.79 ± 1.01	5.49 ± 0.89	8.00 ± 1.03	120.89 ± 11.22	7.79 ± 1.67	9.47 ± 1.28	2.78 ± 0.29	2.16 ± 0.34
<i>IRS-1^{-/-}</i>	5.76 ± 0.71*	14.79 ± 2.32*	2.16 ± 0.86*	0.89 ± 0.26*	1.23 ± 0.18*	59.46 ± 12.53*	3.11 ± 0.36*	4.27 ± 0.71*	1.53 ± 0.12*	N.D.

* : P < 0.01

2. 骨芽細胞・破骨細胞におけるIRSシグナルの検討

新生仔マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞様細胞、骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養から単離精製した成熟破骨細胞、および破骨細胞前駆細胞株であるC7細胞におけるIRS-1およびIRS-2の発現をcompetitive RT-PCRにて検討した。

WT由来の骨芽細胞にはIRS-1は強く発現していたがIRS-2の発現は微弱であった(図3-左)。*IRS-1^{-/-}*由来の骨芽細胞にはIRS-2のみが発現していた(図3-左)。

WT由来骨芽細胞をインスリンおよびIGF-Iで刺激して抗リン酸化チロシン抗体および抗IRS-1抗体を用いた免疫沈降・western blotを行ったところ、IRS-1の自己リン酸化を含む複数の蛋白のリン酸化が誘導された。*IRS-1^{-/-}*由

来骨芽細胞を両因子で刺激してもチロシンリン酸化の誘導は見られなかったため、骨芽細胞においてはIRS-1を介するシグナルがメインストリームであることが明らかとなった。

一方、WTおよび*IRS-1^{-/-}*どちらのマウス由来の成熟破骨細胞にも、各分化段階におけるC7細胞にも、IRS-1は全く発現しておらず、IRS-2の発現が強く認められた(図3-中、右)。

3. 培養骨芽細胞の増殖・分化におけるIRS-1の関与

IGF-Iとインスリン添加による培養骨芽細胞の増殖能は3日後の[³H]-TdRの取り込みを、分化能は14日後のALP活性によって解析した。コントロールとして、増殖能の検討にはFGF-2、分化能に対してはBMP-2を用いた。

サイトカイン非添加群においては、*IRS-1^{-/-}*由来の培養骨芽細胞の増殖能・分化能ともに、WT由来の骨芽細胞に比べて有意に低下していた(図4-a, b)。IGF-Iとインスリンを添加することで、両サイトカイン共にWT由来の骨芽細胞の増殖能(図4-a)および分化能(図4-b)をさらに濃度依存性に促進したが、*IRS-1^{-/-}*マウス由来の骨芽細胞には全く影響を与えなかった(図4-a, b)。しかしながらFGF-2による増殖促進作用とBMP-2による分化促進作用

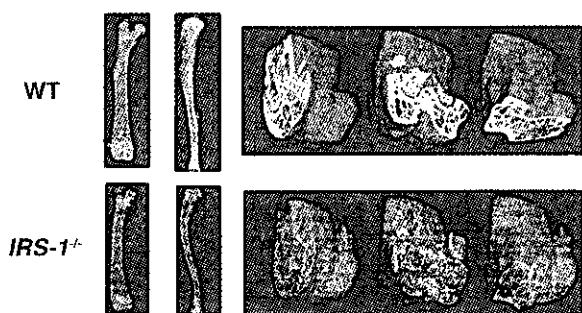


図2 IRS-1ノックアウトマウス(*IRS-1^{-/-}*)と野生型マウス(WT)の長管骨のX-P写真(左), および大腿骨遠位端における3次元マイクロCT画像(右)

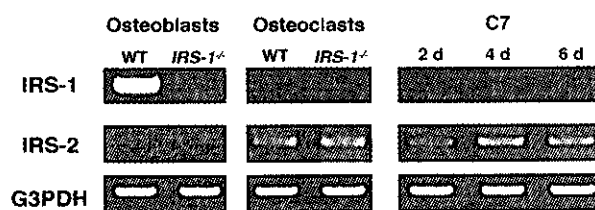


図3 competitive RT-PCR法を用いた、骨芽細胞、成熟破骨細胞、および破骨細胞前駆細胞株C7細胞(培養後2日、4日、6日)でのIRS-1(上段)およびIRS-2(下段)の発現

コントロール: G3PDH

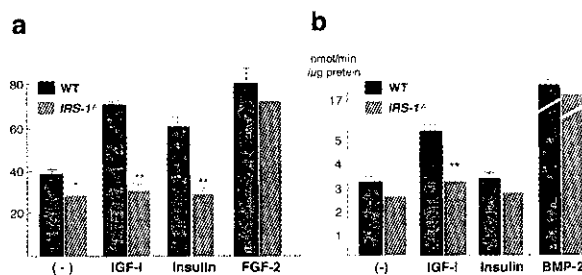


図4 a IRS-1ノックアウトマウス(*IRS-1^{-/-}*)および野生型マウス(WT)由来培養骨芽細胞における3日後の[³H]-TdRの取り込みによる増殖能の検討

図4 b IRS-1ノックアウトマウス(*IRS-1^{-/-}*)および野生型マウス(WT)由来培養骨芽細胞における培養14日後のALP活性による分化能の検討

は、WT由来およびIRS-1^{-/-}由来の骨芽細胞において同程度に見られた(図4-a, b)。以上よりIRS-1^{-/-}マウス由来の骨芽細胞において、IGF-Iとインスリンの増殖、分化へのシグナルが一部ブロックされていることが明らかとなった。

4. 培養破骨細胞の分化・活性・survivalにおけるIRS-1の関与

IGF-I, 1,25(OH)₂D₃, IL-11, およびPGE₂存在下での、WTまたはIRS-1^{-/-}由来の、骨芽細胞と造血系細胞(骨髓細胞または脾細胞)の共存培養系におけるTRAP陽性多核細胞形成能を測定した。また、コラーゲンゲル上で形成した破骨細胞を単離精製した後survival rateおよび象牙片上でのpit formationを測定した。

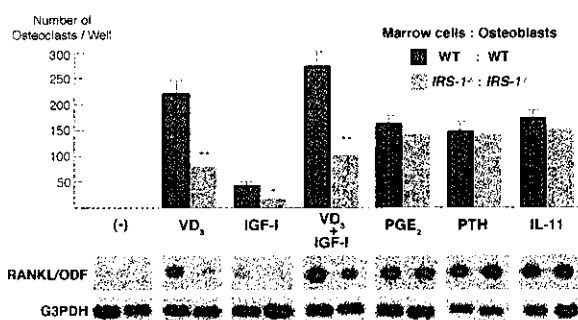


図5 上段棒グラフ;IGF-I, 1,25(OH)₂D₃, IL-11, およびPGE₂存在下での、IRS-1ノックアウトマウス(IRS-1^{-/-})および野生型マウス(WT)由来の骨芽細胞と骨髓細胞の共存培養系におけるTRAP陽性多核細胞形成能。下段;各サイトカイン刺激による骨芽細胞におけるODFの発現(Northern blotting法による発現)

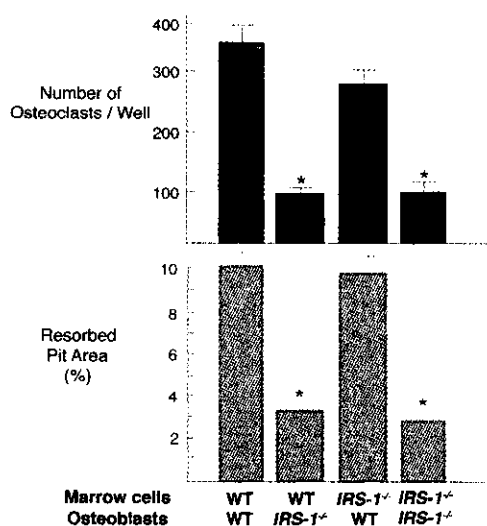


図6 1,25(OH)₂D₃存在下でのIRS-1ノックアウトマウス(IRS-1^{-/-})および野生型マウス(WT)由来の骨芽細胞, 骨髓細胞の組み合わせによる共存培養系での破骨細胞形成能(上段), およびその骨吸収活性(下段)。

更に、同様のサイトカイン刺激下での骨芽細胞におけるODFの発現をNorthern blottingで検討した。

IGF-Iのみならず1,25(OH)₂D₃存在下において、骨芽細胞および造血系細胞がIRS-1^{-/-}由来の場合、破骨細胞形成が著明に低下していた(図5)。また造血系細胞の由来がWTでもIRS-1^{-/-}でも、骨芽細胞がIRS-1^{-/-}由来の場合に限り、破骨細胞形成が著明に低下していた(図6)。しかしながら形成された破骨細胞の骨吸収活性は正常であり(図6)、またsurvival rateも同様に正常であった。このことより、骨芽細胞がIRS-1^{-/-}由来の場合のみに破骨細胞形成能支持能の低下が認められた。そこでIGF-Iおよび1,25(OH)₂D₃刺激によるRANKL/ODFの誘導を検討したところ、WT由来骨芽細胞に比べてIRS-1^{-/-}由来骨芽細胞では、IGF-Iのみならず1,25(OH)₂D₃刺激によるRANKL/ODFの発現が著明に抑制されていた(図5下段)。一方、IL-11およびPGE₂による破骨細胞形成支持能およびODF発現は、WTおよびIRS-1^{-/-}由来の骨芽細胞間で差はなかった(図5)。

尚、本研究で使用したマウスに関しては、全て東京大学動物実験倫理委員会の基準に基づいて実験を行った。

D. 考察および

E. 結論

IRS-1^{-/-}マウスでは明らかな骨代謝回転の低下が見られ、低回転型の骨粗鬆症が認められた。その背景には骨芽細胞機能の変化、すなわち増殖・分化能の低下、アポトーシスの亢進、およびODFの発現抑制に基づく破骨細胞形成支持能の低下が存在することが明らかとなった。IGF-I, インスリンからのシグナルのみならず、1,25(OH)₂D₃など他のシグナルとのクロストークを介して、IRS-1は骨代謝回転の維持に重要な役割を果たしていることが示された。

F. 研究成果

1. 論文発表

Naoshi Ogata, Hiroshi Kawagushi, et al. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable to maintain bone turnover. Journal of Clinical Investigation 105: 935-945, 2000.

2. 学会発表

1. 緒方直史, 近津大地, 中村耕三, 川口浩:
骨芽細胞におけるインスリン受容体基質-1
(IRS-1) を介するシグナルは骨代謝回転の
維持に必須である。第17回日本骨代謝学会。
2. 緒方直史, 川口浩, 近津大地, 中村耕三:
インスリン受容体基質-1 (IRS-1) シグナル
の骨代謝における重要性。第14回日本整形外
科学会基礎学術集会。
3. Ogata N, Kubota T, Tobe K, Kadowaki
T, Nakamura K, Kawaguchi H : Mice
lacking insulin receptor substrate-1
exhibit low-turnover osteopenia through
impairment of osteoblast functions. 21st
Annual Meeting of the American Society
of Bone and Mineral Research.

G. 知的所有権の取得状況

特許, 実用新案等は特にありません。

TWY マウス原因遺伝子 *NPPS* の OPLL への関与

前田 真吾 (鹿児島大学医学部整形外科学教室),
猪狩 勝則 (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),
古島 弘三 (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),
原田 征行 (弘前大学医学部整形外科学教室), 古賀 公明 (鹿児島大学医学部整形外科学教室),
松永 俊二 (鹿児島大学医学部整形外科学教室), 小宮 節郎 (鹿児島大学医学部整形外科学教室),
井ノ上逸朗 (群馬大学生体調節研究所調節機構部門遺伝情報分野)

【研究要旨】

近年, nucleotide pyrophosphatase (以下 *NPPS*) の遺伝子変異が OPLL モデル動物である *twy* マウスの原因となっていること, またヒトの *NPPS* 遺伝子多型のひとつであるイントロン 20 の多型が患者・対照関連試験において有る程度の有意差を認めたことが報告され, *NPPS* 遺伝子と OPLL との関連性が示唆された。*NPPS* 遺伝子の OPLL への関与について, 連鎖解析, 関連解析により検討を試みた。まず 110 対の罹患同胞体をもちい連鎖解析を試みた。その結果, *NPPS* 内の遺伝子マーカーで $p=0.197$, 隣接する D6S457 で $p=0.236$ と有意な結果は得られなかった。また有意な差があったとされるイントロン 20(-11) の多型について患者・対照関連試験による遺伝子座検定を行った。結果, (-11) で $p=0.367$ と有意差を認めることはできなかった。本研究と Nakamura らの結果の相違を検証するため, サンプルの Hardy-Weinberg 平衡からの乖離度を検定した。Nakamura らの結果は $P=0.017$ と有意な乖離を認め, 偏ったサンプル収集, もしくはタイピングエラーの可能性が示唆された。これらを総合すると *NPPS* 遺伝子が OPLL 原因遺伝子として少なくとも主要なものではないと結論づけられた。

A. 研究目的

近年 nucleotide pyrophosphatase (以下 *NPPS*) の遺伝子変異が OPLL モデル動物である *twy* マウスの原因となっていることが Okawa ら¹⁾ により明らかにされた。また *NPPS* 遺伝子多型がヒトにおいてもいくつか同定され, そのなかのイントロン 20(-11) 多型 (T の欠損) が患者・対照関連試験においてある程度の有意差を認めたことが Nakamura ら²⁾ により報告されており, ヒトにおいても *NPPS* 遺伝子と OPLL との関連性が示唆された。そこでわれわれは *NPPS* の OPLL に対する遺伝学的関与を確認するため, *NPPS* 遺伝子座と OPLL との罹患同胞対連鎖解析を試みた。また有意差があったとされるイントロン 20 の多型について患者・対照関連試験による確認を行なった。

B. 研究方法

NPPS 近傍の CA リピート・マーカーを同定するため, *NPPS* 領域を含む PAC クロームを入手し制限酵素で切断して, CA が 20 回反復するオリゴヌクレオチド・プローブを用いたサザン・プロットにて CA

リピートを含む DNA 断片を同定し, サブ・クローニングした。このクロームのシーケンスを行ない CA リピート・マーカーを確認し, RH mapping を行なった後, 既存の他のマイクロ・サテライト・マーカーと共に罹患同胞対連鎖解析に用いた。タイピングは鹿児島大学と弘前大学で主に採取された 110 対の罹患同胞の血液より抽出された genomic DNA に対し, GENESCAN にて施行し, 連鎖の検定はノンパラメトリック法である罹患同胞対法に従い, SAGE パッケージの SIBPAL プログラムにて行なった。イントロン 20(-11) の遺伝子型タイピングは, 鹿児島大学と弘前大学で主に採取された患者 (251 人) と対照者 (頸胸腰椎側面単純レントゲンにて OPLL を否定された 173 人) の血液より抽出された genomic DNA を用い, 報告されている²⁾ プライマー・セット Ex21A (Forward: AAGCAATTTTC TTCTCTGTGCC, Reverse: GAGGAACCCGTA ACTCACTTTG) にて PCR-SSCP 法を試みた。ところが遺伝子型判別が困難であったため, PCR 直接シーケンス法にて行なった。この際新たに認められたイントロン 20(-10) と (-9) の多型についても同

時にタイピングを行ない、(-11)と併せて患者・対照関連試験を施行した。本研究とNakamuraら²⁾のイントロン20(-11)の結果の相違を検証するため、サンプルに偏りがいないかHardy-Weinberg平衡からの解離度を検定し、さらにtype・errorの検定を行なった。

(倫理面への配慮)

全ての血液サンプルは十分な口頭と文章による説明の後、同意を得て同意書を作成し、頸胸腰椎側面単純レントゲン撮影でOPLLの有無を確認後採取した。また本研究は鹿児島大学、および弘前大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

NPPS遺伝子座は第6染色体長腕, 6q22にマップされているが、今回得たNPPSマーカーの詳細な位置をRH mappingにて確認した。110対の罹患同胞による連鎖解析の結果、NPPSマーカーで $p=0.20$ 、隣接するD6S457で $p=0.24$ と有意な連鎖は得られなかった(図1)。

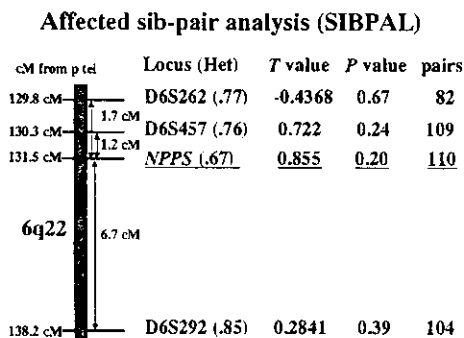


図1 NPPSマーカーと近傍のマイクロサテライトマーカーの罹患同胞連鎖解析の結果

イントロン20(-11)多型の遺伝子型タイピングをPCR-SSCP法にて試みた結果、3種類を超えるバンドが出現し、このPCR断片の中に(-11)の塩基以外に塩基多型が存在することが示唆された(図2)。そこで直接シーケンスで確認した結果、イントロン20(-10)の塩基cが欠損する多型と、イントロン20(-9)の塩基gがaに置換する多型が今回新たに見出された(図2)。この連続する3塩基の多型の組み合わせによって複雑なSSCPパターンを呈したと考えられた。

直接シーケンス法による遺伝子型タイピングにより患者・対照関連試験を行なった結果、イントロン20(-11)では、Nakamuraら²⁾に準じてvariantアレルを有しない群と有する群に分けた場合

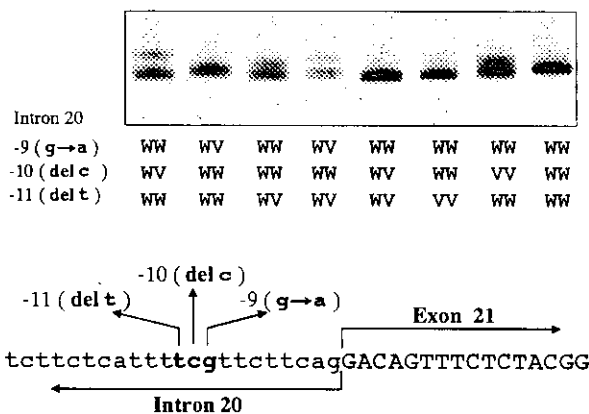


図2 NPPS遺伝子のイントロン20(-11)多型と新たに見出した(-10)と(-9)の多型の組み合わせにより生じた8通りのPCR-SSCP多型。(W: wild-type allele, V: variant allele)

イントロン20-11 (del t)

	W/W	W/V	V/V		W/W	W/V+V/V	W	V
OPLL患者	105	110	36		105	146	320	182
対照	60	90	23		60	113	210	136
				χ^2			2.2028	0.8137
				P			0.1377	0.367

表1 イントロン20(-11)多型の患者・対照関連試験

イントロン20-10 (del c)

	W/W	W/V	V/V		W	V
OPLL患者	243	8	0		494	8
対照	164	8	1		336	10
				χ^2		1.6573
				P		0.198

表2 イントロン20(-10)多型の患者・対照関連試験

イントロン20-9 (g-a)

	W/W	W/V	V/V		W	V
OPLL患者	236	15	0		487	15
対照	170	3	0		343	3
				χ^2		4.435
				P		0.035

表3 イントロン20(-9)多型の患者・対照関連試験

$p=0.1377$ 、wild-typeアレルとvariantアレルに分けた場合 $p=0.367$ といずれも有意差を認めず(表1)、Nakamuraら²⁾と異なる結果となった。イントロン20(-10)でも $p=0.198$ と有意差を認めなかった(表2)。イントロン20(-9)では $p=0.035$ と弱い有意差を認めた(表3)。

本研究とNakamuraらのサンプルの、イントロン20 (-11) 遺伝子型のHardy-Weinberg平衡からの解離についてカイ二乗検定を行なった結果、Nakamuraらの対照群において $p=0.017$ と有意な解離が認められた(表4)。

<本研究>	W/W	W/V	V/V	計	χ^2	P
OPLL患者	105 (101.8)	110 (116.1)	36 (33.1)	251 251	0.675	0.411
対照	60 (63.7)	90 (82.5)	23 (26.7)	173 173	1.409	0.235

<Nakamuraら>	W/W	W/V	V/V	計	χ^2	P
OPLL患者	112 (116.7)	164 (154.9)	47 (51.4)	323 323	1.101	0.294
対照	153 (143.3)	130 (149.6)	49 (39.1)	332 332	5.731	0.017

表4 本研究とNakamuraらのサンプルのHardy-Weinberg平衡からの解離の比較(括弧内は期待値)

<本研究>	W/W	W/V+V/V	<本研究>	W	V
OPLL患者	105	146	OPLL患者	320	182
対照	60	113	対照	210	136
<Nakamuraら>			<Nakamuraら>		
OPLL患者	112	211	OPLL患者	388	646
対照	153	179	対照	436	228

$\alpha = 0.0029, t = 2.76$
 $Z \text{ power} = 0.4008$
 $\text{power} = 0.6591$

$\alpha = 0.036, t = 1.8$
 $Z \text{ power} = 0.1399$
 $\text{power} = 0.9192$

表5 Type II errorの検定

ここまでの患者・対照関連試験は、患者と対照のアレル頻度に差がないことを検定(差がないという帰無仮説が正しいときにこれを棄却する確率[Type II error]を p valueで表す)したものであった。そこでNakamuraらの示した結果を基に、患者と対照のアレル頻度に差があることを検定するためType II errorの検定を行なった(差がないという帰無仮説が誤りであるときにこれを棄却しない確率がType II errorで、これを1から引いた値[帰無仮説が誤りであるときにこれを棄却する確率]を検定力[Power]として表す)。その結果、variantアレルを有しない群と有する群に分けた場合検定力0.6591で、アレル別に分けた場合では検定力0.9192で、すなわち91.92%の確率で患者・対照間に差があることが否定された。

D. 考察

NPPSがOPLLモデル動物TWYマウスの原因遺伝子とされり、ヒトNPPSの塩基多型の患者・対照関連試験にて、イントロン20 (-11) に有意差を認め²⁾、ヒトにおいてもNPPSがOPLLに関与している可能性が示唆されたことから、本研究ではこれを罹患同胞対連鎖解析と患者・対照関連試験にて検討した。

罹患同胞対連鎖解析の結果、NPPS マーカー、近傍のD6S457いずれも連鎖を認めなかった。このことからNPPSがOPLL原因遺伝子として少なくとも主要なものではないことが示唆された。

患者・対照関連試験においてはイントロン20(-11)に有意差はみられなかった。今回新たに見出したイントロン20(-10)と(-9)の連続する塩基多型の患者・対照関連試験の結果、(-10)には有意差を認めず、(-9)には弱い有意差を認めた。しかし(-9)はvariantのアレル頻度がOPLL 2.99%, 対照0.87%と低く、主要な原因多型としては考えにくい。このように本研究とNakamuraら²⁾の患者・対照関連試験の結果には相違がみられたが、この原因を検討するため、まず両者のサンプルに偏りはないか、すなわちアレル頻度と遺伝子型がHardy-Weinberg平衡にある集団であるか検定した。その結果Nakamuraらの対照群においてHardy-Weinberg平衡からの解離が認められた。この理由として次の可能性が考えられた。1つは偏った集団を選んだ可能性、2つ目はサンプル数が少ない可能性、3つ目はNakamuraらはイントロン20(-10)と(-9)の多型を認めておらず、遺伝子型タイピングをPCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) またはASO (allele-specific oligonucleotide) hybridizationにて施行し、いずれにしても直接シーケンスでみていないため、タイピング・エラーを生じていた可能性である。Nakamuraらのイントロン20 (-11) の患者・対照関連試験については、Type II errorの検定も行ない、91.92%の確率で有意差があるということが否定された。

以上よりヒトNPPSはOPLLに少なくとも密接には関与しておらず、TWYマウスとヒトのOPLLは遺伝学的には異なる疾患であることが示唆された。

E. 結論

1. NPPS 遺伝子のOPLLに対する遺伝学的関与を確認するため、NPPS内のCAリピート・マーカーを同定し罹患同胞対連鎖解析を行なった。

その結果 *NPPS* と *OPLL* に有意な連鎖を認めなかった。

2. Nakamuraらにより有意差が報告されているイントロン20(-11)について患者・対照関連試験を行った。新たに見出した(-10)と(-9)塩基による複雑なSSCPパターンを示しタイピングが困難であった為、直接シーケンス法にてタイピングを行なった。患者・対照関連試験の結果、イントロン20(-11)と(-10)に有意差を認めず、(-9)には弱い有意差を認めた。
3. 本研究とNakamuraらのイントロン20(-11)の患者・対照関連試験の結果の相違を検証したところ、Nakamuraらの対照群にHardy-Weinberg平衡からの解離を認め、Type II errorの検定にて、91.92%の検定力で有意差を否定する結果を得た。
4. 罹患同胞対連鎖解析と患者・対照関連試験の結果から、*NPPS* は *OPLL* の主要な原因遺伝子ではないことが示唆された。

[参考文献]

- 1) Okawa, A. et al. Mutation in *NPPS* in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat. Genet.* 19: 271-273 (1998)
- 2) Nakamura, I. et al. Association of the human *NPPS* gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (*OPLL*). *Hum. Genet.* 104: 492-497 (1999)

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)

中島 新 (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),
相庭 温臣 (千葉大学医学部整形外科), 清水 純人 (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), 守屋 秀繁 (千葉大学医学部整形外科)

KEYWORD = db/db mouse, leptin, leptin receptor, spinal ligament, spinal hyperostosis

【研究要旨】

[目的] 脊柱靭帯骨化症のモデル動物, Zucker fatty ラットではレプチン受容体遺伝子変異が存在する。本研究では, Zucker fatty ラットとは異なるレプチン受容体遺伝子異常 (Ob-Rb 特異的欠損) を有する db/db マウスの脊椎を解析し, レプチン受容体の機能異常と脊柱靭帯骨化の関連を明らかにすることを目的とした。[方法] homo (db/db), hetero (db/+), wild (+/+) の脊椎および下肢を経時的に摘出し, X線学的検討を行った。[結果] homo は8ヵ月齢以上の飼育は困難であり, この時点ではhomo, heteroともに明らかな脊柱靭帯骨化の所見は観察されなかった。heteroは長期間飼育が可能であり, 1年8ヵ月齢まで観察を続けたが, 明らかな脊柱靭帯骨化の所見は観察されなかった。[結論] C57BL/Ksをバックグラウンドにもつ db/db マウスは生存中に脊柱靭帯骨化が生じることはないと考えられた。

A. 研究目的

レプチン受容体遺伝子変異による遺伝性肥満モデル動物として, Zucker fatty ラットのほかに db/db マウスが知られている^{1,2,3)}。昨年度の班研究活動において, 我々はこの db/db マウスに着目し, 脊柱靭帯骨化との関連を形態学的に観察し, このマウスでは少なくとも早期に脊柱靭帯骨化は起こらないことを報告した⁴⁾。しかしながら同じ遺伝性肥満モデル動物である Zucker fatty ラットでは13ヵ月齢以降に前縦靭帯の骨化がおこるため, db/db マウスにおける脊柱靭帯骨化の可能性は完全には否定できず, このマウスでも, より長期間の観察を行う必要があると考えられた。本年度は昨年度に引き続いて長期間飼育が可能であった db/db マウスについて X線学的検討を行った。

B. 研究方法

雄の homo (db/db) 3匹, hetero (db/+) 6匹, wild type (+/+) 2匹を検討に用いた。屠殺直前に体重, 血糖値を計測し, 生後8ヵ月および1年8ヵ月の時点で屠殺した。なお, homo (db/db) は8ヵ月齢において衰弱が著しく, これ以上長期間の飼育は不可能と思われたため, この時点で全て屠殺した。4%パラフォルムアルデヒドを用いて還流固定後, 脊椎および両下肢を摘出, 周囲の軟部組織を可及的

に除去した後, 4%パラフォルムアルデヒド中で4℃, 24時間固定した。続いて軟X線撮影を行った後, 20%EDTA中で4℃, 7日間脱灰し, 正中矢状断パラフィン切片を作成した。今回はX線学的評価のみを行い, 脊椎に加え, アキレス腱部の検討も行った。

C. 研究結果

8ヵ月齢において homo (db/db) を3匹 (平均体重: 22.0 g, 平均血糖: 500mg/dl以上), hetero (db/+) を3匹 (32.3 g, 138mg/dl), wild (+/+) を2匹 (27.5 g, 98.5mg/dl) 解析した。homoは6ヵ月齢以降, 高血糖は維持されていたが, 体重は減少傾向にあり, 著しく衰弱していた。X線学的には6ヵ月齢と同様に homo および hetero において wild に比べて頸胸椎, 腰椎ともに明らかな脊椎の形態異常は観察されなかった (図1)。また, アキレス腱部の genotype ごとの石灰化の頻度は, db/db: 0/3, db/+: 3/3, +/+: 1/2 であり, hetero に石灰化の頻度が高かった。

1年8ヵ月齢まで長期間生存可能であった hetero (db/+) 3匹 (平均体重: 29.9 g, 平均血糖: 59.2mg/dl) をすべて検討した。X線学的には, hetero, wild ともに骨棘形成, 靭帯骨化などの異常所見を認めなかった (図2)。また, アキレス腱部の石灰化の有無を観察したが, この時点では hetero,

図1 腰椎軟軟X線像 (8ヵ月齢)
homo(db/db), hetero(db/+), wild-type(+/+)

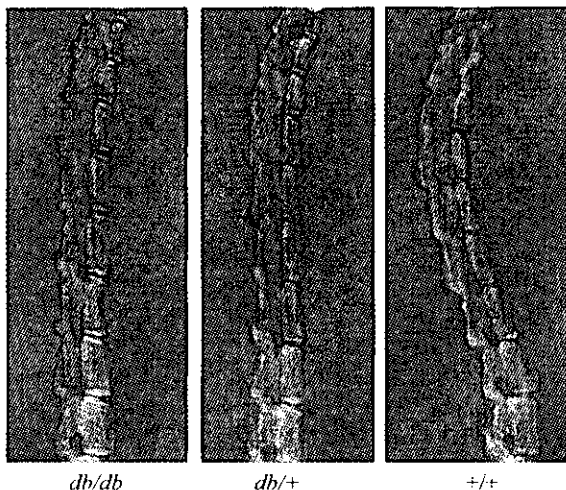
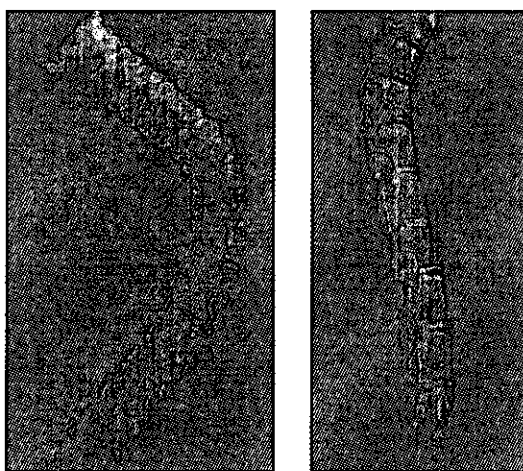


図2 頷胸椎軟軟X線像 (db/+, 1年8ヵ月齢)
頷胸椎 (左), 腰椎 (右)



wildとともに同程度の石灰化が認められ、genotypeによる差はなかった。

D. 考察

本年度は、昨年度に引き続いて8ヵ月齢以降の長期間飼育が可能であったマウスの解析を試みたが、いずれのgenotypeにおいても明らかな脊柱靭帯骨化の所見は観察されなかった。またアキレス腱部の石灰化については、8ヵ月齢という中年期においてhomo, wildは石灰化を認めず、heteroにおいて比較的高率に石灰化が認められた。このことから、昨年度の報告書において我々が述べたように、インスリン抵抗性および高インスリン血症が異所性石灰化のおこりやすさを規定している可能性が考えられる⁴⁾。

Zucker fattyラットでは13ヵ月齢以降に高率に脊柱靭帯骨化が出現することが明らかになっている^{5,6)}。db/dbマウスについてもZucker fattyラット同様に長期間の飼育を行い、両者を比較することにより、レプチン受容体遺伝子変異の領域と脊柱靭帯骨化との関連を正確に評価可能と言える。しかしながら、今回我々が検討したdb/dbマウス(バックグラウンドがC57BL/Ks)では8ヵ月齢以降の飼育は困難である。このためZucker fattyラットとの正確な比較は少なくともこのstrainを用いている限りは不可能であると思われる。

ところで、db遺伝子をC57BL/6系に移すとラ鳥の変性は起こらず、インスリン抵抗性、高インスリン血症、高血糖が持続するといわれている⁷⁾。この場合、寿命は18-20ヶ月であり、このstrainを用いれば、db/dbマウスの長期飼育が可能になると考えられる。レプチン受容体遺伝子変異の領域と脊柱靭帯骨化との関連を明らかにするためには、今後はこのstrainを用いてdb/dbマウスの長期飼育を行い、脊柱靭帯の観察を行うことが必要である。現在、我々はC57BL/6系のdb/dbマウスの解析を進めている。C57BL/6系のdb/dbマウスではZucker fattyラットと同様にインスリン抵抗性、高インスリン血症が存在する⁷⁾。先に述べたように、昨年度の報告書において、我々はインスリン抵抗性および高インスリン血症がZucker fattyラットにおける脊柱靭帯骨化を引き起こしている可能性を指摘した⁴⁾。C57BL/6系のdb/dbマウスの長期間飼育が可能であれば、マウスにおいても脊柱靭帯骨化の所見が観察される可能性がある。今後はC57BL/6系のdb/dbマウスの脊柱靭帯骨化および異所性骨化の有無を経時的に観察し、レプチン受容体遺伝子変異の領域と脊柱靭帯骨化との関連を解析していく予定である。

E. 結論

レプチン受容体Ob-Rbの特異的欠損動物であるdb/dbマウス(バックグラウンドがC57BL/Ks系)では、生後8ヵ月齢以上の飼育は困難であり、この時点で脊柱靭帯骨化の所見は観察されなかった。

[参考文献]

- 1) Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM: Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. Nature 379: 632-635, 1996

- 2) 益崎裕章, 小川佳宏, 細田公則, 西村治男, 中尾一和: 肥満におけるレプチンとレプチン受容体. 最新医学 52: 1110-1124, 1997
- 3) Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstem JP: Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. Cell 84: 491-495, 1996
- 4) 中島新, 山崎正志, 小笠原明, 清水純人, 相庭温臣, 中島文毅, 後藤憲一郎, 守屋秀繁: db/dbマウスにおける脊柱靭帯の形態的観察. 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: 53-56, 1999
- 5) 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
- 6) Okano T, Ishidou Y, Kato M, Imamura T, Yonemori K, Origuchi N, Matsunaga S, Yoshida H, ten Dijke P, Sakou T: Orthotopic ossification of the spinal ligaments of Zucker fatty rats: a possible animal model for ossification of the human posterior longitudinal ligament. J Orthop Res 15: 820-829, 1997
- 7) Yoon JW, Leiter EH, Coleman DL, Kim MK, Pak CY, McArthur RG, Roncari DA: Genetic control of organ-reactive autoantibody production in mice by obesity(ob) diabetes (db) genes. Diabetes 37: 1287-1293, 1988

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—

奥田 真也 (大阪大学整形外科), 和田 英路 (大阪大学整形外科),
有賀 健太 (大阪大学整形外科), 中瀬 尚長 (大阪大学整形外科),
米延 策雄 (大阪大学整形外科), 宮本 紳平 (大阪警察病院整形外科)

【研究要旨】

良性骨芽細胞腫に合併した黄色靭帯骨化の3例を報告した。組織学的にはnidus周囲と隣接する黄色靭帯付着部において、著明な骨形成を認めた。さらに免疫組織化学的にnidusの骨芽細胞様細胞にBMPの強い発現を認めた。つまりnidusより分泌されたBMPが、易骨化性を有する靭帯付着部に作用して黄色靭帯骨化を生じたものと考えられた。

A. 研究目的

良性骨芽細胞腫は骨腫瘍の1%をしめ、そのうち約40%が脊椎に生じる。良性骨芽細胞腫に特徴的なnidusとその周囲の骨硬化像に対する画像上の報告は多数あるが、異所性骨化を伴った報告は殆ど無く、その病態は不明である。今回我々は脊椎発症の良性骨芽細胞腫に合併した黄色靭帯骨化の3例を経験したので報告する。また異所性骨化を生じた原因として、nidusからの骨形成促進因子の分泌を疑いBone morphogenetic protein (BMP) の発現を免疫組織化学的に検討した。

B. 研究方法

当院で脊椎発症の良性骨芽細胞腫の診断をうけた3例を対象とした。症例は男性1例、女性2例で平均年齢は28歳(25~32)であった。これらの症例に対し、十分なインフォームドコンセントを行ったうえで、術前経過、神経症状、画像所見、手術所見、病理所見、および術後経過を検討した。さらにBMP2/4の抗体を用いて免疫組織化学的検討も行った。

C. 研究結果

術前の自覚的所見としては全例疼痛のみであった。また他覚的にも神経症状は見られなかった。術前CTにおいて、3例ともnidus周囲の黄色靭帯付着部に骨化が見られた。全例に腫瘍および骨化靭帯の摘出を行い、術後疼痛は消失した。組織学的にはnidus周囲と隣接する黄色靭帯付着部において、著明な骨形成を認めた。免疫組織化学的にnidusの骨芽細胞様細胞にBMP2/4の発現を認めた。Nidus周

囲の骨硬化部ではBMP2/4の発現は殆ど認められなかった。

D. 考察

これまで後縦靭帯骨化症や黄色靭帯骨化症等の異所性骨化病の原因として、BMPの関与を示唆する報

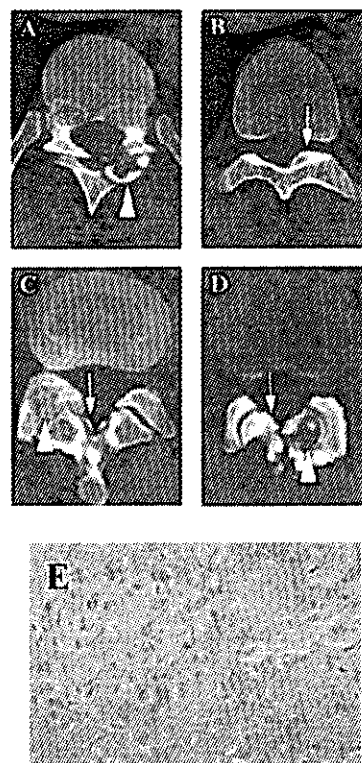


図 A, B : 症例1術前CT
C : 症例2術前CT
D : 症例3術前CT
E : nidus部免疫組織染色 (抗BMP抗体)