

告が多数見られる。しかしながらこれらの疾患は高齢発症で、少なからず加齢変化と関わっているのも疑いの余地がない。今回我々は比較的若年者において、良性骨芽細胞腫に伴う黄色靭帯骨化の3例を経験した。いずれも nidus 周囲の黄色靭帯付着部に骨化を認めた。靭帯付着部は、enthesis と呼ばれ組織学的に骨化前段階にあると考えられ、後縦靭帯骨化症や黄色靭帯骨化症の骨化も enthesis より生じるとされている。つまり今回の症例では nidus より分泌された BMP が周囲の enthesis に作用して黄色靭帯骨化を生じたものと考えられた。

E. 結論

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。nidus の骨芽細胞様細胞から分泌された BMP の作用により、隣接する黄色靭帯付着部において異所性骨化を生じたものと考えられた。

F. 研究発表

なし。

G. 知的所有権の取得状況

なし。

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

山本 祐司 (弘前大学整形外科), 古川 賢一 (弘前大学薬理学),
植山 和正 (弘前大学整形外科), 丹野 雅彦 (弘前大学整形外科),
赤石 孝一 (弘前大学整形外科), 中西 徹 (岡山大学歯学部口腔生化学),
滝川 正春 (岡山大学歯学部口腔生化学), 原田 征行 (弘前大学整形外科)

【研究要旨】

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は靭帯組織の異所性骨化であり, その骨化は主に内軟骨性骨形成過程を介していると考えられている。最近, 結合組織成長因子 (CTGF) が内軟骨性形成の全過程 (軟骨細胞の増殖・分化, 骨側からの血管侵入) において重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。今回, 我々はOPLL患者から摘出した骨化靭帯におけるCTGFの発現を免疫組織化学的に検討した。また, 培養脊柱靭帯細胞においてTGF- β ならびにCTGF添加によって誘導される骨芽細胞, 軟骨細胞の分化マーカー (mRNA量) の変化をRT-PCR法にて検討した。

OPLLの靭帯骨化移行部の軟骨細胞にCTGFが発現していることを確認した。脊柱靭帯細胞において, CTGF添加によりALPの発現が増加, さらにアスコルビン酸存在下では, CTGF添加により2型コラーゲンの発現も認められた。またCTGFの発現はTGF- β 添加によって誘導された。以上より, CTGFは正常な内軟骨性骨化と同様に異所性骨化であるOPLLの骨化進展に重要な役割を果たしている可能性があり, さらには発生の段階にも関与している可能性がある。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は脊柱管内の後縦靭帯組織が異所性に骨化することにより, 脊髄を圧迫し種々の脊髄症状を呈する疾患である。本疾患における靭帯骨化は組織学的検討から主に内軟骨性骨形成過程を介していると考えられている^{1, 2)}。

最近, 中西らはヒト軟骨肉腫由来の軟骨細胞株HCS-2/8³⁻⁸⁾よりdifferential display-PCR法で単体外で軟骨細胞においては増殖と分化を促進し⁹⁾, 血管内皮細胞においては増殖と遊走を促進することが報告されている¹⁰⁾。これらの知見はCTGFが内軟骨性骨形成過程全般 (軟骨細胞の増殖・分化, 骨側からの血管侵入) において重要な役割を果たす可能性を示唆している。

今回, OPLLの骨化が主に内軟骨性骨化を介していることに着目し, 正常な内軟骨性骨化で重要な働きをするCTGFが異所性骨化であるOPLLにも関与しているかどうかを明らかにするため, その発現を免疫組織化学的に検討した。さらに, CTGFがOPLLの発生の段階にも関与しているか明らかにするため脊柱靭帯由来培養細胞におけるリコンビナントCTGF (rCTGF) の影響を検討した。

B. 研究方法

本研究を行うにあたって, 対象者にインフォームドコンセントを行い, 事前に弘前大学医学部倫理委員会の承認を得た。

1. 組織標本・免疫染色

OPLL患者5例から手術時に摘出した骨化靭帯を使用した。コントロールとしてOPLLのない患者 (non-OPLL) 2例 (頸椎椎間板ヘルニア, 頸椎症性脊髄症各1例) から手術時に摘出した後縦靭帯を用いた。これらの組織を4%パラホルムアルデヒドで24時間固定後, 10% EDTAにて脱灰し, パラフィン包埋ブロックを作製した。その切片をH-E染色およびサフラニンO染色した。免疫染色はヒアルロニダーゼ (Sigma社製) で前処置後, ヒストファインSAB-POキット (ニチレイ社製) を用いてABC法にてCTGFおよび2型コラーゲンについて行った。一次抗体はCTGFペプチドを免疫して作成した抗CTGFポリクローナル抗体¹⁰⁾と抗ヒト2型コラーゲンポリクローナル抗体 (Chemicon社製) を使用した。ネガティブコントロールとして, 非免疫血清を一次抗体に使用した。

2. 細胞培養・rCTGF添加・RT-PCR

OPLL患者5例, non-OPLL患者5例(頸椎椎間板ヘルニア2例, 頸椎症性脊髄症3例)から手術時に摘出した後縦靭帯を使用した。OPLL患者の場合は骨化部位と離れた非骨化靭帯を使用した。これらの組織を無菌的に細切し, 10%FBS含有DMEM培地中で explant 法に培養し, それぞれOPLL細胞, non-OPLL細胞とした。

5代継代した細胞を使用して, rCTGF¹¹⁾の添加実験を行った。10ng/mlのrCTGFをOPLL細胞, non-OPLL細胞それぞれに添加し, 24時間後にRNAを抽出し, RT-PCR法にて骨芽細胞の分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ(ALP), 軟骨細胞の分化マーカーとして2型および10型コラーゲンのmRNA量を測定した。アスコルビン酸存在下で同濃度のrCTGFを添加し12, 24, 48, 72時間後にRNAを抽出した。また, CTGFの発現を誘導するといわれているTGF- β の添加実験も行った。10ng/mlのヒトtransforming growth factor- β 1(TGF- β 1)(和光社製)を12時間作用させRNAを抽出し, RT-PCR法にてCTGF, ALP mRNA量を測定した。

PCRはmRNA量を定量化するためPCR産物が指数関数的に増加しているサイクル数でそれぞれ行った。内部標準としてglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(G3PDH)を用いた。

C. 結論

1. OPLL患者の骨化靭帯では, 靭帯から骨組織へ連続的に移行しており, その移行部には線維性軟骨, 石灰化軟骨が観察された。サフラニンO染色および2型コラーゲンの免疫染色で靭帯骨化移行部の細胞外マトリックスや軟骨細胞周囲が染色され, 靭帯骨化移行部は軟骨組織であることが確認された。

抗CTGF抗体による免疫染色では靭帯骨化移行部の軟骨細胞, 特に石灰化軟骨に存在する肥大軟骨細胞と思われる細胞がCTGF陽性であった(図1)。骨化巣と離れた非骨化領域では一部の線維芽細胞が弱く染色されていた。

コントロールとしたnon-OPLL患者の頸椎後縦靭帯では, 靭帯内の細胞はCTGF陰性であった。

2. rCTGF添加によるALP mRNA量への影響

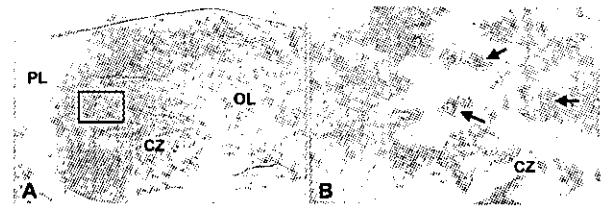


図1 OPLLの靭帯骨化移行部でのCTGFの局在(A)×40(B)×200

PL: 後縦靭帯 CZ: 石灰化層 OL: 骨化巣

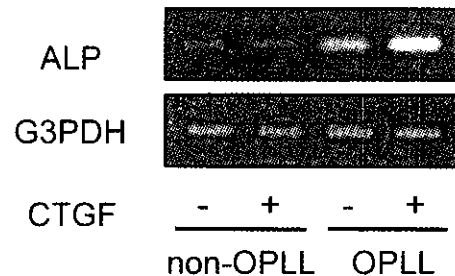


図2 脊柱靭帯細胞におけるALP mRNAの発現に対するCTGFの影響

をOPLL, non-OPLL細胞それぞれ5例ずつ検討した。rCTGF非添加時の相対的ALP mRNA量(ALP/G3PDH)は細胞によって様々であり, 両グループ間に有意差を認めなかった。しかし, CTGF添加によりOPLL細胞では5例中4例でALP mRNA量が増加したのに対して, non-OPLL細胞ではいずれも有意な増加を示さなかった(図2)。ALP mRNA量の増加率は非添加時を100%とするとOPLL細胞で $159.8 \pm 52.6\%$, non-OPLL細胞で $104.0 \pm 10.6\%$ であり, 統計学的に有意差を認めた($p < 0.05$)。

TGF- β の添加はOPLL, non-OPLL細胞それぞれ4例ずつに行った。TGF- β の添加によりCTGF mRNA量はOPLL細胞で $206.0 \pm 70.5\%$, non-OPLL細胞で $186.3 \pm 43.4\%$ とどちらの細胞でも有意差なく増加することが確認された。しかしながら, ALP mRNA量についてはOPLL細胞で $163.3 \pm 47.6\%$, non-OPLL細胞で $94.3 \pm 10.0\%$ と, TGF- β がOPLL細胞でのみ有意にALP mRNA量を増加させることが確認された($p < 0.05$)(図3)。

アスコルビン酸存在下でのCTGF添加実験ではOPLL, non-OPLL細胞ともに48時間で2型コラーゲンの発現が確認された。10型コラーゲンの発現は72時間以内では認められなかった(図3)。

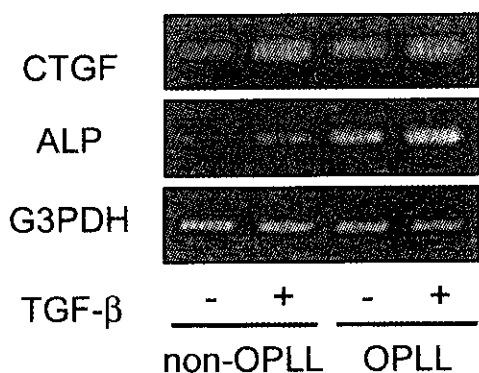


図3 脊柱靱帯細胞におけるCTGF, ALP mRNAの発現に対するTGF- β の影響

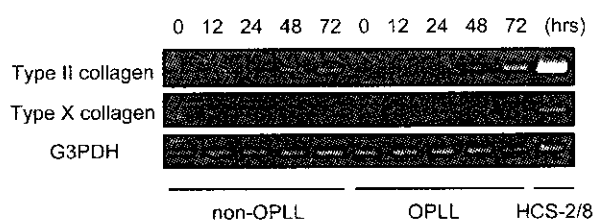


図4 アスコルビン酸存在下でのCTGFによる2型コラーゲン mRNAの発現

D. 考察

今回の研究から(1)CTGFがOPLLの靱帯骨化移行部の軟骨細胞に局在していること、(2)OPLL患者由来の脊柱靱帯細胞ではCTGFによりALPの発現が増加すること、(3)脊柱靱帯細胞におけるCTGFの発現はTGF- β により誘導されること、(4)アスコルビン酸存在下ではCTGFにより脊柱靱帯細胞は2型コラーゲンを発現するようになることが確認された。

OPLLにおける異所性骨化は主に内軟骨性骨形成過程を介していると考えられているが^{1,2)}、靱帯骨化移行部の軟骨組織が硝子軟骨というよりむしろ線維性軟骨であることから典型的な内軟骨性骨化とは異なっていると思われる¹²⁾。これまで骨化巣近傍にある軟骨様細胞の周囲に2型コラーゲンが存在することが報告されているが¹²⁾、今回もサフラニンO染色および2型コラーゲンの免疫染色から靱帯骨化移行部の組織が軟骨組織であることが確認された。また、この軟骨組織内にある軟骨細胞が広範囲にCTGFを発現しており、骨化巣と離れた靱帯組織内の線維芽細胞はCTGFをほとんど発現していないことがわかった。最近、CTGFは軟骨細胞を内軟骨性骨化へと導く重要な因子であることが新たに示されている^{7,9,10)}。つまり、OPLLの靱帯骨化移行部に存在す

る軟骨細胞がCTGFを発現していたことは、CTGFが正常な内軟骨性骨化と同じようにOPLLにおける内軟骨性骨化の進展にも重要な役割を果たしていることが示唆される。

in vitroでCTGFはOPLL患者由来脊柱靱帯細胞のALPの発現をnon-OPLL患者由来細胞と比較し有意に増加させた。ALPは骨芽細胞の早期の分化マーカーと考えられておりOPLL細胞はCTGFにより骨芽細胞へと分化する可能性があること、またOPLL細胞ではCTGFによって惹起されるシグナル伝達が正常とは異なっていることが考えられる。さらに、アスコルビン酸存在下ではCTGFにより軟骨細胞のマーカーである2型コラーゲンの発現を認め、環境によっては軟骨細胞へと分化する可能性が示唆される。

これまでの研究ではbone morphogenic protein-2 (BMP-2)^{13,14)}、TGF- β ^{13,15)}、insulin-like growth factor I (IGF-I)¹⁶⁾などの骨・軟骨形成に関与するサイトカインが局所因子としてOPLLの発症や進展に関与していることが報告されている。CTGFの発現は皮膚線維芽細胞でTGF- β により誘導されること¹⁷⁾、軟骨細胞ではBMP-2とTGF- β により誘導されることが示されている⁷⁾。Duncanらは線維芽細胞においてTGF- β によるコラーゲン合成の促進はCTGFを介していることをCTGFのアンチセンスと抗体を用いて証明している¹⁸⁾。今回、脊柱靱帯細胞においてもTGF- β がCTGFの発現を誘導することが示された。さらに、ALPの発現におけるTGF- β の影響はOPLLとnon-OPLL細胞とでは差があり、CTGFによる影響とはほぼ同様であった。このことはOPLL細胞のCTGFに対する反応性の亢進が、他のサイトカインと組み合わせさせてOPLLの異所性骨化に関与していることを示唆している。

E. 結論

CTGFはOPLLにおける内軟骨性骨化の進展に重要であり、さらにはその発生にも関与している可能性がある。

【参考文献】

- 1) Ono K, Ota H, Hamada H et al. Ossified posterior longitudinal ligament: a clinicopathological study. Spine 1977; 2:126-38.
- 2) Okada K, Oka S, Tohge K et al. Thoracic myelopathy caused by ossification of the

- ligamentum flavum: clinicopathologic study and surgical treatment. *Spine* 1991; 16:280-7.
- 3) Takigawa M, Tajima K, Pan HO et al. Establishment of a clonal human chondrosarcoma cell line with cartilage phenotypes. *Cancer Res* 1989; 49: 3996-4002.
 - 4) Enomoto M, Takigawa M. Regulation of tumor derived and immortalized chondrocytes. In: Adolphe M, editor. *Biological Regulation of the Chondrocytes*. Boca Raton, FL: CRC Press; 1992. p.321-38.
 - 5) Zhu JD, Pan HO, Suzuki F et al. Proto-oncogene expression in a human chondrosarcoma cell line: HCS-2/8. *J Cancer Res* 1994; 85: 364-37.
 - 6) Ohba Y, Goto, Y, Kimura Y et al. Purification of an angiogenesis inhibitor from culture medium conditioned by a human chondrosarcoma-derived chondrocytic cell line, HCS-2/8. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1245: 1-8.
 - 7) Nakanishi T, Kimura Y, Tamura T et al. Cloning of mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 206-10.
 - 8) Hattori T, Fujisawa T, Sasaki K et al. Isolation and characterization of a rheumatoid arthritis-specific antigen (RA-A47) from a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 245: 679-83.
 - 9) Nakanishi T, Nishida T, Shimo T et al. Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology* 2000; 141: 264-73.
 - 10) Shimo T, Nakanishi T, Kimura Y et al. Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells. *J Biochem* 1998; 124: 130-40.
 - 11) Nishida T, Nakanishi T, Shimo T et al. Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 905-9.
 - 12) Yasui N, Ono K, Yamaura I et al. Immunohistochemical localization of type I, II, and III collagens in the ossified posterior longitudinal ligament of the human cervical spine. *Calcif Tissue Int* 1983; 35: 159-63.
 - 13) Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y et al. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenic protein-2 and transforming growth factor- β in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine* 1992; 17: S33-6.
 - 14) Kon T, Yamazaki M, Tagawa M et al. Bone morphogenic protein-2 stimulates differentiation of cultured spinal ligament cells from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Calcif Tissue Int* 1997; 60: 291-6.
 - 15) Inaba K, Matsunaga S, Ishidou Y et al. Effect of transforming growth factor- β on fibroblasts in ossification of the posterior longitudinal ligament. *In Vivo* 1996; 10: 445-50.
 - 16) Goto K, Yamazaki M, Tagawa M et al. Involvement of insulin-like growth factor I in development of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Calcif Tissue Int* 1998; 62: 158-65.
 - 17) Igarashi A, Okochi H, Bradham DM et al. Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol. Biol Cell* 1993; 4: 637-45.
 - 18) Duncan MR, Frazier KS, Abramson S et al. Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor β -induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* 1999; 13: 1774-86.

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)

平川 均 (弘前大学整形外科), 原田 征行 (弘前大学整形外科),
植山 和正 (弘前大学整形外科), 岡田 晶博 (弘前大学整形外科)

【研究要旨】

【目的】 ttw マウスを用いて, 異所性骨化抑制作用を有する EHDP の作用を検討すること。

【方法】 6 週齢の ttw マウスに対して, 宮本らの方法を参考に下位胸椎から腰椎部の棘突起, 棘上, 棘間靭帯を切除し, 皮膚のみ縫合した (OPLL の術後モデルとした)。コントロール群, EHDP 投与群, 手術施行群, 手術施行及び EHDP 投与群の 4 群を作製, 22 週齢にて軟線 X 線撮影を行い, 手術部位の脊柱を摘出し HE 標本を作製した。EHDP は 30mg/kg を週 3 回皮下注にて, 7 週齢より 22 週齢まで行った。【結果】 手術群ではコントロール群に比し, 手術部位及び手術部位の上位椎間管に骨化進展を認めた。EHDP 投与群では骨化抑制を予想したが, 特に頸胸椎で骨化の抑制は認められず, むしろ EHDP 非投与群に比べ骨化の進展を認めた。【総括】 ttw マウスの異所性骨化抑制を期待するためには, EHDP の投与量, 投与方法, 投与期間の再検討が必要と思われた。

A. 研究目的

EHDP は異所性骨化抑制作用を有し, OPLL の骨化前駆状態に作用し, 骨化進展を抑制する可能性がある。また, 臨床では OPLL の手術症例で術後に骨化が進展する症例を経験する。本研究の目的は, OPLL の術後骨化進展抑制に対する EHDP の効果, OPLL 動物モデルである ttw マウスを用いて検討することである。

B. 研究方法

手術は 6 週齢の ttw マウスに対して, 宮本らの方法¹⁾を参考に, 下位胸椎から腰椎部の背側傍脊柱筋を剥離し, 棘突起, 棘上, 棘間靭帯を切除し, 背側傍脊柱筋は縫合せず, 剥離したまま皮膚のみ縫合した。

EHDP の投与方法は 30mg/kg を週 3 回皮下注にて, 7 週齢より屠殺時まで継続して行った。EHDP 非投与群に対しては同量の生食を投与した。

以上よりコントロール群, EHDP 投与群, 手術施行群, 手術施行及び EHDP 投与群の 4 群を作製, 22 週齢のマウスを麻酔後, 軟線 X 線撮影を行い, 手術部位の脊柱を摘出し HE 標本を作製した。

C. 研究結果

手術群ではコントロールに比し, 手術部位及び手術部位の上位椎間に骨化進展を認めた (図 1, 2)。EHDP 投与群では骨化抑制を予想したが, 特に頸胸

椎で骨化の抑制は認められず, 寧ろ EHDP 非投与群に比べ骨化は進展していた (図 1, 2)。

D. 考察

今回我々は, 宮本らの方法¹⁾を参考に, 手術操作が比較的容易な下位胸椎から腰椎にかけて背側傍脊柱筋を剥離し, 棘突起, 棘間靭帯, 棘上靭帯を切除した。手術施行群は脊柱の後方要素を破壊することによって, 脊柱に加わる力学的負荷が増大し, 手術施行部位やその隣接椎間の靭帯骨化が進展したと考えられ, ttw マウスの手術施行群を, OPLL の術後モデルとした。

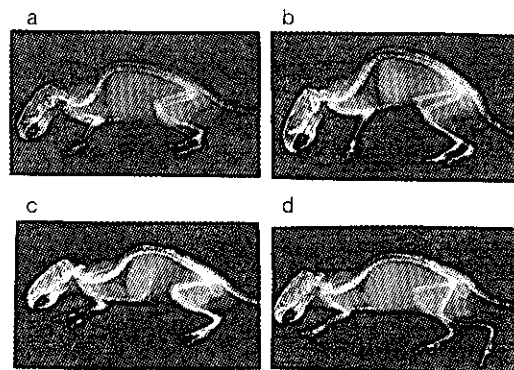


図 1 a : コントロール
b : 手術施行
c : EHDP 投与
d : 手術施行及び EHDP 投与
b : コントロールに比べ, 手術部位の骨化進展を認めた
c, d : 頭頸移行部の巨大石灰化腫瘍と頸胸椎レベルの骨化進展を認めた

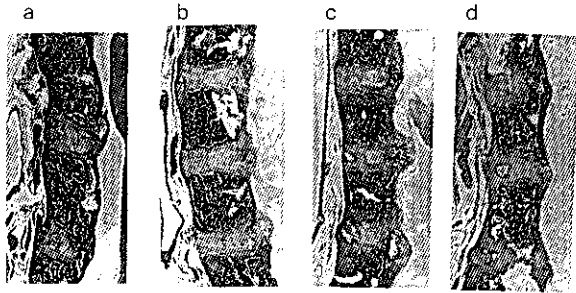


図2 a : コントロール
 b : 手術施行
 c : EHDP 投与
 d : 手術施行及びEHDP 投与
 EHDP 投与群では椎間板レベルで石灰化の増大を認めた

これまでのttwマウスに対するEHDPの投与実験において、丹野²⁾はEHDP30mg/kgを週3回皮下注にて、6週齢より8週間投与したものが第2腰椎から第6腰椎におけるenthesesの石灰化を最も抑制したと報告している。また、中橋³⁾はEHDP20mg/kgを週3回腹腔内投与にて、10週齢より22週齢まで行い、後頭部から第2胸椎における脊柱管内の骨化が抑制されたと報告している。これらの報告を参考に、今回我々は7週齢から22週齢まで、EHDP30mg/kgを週3回、マウスの腰殿部を中心に皮下注した。今回のEHDP30mg/kgという投与量に関しては、異所性骨化抑制を目的にした場合、十分な高容量と考えたが、靭帯骨化を助長するような結果が得られた。EHDPは一般に、低容量では破骨細胞機能を抑制し、骨量増加作用を有し、高容量では異所性骨化作用を有し、投与量により作用が異なる性質を持っている。また、EHDPは比較的吸収が悪いといわれており、EHDP30mg/kgという投与量が高容量ではあるが、吸収が悪ければ、十分な薬理作用を発揮しなかったとも考えられる。今後、ttwマウスの異所性骨化抑制を期待するためには、EHDPの投与量、投与方法、投与期間の再検討が必要と思われる。

〔参考文献〕

- 1) Shimpei M et al: Experimental cervical spondylosis in the mouse. Spine 16: S495-500, 1991.
- 2) 丹野隆明：遺伝性骨軟骨異常マウス(twy/twyマウス)脊椎骨病変の進展および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

症の発生病態に関連して一. 日整会誌 66: 1073-1083, 1992.

- 3) 中橋謙次：TWYマウスの脊柱靭帯骨化に関する実験的研究. 金沢大学+全医学会雑誌 103:959-971, 1994.

四肢短縮型小人症における脊柱靱帯骨化症の解析

河内 敏行 (東京医科歯科大学整形外科), 高橋 誠 (東京医科歯科大学整形外科),
小森 博達 (東京医科歯科大学整形外科), 四宮 謙一 (東京医科歯科大学整形外科)

【研究要旨】

四肢短縮型小人症に併発した脊柱靱帯骨化症を経験した。病態の主因は胸椎黄色靱帯骨化症による脊髄症であったが、内軟骨生骨化障害に起因すると考えられる特有のレントゲン所見像を呈していた。画像的には代表的骨系統疾患のいずれとも分類不能のため、最も骨格形態異常の相似した骨系統疾患のうち原因遺伝子が判明しているものについて検討した。遺伝子解析を行った結果 achondroplasia や hypochondroplasia の原因遺伝子である FGF 受容体 (FGFR) 遺伝子及び pseudoachondroplasia の原因遺伝子の Cartilage Oligometric Matrix Protein (COMP) 遺伝子に点突然変異等は認めず、今後更なる解析が必要と思われた。

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症は従来の研究より、機械的ストレス、内因性因子 (ホルモン、サイトカイン、成長因子) 等様々な要因が関与すると考えられているが、骨化形態からは内軟骨性骨化を主体とした骨化であることが示唆されてきた。一方今回経験した症例は四肢体幹のレントゲン像から内軟骨性骨化障害が形態変化の主体である特徴を呈していた。内軟骨性骨化障害患者での脊柱靱帯骨化は、文献上稀であるため、本件患者に注目し、脊柱靱帯骨化と関連を含めて検討することを企画した。まず今回我々は、本症例の疾患遺伝子解析を行ったので報告する。

B. 研究方法

対象は44歳女性で、生下時正常分娩、近親婚や同胞等の家族歴に特に問題は無く、mental retardation も認めない。2歳頃より手足が短いことを指摘され、17歳時に先天性骨軟骨形成不全症と診断されるが、ADL上は特に支障はなかった。44歳時階段転落後、両下肢脱力、臀部、両下肢のしびれが出現し、下肢不全麻痺を主訴に来院した。神経学的所見としては深部腱反射は上肢：正常、下肢：亢進、知覚は臀部、下肢で両側5/10の低下、下肢筋力はMMT4レベルであった。日整会頸髄症スコアから上肢の項目を除いたTJOAスコアで、1, 0, 2, 3=6点であった。断層写真で、Th9～Th12に胸椎黄色靱帯骨化、L1～L3に分節型後縦靱帯骨化 (図1) が認められ、下降性ミエログラムでは胸椎ではTh10に完全ブロックを認め、CTミエログラムでは全体的に脊柱管の狭

小化が見られ、Th9～Th12では黄色靱帯骨化によって硬膜管が圧排されていた (図2)。身体所見としては身長105cm、体重25kg、上肢長33cm 下肢長44cmであり四肢短縮型の低身長を示した。頭蓋、顔貌は正常で、上肢近位節の短縮、肘関節、膝関節

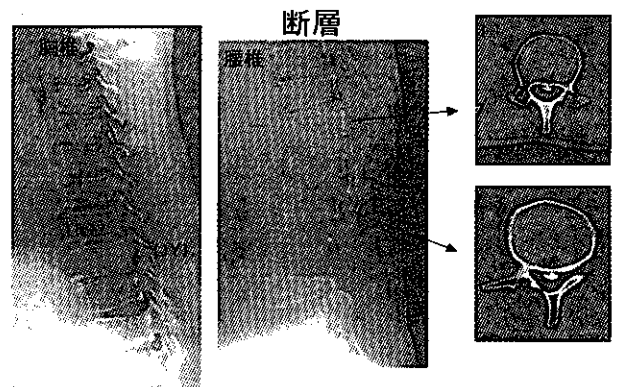


図1

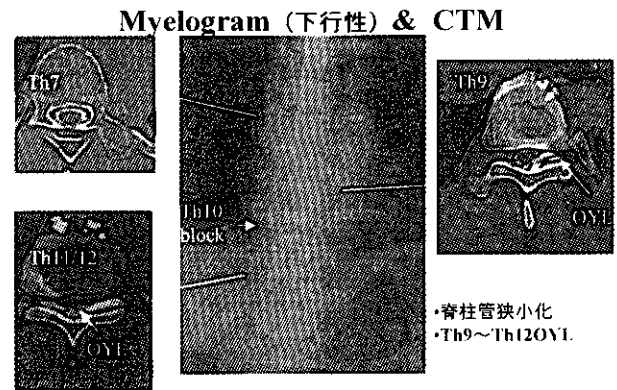


図2

身体所見

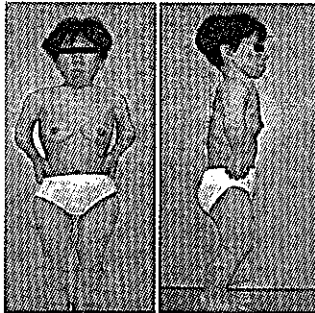


図 3

- 身長 108 cm
- 体重 25 kg
- 上肢長 (33 cm)
- 下肢長 (44 cm)
- 四肢短縮型

PCR-RFLP

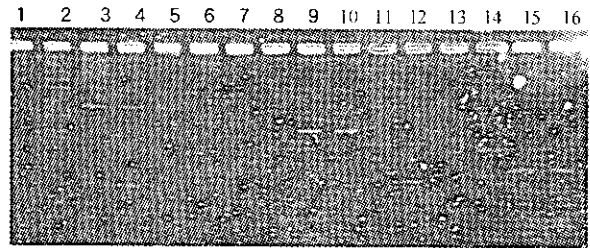


図 4

の伸制限, 手指短縮が認められた (図 3)。四肢のレントゲン像では近位節の短縮, 骨幹の肥厚, 骨幹端部の拡大, 頸部の短縮, 中節では橈骨, 尺骨の尺側への彎曲, 短縮, 遠位節でも中手, 末節骨の短縮があった。体幹では, 椎体の扁平化が見られるが, 環軸椎の異常は認められない。胸腰移行部の後彎形成がみられ, 椎弓根間距離は全体的に狭いが, 下部腰椎で特に狭小化は認められなかった。

そこで, 患者の informed consent を得て, 末梢血から genomic DNA を抽出し FGF 受容体遺伝子及び COMP 遺伝子に対する primer を作成し PCR 法を用いて増幅後, RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法を用いて解析した。

C. 研究結果

末梢血 5ml から QIAamp DNA blood mini kit を用いて genomic DNA を抽出した。まず achondroplasia や hypochondroplasia の原因遺伝子である FGFRs で保存されている tyrosin kinase domain sequence (Primer 1: 5'-TCNGA GATGGAGRTGATGA A-3' Primer 2: 5'-CCA AAGTCHGCDATCTTCAT-3') を primer として genomic DNA に 30 cycle の PCR (denaturation 94°C 1 分, annealing 55°C 2 分, extension 72°C 2 分, terminal extension 72°C 5 分) を行った (Biotechniques 1997; 22: 1068-1070)。PCR 増幅産物をそれぞれ, 制限酵素 PvuII, PstI, EcoRI で消化後ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったが, 4 種の FGFRs の異常は認められなかった。続いて, 四肢短縮型の骨化異常形態から pseudoachondroplasia の可能性もあるため COMP 遺伝子に着目した。COMP 遺伝子の mutation は従来の報告 (Hum.Genet 1998; 103: 633-638) から Exon 9, 11, 14 の Calmodulin-like repeat の点突然変異が知られているため, それぞれの点突然変異が

解析できるような以下の primer を作成し使用した。
 i7i9/F: 5'-TTGAGGCGGGGTTGGGTG-3'
 i7i9/R: 5'-GCCGTAGATCTACCTTTTCATTGGG-3'
 i10i11/F: 5'-CATCCTAATGAAGTCATTCTGGC-3'
 i10i11/R: 5'-ATCCAACCTTGCAGTTCACCC-3'
 E14/F: 5'-GACGTGTGCCAGGACGACTT-3'
 E14/R: 5'-CCCACCTGGTTGAGCACCCAC-3'
 genomic DNA に上記の primer を用い 35 cycle の PCR (denaturation 94°C 0.5 分, annealing 63°C 0.5 分, extension 72°C 0.5 分, terminal extension 72°C 5 分) を行った。PCR 増幅産物をそれぞれ, 制限酵素 DdeI, MvaI, Sau96HI, TaqI で消化後 3% GTC Agarose gel 電気泳動後, Et-Br stain を行った (図 4)。対照として健常人の末梢血より採取した genomic DNA (Cntl) に同様の操作を加えたものを泳動した。以下に lane 番号 (図 4 の左側より) と対応を記す。

1	null	
2	pBR322 DNA-Msp I Digest	
3	E9 not digested.	Pt.
4		Cntl.
5	E9 Dde I digest.	Pt. cleaved.
6		Cntl. cleaved.
7	E9 Mva I digest.	Pt. cleaved.
8		Cntl. cleaved.
9	E11 not digested.	Pt.
10		Cntl.
11	E11 Sau96HI digest.	Pt. not cleaved.
12		Cntl. not cleaved.
13	E14 not digested.	Pt.
14		Cntl.
15	E14 Taq I digest.	Pt. cleaved.
16		Cntl. cleaved.

以上より, 本症例には今回検索し得た領域の異常は認められなかった。

D. 考察

四肢短縮型小人症として最も代表的な疾患は achondroplasia であり、特有の顔貌や三尖手などが診断の決め手になる。本例のようにそれらの特徴が無い場合、hypoachondroplasia, pseudoachondroplasia, acromesomeric dysplasia 等の近縁疾患が鑑別の対象となるが、成長期以降のレントゲン像から骨系統疾患の診断を下す場合、正確な診断は困難である。今回我々は、上記のうち遺伝子レベルでの検索が進んでいる hypoachondroplasia, pseudoachondroplasia の遺伝子診断を行ったが、渉猟し得た範囲での点突然変異は認めなかった。今後更に遺伝子レベルでの検索をすすめ、それらと脊柱靭帯骨化との関連を調査することを予定している。

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

岡崎 賢 (九州大学整形外科), 神宮司誠也 (九州大学整形外科),
占部 憲 (九州大学整形外科), 坂井 宏旭 (九州大学整形外科),
平田 剛 (九州大学整形外科), 岩本 幸英 (九州大学整形外科)

【研究要旨】

【目的】脊椎靭帯骨化症患者を対象とした遺伝子解析より, type XI collagen A2 遺伝子の異常が有意に認められることが報告されているが, その働きについては十分に解明されていない。今回, マウス変形性関節症モデルでの靭帯付着部骨化部位における type XI procollagen の mRNA 発現を検討した。

【対象および方法】10週齢の C57Bl10 マウスの膝関節内に 1% collagenase を単回投与した。反対側には対照として PBS を投与した。関注後 5, 7, 14 日目に膝関節を採取し, 薄切して組織学的検討および pro- α 2(XI)collagen と pro- α 1(II)collagen に対する in situ hybridization をおこなった。

【結果】collagenase 関注後 5 日目で靭帯付着部において, 繊維芽細胞様細胞の増殖が認められた。7 日目では靭帯付着部に増殖軟骨細胞が認められ, pro- α 2(XI)collagen 及び pro- α 1(II)collagen mRNA の発現が認められた。14 日目では同部に内軟骨性骨化が観察された。

A. 研究目的

難病である脊椎靭帯骨化症に対して病因を解明して本質的な治療を行うためには, まず靭帯が骨化していく過程を解析する事が必要である。本研究班での大きな実績である遺伝子解析により, COL11A2 遺伝子の異常が靭帯骨化症患者に有意に認められる事が報告されたが, XI 型コラーゲンの靭帯骨化における関与は十分に解明されていない。今回, 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 の遺伝子発現を検討した。XI 型コラーゲンと靭帯骨化との関係を論ずる上での基礎になりうる研究である。

B. 研究方法

10週齢の雄性 C57Bl10 マウスの膝関節内に 1% collagenase を単回投与した。反対側には対照として PBS を投与した。関注後 5, 7, 14 日目に膝関節を採取し, 薄切して組織学的検討, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) に対する免疫染色, および pro- α 2(XI)collagen と pro- α 1(II)collagen に対する in situ hybridization (ISH) をおこなった。
(倫理面への配慮)

動物に対しては麻酔下に処置を行い, 深麻酔にて安楽死させており, 九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け, その取り決めの下に行った。

C. 研究結果

対照群では組織学的変化が生じなかったのに対し, collagenase 関注群では, 5 日目で靭帯付着部において, PCNA 陽性の繊維芽細胞様細胞の増殖が認められた。7 日目では靭帯付着部に PCNA 陽性の軟骨細胞が出現し, 軟骨形成が認められた。ISH にて増殖軟骨細胞に pro- α 2(XI)collagen (図 1) および pro- α 1(II)collagen mRNA の発現が認められた。14 日目では同部に内軟骨性骨化が観察された。現時点で内軟骨性骨化部位での pro- α 2(XI)collagen の発現については確認できていない。

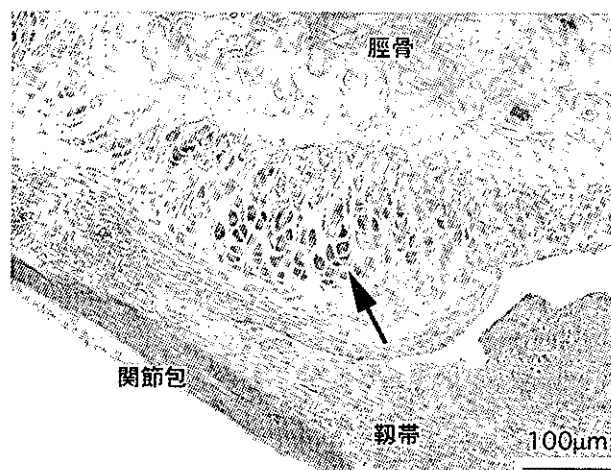


図 1 脛骨外側での靭帯付着部軟骨形成部での pro- α 2(XI)collagen に対する ISH

D. 考察

本関節症モデルは、関節内靭帯付着部骨化過程が比較的再現性良く、経時的に観察する事ができるモデルである。この骨化過程において、pro- α 2(XI) collagenはpro- α 1(II) collagenの発現の認められない線維芽細胞様細胞からは発現されず、軟骨細胞へ分化した後から発現が始まり、pro- α 1(II) collagenとはほぼ共通の発現分布を呈した。過去の報告で胎生期や骨折仮骨の膜性骨化部位の骨芽細胞や培養骨芽細胞からpro- α 2(XI) collagenの発現が認められており、内軟骨性骨化部位での発現の詳細については更なる検討が必要と思われた。

E. 結論

マウス関節内靭帯付着部骨化過程において、軟骨細胞へ分化した後の増殖軟骨細胞にpro- α 2(XI) collagen mRNAの発現が認められた。

肥大軟骨細胞由来の成長因子Hcs24/CTGFの内軟骨性骨化促進作用

滝川 正春 (岡山大学歯学部・口腔生化学, 中央研究施設)

中西 徹 (岡山大学歯学部・口腔生化学)

西田 崇 (岡山大学歯学部・中央研究施設)

【研究要旨】

肥大軟骨細胞に高発現するCTGF/Hcs24の組み換え体タンパク質は、増殖軟骨細胞の増殖、前成熟期の軟骨細胞の成熟、成熟期の軟骨細胞の肥大化を促進し、また、骨芽細胞の増殖と分化を促進した。rCTGF/Hcsが血管内皮細胞の接着、遊走、増殖、管腔形成を促進し、in vivoでも血管新生を誘導することをすでに明らかにしており、これらの事実は肥大軟骨細胞に高発現するCTGF/Hcs24が軟骨細胞の増殖、分化を促進する一方、骨側の血管内皮細胞に働きかけ、石灰化軟骨への血管進入を促進しこの血管に随伴する骨芽細胞にも働いて骨形成を促進し、結果として軟骨の骨への添加を促すことを示唆している。すなわちCTGF/Hcs24は内軟骨性骨化を促進する因子ecogenin(endochondral ossification genetic factor)と呼ぶべき因子であることが示唆される。

A. 研究目的

我々は、内軟骨性骨形成過程を幅広く促進する因子を単離することを目的に、世界に先駆けて自ら樹立したクローン化軟骨培養細胞株HCS-2/8から軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子のクローニングを試み、幾つかの遺伝子を単離したが、そのうちのひとつでhcs-24と名付けた遺伝子は結合組織成長因子(CTGF)をコードしていた^{1,2)}。CTGF/Hcs24はCCNファミリーという、一群の4つのドメイン構造を有するシステインに富むタンパク質の一つで、極めて新しい成長因子である³⁾。そのため、最近までCTGFの機能を示唆する知見としては、結合組織の創傷治癒の際に発現がみられること、線維芽細胞においてTGF- β で誘導され皮膚の線維化に関与すること等、病的な状態での発現についての報告しか見られず、その生理機能についてはほとんど知られていなかった。

そこで、この遺伝子産物CTGF/Hcs24の機能を明らかにすべく、その遺伝子発現を*in situ* hybridizationならびに免疫染色で詳細に解析したところ、細胞間基質の産生が亢進する病的組織では軟骨細胞以外でも発現が見られた^{4,5,6-8)}ものの、正常組織では肥大軟骨細胞にほぼ特異的に発現していた。また、骨形成に関与するTGF β やBMPによりこの遺伝子の発現が誘導されることが明らかになった^{1,3)}。さらに、我々はクローン化軟骨培養細胞株

HCS-2/8がCTGF/Hcs24に特異的な受容体を有することを明らかにした⁹⁾。そこで、本研究では、内軟骨性骨形成過程で重要な役割を果たす軟骨細胞と骨芽細胞に対する組み換え体CTGF/Hcs24の作用を調べた。

B. 研究方法

軟骨細胞としてクローン化軟骨培養細胞株HCS-2/8およびウサギ肋軟骨成長軟骨初代培養細胞を用いた。前者はダルベッコMEM+10%牛胎児血清(FBS)で、後者はアルファMEM+10%FBSで培養した。骨芽細胞株としては、ヒト骨肉腫由来の細胞株Saos-2およびマウス骨芽細胞株MC3T3細胞を用いアルファMEM+10%FBSで培養した。

組み換え体CTGF/Hcs24(rCTGF/Hcs24)の作製に際しては、まず、CTGF/Hcs24のcDNAを動物細胞発現ベクターpcDNA3.1のCMVプロモーター下流に接続して、HeLa細胞に導入した。ついで、培養上清中に生産されたCTGF/Hcs24を、ヘパリンアフィニティーカラムと抗CTGF抗体カラムにて精製して、実験に用いた^{9,10)}。

C. 研究成果

1. CTGF/Hcs24の軟骨細胞に対する増殖・分化促進作用
組み換えCTGF蛋白質(rCTGF/Hcs24)を

HCS-2/8細胞やウサギ肋軟骨成長軟骨細胞培養系に添加すると、対数増殖期に添加した場合、細胞の増殖やDNA合成が促進され、さらにコンフルエントに達した細胞では、プロテオグリカン合成が亢進した(図1)。従って、rCTGF/Hcs24は、増殖期の軟骨細胞においてはさらに強く増殖を促進し、前成熟期の軟骨細胞においてはプロテオグリカン合成を促進することがわかった。これらの効果は抗CTGF抗体で中和されるため、rCTGF/Hcs24の直接的作用であると考えられた。又、前肥大化期のウサギ成長軟骨細胞においては、石灰化のマーカーであるアルカリホスファターゼ活性が上昇した(図1)。さらに、rCTGF/Hcs24

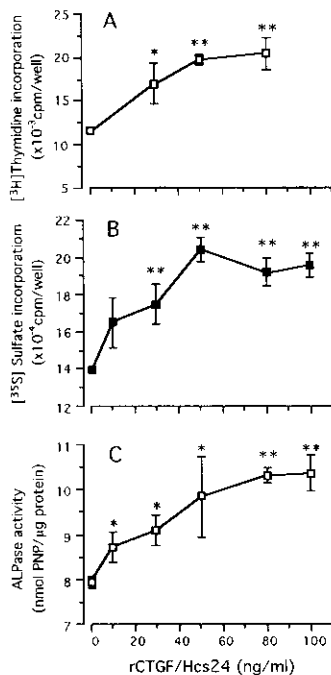


図1 ウサギ肋軟骨成長軟骨初代培養細胞のDNA合成(A)、プロテオグリカン合成(B)およびアルカリホスファターゼ活性(C)に及ぼすrCTGF/Hcs24の影響。

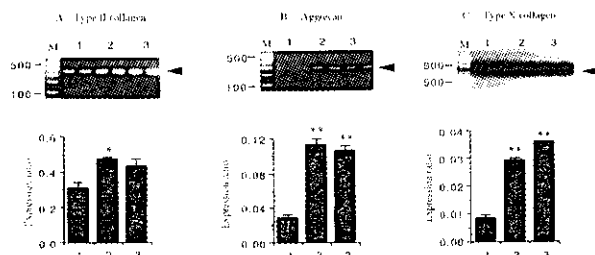


図2 ウサギ肋軟骨成長軟骨初代培養細胞におけるII型コラーゲン(A)、アグリカン(B)およびX型コラーゲンのmRNAの発現に対するrCTGF/Hcs24の影響。上段:RT-PCRによる増幅産物の電気泳動像。下段:上段のバンドをデンストメーターで測定した結果を示す。

はII型コラーゲン遺伝子、アグリカン遺伝子、X型コラーゲン遺伝子の発現を促進した(図2)。これらの結果は、肥大軟骨細胞から産生されたCTGF/Hcs24がバラクリンの軟骨細胞に働いて、その増殖、成熟ならびに肥大化を促進していることを示している。

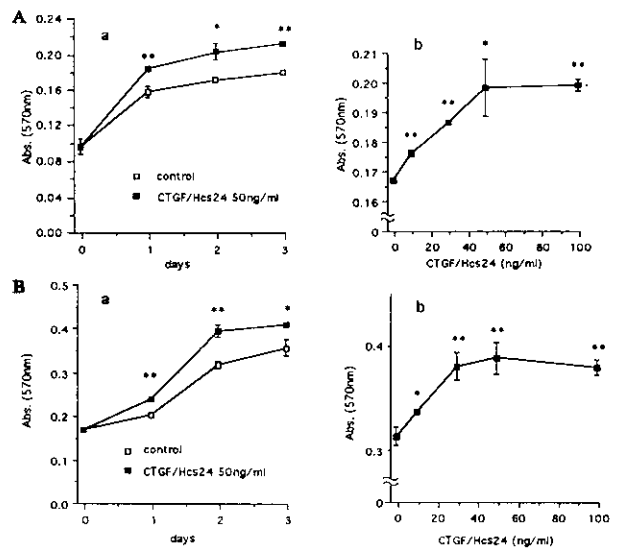


図3 ヒト骨肉腫由来骨芽細胞用細胞株Saos-2 (A)およびマウス骨芽細胞株MC3T3-E1 (B)の増殖に及ぼすrCTGF/Hcs24の影響。(a)経時的变化,(b)用量依存性

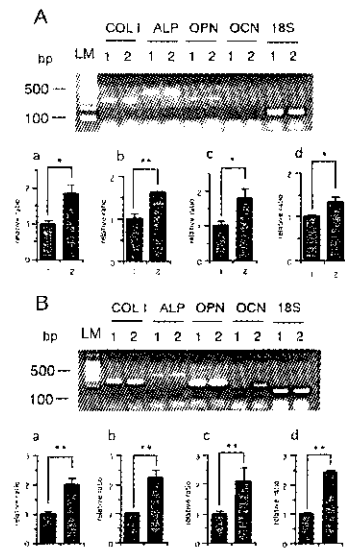


図4 ヒト骨肉腫由来骨芽細胞用細胞株Saos-2 (A)とマウス骨芽細胞株MC3T3-E1 (B)におけるI型コラーゲン(COL1)、アルカリホスファターゼ(ALP)、オステオポンチン(OPN)およびオステオカルシン(OCN)のmRNAの発現に対するrCTGF/Hcs24の影響。上段:RT-PCRによる増幅産物の電気泳動像。下段:上段のバンドをデンストメーターで測定した結果を示す。(a)COL1,(b)ALP,(c)OPN,(d)OCN

2. CTGF/Hcs24の骨芽細胞に対する増殖・分化促進作用

我々の *in situ* hybridization ならびに免疫染色法を用いた研究では、骨形成に中心的役割を演ずる骨芽細胞には CTGF/Hcs24 が発現していなかった。しかし、肥大軟骨細胞で産生された CTGF/Hcs24 が石灰化軟骨に隣接する骨側の骨芽細胞に作用する可能性は考えられる。

そこで、両細胞株を rCTGF/Hcs24 存在下で培養するとその増殖が濃度並びに時間依存性に促進された (図 3)。

また、骨芽細胞の分化形質であり、骨基質タンパク質である I 型コラーゲン、オステオポンチン、オステオカルシンの mRNA 発現量も rCTGF/Hcs24 の添加により増加した (図 4)。また、石灰化のマーカであるアルカリホスファターゼ mRNA の発現も亢進し (図 4)、さらにアルカリホスファターゼ活性も上昇した。これらの結果は CTGF/Hcs24 は骨芽細胞の増殖と分化、特に骨基質の産生を増加させ、骨形成を促進する作用を有することを示唆している。

D. 考察

内軟骨性骨形成過程においては未分化間葉系細胞から分化した静止軟骨細胞はさらに成長軟骨細胞へと分化して増殖し、成熟して多量の基質を産生する。その後、細胞自身は肥大化すると共に基質の石灰化が起こり、この石灰化基質に血管が侵入し、これらに随伴する破軟骨細胞と骨芽細胞により軟骨組織は骨組織に置換する。

本研究において軟骨細胞を用いて得られた結果は、肥大軟骨細胞に高発現する CTGF/Hcs24 が、肥大軟骨細胞よりも未分化な状態にある増殖軟骨細胞の増殖を促進し、前成熟期にある軟骨細胞の成熟を促進し、成熟期にある軟骨細胞の肥大化を促進することにより、肥大軟骨細胞を増加させることを示している。また、我々は rCTGF/Hcs24 が血管内皮細胞の接着、遊走、増殖、管腔形成を促進し、さらに、*in vivo* でも血管新生を誘導することを明らかにしている^{2,11,12)} が、この事実は肥大軟骨細胞に高発現する CTGF/Hcs24 が骨側の血管内皮細胞に働きかけ、石灰化軟骨への血管侵入を促進する可能性を示唆している。さらに、本研究で得られた CTGF/Hcs24 の骨芽細胞の増殖・分化促進作用は、肥大軟骨細胞で産生された CTGF/Hcs24 が血管に随伴する骨芽細胞にも働いて骨形成を促進し、結果として軟骨の骨への転化を促すことを示唆している。すなわち、

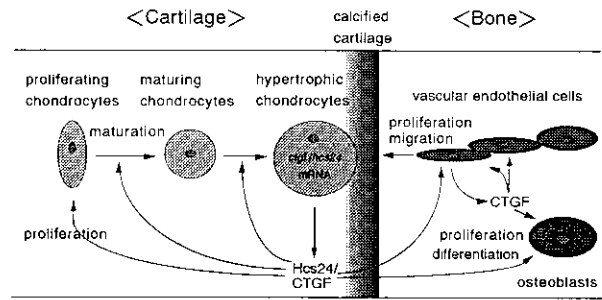


図 5 内軟骨性骨化における CTGF/Hcs24 の ecogenin (endochondral ossification genetic factor) 作用。CTGF/Hcs24 は肥大軟骨細胞で産生され軟骨細胞、血管内皮細胞および骨芽細胞に働いて内軟骨性骨化を多段階で促進する、すなわち、ecogenin と呼ぶべき因子である。

CTGF/Hcs24 は内軟骨性骨化を促進する因子 (ecogenin: endochondral ossification genetic factor) と言うべき因子であることが示唆される^{3,12)} (図 5)。

E. 結論

肥大軟骨細胞で産生される CTGF/Hcs24 は血管内皮細胞だけでなく、軟骨細胞と骨芽細胞に働いて内軟骨性骨化を多段階で促進するパラクリン因子であることが判明した。

[参考文献]

- 1) Nakanishi T, Kimura Y, Tamura T, Ichikawa H, Yamaai Y, Sugimoto T, Takigawa M (1997) Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234: 206-210.
- 2) Shimo T, Nakanishi T, Kimura Y, Nishida T, Ishizeki K, Matsumura T, Takigawa, M (1998) Inhibition of endogenous expression of connective tissue growth factor by its antisense oligonucleotide and antisense RNA suppresses proliferation and migration of vascular endothelial cells. *J. Biochem.* 124: 130-140.
- 3) 滝川正春, 中西 徹, 志茂 剛 (1998) 内軟骨性骨形成に最も重要な新規成長因子 CTGF. *細胞工学*, 17, 357-362.

- 4) Tamatani,T., Kobayashi,H., Tezuka,K., Sakamoto,S., Suzuki,K., Nakanishi,T., Takigawa,M. and Miyano,T. (1998): Establishment of the enzyme-linked immunosorbent assay for connective tissue growth factor (CTGF) and its detection in the sera of biliary atresia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 251, 748-752.
- 5) Ohnishi,H., Oka,T., Kusachi,S., Nakanishi,T., Takeda,K., Nakahama,M., Doi,M., Murakami,T., Ninomiya,Y., Takigawa,M. and Tsuji,T. (1998): Increased expression of connective tissue growth factor in the infarct zone of experimentally induced myocardial infarction in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 2411-2422.
- 6) Kondo,Y., Nakanishi,T., Takigawa,M. and Ogawa,N. (1999) Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor in the rat central nervous system. *Brain Res.*, 834(1-2), 146-151.
- 7) Sato,S., Nagaoka,T., Hasegawa,M., Tamatani,T., Nakanishi,T., Takigawa, M., and Takehara,K. (1999) Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: Association with the extent of skin sclerosis and the severity of pulmonary fibrosis. *J. Rheumatol.*, 27, 149-154.
- 8) Mori,T., Kawara,S., Shinozaki,M., Hayashi,N., Kakinuma T., Igarashi,A., Takigawa,M., Nakanishi,T. and Takehara,K. (1999) Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor- β in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J. Cell. Physiol.*, 181(1), 153-159.
- 9) Nishida T, Nakanishi T, Shimo T, Asano M, Hattori T, Tamatani T, Tezuka K, Takigawa M (1998) Demonstration of receptors specific for connective tissue growth factor on a human chondrocytic cell line (HCS-2/8). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 247: 905-909.
- 10) Nakanishi,T., Nishida,T., Shimo,T., Kobayashi,K., Kubo,T., Tamatani,T., Tezuka, K. and Takigawa, M. (2000) Effects of CTGF/Hcs24, a product of a hypertrophic chondrocyte-specific gene, on the proliferation and differentiation of chondrocytes in culture. *Endocrinology*, 141, 264-273.
- 11) Shimo T, Nakanishi T, Nishida T, Asano M, Kanyama M, Kuboki T, Tamatani T, Tezuka K, Takemura M, Matsumura T, Takigawa M (1999) Connective tissue growth factor induces the proliferation, migration, and tube formation of vascular endothelial cells in vitro, and angiogenesis in vivo. *J. Biochem.* 126: 137-145.
- 12) 中西 徹, 滝川正春 (1999) 結合組織成長因子 CTGF/Hcs24 の生理機能—内軟骨性骨化における役割, *生化学*, 71, 429-432.

F. 研究発表

1. 論文発表

Takashi Nishida, Tohru Nakanishi, Masahiro Asano, Tsuyoshi Shimo and Masaharu Takigawa: Effects of CTGF/Hcs 24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro. *J. Cell. Physiol.* in press.

2. 学会発表

1. 久保田聡, 服部高子, 中西 徹, 滝川正春: ヒト結合組織成長因子 (CTGF) cDNA の3' 非翻訳領域 (3'-UTR) による遺伝子発現抑制。第31回日本結合組織学会学術大会, 1999.6.10-11, 名古屋
2. 中西 徹, 浅野将宏, 山合友一朗, 小守寿文, 西田 崇, 吉道 玄, 服部高子, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 Hcs24/CTGF のマウス胎生期における発現と Cbfa1 による制御。第17回日本骨代謝学会, 1999.7.29-31, 大阪
3. 浅海浩二, 中西 徹, 浅野将宏, 西田 崇, 浅原弘嗣, 川井 章, 井上 一, 滝川正春: マウス肋骨骨折モデルにおける軟骨由来成長因子 Hcs24/CTGF の発現。第17回日本骨代謝学会, 1999.7.29-31, 大阪
4. 久保田聡, 服部高子, 中西 徹, 滝川正春: 軟骨由来の成長因子 Hcs24/CTGF (Ecogenin) の遺伝子発現調節メカニズム。第17回日本骨代謝学会, 1999.7.29-31, 大阪

5. 西田 崇, 中西 徹, 志茂 剛, 浅野将宏, 吉道 玄, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 Hcs24/CTGF はヘパラン硫酸に結合し軟骨細胞の接着を促進する。第17回日本骨代謝学会, 1999.7.29-31, 大阪
6. 山合友一郎, 浅野将宏, 中西 徹, 西田 崇, 吉道 玄, 服部高子, 杉本朋貞, 滝川正春: 軟骨由来成長因子-CTGF/Hcs24のマウス発生過程での遺伝子発現のパターン解析。第41会歯科基礎医学会学術大会, 1999.9.24-25, 東京
7. 久保田聡, 服部高子, 志茂 剛, 中西 徹, 滝川正春: 軟骨由来の成長因子-CTGF/Hcs24の細胞内での動態と機能。第72回日本生化学会大会, 1999.10.6-9, 横浜
8. 西田 崇, 中西 徹, 浅野将宏, 志茂 剛, 玉谷卓也, 手塚克成, 滝川正春: 骨芽細胞の増殖と分化に与える軟骨由来成長因子-CTGF/Hcs24の作用。第72回日本生化学会, 1999.10.6-9, 横浜
9. 中西 徹, 浅野将宏, 縄地久美子, 山合友一郎, 小守寿文, 西田 崇, 吉道 玄, 久保田聡, 服部高子, 滝川正春: 骨, 軟骨の発生過程における軟骨由来成長因子-CTGF/Hcs24の発現とCbfa1によるその制御。第72回日本生化学会, 1999.10.6-9, 横浜
10. 浅海浩二, 中西 徹, 浅野将宏, 西田 崇, 川井 章, 三谷 茂, 浅原弘嗣, 井上 一, 滝川正春: 骨折治癒過程における軟骨由来成長因子-Hcs24/CTGFの発現-IN VIVO STUDY-。第14回日本整形外科学会基礎学術集会, 1999.10.7-8, 奈良
12. 中西 徹, 浅野将宏, 山合友一郎, 小守寿文, 滝川正春: Cbfa1ノックアウトマウスにおける軟骨成長因子-CTGF/Hcs24の発現とその制御様式。第22回日本分子生物学会年会, 1999.12.7-10, 福岡
13. 久保田聡, 江口傑徳, 服部高子, 近藤誠二, 中西 徹, 滝川正春: 軟骨由来細胞株HCS-2/8細胞におけるCTGFの動態。第13回日本軟骨代謝学会, 2000.3.3-4, 横浜
14. 井上美穂, 中西 徹, 西田 崇, 滝川正春: ヒト軟骨肉腫由来軟骨細胞様細胞株HCS-2/8におけるチロシンキナーゼファミリー遺伝子のクローニング。第13回日本軟骨代謝学会, 2000.3.3-4, 横浜
15. 中西 徹, 浅野将宏, 山合友一郎, 小守寿文, 西田 崇, 吉道 玄, 服部高子, 滝川正春: 軟骨由来成長因子 Hcs24/CTGF の軟骨分化における役割とCbfa1によるその発現制御。第13回日本軟骨代謝学会, 2000.3.3-4, 横浜
16. 江口傑徳, 久保田聡, 近藤誠二, 服部高子, 中西 徹, 窪木拓男, 滝川正春: ヒト軟骨細胞様培養細胞株HCS-2/8におけるCTGF/Ecogenin遺伝子発現制御機構。第13回日本軟骨代謝学会, 2000.3.3-4, 横浜

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

南 晋司 (和歌山県立医科大学整形外科教室), 坂田 亮介 (和歌山県立医科大学整形外科教室), 玉置 哲也 (和歌山県立医科大学整形外科教室)

KEYWORD=histone deacetylase inhibitor, trichostatinA, osteoblastic differentiation, OPLL

【研究目的】

[目的] マウス未分化間葉系細胞を用いヒストン蛋白脱アセチル化酵素阻害剤による骨分化への誘導能を検討することを目的とした。[方法] マウス未分化間葉系細胞C3H10T1/2に histone deacetylase inhibitorである trichostatinA (TSA) を50ng/ml添加し投与後72時間後に osteopontin の mRNA 発現を検討した。さらに all-trans-Retinoic acid (RA) を TSA とともに添加し osteopontin の mRNA 発現に与える影響を検討した。osteopontin の mRNA は血清によりその発現が上昇するため低血清状態において TSA を50ng/ml添加し投与24時間後に osteopontin mRNA の発現を検討した。[結果] TSA 投与により osteopontin の mRNA 発現の上昇を認めた。また, RA と同時に投与すると RA 単独に投与したもの 비해発現の亢進が認められた。(表1) 低血清状態においても TSA を添加することにより osteopontin の mRNA 発現の亢進を認めた。(表2) [結論] ヒストン蛋白のアセチル化により骨分化マーカーである osteopontin の mRNA の亢進を認めた。これらの結果はヒストン蛋白のアセチル化が骨分化への誘導に影響を与えている可能性を示唆するものであった。

A. はじめに

ビタミンAと骨増殖との関連, in vitro においてもその活性化型物質であるレチノイン酸が骨分化を調節すると以前より報告されレチノイン酸と靱帯骨化症発症との関連が示摘されている。また最近, レチノイン酸のレセプターである retinoic acid receptor (RAR) や retinoid X receptor (RXR) がヒストン蛋白のアセチル化により転写レベルによるその発現を調節されている可能性が報告されている。従って, ヒストン蛋白をアセチル化する酵素である histone deacetylase inhibitor を用いることによ

り骨分化過程において RAR や RXR がどのように調節されているのか, またそれによる骨分化との関連性を調べることは骨化進展におけるメカニズムを解析する上で重要と考えられる。今回我々は骨分化能をもつ未分化間葉系細胞を用いヒストン蛋白のアセチル化による骨分化誘導能の可能性の検討をおこなった。また RA とともに投与し骨分化マーカーである osteopontin の発現にどのように影響するかにおいても検討を加えた。

	28S による補正值	control 比
1	2197	1
2	9612	4.375
3	7834	3.565
4	22622	10.296

表1 Osteopontin mRNA の発現
1. control 2. TSA 50ng/ml 3. RA 10⁻⁶M
4. TSA 50ng/ml+RA10⁻⁶M

	28S による補正值	control 比
1	1940	1
2	4890	2.52
3	5085	1
4	11802	2.32
5	6669	1
6	12044	1.8

表2 低血清状態における Osteopontin mRNA の発現
1. 0.1%FBS TSA(-) 2. 0.1%FBS TSA 50ng/ml
3. 0.5%FBS TSA(-) 4. 0.5%FBS TSA 50ng/ml
5. 1%FBS TSA(-) 6. 1%FBS TSA 50ng/ml

B. 研究方法

未分化間葉系細胞C3H10T1/2を2.5x10⁵個/10cm dish播種し24時間後にhistone deacetylase inhibitorであるtrichostatinA(TSA)を50ng/ml添加した。投与後72時間後にosteopontinのmRNA発現をNorthern blotting法にて解析した。また,RA 10⁻⁶Mも同時に添加しTSAとの相乗作用を検討した。またC3H10T1/2を2.5x10⁵個/10cm dish播種し24時間後,低血清培地に交換48時間後TSA 50ng/mlを培地に添加しさらに24時間後に培養細胞よりtotal RNAを抽出,osteopontinのm-RNAの発現をNorthern blotting法にて解析した。またinternal controlとして28Sを用い,画像解析はNIH Imageを用いておこなった。

C. 研究結果

osteopontinのm-RNAの発現はTSA投与により上昇し,RAと同時に投与するとRA単独に投与したものに比べosteopontinのm-RNAの発現の亢進を認めた。低血清下においてTSAを添加したものでも発現の亢進を認めた。

D. 考察および

E. 結論

RAによる骨分化や脊柱靭帯骨化との関連が以前より報告されている。このRAのレセプターであるRXR β は第6染色体短腕に存在し脊柱靭帯骨化症の候補遺伝子であるコラーゲン11 α 2遺伝子の調節にも関与している可能性があり注目をされている。近年,このRAのレセプターであるRARやRXRの発現はRAやTSAによりその発現の亢進が認められること, vitaminDやステロイドなどにより誘導される転写因子と複合体を形成すること, さらにヒストン蛋白のアセチル化作用をもつ転写因子p300がこれら複合体に結合しさまざまな遺伝子発現に関与しているという報告がなされている。従ってこれらの転写因子がどのように遺伝子発現を調節しているかについては興味のあるところである。今回の実験においてhistone deacetylase inhibitorであるTSAを用いヒストン蛋白をアセチル化させることによりTSA投与のみでosteopontinのm-RNAの発現が亢進することが明らかとなった。またRAとともにTSAを投与するとRAのみに比べより高いosteopontinのm-RNAの発現の亢進を認めた。また低血清状態においてもosteopontinのm-RNAの発現の亢進を認めており, 以上の結果からTSAを投

与することによるヒストン蛋白のアセチル化においてはosteopontinの発現に影響を与えることが明らかとなった。これらの発現において転写因子がどのように調節しているのかまだ明らかとはされておらず, 今後はさらにヒストン蛋白のアセチル化においてosteopontinのpromoterを用いどのような転写因子に調節されているのかを解析し, 骨分化や靭帯骨化症発症と関連について検討加える必要があるものと考えている。

[参考文献]

- 1) 荒井三千雄: 整形外科疾患とビタミンA 日整会誌 65: s15, 1991
- 2) Minucci S, Horn V, Bhattacharyya N, Russanova V, Ogryzko V.V, Gabriele L, Howard B. H, Ozato K: A histone acetylase inhibitor potentiates retinoid receptor action in embryonal carcinoma cells Proc. Natl. Acad. Sci. USA: 94, 11295-11300, 1997
- 3) 古賀公明 他: 脊椎後縦靭帯骨化症の遺伝子解析, 脊椎後縦靭帯骨化症調査研究班平成8年度研究報告書: 8-10, 1997
- 4) Tsumaki N, Kimura T: Differential expression of an acidic domain in the amino-terminal propeptide of mouse pro- α 2(XI) collagen by complex alternative splicing J Biol Chem: 270, 2372-2378, 1995

脊柱靱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—

小谷野康彦（東京慈恵会医科大学整形外科），藤井 克之（東京慈恵会医科大学整形外科）

KEYWORD = 脊柱靱帯骨化症，内軟骨性骨化，軟骨細胞分化

【研究要旨】

脊柱靱帯骨化症発症のメカニズムを解明するために，内軟骨性骨化過程に着目し，成長軟骨細胞の分化を制御する新規遺伝子を単離し，その機能について解析を行なった。すなわち，我々がこれまでにクローニングした軟骨細胞の分化維持に重要と思われる数種類の新規遺伝子のうち，CDEP(1)とDEC 1 (2)と命名された2つの因子についてcDNAおよびアミノ酸配列の解析を行なった。その結果，CDEPは，細胞形態および遺伝子発現を制御する低分子量G蛋白質Rhoの活性調節因子と考えられ，またDEC 1はbHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子である可能性があり，組織の発生や分化に関与する遺伝子の発現を制御すると考えられている。これらの新規因子が，肥大型に特に高レベルに発現すること，そしてPTHおよびcAMPにより誘導されることから，軟骨細胞の最終分化に深く関与することが示唆された。今後，脊柱靱帯細胞における発現について検討し，靱帯骨化のメカニズムを解明したい。

A. はじめに

成長軟骨細胞は，細胞増殖期，基質合成期，成熟期，肥大型，石灰化期の各段階を経て分化することが知られている。これらの各分化段階において，軟骨細胞は種々の成長因子やホルモンさらにはこれまで知られていない未知の因子によってその分化が制御されていると考えられているが，その詳細なメカニズムは未だ解明されていない。分化過程にある軟骨細胞に特異的に発現する遺伝子を探索することは，軟骨の分化や変性のメカニズムを分子レベルで解析するために重要であり，このことは内軟骨性骨化によると考えられる脊柱靱帯骨化症発症のメカニズムの解明につながるものと考えられる。そこで今回は，まず，培養ヒト胎児骨端軟骨細胞に，cAMPを添加することにより，軟骨を分化状態に保ち，これらとcAMPを添加せず脱分化した軟骨細胞との間で発現に差のあるクローンの検索を行い，前者に特異的に発現している遺伝子のクローニングを行った。その結果，新規のRho GEF (guanine nucleotide exchange factor) やbHLH (basic helix-loop-helix) 型の転写因子が同定された。

B. 研究方法

軟骨細胞培養 ヒト胎児骨端軟骨を無菌的に採取し，0.1%トリプシン-EDTAおよび0.1%コラゲナーゼ消化し，軟骨細胞を単離した。これらを10%牛

胎仔血清，50 μ g/mlアスコルビン酸を含む α -MEM中に1 \times 10⁶個/10cmディッシュで単層培養し，サブコンフルエントになった後，dbcAMP(1mM)を約2週間添加して軟骨細胞の分化状態を維持させた群 (cAMP添加群)，およびdbcAMP無添加により脱分化させた群 (cAMP非添加群) を作製した。

サブトラクション法 次に，両群からtotal RNAを回収し，発現量の差によって検出するサブプレッショントラックティブハイブリダイゼーション法によりcAMPによる分化誘導刺激後の軟骨細胞において発現が認められるクローンを回収し，それらの部分塩基配列を決定した。各塩基配列をデータベースと照合し，これまでに報告のない未知の遺伝子断片についてはRACE (rapid amplification of cDNA ends) 法により全長cDNAのクローニングを行った。

肋軟骨成長板組織におけるCDEP mRNAの発現

4週齢日本白色家兎の肋軟骨成長板スライス (軟骨側からG1, G2, G3) および静止軟骨層 (R) (図1 a) の各層からグアニジン-セシウム超遠心法によりtotal RNAを抽出し，CDEP mRNAの発現レベルをRT-PCRサザンブロット法にて検討した。同時に軟骨分化マーカーとしてX型コラーゲン，アルカリフォスファターゼ，プロテオグリカンアグリカンの各スライスにおける発現レベルをRT-PCR法で検討した。