

別添2

厚生科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

後縦靭帯骨化症責任遺伝子同定と予防・治療への応用

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井ノ上 逸朗

平成13年4月

## 目 次

I. 総括研究報告書	
後縦靭帯骨化症責任遺伝子同定と予防・治療への応用 . . . . .	1
井ノ上逸朗	
II. 分担研究報告	
1. 後縦靭帯骨化症の疫学とサンプル収集 . . . . .	8
原田征行	
2. OPLL 患者 DNA の収集、チェコでの OPLL および DISH 収集 . . . . .	12
松永 俊二	
3. OPLL 患者靭帯組織の摘出・培養 . . . . .	18
米 和徳	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 . . . . .	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . .	26

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

## 後縦靭帯骨化症責任遺伝子同定と予防・治療への応用

主任研究者 井ノ上 逸朗 東京大学・医科学研究所 助教授

### 研究要旨

脊椎後縦靭帯骨化症は進行性靭帯骨化を特徴とする多因子疾患であり、脊髄神経圧迫によりさまざまな程度の脊髄神経症状をきたす。原因がいまだ解明されていない難病であり、厚生労働省の特定疾患に指定されている。現在のところ治療法は脊髄圧迫を取り除く外科手術が中心である。OPLL は整形外科領域の Common Disease であり、とくに日本人において非常に頻度が高い（30歳以上の3-4%が罹患）。同時に整形外科領域におけるミエロパチーの第1原因となっている。高齢発症にもかかわらず、OPLL には強い遺伝背景が存在することが疫学調査の結果明らかとなっている。本研究ではOPLLの成因解明を目的とし、その結果を治療に結実させることを最終目的とする。成人疾患の中でもOPLLの遺伝要因の関与は強く、遺伝要因の強さの指標である相対危険率は1.0と算出されている。OPLLに関連する遺伝子同定を目的とし、141対の罹患同胞対を収集し、404個のマイクロサテライトを用いゲノム全域にわたる連鎖解析をおこなった。連鎖の検定はノンパラメトリック法に従った。OPLLのゲノムスキャン解析で5ヶ所の遺伝子座を特定できている（5, 6, 13, 16, 21番）。その中で最も強い連鎖を認めた領域は21番染色体長腕(21q22)であった（最大lod値=3.6）。21番染色体は日本の研究グループを中心にゲノム解析がなされており、連鎖を認めた領域から感受性遺伝子同定にむけて一塩基多型をもちいたケースコントロールスタディをおこなっている。ゲノム全域での連鎖解析と平行して、候補遺伝子からの検討もおこなっている。候補遺伝子は骨代謝に関連する遺伝子64個と、ヒト間葉系幹細胞が骨芽細胞へ分化する過程で発現が増加、もしくは減少する遺伝子24個を解析した。これらの遺伝子近傍のマーカーで連鎖解析をおこない、いくつかの遺伝子で弱い連鎖を認めている。

### 分担研究者

原田征行 弘前大学・医学部 教授  
米 和徳 鹿児島大学・医学部整形外科 助教授  
松永俊二 鹿児島大学・医学部整形外科 講師

### A 研究目的

脊椎後縦靭帯骨化症（OPLL）は整形外科領域

の脊髄症の第一位原因となっており、頻度の高い疾患であるので医療の現場での重要度は高い。未曾有の少子高齢化を迎えつつある我が国において、高齢者に多いOPLLの成因解明かつ治療法の開発は急務といえるだろう。成因解明のためにOPLL責任遺伝子の同定がその端緒となり、疾患機序の解明、ひいては新たな治療法

の開発に結びつくと予想される。OPLLは全身性の骨化傾向亢進という捉え方もできる。対極に位置する疾患、骨粗鬆症、の理解にも役に立つことが期待できる。

## B. 研究方法

### B-1) サンプル収集

OPLLに関連する遺伝子同定法として、まず罹患同胞対連鎖解析により、染色体上での遺伝子座の特定を試みた。必要となるOPLLに罹患している同胞は鹿児島大学（松永、米）、弘前大学（原田）により収集された。現在までのところ141対の罹患同胞対を得ることができている。同様にアソシエーションスタディに必要なOPLL患者、非OPLL患者（単純X線でOPLLを否定できたグループ）、それぞれ250例、210例収集できている。それぞれの患者について、発症年齢、症状、OPLL臨床型（連続型、分節型、混合型、その他型）、骨化している頸椎の位置などの詳細にわたる臨床情報をエクセルファイルに保存している（松永担当）。なお個人情報に関しては個人情報管理者により匿名化されており、ここでの臨床データとしては入力されていない。血液からのゲノムDNA精製は常法に従った。

疾患関連性については人種差があることはよく知られている。残念ながら白人にはOPLLをあまり認めないので、白人サンプルの収集は困難である。diffused idiopathic skeletal hyperostosis (DISH)は全身性骨化傾向をきたす疾患で白人に多く、OPLL類似疾患として位置づけられる。チェコ・プラハ大学との共同研究により白人OPLL、およびDISHの収集を開始している（松永担当）。また同じアジア系として、中国でのOPLL患者収集も目指している（原田担当）。

### B-2) 連鎖解析

ゲノム全域を網羅するマイクロサテライトマーカーセットはPE AppliedのLinkage mapping set version IIをもちいた。このセットは400個のマーカーから成り、ゲノム全域を平均8センチモルガン間隔で網羅できる。しかしながらいくつかの問題点もあった。OPLLは高齢疾患なので、患者両親の情報は得ることが困難なので、それぞれのマーカーについてアレル頻度から両親の遺伝型を予測する必要がある。その際、高いヘテロ接合性が要求される。元来このマーカーセットは白人ではヘテロ接合性が高いものの、日本人においては400マーカーのうち40個は多型性（情報度）の低いマーカーであった（ヘテロ接合性=60%以下）。そこで、データベースからマイクロサテライトを検索し、代わりとなるマーカーを探した。結果、404個からなる日本人に適応した新たなマーカーセットができあがった。平均ヘテロ接合性は75.6%、平均インターバルは8.7cM、最大インターバルは26.8cMである。

連鎖の検定はふたつの方法に従った。SIBPALとGENEHUNTERである。両方ともノンパラメトリック連鎖解析であり、メンデルの遺伝形式、侵透度、遺伝子頻度などの情報は必要でない。OPLLのような多因子疾患には適した手法であるが、検定力が弱い、特定できる領域が広い（20センチモルガン程度）という欠点がある。

B-3) マイクロサテライトマーカータイピング  
蛍光色素でラベルされたプライマーによりPCRをおこない、シーケンサーで解析することにより、サイズの違いを検出することでタイピングをおこなった。タイピングにはGENESCAN、GENOTYPERのソフトウェアを用いている。

B-4) 21q22領域での1塩基多型（SNP）解析

もっとも強い連鎖を得た 21 番染色体領域 (21q22) には 200 個の遺伝子が存在している。それらを領域候補遺伝子として、SNP をデータベースから得た。用いたデータベースは以下である。

<http://snp.cshl.org>

[http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index\\_ja.html](http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

位置に頼らず、骨代謝と密接に関連する機能的な遺伝子も候補としていくつか選定して、同様にデータベースから SNP を同定している。データベースに SNP がない場合は、直接シーケンスにより SNP を独自に開発している。

SNP 頻度は患者・対照関連解析にて  $\chi$  検定を用い解析した。必要に応じて Odds 値をだしている。

#### B-4) 靭帯細胞培養 (米担当)

遺伝解析の結果は統計学に基づき、直接機能変化と関連するものではない。疾患に関連する変異 (多型) がどのような機能変化をおこすかについては、実験手法を用いて示す必要がある。感受性遺伝子が同定されていない段階ではあるが、実験材料の準備は必要である。OPLL 手術時 (対照は頸椎症性脊髄症) に摘出、処理される棘間靭帯を採取し、初代培養系を確立する。摘出サンプルを 1mm 片に細かく切断し、培養皿にうつし、explant 細胞を培養する。

#### B-5) ヒト間葉系幹細胞 (MSC) 培養および分化誘導

MSC は骨、軟骨、靭帯、筋あるいは脂肪などに分化する能力を有する細胞で、ヒト骨髓液から単離・培養できる。MSC を Osiris 社から購入し、デキサメサゾン、グリセロフォスフェート存在下に、骨芽細胞系へ 24 時間分化誘導した。分化前、後の細胞から mRNA を分離し、マイクロアレイ解析をおこなった。マイクロアレイは 8

300 個の cDNA に対しておこない、2 倍以上の増加、1/2 以下の減少している遺伝子を候補として選定した。候補遺伝子内、または 3cm 以内の有用な DNA 多型マーカー (マイクロサテライトマーカー) を用い、罹患同胞対連鎖解析を施行した。マイクロサテライトマーカーはインターネット (The Whitehead Institute for Biomedical Research / MIT Center for Genome Research ; <http://www.genome.wi.mit.edu/>) から検索した。

### C. 研究結果

#### C-1) ゲノム全域での連鎖解析

鹿児島大学、弘前大学の全面的な協力により罹患同胞対を増やすことができている (141 対)。OPLL の相対危険率は 1.0 と算出されているので、この罹患同胞対でゲノム全域解析がおこなえる検定力があると判断された。250 サンプルについて 400 マーカー以上のタイピングをおこなうので、延べ 10 万タイピング以上となり膨大な量の解析が必要である。得られたデータは GENESCAN、GENOTYPER 等のプログラムで半自動的にタイピングをおこない、その後の連鎖解析に導入した。連鎖の検定は SIBPAL、GENEHUNTER でおこなっている。400 個の遺伝マーカーをもちいるとゲノム全域を 10 センチモルガン以下の間隔で解析できる。罹患同胞対連鎖解析法の欠点のひとつは、組換え情報がないので狭い領域への絞り込みが不可能な点である。一方、同様の理由で 10-20 センチモルガンにわたり連鎖を認めるので、10 センチモルガン間隔での解析でも連鎖を見逃すことは少ないともいえる。通常、連鎖を認めた領域でさらに多数のマーカーをもちいた解析 (dense mapping) をおこない、確実な連鎖の検定をおこなう。OPLL のゲノムスキャン解析で

5ヶ所の遺伝子座を特定できた。その中で、もっとも強い連鎖を認めた領域は21番染色体長腕(21q22)であった。D21S263および近傍マーカーでの連鎖を認めており、D21S263では $\text{lod}=3.6$ ,  $P=0.000009$ と非常に強い連鎖を得ている。この結果からD21S263近傍に新たなOPLL責任遺伝子が存在することが強く示唆される。

C-2) 21番染色体長腕でのOPLL関連遺伝子探索

連鎖を認めた領域からの責任遺伝子同定が今後の課題となるが、いくつかの方法を組み合わせる必要があるだろう。ヒトゲノム情報がほぼ解読されており、この領域(21q22)も東京大医科研 榊教授、および慶応大学 清水教授率いるグループによりゲノム配列があきらかにされている。これらの遺伝情報を最大限利用し、遺伝子同定を目指しているところである。

ゲノム配列情報からマイクロサテライトの同定ができる。多型性に富むマーカーなので、連鎖解析のみでなく患者・対照関連解析にも応用可能である。21q22領域ほぼ10センチモルガンにわたり100個のマイクロサテライトを同定し、それらを用いた連鎖不平衡マッピングをおこなった。5つのマーカーで有意差を認めたものの、その中には偽陽性が含まれるものと予想される。確実なマッピングをおこなうためにSNP情報を組み合わせたハプロタイプ解析、連鎖不平衡解析をおこなう必要がある。

#### C-3) OPLL 候補遺伝子での連鎖解析

ゲノム全域からの責任遺伝子同定作業は確実な手法であるが、時間と労力を要するので、同時に候補遺伝子を用いた解析を平行させている。候補遺伝子の選択は、①疾患の発症機構に関係する、もしくは文献的に骨代謝に関連すると考えられている遺伝子、②ヒト間葉系幹細胞

が骨芽細胞系に分化する過程で、発現量に差を認められた遺伝子である。分化誘導後24時間で発現の変化する遺伝子をマイクロアレイ法により同定している。これらを選定した後、候補遺伝子内、または3cM以内の情報度の高いマイクロサテライトマーカーを用い罹患同胞対連鎖解析を施行した。解析により( $p\text{-value} < 0.05$ 以下)連鎖が認められた遺伝子は6個(bone morphogenetic protein 4, proteoglycan 1, osteopontin, parathyroid hormone receptor 1, transforming growth factor, beta 3, insulin-like growth factor 1)であった。またマイクロアレイ解析により候補遺伝子は計24個(増強した遺伝子12個、減弱した遺伝子12個)選別でき、そのうち発現量に最も差が見られたCRYAB(Crystallin, alpha B)遺伝子において連鎖が認められた。連鎖の認められた遺伝子の中でCRYAB、BMP4が有意に高い値を示していた。

#### D. 考察

この2-3年で、さまざまなCommon Diseaseの責任遺伝子座が相次いでマッピングされてきている。しかしながら責任遺伝子同定はまだまだ遠い道のりである。実際にこれまで疾患遺伝子座からのポジショナルクローニング成功例は糖尿病におけるNIDDM1のみである。おそらく遺伝要因の弱さがすべての解析段階で邪魔をしているのであろう。しかしながら疾患関連遺伝子同定の意義が小さいわけではない。疾患遺伝子同定により、疾患メカニズムの解明が可能となり、本質的な治療法の開発が可能となる。

本研究ではOPLL罹患同胞対連鎖解析によりゲノム全域からマッピングされた染色体領域(21q22)からの遺伝子同定を目指す。疾患遺

伝子座の限局化の目的に SNP を組み合わせたハプロタイプ解析による連鎖不平衡マッピングが期待されている。今回、ゲノムの塩基配列情報からマイクロサテライトを同定し、マイクロサテライトによる患者・対照関連解析をおこない、疾患遺伝子へのアプローチを試みた。この方法はゲノム配列情報があれば、候補遺伝子に頼らず系統的にマッピングできる方法である。さらには SNP との組み合わせでさらに確実かつ詳細なマッピングが可能となり、原因遺伝子の同定、ポジショナルクローニングが現実のものとなるであろう。

我々はスクリーニングの精度を高めるために、代表的な骨代謝関連遺伝子の部位を Web site から獲得し連鎖解析を行うことで原因遺伝子を突き止めることも同時に試みている。候補遺伝子は骨形成に関与する遺伝子、及びマイクロアレイ解析によりヒト間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する過程で発現量に差を認めた遺伝子、計 88 個の遺伝子を選定した。ヒト間葉系幹細胞を骨芽細胞系へ分化誘導後、24 時間で発現の変化する遺伝子をマイクロアレイ法により同定している。これらを選定した後、候補遺伝子内、または 3cM 以内の情報度の高いマイクロサテライトマーカーを用い罹患同胞対連鎖解析を施行した。ノンパラメトリック解析により ( $p$ -value  $< 0.05$  以下) 連鎖が認められた遺伝子は 6 個であった。またマイクロアレイ解析により候補遺伝子は計 24 個 (増強した遺伝子 12 個、減弱した遺伝子 12 個) 選別でき、そのうち発現量に最も差が見られた CRYAB (Crystallin, alpha B) 遺伝子において連鎖が認められた。同時に GENEHUNTER での連鎖解析をおこなっており、CRYAB、BMP4 が有意な連鎖不平衡を認めた。BMP4 は骨形成に密接に関連する遺伝子でありさらなる遺伝子解析が必要となろう。

## E 結論

OPLL 罹患同胞対 141 対の収集ができた。ゲノム全域での連鎖解析にていくつかの染色体領域で連鎖を認めた。その中でも 21 番染色体で強い連鎖を得た (最大 LOD=3.6 at D21S263)。候補領域からのポジショナルクローニングを試みているところである。あわせて位置に頼らない候補遺伝子解析も進行中である。

## F 研究発表

### 1. 論文発表

Mori, H., Ikegami, H., Kawaguchi, Y., Seino, S., Yokoi, N., Takeda, J., Inoue, L., Seino, Y., Yasuda, K., Hanafusa, T., Yamagata, K., Awata, T., Kadowaki, T., Hara, K., Yamada, N., Gotoda, T., Iwasaki, N., Iwamoto, Y., Sanke, T., Nanjo, K., Oka, Y., Matsutani, A., Maeda, E., Kasuga, M. 2001. Association of the Pro12-Ala substitution in peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 2 both with resistance to development of diabetes and with impairment of insulin secretion and disease severity in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 50, 891-894.

The Study Group of Comprehensive Analysis of Genetic Factors in Diabetes Mellitus (Kanamori, M., Wang Y-J, Takeda, J., Inoue, L., Sanke, T., Nanjo, K., Mori, H., Kasuga, M., Hara, K., Kadowaki, T., Tanizawa, Y., Oka, Y., Iwami, Y., Ohgawara, H., Yasuda, K., Yamada, Y., Seino, Y., Yokoi, N., Yano, H., Seino, S.) 2001. S20G mutation of the amylin gene is associated with type 2 diabetes in Japanese. *Diabetologia* In press.

Maeda, S., Ishidou, Y., Koga, H., Taketomi, E., Ikari,

- K., Komiyama, S., Takeda, J., Sakou, T., and Inoue, I. 2001. Functional impact of human collagen  $\alpha 2$  (XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Miner. Res.* 16, 948-957.
- Aihara, Y., Onda, H., Teraoka, H., Yokoyama, Y., Seino, Y., Kasuya, H., Hori, T., Tomura, H., Inoue, I., Kojima, I., and Takeda, J. 2001. Assignment of SLC17A6 (alias DNPI), the gene encoding brain/pancreatic islet-type Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter to human chromosome 11p14.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 92, 167-169.
- Havelka, S., Koga, H., Maeda, S., Inoue, I., Vesela, A., Pavelkova, A., Halman, L., and Ruzicova, S. 2001. Are diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL) genetically related? *Annal. Rheum. Dis.* In press.
- Yabe, I., Sasaki, H., Yamashita, I., Tashiro, K., Tatei, A., Suzuki, Y., Kida, H., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Hokezu, Y., Nagamatsu, K., Oda, T., Ohnishi, A., Inoue, I., and Hata, A. 2001. Predisposing chromosome of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) in Japanese. *J. Med. Genet.* 38, 328-333.
- Nishigori, H., Tomura, H., Kanamori, M., Yamada, S., Kikuchi, N., Sho, K., Tonooka, N., Onigata, K., Inoue, I., Kojima, I., Yamagata, K., Yang, Q., Matsuzawa, Y., Kohama, T., Miki, T., Seino, S., Kim, M., Choi, H., Moore, D., Takeda, J. 2001. Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 575-580.
- Takeoka, S., Unoki, M., Onouchi, Y., Doi, S., Fujiwara, H., Miyatake, A., Fujita, K., Inoue, I., Nakamura, Y., and Tamari, M., 2001. Amino-acid substitutions in the IKAP gene product significantly increase risk for bronchial asthma in children. *J. Hum. Genet.* 46, 57-63.
- Maeda, S., Koga, H., Matsunaga, S., Numasawa, T., Takeda, J., Harata, S., Sakou, T., Inoue, I. 2001. Gender-specific haplotype association of collagen  $\alpha 2$  (XI) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Hum. Genet.* 46, 1-4.
- Aihara, Y., Mashima, H., Onda, H., Hisano, S., Kasuya, H., Hori, T., Yamada, S., Tomura, H., Yamada, Y., Inoue, I., Kojima, I., Takeda, J. 2000. Molecular cloning of a novel brain-type Na<sup>+</sup>-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J. Neurochem.* 74, 2622-2625.
- 井ノ上逸朗 遺伝子多型を利用した疾患遺伝子検索法  
ポストシーケンスのゲノム科学、中山書店  
松原、榊 (監修) 47-69, 2000
2. 学会発表  
Candidate Approach Identifying Susceptible Gene for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine  
K. Furushima, K. Ikari, S. Maeda, H. Koga, S. Komiyama, K. Shimo-onoda, S. Harata, I. Inoue  
The Orthopaedic Research Society, February 25-28, 2001 San Francisco



Gene Mapping of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine by Genome Screen and association study

K. Ikari, K. Furushima, S. Maeda, H. Koga, S. Komiya, S. Harata, I. Inoue

The Orthopaedic Research Society, February 25-28, 2001 San Francisco

Candidate Approach Identifying Susceptible Gene for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine

K. Furushima, K. Ikari, S. Maeda, H. Koga, S. Komiya, K. Shimo-onoda, S. Harata, I. Inoue

American Society of Bone and Mineral Research, September 22-26, 2000 Toronto

Mapping of Major Susceptibility Locus for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine to Chromosome 21q by Genome-Wide Linkage Analysis

K. Ikari, K. Furushima, S. Maeda, H. Koga, S. Komiya, K. Shimo-onoda, S. Harata, I. Inoue

American Society of Bone and Mineral Research, September 22-26, 2000 Toronto

The Alteration of mRNA Expression of Candidate Genes for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine during Normal Human Osteoblast Differentiation.

S. Maeda, K. Ikari, H. Furushima, K. Shimo-onoda, H. Koga, S. Matsunaga, K. Yone, S. Harata, S. Komiya, I. Inoue

American Society of Bone and Mineral Research, September 22-26, 2000 Toronto

Genome-Wide Linkage Analysis for Ossification of

the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine with Evidence for Linkage to a Region on Chromosome 21

K. Ikari, K. Furushima, S. Maeda, H. Koga, J. Takeda, S. Harata, I. Inoue

Spine Across the Sea, July 23-27, 2000 Hawaii

Pathogenesis of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine

S. Maeda, H. Koga, Y. Ishidou, I. Inoue

Spine Across the Sea, July 23-27, 2000 Hawaii

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 後縦靭帯骨化症の疫学とサンプル収集

分担研究者 原田征行 弘前大学・医学部整形外科 教授

### 研究要旨

脊椎後縦靭帯骨化症（OPLL）は整形外科を中心とした長年の研究にもかかわらず、その成因については不明な点が多い。また治療法も外科手術に頼るのみなので、創薬など新たな治療法の開発が求められる。本研究では OPLL 発症に関連する遺伝子同定を目指し、その知見に基づき成因解明を試みる。疾患感受性遺伝子が同定できれば、即、成因解明にいたるわけではないし、治療への応用へは長期にわたる研究継続の必要性がある。基礎研究のみでなく臨床研究も重要で、両者の密な協力が本研究の利点でもある。本研究課題においては、臨床サイドからの協力が分担研究者の最も重要な役割であろう。

- 1) OPLL 患者、非患者対照の収集
- 2) 中国での疫学調査およびサンプル収集
- 3) 黄色靭帯摘出と靭帯細胞培養

日本人 OPLL サンプルについては弘前大学にて罹患同胞対 40 対、OPLL 患者 80 例、対照 40 例ほど収集できており、現在も継続中である。

中華人民共和国での OPLL 疫学調査は雲南省で大理白族を対象におこなった。漢民族と日本人には OPLL 頻度に差がないことを明らかにしていたが、中国南方系における少数民族においては OPLL 頻度がやや低いことがあきらかとなった。これらの異なる対象での遺伝解析は意義があるだろう。残念ながら中国政府方針もあり、中国人の DNA サンプル収集はできていない。

黄色靭帯細胞は、適時、摘出し培養している。OPLL 患者からの黄色靭帯細胞は OPLL に存在する骨化亢進状態を反映していると予想され、細胞外マトリックスの変化が解析されている。

### A 研究目的

後縦靭帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament, 以下 OPLL) は脊柱管内の後縦靭帯が異所性に骨化し、脊髄を圧迫することで重篤な脊髄麻痺を起す疾患である。発症には遺伝学的因子及び環境因子等が複雑に関与していると考えられているが、その詳細は不明である。

本研究では OPLL の成因解明、および治療

法の開発が最終ゴールである。その目的に感受性遺伝子を同定し、その遺伝子の疾患への関与から成因解明を目指す。東大医科研でおこなわれている遺伝子解析研究の支援体制を整えることが我々臨床サイドのもっとも重要な役割である。患者サンプルの収集が鍵となることはいうまでもないが、日本人のみならず、他の人種（中国と交渉中）のサンプル収集も目指す。また OPLL 患者について遺

伝子型との相関を検討すべく、臨床型について詳細な検討を加えファイル化する。

## B. 研究方法

### B-1) 日本人サンプル収集

頸椎単純X線で骨化を認めた症例につき、インフォームドコンセントを得た場合のみ、採血をおこなう。OPLLの対照として、高齢者(60歳以上)で頸椎に骨化を認めない症例を集める。本研究を行うにあたって、対象者に遺伝子解析についての説明をおこない、同意のもとにインフォームドコンセントを得た。本研究は事前に弘前大学医学部倫理委員会の承認を得ている。現在のところ弘前大学において、罹患同胞対として40対、患者80例、対照40例を収集している。

### B-2) 中国での疫学調査

雲南省昆明を中心に、少数民族においてOPLL疫学調査をおこなった。

### B-3) 黄色靭帯細胞培養

椎弓切除手術時に摘出される黄色靭帯を1mm片に細切し、培養皿にうつし、out-growthした細胞を培養する。

## C. 結果

これまで弘前大学の患者サンプルとして80例、非患者サンプル40例収集できている。遺伝解析においてサンプル収集がもっとも重要なところなので、積極的な支援体制を整え、今後もサンプル収集を継続する。同時に骨化部位、臨床型、症状などの詳細な臨床情報をデータベース化している。

OPLLは日本人特有の疾患ではなく、広くアジア系に高頻度にみられる。白人でのOPLL頻度は低いので、アジア系共通の遺伝的素因が関与していることが予測できる。責任遺伝解析には他の人種での解析が重要となる。中

国雲南省での大理白族における疫学調査の結果、北方系民族(漢族、モンゴル民族)と比較すると、OPLLの頻度は低かった。当然、DNAサンプルでの解析が必要となる。しかしながら、現在のところ中国政府の許可を得ることができず、DNAサンプル収集については許可を得る事ができ次第開始する。

培養黄色靭帯細胞を材料として、OPLL患者での細胞外マトリックス変化について検討した。エラスチンに注目し、患者と対照での発現量の違い、アミノ酸組成の違いを検討したが、両者に差を認めていない。

## D. 考察

後縦靭帯での異所性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。内軟骨性骨形成過程とは、軟骨細胞の増殖と分化および骨側からの血管侵入を伴う過程である。また一部膜性骨化を示す組織像も認められる。異所性骨化には骨芽細胞、軟骨細胞が遊走してくる必要があり、靭帯細胞はそれらの足場を提供していると考えられる。そこで、プロテオグリカン、エラスチンなどの細胞外マトリックスに注目した。OPLL患者から得られた黄色靭帯細胞における細胞外マトリックスの変化を検討した。これまでプロテオグリカンを中心に検討を加えてきたが、細胞外マトリックスの主要成分であるエラスチン変化を検討した。OPLL患者からの黄色靭帯細胞でのエラスチン量、アミノ酸構成に変化はみられなかった。今回の検討ではOPLLに特異的な変化を認めていないが、遺伝子研究の進展とともに機能的な解析が必要となる。成因メカニズムの解明、続く創薬など治療法の開発の時点で、培養黄色靭帯細胞が必要なマテリアルとなると予想されるので、靭帯培養の継続の意義は

大きいと考えられる。特に責任遺伝子およびその遺伝子変異が同定されると、遺伝子変異にともなう機能変化の研究が必要となる。その際に目的の遺伝型を有する細胞でないと機能変化の検討ができない可能性があり、多数の靭帯細胞を準備しておく必要がある。

## E 結論

分担研究者の本研究における主要な役割は臨床サイドからの支援体制である。患者 DNA サンプルのみでなく、培養靭帯細胞も準備する。また日本人以外での遺伝解析も重要な意味をもつので、中国人サンプルの収集を試みる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 中島菊雄、大竹進、原田征行、毛糠英治、山田史朗：筋ジストロフィーにおける脊柱靭帯骨化の疫学調査と素因についての研究—筋緊張性ジストロフィー—。整形・災害外科 Vol. 44 No. 2 : 169-175 2001
- 2) 植山和正、原田征行、岡田晶博、越後谷直樹、横山徹、岩谷道生：弘前市（地方都市）における側彎症検診の現状と問題点—アドバンテージ・ディスアドバンテージ—。整形・災害外科 Vol. 44 No. 1:15-19 2001
- 3) 桜田純人、大塚博徳、徳谷聡、若井裕司、原田征行、岡村良久：家兎膝関節軟骨全層欠損に対する自家骨膜移植術と自家軟骨膜移植術の比較検討。日関外誌 Vol. 19 : 109-118 2000
- 4) 南雲明、安田和則、遠山晴一、原田征行：TGF- $\beta$  および EGF の投与が前縦字靭帯 in situ 凍結解凍処理後の膝前後動揺性および大腿骨-前縦字靭帯-脛骨複合体の構造特性に与える効果。日本臨床バイオメカニクス

学会誌 Vol. 21 : 121-126 2000

- 5) Satoshi Toh, Akihiko Nagao, and Seiko Harata: Severely Displaced Scaphoid Fracture Treated by Arthroscopic Assisted Reduction and Osteosynthesis. J. Orthopaedic Trauma 299-302 Vol.14, 2000
- 6) Satoshi Toh, Kenji Tsubo, Hisamichi Arai, and Seiko Harata: Vascularized Free Flaps For Reconstruction After Resection of Congenital Arteriovenous Malformations of the Hand. J. Reconstructive Microsurgery. 511-517, Vol.16, 2000
- 7) Takafumi Yokoyama, Seiko Harata, Satoshi Toh, Yasushi Kumazawa, Hiroyuki Akimoto and Kazuaki Fujii: Vascularized pedicle bone-grafting for experimental necrosis of the femoral head. New Directions for Cellular and Organ Transplantation: 211-216 ELSEVIER 2000
- 8) 大塚博徳、原田征行：テーピング。理学診療マニュアル—運動器疾患のリハビリテーション—改訂第2版：114-119 2000
- 9) 盛島利文、岩崎光茂、富田卓、大竹進、原田征行、植山和正、新戸部泰輔、岩谷道生：長期経過で高度側彎を呈した非手術例の検討。 vol. 14: 143-146 2000
- 10) 横山徹、原田征行、植山和正、岡田晶博、越後谷直樹、李 勤：腰痛後のスポーツ復帰（手術例を含む）—腰椎分離症・腰椎椎間板ヘルニア—満足度調査。 vol. 9: 26-29 2000
- 11) 佐々木知行、原田征行、石橋恭之、長尾秋彦、小山隆男、岡村良久：スポーツ外来における腰痛症：スポーツにおける腰痛の特殊性とメディカルチェック。 vol. 9: 15-18 2000
- 12) 越後谷直樹、原田征行、植山和正、岡田晶博、横山徹、荒井久典：3 椎体に腰椎分離

- が発生したハンドボール選手の1例 青森 なし  
スポーツ医学研究会誌 vol. 9: 8-11 2000
- 13) 原田征行: 頸椎部の痛み. 特集整形外科領域における痛みと病態-診断と治療-  
医学と薬学第44巻第1号: 13-20 2000
- 14) 原田征行、岡田晶博: 強直性脊椎炎.  
総合臨床 vol. 49: 563-564
- 15) 原田征行、越後谷直樹: 骨関節炎. 総  
合臨床 vol. 49: 565 2000
- 16) 石橋恭之、原田征行: 疲労骨折. 臨床  
スポーツ医学 vol. 17 臨時増刊号スポー  
ツ医学におけるMR画像の応用-診断と再診の  
研究・展望を中心に- 318-329 2000
- 17) 原田征行: 脊柱靭帯骨化症の疫学. 骨・  
関節・靭帯 13巻: 311-315 2000
- 18) 原田征行、岡田晶博: 腰椎部腫瘍の診断  
と治療. リウマチ科 23巻: 361-373 2000
- 19) 原田征行: 胸椎部・胸郭の疾患. 今日  
の整形外科治療指針第4版 567-568 2000

## 2. 学会発表

- 1) 後縦靭帯骨化症のupdate. 第12回日本  
理学診療医学会 2000年7月9日(神戸国際  
会議場)
- 2) The causes of ossification of  
spinal ligament. 第10回日台整形外科シ  
ンポジウム 2000年5月21日(ホテルプレミ  
ア箕輪)
- 3) 卒後教育の問題点. 日整会基礎学術集会  
2000年4月7日(神戸ポートピアホテル)

## G 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

OPLL 患者 DNA の収集、チェコでの OPLL および DISH 収集

分担研究者 松永 俊二 鹿児島大学・医学部整形外科 講師

**研究要旨**

後縦靭帯骨化症（OPLL）の成因については不明な点が少なくない。成人の 3－4％の頻度であり、明らかな男女差が存在し、男性に多くみられる。また OPLL は白人に少ないということがよく知られている。白人では 0.1％以下とされている。すなわち日本人を始めアジア系に特別な遺伝要因が存在することが予想される。日本での OPLL 患者および対照の収集は当然である、加えて、チェコ・プラハ大学との共同研究により、白人 OPLL サンプル採取、および類似の骨化亢進状態である DISH (diffused idiopathic skeletal hyperostosis) サンプル収集をおこなっている。DISH は白人では頻度の高い疾患で、全身性の骨化傾向があり、高頻度（15％）に OPLL を合併する。逆の言い方をすると、白人での OPLL はほとんど DISH に伴うものと理解していいかもしれない。チェコ・プラハ大学にて 50 例の DISH サンプル、50 例の対照を収集し、そこで DISH と OPLL との遺伝的オーバーラップについて検討を試みた。

これまでに、日本人 OPLL においてコラーゲン 11A2 遺伝子変異が疾患と関連していることを示してきた。コラーゲン 11A2 の 5 カ所の変異でハプロタイプを構築したところ、ひとつのハプロタイプが疾患と強く関連していた。しかしながら、このハプロタイプは女性では OPLL と関連しておらず、男性において強く関連していた。すなわち OPLL 頻度の男女差を説明する遺伝要因のひとつと考えられる。この遺伝子変異についてチェコ DISH サンプルで確認したところ、残念ながら有意な差を得ることはできなかった。白人においてコラーゲン 11A2 変異の頻度は日本人より有意に高く、この変異は OPLL に罹りにくくするアレルであることが知られているので、白人に OPLL が少ないことを反映しているのかもしれない。今後、OPLL 責任遺伝子の同定にともない、DISH でも原因となっている可能性について検討を加える。

**A 研究目的**

OPLL は日本人を始めアジア系に多い疾患である。白人に少ないこともあり、明らかな人種差を認める。異なる遺伝背景が存在すると予想され、遺伝背景の違いを明らかにする目的でチェコ・プラハ大学との共同研究をおこなった。日本人 OPLL サンプル収集に加え、チェコでの OPLL

収集、DISH 収集をおこなう。

遺伝要因の疾患への関与を検討するには臨床型の分類が重要である。単純 X 線検査から OPLL の重症度を点数化することを試みている。重症度を定量化することにより、グループ化が可能となり、遺伝要因の関与についての詳細な検討が可能となる。

## B. 研究方法

### B-1) 患者サンプル収集

本研究は鹿児島大学医学部倫理審査委員会の承認を受けている。

患者サンプル、対照（非患者）サンプルは単純X線検査をおこない、遺伝子研究への協力についての説明の後、同意を得ることができた患者からのみ収集した。採血（5ml）後、常法に従いゲノムDNAを分離した。

### B-2) 臨床分類

従来のOPLL分類は連続型、分節型、混合型、その他型と簡単な分類であり、重症度を忠実に反映したものとはいえない。我々はOPLL重症度の点数化を試みた。

### B-3) チェコでのDISHサンプル

チェコ・プラハ大学Havelka教授との共同研究によりチェコにおけるOPLL研究を開始した。白人でのOPLL患者は少ないので、OPLLの類似疾患であり、白人で頻度が高いDISH（全身性特発性骨増殖症、diffused idiopathic skeletal hyperostosis）を中心に収集した。DISHは男性に多く、脊椎、とくに胸椎下部から腰椎にかけての前後縦靭帯骨化が広範かつ顕著におこり、脊柱の前方、側方に鑑をたらし込んだような厚い骨化像を呈する。DISHの15%にOPLLを認めるとの報告もあり、両疾患はある程度オーバーラップしていると考えられる。現時点でDISH50例、対照50例収集できている。

### B-4) ハプロタイプ構築

コラーゲン11A2遺伝子内に20の多型を同定し、そのうちそれぞれ連鎖不平衡にある5箇所の多型でハプロタイプを構築した。ハプロタイプ構築はmaximum likelihood法にもとづきLalouel（ユタ大学）が開発したGENEFプログラムを用いた。ハプロタイプ頻度比較は単純カイ検定に従った。

## C. 研究結果

コラーゲン11A2遺伝子変異がOPLLに関連することをすでに報告している。コラーゲン11A2（COL11A2）遺伝子のイントロン6（-4）変異がOPLLに関連しており（ $P=0.0003$ ）、原因のひとつと考えられる。この変異によりコラーゲン11A2分子のスプライシングに差を生じることが明らかになっており、機能的な変化をきたす変異である。コラーゲン11A2遺伝子内の5カ所の多型を用いハプロタイプを構築したところ、すべて頻度の高いアレルから成り立つハプロタイプがOPLLと強く関連していた。しかしながら、男女差をとると、このハプロタイプは女性ではまったくOPLLと関連しておらず、男性のみに関連していた。OPLLで観察される男女の頻度差のある程度はコラーゲン11A2遺伝子変異で説明できるといえる。患者の重症度をスコア化し、重症度とコラーゲン11A2遺伝子変異との関連を調べたが、残念ながら有意な差は得ていない。

この変異がOPLLと類似疾患であるDISHと関連しているかをチェコからのDNAサンプルで調べた。単純カイ検定の結果、頻度差は認めず、この変異はDISHには関連していないという結果を得た。

## D. 考察

OPLLの成因については長年の研究がなされ、未だ解明にはいたらないものの着実な成果があがりつつある。OPLLは男女比が2:1で男に多い。OPLLはかつて日本人特有の疾患といわれていた。白人には少ないものの、広くアジアでは頻度の高い疾患であることが、疫学調査の結果明らかになってきた。男女差、人種差に関してはなんらかの遺伝要因の関与の違いが存在す

るものと予測できた。

我々は意図的に女性 OPLL 患者収集を試み、男女、同数にしてハプロタイプによる関連解析をおこなった。コラーゲン 11A2 遺伝子多型と OPLL との関連を報告してきた。コラーゲン 11A2 のハプロタイプ解析により、男性では強いハプロタイプとの関連を認めたものの、女性ではこの遺伝子はまったく疾患と関連していないことが判明した。すなわち OPLL で観察される男女差を遺伝要因で説明できるといえる。現時点では女性でのコラーゲン 11A2 遺伝子の関与が認められない理由については不明である。

チェコ白人 DISH サンプルにおいても同様にコラーゲン 11A2 遺伝子の関与について検討した。50 例の DISH サンプルおよび 50 例の対照で、患者・対照関連解析をおこなったところ、有意な差を得ることはできなかった。サンプル数を増やして検討する必要があるが、異なる遺伝要因の関与が示唆される。

遺伝要因の関与を検討するにあたり、患者の臨床型の分類が必要となる。骨化部位、骨化椎骨数など、重症度の数値化を試みた。一般に重症度の低い女性では低いスコアとなったので、数値化の評価はある程度の信頼度があるものと考えられた。コラーゲン 11A2 遺伝子変異と重症度との関連性は認められていない。スコアによる分類をおこなったため、グループごとのサンプル数が少なくなったこともひとつの理由としてあげられる。

## E 結論

OPLL はアジア系に多い疾患なので、アジア系に特別な遺伝要因が寄与している可能性がある。チェコ・プラハ大学との共同研究により白人 DISH サンプル収集をおこなった。DISH 発症とコラーゲン 11A2 遺伝子変異は関連していな

かった。今後もサンプル収集を継続する必要があるだろう。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

松永俊二、酒匂 崇 環軸椎前方固定術 100-105, 2000 南江堂 富永積生、伊藤達雄 編 上位頸椎の臨床 東京

松永俊二 頸椎後縦靭帯骨化症 100-104, 2000 全日本病院出版会 室田景久、矢部 裕 編 整形外科有痛性疾患保存療法のコツ上巻 東京

S. Matsunaga, K. Ijiri, H. Koga Results of longer than 10-year follow-up of patients with rheumatoid arthritis treated by occipitocervical fusion. Spine 25, 1749-1753, 2000

山口知之、山口正男、中原真二、松永俊二 脊椎不安定性を呈した椎弓形成不全の一症例 整形外科と災害外科 49, 447-449 2000

松永俊二、井尻幸成、酒匂 崇 10 年以上前に後頭頸椎固定術を受けた慢性関節リウマチ患者の転帰-患者予後からみた手術の意義について- 臨床整形外科 35, 379-383, 2000

井尻幸成、武富栄二、松永俊二、石堂康弘、領木良浩、酒匂 崇、小宮節郎 頸椎後縦靭帯骨化症の長期手術成績-10 年以上経過例の検討- 臨床整形外科 35, 429-432, 2000

松永俊二、井尻幸成、山元拓哉、米 和徳 自然経過からみた腰椎変性すべり症における固定の必要性について 西日本脊椎研究会誌 26, 1-2, 2000

井尻幸成、米 和徳、松永俊二、山口正男、川



内義久、山元拓哉、酒匂 崇 腰椎変性すべり症-後側方固定術後の固定椎間のX線学的変化 西日本脊椎研究会誌 26、125-128、2000

山元拓哉、米 和徳、松永俊二、山口正男、川内義久、鮫島浩司、井尻幸成、酒匂 崇 腰椎変性すべり症に対する後側方固定例と非固定例の術後成績の検討 西日本脊椎研究会誌 26、81-86、2000

T. Sakou, S. Matsunaga, H. Koga Recent progress in the study of pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament J Orthop Sci 5, 310-315, 2000

S. Matsunaga, K. Ijiri, K. Hayashi Nonsurgically managed patients with degenerative spondylolisthesis: a 10-to 18-year follow-up study J Neurosurg 93, 194-198, 2000

S. Matsunaga, T. Onishi, T. Sakou, Significance of occipitoaxial angle in subaxial lesion after occipitocervical fusion Spine 26, 161-166, 2001

濱田 隆、松永俊二、小宮節郎、山内常一郎 後頭頸椎固定術後の中下位頸椎におけるx線学的検討-非慢性関節リウマチ患者について-整形外科と災害外科 50、12-14、2001

瀬戸口啓夫、井尻幸成、松永俊二、小宮節郎 頸椎 OPLL に対する頸椎椎弓形成術後の上位頸椎異常可動性について 整形外科と災害外 50、15-18、2001

S. Matsunaga, T. Mori, T. Sakou Three-to 11-year follow-up of occipitocervical fusion for rheumatoid arthritis Review series Rheumatology 1, 12-13, 2001

S. Matsunaga, T. Sakou, Y. Arishima, H. Koga, K. Hayashi, S. Komiya Quality of life in elderly patients with ossification of the posterior longitudinal ligament Spine 26, 494-498, 2001

K. Ijiri, H. Koga, S. Matsunaga, K. Yone Epidemiology of ossification of the posterior longitudinal ligament Osteological Bulletin 2, 43-46, 2000

S. Maeda, H. Koga, S. Matsunaga, T. Numasawa, K. Ikari, K. Furushima, S. Harata, J. Takeda, T. Sakou, S. Komiya, I. Inoue Genetic-specific haplotype association of collagen  $\alpha 2$  (XI) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine J Hum Genet 46, 1-4, 2001

## 2. 学会発表

古賀公明、前田真吾、武富栄二、米 和徳、松永俊二、沼沢拓也、猪狩勝則、酒匂 崇、井ノ上 逸朗 後縦靭帯骨化症における遺伝子座位の同定-コラーゲン11A2の遺伝的関与-シンポジウム 2000 第73回日本整形外科学会総会 神戸 4月

山元拓哉、米 和徳、松永俊二、砂原伸彦、森輝男、中原真二 上位頸椎手術を行った慢性関節リウマチ患者の予後-術後10年以上経過例の検討-2000 第73回日本整形外科学会総会 神戸 2000/4/6

藤井康成、米 和徳、松永俊二、井尻幸成、中原真二、田邊史、小倉 雅 脊椎圧迫骨折の造影MRIによる検討-椎体内の非造影部と造影陽性域の経時的変化 2000 第73回日本整形外科学会総会 神戸 2000/4/6

松永俊二、森 輝男 リウマチ患者に対する後頭頸椎固定角と軸椎下亜脱臼の出現の関係 ワークショップ 2000 第44回日本リウマチ学会総会 横浜 2000/5/13

濱田 隆、松永俊二、小宮節郎、山内常一郎 後頭頸椎固定術後の中下位頸椎におけるX線学的検討-非慢性関節リウマチ患者について- 2000 第99回西日本整形災害外科学会 小倉

2000/6/6

谷口 昇、山元拓哉、松永俊二、米 和徳  
破壊性椎間板病変を伴う強直性脊椎炎の治療  
経験 2000 第 19 回九州リウマチ学会 久留米  
2000/3/4

谷口 昇、山元拓哉、領木良浩、井尻幸成、松  
永俊二、米 和徳、小宮節郎 破壊性椎間板病  
変を伴う強直性脊椎炎の治療経験 2000 第  
10 回日本 AS 研究会 西宮 2000/10/27

S. Matsunaga Long-term follow-up study  
of non-operated patients with degenerative  
spondylolisthesis 2000 67th Annual meeting  
of American Academy of orthopaedic  
Surgeons-13th Annual meeting of Specialty  
Day Orland, USA 2000/3/18

S. Matsunaga, K. Ijiri, H. Koga, S. Komiya  
Significance of occipito-axial fixed  
position for subaxial lesion of patients  
with rheumatoid arthritis 2000 Spine  
across the sea 2000 Hawaii, USA 2000/7/26

松永俊二、山元拓哉、中西賢二、小宮節郎  
脊椎固定術後の隣接椎間板ひずみ分布の解析  
2000 第 21 回バイオメカニズム学術講演会  
福岡 2000/11/25

松永俊二、山元拓哉、井尻幸成、古賀公明、中  
西賢二、小宮節郎 腰痛患者における腰椎椎間  
板ひずみ分布解析-非腰痛患者と比較した剪断  
ひずみ分布の異常-2000 第 15 回日本整形  
外科学会基礎学術集会 京都 2000/9/28

松永俊二、石堂康弘、山浦一郎、廣津匡隆、古  
賀公明、小宮節郎 頸椎後縦靭帯骨化症患者の  
脊髓症状出現に関する外傷の関与 2001 第 74  
回日本整形外科学会学術集会 千葉  
2001/4/19

古賀公明、猪狩勝則、前田真吾、沼沢拓也、武  
富栄二、松永俊二、下小野田一騎、小宮節郎、  
井ノ上 逸朗 脊椎後縦靭帯骨化症におけ  
る罹患同胞対連鎖解析 2001 第 74 回日本整形外  
科学会学術集会 千葉 2001/4/19

領木良浩、井尻幸成、松永俊二、米 和徳、小  
宮節郎 環軸椎回旋固定の治療成績 2001 第  
74 回日本整形外科学会学術集会 千葉  
2001/4/19

永吉隆作、瀬戸口啓夫、南 周作、宮口文宏、  
松永俊二、井尻幸成、小宮節郎、砂原伸彦、丸  
山裕之、武富栄二、泉原智磨、松田剛正、新村  
健 RA 死亡例の検討 (THA, TKA 例を中心に)  
2001 第 21 回九州リウマチ学会 鹿児島  
2001/3/17

松永俊二、山元拓哉、大西敏之、小宮節郎、中  
西賢二 慢性腰痛患者における椎間板の剪断  
ひずみ分布異常 2001 第 30 回日本脊椎脊髄病  
学会 高知 2001/6/7

S. Matsunaga, T. Onishi, S. Komiya  
Significance of occipito-axial fixed  
position for subaxial lesion of patients  
with rheumatoid arthritis 2001 17th  
meeting of cervical spine research  
society-European section Torino, Italy  
2001. 6. 6

S. Matsunaga, T. Hamada, T. Onishi, T. Sakou,  
S. Komiya Occipito-axial fixed position  
and occurrence of subaxila lesion after  
occipito-cervical fusion in patients with  
rheumatoid arthritis 2001 SICOT/SIROT  
annual international conference 2001 Paris,  
France 2001. 9. 1

松永俊二、濱田 隆、小宮節郎 後頭頸  
椎固定術における後頭頸椎固定角と軸椎下亜  
脱臼の出現の関係-リウマチ患者と非リウマチ

患の比較 2001 第 45 回日本リウマチ学会 東京  
2001/5/14

松永俊二、小宮節郎 頸椎後縦靱帯骨化  
症患者の脊髄症状発症と外傷の関係について  
の後向き及び前向き調査 52 2001 第 38 回  
日本リハビリテーション医学会 2001/6/15  
横浜

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
分担研究報告書

OPLL 患者靱帯組織の摘出・培養

分担研究者 米 和徳 鹿児島大学・医学部整形外科 助教授

研究要旨

脊椎後縦靱帯骨化症（OPLL）は靱帯の異所性骨化を特徴とし、全身での骨化傾向亢進状態にあると考えられている。本研究の全体計画は OPLL 責任遺伝子を同定し、成因解明、および新規治療法も開発を目指すものであるが、本分担研究では靱帯培養細胞を培養、提供することで臨床サイドから貢献する。全身性に骨化傾向のみられる OPLL なので、細胞レベルでもなんらかの機能的変化があることが予測できる。OPLL 患者および頸椎症性脊髄症患者の手術時に摘出、処理される棘間靱帯を採取し、初代培養系を確立した。靱帯細胞は骨芽細胞系へと分化させることも可能であることが示され、それに伴いアルカリフォスファターゼ活性の上昇、骨関連遺伝子発現上昇が観察された。

A 研究目的

OPLL の成因解明および新規治療法の開発を目的とした本研究において、責任遺伝子同定はもっとも重要な鍵となる。しかしながら、責任遺伝子同定は遺伝統計学的知見に基づくのみなので、機能的変化は実験的手法を用い示す必要がある。本分担研究では手術時に摘出、処理される棘間靱帯を培養細胞とし、遺伝子機能を検討するための材料提供をおこなう。遺伝子変異に伴う機能変化を調べるためには、目的の遺伝型を有する細胞が必須であり、現時点では数多くの靱帯細胞を準備することで、将来の解析に対応する。

B, C 研究方法および結果

1) 靱帯組織の摘出

頸椎 OPLL 患者から、術前に鹿児島大学医学部の定めた方法に従って説明を行い、同意を求め、同意を得られた場合のみ、頸椎椎弓形成術施行

時に摘出される棘間靱帯を組織培養した。摘出した組織は、第6・7頸椎間、および第7頸椎・第1胸椎間の棘間靱帯を採取している。

2) 靱帯細胞培養

手術時に摘出された棘間靱帯組織を迅速に処理し、組織培養をおこなった。組織を1mm程度の細片に切断し、その上に最小限量の培養液を加え、一晚培養する。繊維芽細胞様の explant 細胞を持続培養する。これまで、10例（OPLL 5例、頸椎症性脊髄症5例）の培養細胞を確立している。

3) 靱帯培養細胞における遺伝子発現変化

棘間靱帯組織からの培養靱帯細胞は繊維芽細胞様の紡錘型形態を示す。しかしながらデキサメサゾン、グリセロフォスフェート存在下に培養すると、細胞形態が紡錘状から球状へ変化し、アルカリフォスファターゼ活性の上昇がみられ、von Kossa 染色陽性となるなど、骨芽細胞様に変化する。同時にオステオカルシン、オス