

脊椎疾患における髄液中NO濃度 —後縦靭帯骨化症との比較検討—

弓手 康正 (国立岡山病院整形外科), 中原進之介 (国立岡山病院整形外科),
田中 雅人 (国立岡山病院整形外科), 甲斐 信生 (国立岡山病院整形外科)

【研究要旨】

脊椎脊髄疾患の既往のない対照群 34 例と脊椎疾患群 137 例(頸椎疾患 39 例, 腰椎疾患 98 例)を対象とし髄液中NO濃度を測定し頸椎後縦靭帯骨化症との比較検討を行った。NO濃度は脊髄症を呈した頸椎OPLLでもっとも高値を示し, 頸椎神経根症では低い濃度であった。症状との関連では, JOA scoreが低い程NO濃度は高く, NO濃度が神経障害性の良い指標になる可能性が示唆された。また, 腰椎疾患では, 椎間板ヘルニアに比べ腰部脊椎管狭窄症で有意に高値であった。腰椎ではNO濃度とJOA scoreに一定の関係は見られていないが, 髄液中の白血球数が多いものほどNOの濃度は高いという関係が見られ症状要因の一つに炎症の関与が示唆された。

【研究目的】

NOと神経の関係は主として中枢神経においていろいろな報告がなされている。本研究では種々の脊椎疾患にかかる髄液中NO濃度を測定し, 病態, 臨床症状, 髄液検査所見との関連につき検討し, 頸椎後縦靭帯骨化症と比較検討した。

【研究対象及び方法】

脊椎脊髄疾患の既往のない34例(男性10例, 女性24例, 平均年齢50才)を対照とし脊椎疾患137例(男性91例, 女性47例, 平均年齢61才), 内頸椎疾患39例腰椎疾患98例を対象とした。髄液は対照群では腰椎麻酔時に, 疾患群では脊髄造影時に1.5cc採取した。採取した髄液は凍結保存し, 測定直前に常温で解凍し, NaOHとZnSO₄により除蛋白後, TCI-NOX 1000 (NO₃→NO₂変換器)およびVisible detector/S-3250吸光計を用いてGriess法に従い測定した。

検討はまず対照群と疾患群で髄液中NO濃度を比較した。頸椎疾患では頸椎症性神経根症と頸椎症性脊髄症, 頸椎OPLLの3群で検討し, 腰椎疾患では根症状中心の椎間板ヘルニア, 広範囲に圧迫があり馬尾症状を呈する腰部脊椎管狭窄症, および変成すべり症にわけて検討した。また, 臨床症状の評価は日本整形外科学会成績判定基準(以下JOA score)を用いNO濃度との関連について検討した。

【研究結果】

髄液中NO濃度は対照群で平均2.6mMで年齢差,

男女差ともに認められなかった。頸椎疾患は平均5.4mM, 腰椎疾患は平均5.5mMでも対照群より高値であった。頸椎疾患群では広範囲の脊椎圧迫症状を有する頸椎OPLLが平均5.9mMと最も高く, 次いで頸椎症性脊髄症の平均平均4.9mMで, 神経根症では平均3.4mMと低い濃度であった。JOA scoreとNO濃度の関係では, R値0.54と高い相関関係でJOA scoreが低い程, すなわち脊椎症状が強い程NO濃度は高いという結果であった。また, 腰椎疾患では, 椎間板ヘルニアに比べ腰部脊椎管狭窄症, 腰椎変性すべり症の方が有意にNO濃度が高かった。腰椎疾患ではNO濃度とJOA scoreの間に一定の関係は認められなかったが, 髄液検査で白血球数が多いものほどNO濃度は高かった。

【考察】

NOは1988年に血管内皮細胞由来因子としてFurchgottらが発表して以来注目され, 様々な分野で報告がなされてきた。神経系分野では細胞死, 神経情報伝達の修飾, 細胞の増殖と活性化などの報告がある。脊髄では後角および中心管にNO産生酵素が存在することがMellerらにより報告されており, 脊髄にも脳内での痛みの制御と同様の機序が存在するといわれている。一方, 末梢組織においては低濃度では末梢血管透過性の亢進による炎症増悪作用と高濃度での侵害受容器への直接的抑制作用により痛みは軽減するとされている。血管内皮細胞にはC-NOS, マクロファージにはI-NOS, 神経細胞にはN-NOSの3種類の酵素が同定され, これらにより

NO は産生されていると考えられているが、今回の結果から頸椎疾患では圧迫椎間数の多い頸椎 OPLL で最も NO 濃度が高く、圧迫による直接の神経細胞障害および軸索に対する障害、圧迫に付随した血行障害がその原因と思われた。また NO 濃度と JOA score との逆相関関係が見られ、NO 濃度は神経障害性の良い指標となる可能性が示唆された。一方、腰椎疾患では、JOA score と NO 濃度に一定の関係は見られず、単椎間での根症状を主体とした椎間板ヘルニアよりも多椎間圧迫のみられる馬尾症状を呈した脊椎管狭窄症や変性すべり症での NO 濃度は高く、髄液検査で白血球数が多く見られたものほど NO 濃度が高いことから、症状要因の一つに炎症の関与の可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Furchgott, R.F. et al. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrate, Raven Press, New York, 1988, 401-414.
- 2) Dawson, V.L. et al. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 6368-6371, 1991.
- 3) Kiedrowski, L. et al. Sodium nitroprusside inhibits N-methyl-D-aspartate-evoked calcium influx via a nitric oxide and cGMP-independent mechanism. *Mol. Pharmacol.* 41 : 779-784, 1992
- 4) Meller, S.T. et al. The role of nitric oxide in spinal nociceptive processing. In *Nitric Oxide, Roles in Neuronal Communication and Neurotoxicity* (Takagi, H., Toda, N. and Hawkins, R.D., eds) , Japan Scientific Society Press, Tokyo, and CRC Press, Boca Raton, 1994, 115-125.
- 5) Asahara, H. et al. Increased cerebrospinal fluid Nitrate and Nitrate levels in patients with lumbar spondylosis. *Res. Comm. Mol. Path. Pharm.* 91 : 77-83, 1996

III

骨形成（骨吸收）因子

OPLLにおけるPPAR γ の機能解析

津留美智代 (久留米大学医学部整形外科), 永田 見生 (久留米大学医学部整形外科),
佐藤 公昭 (久留米大学医学部整形外科), 安藤 則行 (久留米大学医学部整形外科)

【研究要旨】

PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma) は、核内受容体で、脂肪細胞の分化やマクロファージの機能において重要な役割を演じる転写因子であり、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化を抑制することが知られている。脊柱後縦靭帯骨化症 (OPLL) の発症に関する研究の一環として、II型糖尿病患者30名とOPLL患者29名を調査対象とし、PPAR γ の遺伝子解析ならびにプロテオーム解析を行なった。その結果、II型糖尿病患者とOPLL患者ともにPPAR γ の塩基配列に変異が存在し、両群間に相違部を認めた。また、そのプロテオーム解析にてOPLL特有のプロットが得られた。すなわち、OPLL患者における靭帯骨化発症に、PPAR γ の遺伝子変異が関与していることが示唆された。

A. 研究目的

脊柱後縦靭帯骨化症 (OPLL) の発症に関連する遺伝子同定は、本症の予防と治療に大いなる福音となるが、現在のところ、複数の病因遺伝子が注目されているものの、解明には至っていない。

我々は、OPLL患者には糖尿病を合併することが多いこと、IRS-1やinsulin-like growth factor (IGF-1)の発現が検討されていることに注目し、PPAR γ の機能解析を行なった。PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) は、核内受容体で、細胞内で作用物質と結合することにより遺伝子発現を制御する転写因子であるが、 α 、 β 、 γ の三種類のサブタイプがある¹⁾。その中でPPAR γ は脂肪細胞の分化や糖代謝、マクロファージの機能において重要な役割を演じるばかりでなく、近年、未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化に関与することが示唆されている²⁾。また、PPAR γ 遺伝子に変異を持つ患者はII型糖尿病に似た症状を呈することが報告されている (Nature 1999)。そこで、今回OPLL患者と靭帯骨化が認められないII型糖尿病患者におけるPPAR γ の相違点を解析することは、靭帯骨化の発症メカニズムの解明に示唆を与えると考え調査した。

B. 研究方法

対象:久留米大学医学部倫理委員会の承諾を受け、本研究に理解が得られた久留米大学病院に通院中の靭帯骨化がないII型糖尿病患者30名(男性17名,女性13名,年齢:42歳~68歳,平均58歳)と確実に骨化を認めるOPLL患者を調査対象とし採血した。OPLL患者は、男性16名,女性13名,計29名,年

齢は49歳~78歳,平均59歳である。なお、OPLL患者の内、4名にはII型糖尿病の合併がみられた。また、父親49歳と母親46歳が偶然OPLLであり、OPLLが発症していない子供2名(23歳男性,20歳女性)も調査に加えた。

方法:患者より採取した血液より、DNAを抽出し遺伝子解析を行なった。

PPAR γ のプライマーを合成し、PPAR γ 発現部位を解析した。II型糖尿病患者とOPLL患者の両群ともにPPAR γ の存在が確認された。この部の遺伝子解析、プロテオーム解析を施行した。

C. 研究結果

遺伝子解析の結果、II型糖尿病患者とOPLL患者ともにPPAR γ の塩基配列に変異が存在し、相違部があった。また、そのプロテオーム解析にてOPLL特有のプロットが得られた (図-1)。

D. 考察

核内受容体であるPPAR γ は脂肪細胞分化の過程で中心的役割を担っている蛋白で、脂質代謝に関わる蛋白の発現を制御することで正常な脂肪細胞の機能を維持していると考えられている。その他に現在、1)細胞内で産生されるPGがPPAR γ を介してサイトカインやホルモンの刺激に誘導される炎症や血管新生に関与するCOX-2遺伝子の転写をフィードバック制御し、COX-2の発現調節に関与する³⁾。2)膵臓の β 細胞腫瘍に特異的に発現し、そのインスリンの転写制御に重要な役割を果たす⁴⁾。3)PPAR γ の転写活性はTNF α 、IL-1、TGF- β により抑制されるなど、多彩な機能が解析されつつある²⁾。

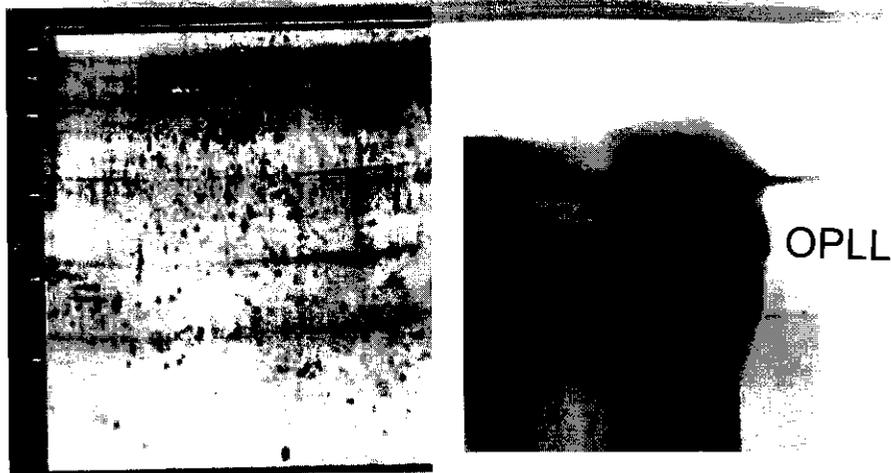


図-1 OPLLの2D-PAGEの解析

骨形成に関しては、PPAR γ 特異的リガンドであるチアゾリジン誘導体 (TZD) を未分化間葉系細胞株 C3H10T1/2 細胞に作用させると、BMP2 により smad4 を介して誘導される骨芽細胞分化が抑制されることが報告されている⁵⁾。今回の解析で OPLL の患者に PPAR γ の遺伝子変異が証明されたことは、OPLL 患者の靭帯骨化に PPAR γ が強く関与していることが示唆された。また、椎間板が変性すると TNF α 、IL-1、TGF- β など各種サイトカインが出現し、これらが PPAR γ の転写活性を強く抑制することなどが複合的に関与して、後縦靭帯の局所的に骨化が起こることが推察されるが、靭帯骨化すべてを説明することは困難であり、さらに PPAR γ の遺伝子変異や他の遺伝子異常と局所的因子の関係を解明する必要がある。

E. 結論

PPAR γ は OPLL 患者と II 型糖尿病患者の両群に存在し、ともに遺伝子の変異が認められたが、変異部位が異なっていた。OPLL 患者においては、骨化発症時期に PPAR γ に何らかの原因で遺伝子変異が起こり、本来 PPAR γ が有している骨芽細胞分化の抑制が解除され、さらに、椎間板の退行性変化による出現する各種サイトカインが PPAR γ の転写活性を抑制することなどが関与して靭帯骨化が起こることが示唆された。

[参考文献]

- 1) 堀越大能, 谷内 誠: 核内受容体 PPAR γ とインスリン抵抗性改善作用を有するチアゾリジンジオン系糖尿病治療薬. 蛋白 核酸 酵素 45:

1096-1101, 2000.

- 2) 須澤美幸, 高田伊知郎, 後藤由季子, 他: NIK からのシグナルと PPAR γ 転写制御機構に及ぼす負のクロストーク. 第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集: 294, 2000.
- 3) 井上裕康, 田辺 忠, 梅園和彦: 誘導型シクロオキシゲナーゼ遺伝子発現の PPAR γ によるフィードバック制御. 第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集: 294, 2000.
- 4) 柿澤供子, 宮本高秀, 市川和夫, 他: 核内受容体 PPAR γ によるインスリン遺伝子の転写抑制. 第 23 回日本分子生物学会年会プログラム・講演要旨集: 294, 2000.
- 5) 波多賢二, 池田史代, 野首孝嗣, 他: BMP2 により誘導される未分化間葉系細胞の脂肪細胞ならびに骨芽細胞への分化過程における核内レセプター PPAR γ の役割. 日本歯科学会誌 29, 2000.

F. 研究発表

Kensei Nagata, Michiyo Tsuru, Hironori Koga, Takato Ueno, Zenji Makita, Michio Sata: Effects of PPAR γ in the bone. Research Report' 99 — Annual report of the Kurume University Research Center for Innovative Cancer Therapy — : 45, 2000.

腰椎変性における軟骨終板の組織学的変化とChM-I, HSP27の関係

高尾 恒彰 (九州大学大学院医学研究院整形外科・脳研病理),

有菌 剛 (九州大学大学院医学研究院整形外科), 前田 健 (九州大学大学院医学研究院整形外科),
斎藤 太一 (九州大学大学院医学研究院整形外科), 神宮司誠也 (九州大学大学院医学研究院整形外科),
岩本 幸英 (九州大学大学院医学研究院整形外科), 岩城 徹 (九州大学大学院医学研究院脳研病理)

【研究要旨】

脊柱靭帯骨化症は、変形性脊椎症を合併していることが少なくない。靭帯骨化の発症に脊椎症性変化が関与している可能性がある。そこで、ヒト剖検例標本 101 例 135 椎間板を用いて、椎間板軟骨終板における軟骨基質蛋白の1つである chondromodulin-I (ChM-I: 血管内皮細胞の増殖抑制作用や軟骨細胞の増殖、分化促進作用をもつ) と軟骨に発現がみられる heat shock protein 27 (HSP27) の変性過程における発現変化を免疫組織化学的に検討した。変性軟骨終板の加齢による変化として、亀裂や血管侵入、島状軟骨細胞の増生が年齢とともに増加した。ChM-I は破壊された軟骨終板及び同部での血管侵入部位周辺の軟骨細胞胞体に強く発現し、変性に伴う血管侵入の抑制に関与していると考えられた。HSP27 は破壊された軟骨終板の肥大した軟骨細胞胞体に発現しており、変性部位の描出に優れていた。

A. 研究目的

椎間板は支持性と運動性という異なる機能を担う機能的脊柱単位の重要な要素である。椎間板変性疾患において、椎間板の変性は、髄核や線維輪に対する機械的なストレスや年齢的变化によるといわれているが、その詳細な機序については明らかになっていない (Dupuis 1985, Frymoyer 1979, Lindahl 1996)。臨床的に椎間板の変性機序の一つとして、軟骨終板の変性に深く関連しているという報告もある (Coventry 1945, Nachemson 1970)。さらに、軟骨終板の消失が椎間板全体及び隣接した椎体での形態的な変化をもたらすという報告もある (Maroudas 1988)。椎間板変性の原因は、軟骨終板が不整となり、血管を含む線維性の結合組織への置換によりしばしば断裂をきたすことによる。

軟骨は血管新生抑制因子によって血管侵入が阻害されている。開らは、抑制因子として chondromodulin-I (ChM-I) を同定した (Hiraki 1996)。ChM-I はウシ胎仔軟骨組織より分離精製され、ヘパリン親和性が高く (Hiraki 1991)、分子量が 25kDa の糖蛋白質である (Hiraki 1997b)。前駆体蛋白質の C 末端側が切断され、糖鎖による修飾を受けて細胞外に分泌される。また、ChM-I は主に軟骨組織に発現すると報告されている (Hiraki 1991, Shukunami 1999)。ChM-I にて軟骨細胞のプロテオグリカン合成が促進されるのと同様に、ChM-I は fibroblast growth factor-2 (FGF-2) の存在下にてウサギ骨端軟骨の軟骨細胞の成長を促進する

(Hiraki 1996)。ChM-I はアガロース中で軟骨細胞の成長を促進する一方で (Inoue 1997)、血管内皮細胞培養系に ChM-I を添加すると、成長や管腔形成が阻害される (Hiraki 1997a)。このように、ChM-I は、標的細胞によって増殖促進にも増殖抑制にも働く。

一方、heat shock proteins (HSPs) は種々のストレスに応答して細胞が自らを守るために一過性に産生が亢進する一群の蛋白質である。ストレスには高熱の他に、重金属、低酸素、エタノール、機械的刺激など種々のものが知られている。この蛋白質は、細胞内で蛋白質の折り畳み (folding, 三次構造形成)、会合状態 (assembly, 四次構造形成) を制御して機能的構造体の形成を助ける、いわゆるシャペロン機能を持ち、細胞骨格の再構成等に関与していると考えられている (Alexandrov 1994, Welch 1993)。また、ラットの脛骨骨端成長板において、HSP28, HSP70 が肥大層に、HSP110 が増殖層から肥大層に発現するという報告もある (Vanmuylder 1997)。

椎間板変性と血管新生に関連する因子については明らかにはなっていないため、ChM-I と血管新生の関係を解明する必要がある。さらに、われわれは本研究において、ChM-I と HSP27 による免疫組織化学を用いて、軟骨終板変性の組織形態学的変化とこれらの分子病態学的変化の関係を解析した。

B. 研究方法

1. 九州大学病理及び脳研病理に保管されている剖検 101 症例の脊椎（死亡時年齢は胎齡 18 週から 96 歳）について検討を行った。詳細は胎兒 12 例（18 週から 37 週）、乳兒 5 例（0 ヶ月から 5 ヶ月）、若年成人 2 例（2 歳から 7 歳）、21 歳から 50 歳 15 例、51 歳から 60 歳 12 例、61 歳から 70 歳 28 例、71 歳から 80 歳 27 例、81 歳から 90 歳 25 例、91 歳以上 9 例、総数 135 例である。剖検時に脊柱を一塊に取り出し、10 % 中性ホルマリン固定を行った。矢状切断し、椎体の中心切片を標本とした。パラフィン包埋切片を H-E, アルシアンブルー、マッソントリクローム染色を行った。

2. 免疫組織化学染色

ChM-I, HSP27 の免疫組織化学的解析を間接法を用いて全例に行った。抗 ChM-I 抗体の作製は、ヒト ChM-I の 8 番目から 33 番目までのアミノ酸配列に相当する合成オリゴペプチドをウサギに免疫して作製した。そのシークエンスは PTTTKRPHSGPRSNPGAGRLNNETRP である。6 μ m 厚のパラフィン包埋切片を作製し、キシレンおよびエタノールで脱パラフィンした。内因性のペルオキシダーゼを阻害するため、メタノールに 0.3 % 過酸化水素を付加した溶液に切片を 30 分間浸した。免疫反応を増強するために、切片をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解させた 0.05 % のトリプシン溶液 (持田製薬) に 37°C, 30 分間処理, あるいは, PBS に溶解させた 3500 単位のヒアルロニダーゼ (タイプ V, Sigma 社) により 37°C, 30 分間処理を行った (Inkinen 1999, Hiraki 1997a, Parkkinen 1996, Tammi 1994)。トリス緩衝液 (50mM Tris-HCl, pH7.6) で洗浄した後に切片と希釈した抗 ChM-I 抗体 (希釈率 1:500), 抗 HSP27 抗体 (clone G3.1, StressGen, Victoria, Canada, 希釈率 1:1000) を一晩 4°C で反応させた。その後, ペルオキシダーゼ標識二次抗体と反応させた。発色反応にはジアミノベンチジン (DAB) を用いた。切片はヘマトキシリンで軽く後染色した。

3. データ解析

ChM-I, HSP27 の半定量化については, 軟骨終板において, 全細胞数に対する陽性細胞の個数で評価した。(+) : 25 % 未満の細胞が陽性, (++) : 25 % 以上 50 % 未満の細胞が陽性, (+++) : 50 % 以上の細胞が陽性を示す。

stage	fissure	blood vessels	cartilaginous growth foci	insular cartilage cell proliferation
Fetal (12)	0(0%)	12(100%)	0(0%)	0(0%)
Newborn 0-5M(5)	0(0%)	5(100%)	0(0%)	0(0%)
Infantile 2-7(2)	0(0%)	2(100%)	0(0%)	1(50%)
21-50 (15)	0(0%)	2(13.3%)	1(6.7%)	5(33.3%)
51-60 (12)	1(8.3%)	2(16.7%)	4(33.3%)	4(33.3%)
61-70 (28)	8(28.6%)	6(21.4%)	7(25%)	5(17.9%)
71-80 (27)	17(63%)	12(44.4%)	19(70.4%)	11(40.7%)
81-90 (25)	15(60%)	14(56%)	17(68%)	13(52%)
91- (9)	5(55.6%)	5(55.6%)	7(77.8%)	3(33.3%)

表 1 HE による軟骨終板組織所見。

軟骨終板の亀裂, 軟骨終板への血管侵入, 軟骨細胞の限局性増生, 島状軟骨細胞増生巣の陽生率を示す。

C. 結果

1. 組織学的所見

変性椎間板は狭小化し, 線維輪の軽度脱出や髄核の褐色変性を示す。線維輪は層構造を失い, 亀裂をきたす。軟骨終板は不整となり, 血管を含む線維性結合組織に置き換わり, しばしば断裂している。このように進行した段階では, 軟骨細胞は部分的に胞体が大きくなり集合体を形成する (軟骨細胞の限局性増生)。アルシアン・ブルー染色, マッソントリクローム染色にて正常の層構造は加齢とともに破壊され, 軟骨基質は徐々に大きさが減少した。

軟骨板の全層にわたる亀裂は, 50 歳以下では 0% であるが, 71 歳以上では約 60% にみられた。亀裂部分には炎症細胞浸潤は認めず, 椎間板髄核組織や線維輪, 椎体骨髄の侵入がみられた。軟骨板への血管侵入について, 胎兒期から小兒期にかけては 100% であり, 変性が進行する 71 歳以上では約 50% に見られた。軟骨細胞の限局性増生は年齢が高い程多くみられた。軟骨終板島状軟骨細胞巣は, 各年齢に均等に分布していた (表 1)。

2. 免疫組織化学法による解析

骨組織との境界部分の発達期軟骨終板軟骨組織は 4 つの連続した部分 (CCZ: 石灰化層, HCZ: 肥大化層, PCZ: 増殖層, RCZ: 静止層) に分けられる。ChM-I に対する免疫組織化学染色にて ChM-I は軟骨細胞の成熟過程に呼応して上記 4 層の大多数の軟骨細胞に強い発現がみられた。HSP27 においても同様の発現を認めた。

ChM-I について, 胎兒期から小兒期にかけて 19

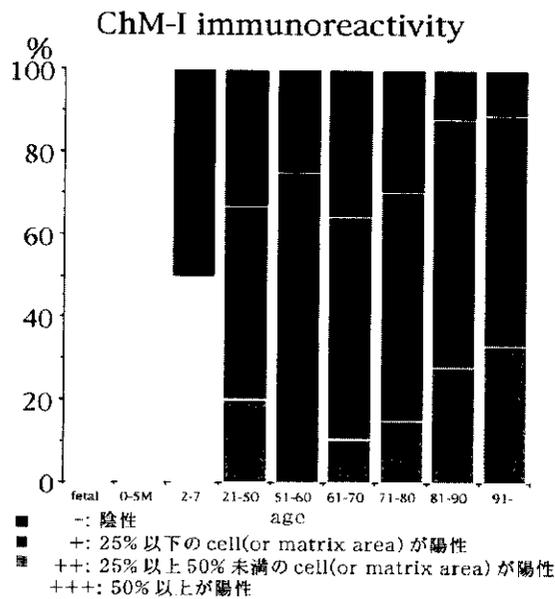


図1 ヒト椎間板におけるChM-Iの発現割合。グラフは年齢群ごとのChM-Iの発現割合を示す。各年齢群は胎児12例(18週から37週), 乳児5例(0ヶ月から5ヶ月), 若年成人2例(2歳から7歳), 21歳から50歳15例, 51歳から60歳12例, 61歳から70歳28例, 71歳から80歳27例, 81歳から90歳25例, 91歳以上9例である。胎児期から小児期にかけて強く, 青壮年期に一旦低下した後, 加齢による変性に伴い増加する傾向にあった。

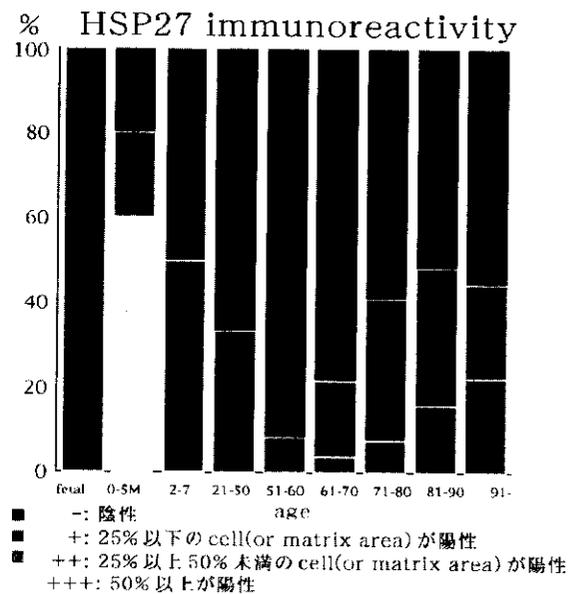


図2 ヒト椎間板におけるHSP27の発現割合。グラフは年齢群ごとのHSP27の発現割合を示す。各年齢群は胎児12例(18週から37週), 乳児5例(0ヶ月から5ヶ月), 若年成人2例(2歳から7歳), 21歳から50歳15例, 51歳から60歳12例, 61歳から70歳28例, 71歳から80歳27例, 81歳から90歳25例, 91歳以上9例である。胎児期から小児期にかけて強く, 青壮年期に一旦低下した後, 加齢による変性に伴い増加する傾向にあった。

例中全例において50%以上の軟骨細胞が陽性であった。25%以上の軟骨細胞陽性率は, 21歳から50歳では15例中13椎間板(67.7%), 51歳から60歳では12例中10椎間板(83.3%), 61歳から70歳では28例中24椎間板(85.7%), 71歳から80歳では27例中25椎間板(92.6%), 81歳から90歳では25例中24椎間板(96%), 91歳以上では9例中8椎間板(88.9%)であった(図1)。

HSP27については, 胎児期から小児期にかけて19例のうち17例において50%以上の軟骨細胞が陽性であった。25%以上の軟骨細胞陽性率は, 21歳から50歳では15例中5椎間板(33.3%), 51歳から60歳では12例中1椎間板(8.3%), 61歳から70歳では28例中6椎間板(21.4%), 71歳から80歳では27例中11椎間板(40.7%), 81歳から90歳では25例中12椎間板(48%), 91歳以上では9例中4椎間板(44.4%)であった(図2)。

以上のように, 軟骨終板におけるChM-I, HSP27の発現は胎児期から小児期にかけて強く, 青壮年期に一旦低下した後, 加齢による変性に伴い増加する傾向にあった。破壊された軟骨終板の

軟骨細胞は, 肥大化や集簇化を示す。ChM-Iは破壊された軟骨板や線維性結合織の侵入部位近傍の軟骨細胞胞体に発現亢進を認めていたが, 組織構築が保たれている軟骨板ではChM-Iは発現していなかった。HSP27はChM-Iと基本的には同じ分布を示していた(図3)。

また, 胎児期の椎間板において, 小血管を含む線維性結合織の周辺にある軟骨組織ではChM-Iの発現が局所的に抑制されていた(図4)。

D. 考察

軟骨終板におけるChM-Iの発現は胎児期から小児期にかけて強く, 青壮年期に一旦低下した後, 加齢による変性に伴い増加する傾向にあった。ChM-Iは破壊された軟骨板及び同部での血管侵入部位周辺の軟骨細胞の胞体にみられており, 椎間板の変性に伴う血管侵入の抑制や軟骨細胞増殖に関与していると考えられた。成長期のウシの尾側椎体を縦断した切片におけるChM-Iの局在が報告されている(Hiraki 1997a)。しかし, ChM-I発現の加齢に伴う変化については, いまだ報告がない。胎児期の椎間

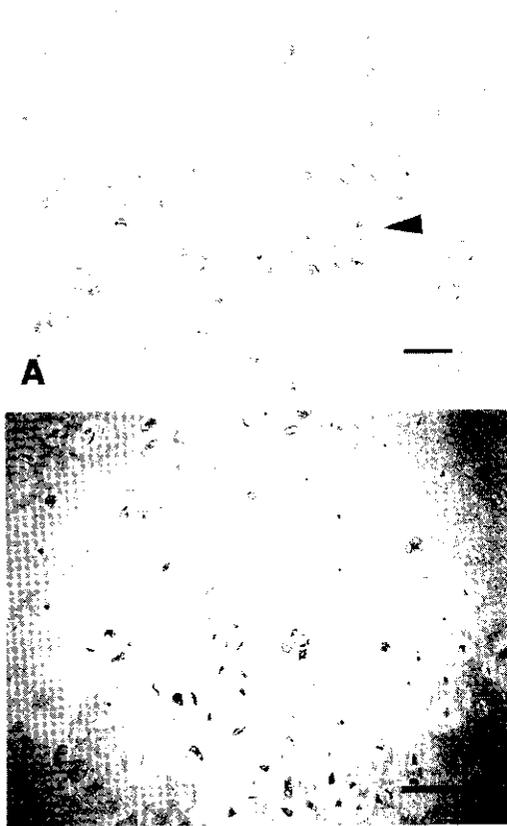


図3 変性軟骨終板におけるChM-I, HSP27の免疫組織化学染色(男性, 79歳)。
A: ChM-I: 軟骨細胞の限局性増生を認め, ChM-Iにて陽性を示す(矢頭)。スケール=100 μ m
B: HSP27: ChM-Iと同様の染色性を示す。スケール=100 μ m



図4 血管周辺でのChM-Iの局所的発現抑制
24週胎児椎体の矢状断。胎児椎体の軟骨細胞や細胞外基質の大部分はChM-Iが強く発現しているが、血管腔(矢印)近傍の軟骨細胞では発現程度は弱い。
スケール=100 μ m

板にChM-Iが強く発現する理由はいくつか考えられる。ChM-IはDNA合成、血管内皮細胞の管腔形成を抑制する(Hiraki 1997b)。さらに、ウシ胎仔軟骨から精製されたChM-Iは、FGFの存在下に骨端軟骨細胞のDNA合成を著しく亢進させる(Hiraki 1991)。正常の成人椎間板とは異なり、胎児椎間板の軟骨組織において、微小血管が多数観察される。以上のことから、胎児椎間板においてChM-Iは、血管新生の程度を調整していると考えられる。

我々の結果では、変性椎間板の軟骨細胞は、椎間板変性が進行するに従い、ChM-Iの発現が強まることが明らかになった。椎間板変性の進行した段階においては、線維化が強くなり、軟骨細胞数が著明に減少する。正常成人椎間板は血管を欠いていることはよく知られている。一方、加齢、変性椎間板では、徐々に血管新生が増加する。椎間板に血管が侵入するのに3通りの経路がある。(1)縦靭帯の直下を通過する場合は最も頻度が高い。(2)椎体縁を通過する場合は、後方よりも前方からの血管侵入が一般的である。(3)最も頻度は低いが、軟骨終板に破壊された部分を通過する場合がある。軟骨終板の変性過程で、隣接椎体骨から椎間板に栄養分を供給する働きをもつ血管床が減少し、毛細血管が椎間板内に新たに形成される(Yasuma 1989)。椎間板変性の初期段階において、椎間板への血管侵入や線維化といった変性を抑制するために、ChM-Iの発現が亢進するものと考えられる。

HSP27は破壊された軟骨板における軟骨細胞の胞体にみられ、反応性の形態変化に対応して発現したのと考えられる。これは胎生期および変性過程における軟骨細胞の形態変化が対応していると考えられた。HSP27は細胞が形態変化を示す時に誘導されるといわれている(Chaufour 1996, Kindas 1994, Kondo 1996, Welsh 1996)。Loonesらは、内軟骨性骨化の際に肥大化層にHSP25, HSP47, HSP70, HSP90が発現することを示した(Loones 1998)。また、HSPsはアポトーシスに関連して発現する(Gunette 1994, Wei 1995)。骨端成長板においては、HSP27, HSP70, HSP110がアポトーシスに陥っている軟骨細胞に強く発現している(Vanmuylder 1997)。さらに、マウスの変形性関節症の初期段階における関節軟骨にHSP47, HSP70, HSP86が発現し、HSP70は早期変形性関節症の指標であるという報告(Takahashi 1997)や、顎関節症の関節軟骨にHSP70が発現し、その程度は顎関節障害の進行に関連するという報告(Suzuki 2000)

がある。

正常加齢における椎間板組織のみならず変性椎間板組織においても ChM-I および HSP27 の発現程度に相違を認めたが、発現局在はほぼ一致していた。さらにこれらのタンパク質は変性椎間板では線維化した部分では低下したが、残存軟骨細胞には強く発現する傾向があった。以上より、chondromodulin-I は軟骨の発達とともに発現調節されており、成人の椎間板変性に対する防御機構に関与していると考えられた。

E. 結論

変性軟骨板の加齢による亀裂、血管侵入、島状軟骨細胞の有無について検討し、年齢とともに増加することを示した。また、変性軟骨板における ChM-I と HSP27 の局在を免疫組織化学的に確認し、軟骨板の変性に伴って発現パターンが変化し、特に HSP27 の発現は変性部位の描出に優れていると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Takao T, Iwaki T, Kondo J, Hiraki Y : Immunohistochemistry of chondromodulin-I in the human intervertebral discs with special reference to the degenerative changes. *The Histochemical Journal*. 32 : 545-50, 2000

2. 学会発表

高尾恒彰, 岩城 徹, 有菌 剛, 前田 健, 斎藤 太一, 神宮司誠也, 岩本幸英 腰椎変性における軟骨終板の組織学的変化と ChM-I, HSP27 の関係

第 29 回日本脊椎外科学会, 名古屋, 2000 年 6 月 8—9 日

[参考文献]

- 1) Alexandrov V. (1994) Function : Aspects of cell response to heat shock. *Int Rev Cytol* 148 : 171-227.
- 2) Chaufour S, Mehlen P, Arrigo AP (1996). Transient accumulation, phosphorylation and changes in the oligomerization of HSP27 during retinoic acid-induced differentiation of HL-60 cells : possible role in the control of cellular growth and differentiation. *Cell Stress* Chap 1 : 225-235.
- 3) Coventry MB, Ghormley RK, Kernohan JW (1945) The intervertebral disc : its microscopic anatomy and pathology. Part II. Changes in the intervertebral disc concomitant with age. *J Bone Joint Surg* 17 : 233-247.
- 4) Dupuis PR, Yong-Hing K, Cassidy JD, Kirkaldy-Willis WH (1985) Radiologic diagnosis of degenerative lumbar spinal instability. *Spine* 10 : 262-276.
- 5) Frymoyer JW, Hanley EN Jr, Howe J, Kuhlmann D, Matteri RE (1979) A comparison of radiographic findings in fusion and nonfusion patients ten or more years following lumbar disc surgery. *Spine* 4 : 435-440.
- 6) Gunette RS, Daehlin L, Mooiebroeck M : (1994) Tanatogen expression during involution of the rat ventral prostate after castration. *J Androl* 15 : 200-211.
- 7) Hayami T, Shukunami C, Mitui K, Endo N, Tokunaga K, Kondo J, Takahashi H, Hiraki Y (1999) Specific loss of Chondromodulin-I gene expression in chondrosarcoma and the suppression of tumor angiogenesis and growth by its recombinant protein in vivo *FEBS Letters* 458 : 436-440.
- 8) Hiraki Y, Tanaka H, Inoue H, Kondo J, Kamizono A, Suzuki F (1991) Molecular cloning of a new class of cartilage-specific matrix, chondromodulin-I, which stimulates growth of cultured chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 175 : 971-977.
- 9) Hiraki Y, Inoue H, Kondo J, Kamizono A, Yoshitake Y, Shukunami C, Suzuki F (1996) A novel growth-promoting factor derived from fetal bovine cartilage, chondromodulin-II-purification and amino acid sequence. *J Biol Chem* 271 : 22657-22662.
- 10) Hiraki Y, Inoue H, Iyama K, Kamizono A, Ochiai M, Shukunami C, Iijima S, Suzuki F, Kondo J (1997a) Identification of Chondromodulin-I as a novel endothelial cell growth inhibitor : purification and its localization in the avascular zone of epiphyseal cartilage. *J Biol Chem* 272 : 32419-32426.

- 11) Hiraki Y, Kono T, Sato M, Shukunami C, Kondo J (1997b) Inhibition of DNA synthesis and tube morphogenesis of cultured vascular endothelial cells by chondromodulin-I. *FEBS Letters* 415 : 321-324.
- 12) Hiraki Y, Mitui K, Endo N, Takahashi K, Hayami T, Inoue H, Shukunami C, Tokunaga K, Kono T, Yamada M, Takahashi HE, kondo J (1999) Molecular cloning of human chondromodulin-I, a cartilage-derived growth modulating factor, and its expression in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 260 : 869-878.
- 13) Inkinen RI, Lammi MJ, Agren U, Tammi K, Puustjervi K, Tammi MI (1999) Hyaluronan distribution in the human and canine intervertebral disc and cartilage endplate. *Histochem J* 31 : 579-587.
- 14) Inoue H, Kondo J, Koike T, Shukunami C, Hiraki Y (1997) Identification of an autocrine chondrocyte colony-stimulating factor — chondromodulin-I stimulates the colony formation of growth plate chondrocytes in agarose culture. *Biochem Biophys Res Commun* 241 : 395-400.
- 15) Kindas MI, Trautinger F (1994) Increased expression of the M(r) 27,000 heat shock protein (HSP27) in vitro differentiated normal human keratinocytes. *Cell Growth Different* 5 : 777-781.
- 16) Kondo A, Baba S, Iwaki T, et al (1996) Hyperbaric oxygenation prevents delayed neuronal death following transient ischaemia in the gerbil hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 22 : 350-360.
- 17) Lindahl O (1996) Determination of sagittal mobility of the lumbar spine : a clinical method. *Acta Orthop Scand* 37 : 241-254.
- 18) Loones MT, Morange M (1998) Hsp and chaperone distribution during endochondral bone development in mouse embryo. *Cell Stress Chap* 3 : 237-244.
- 19) Markwell M, Hass S, Bieber L, Tolbert N (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87 : 206-210.
- 20) Maroudas A (1988) Nutrition and metabolism of the intervertebral disc. In : Ghosh P, ed. *The Biology of the Intervertebral Disc*, Vol. 2, Boca Raton : CRC Press, pp. 1-37.
- 21) Nachemson AL (1960) Lumbar intervertebral pressure : Experimental studies on post-mortem material. *Acta Orthop Scand* (suppl 43) 43 : 42-43.
- 22) Parkkinen JJ, Hakkinen TP, Sayolainen S, Wang C, Tammi R, Agren UM, Lammi MJ, Arokoski J, Helminen HJ, Tammi MI (1996) Distribution of hyaluronan in articular cartilage as probed by a biotinylated binding region of aggrecan. *Histochem Cell Biol* 105 : 187-194.
- 23) Shukunami C, Hiraki Y (1998) Expression of cartilage-specific functional matrix chondromodulin-I mRNA in rabbit growth plate chondrocytes and its responsiveness to growth stimuli in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 249 : 885-890.
- 24) Shukunami C, Yamamoto S, Tanabe T, Hiraki Y (1999) Generation of multiple transcripts from the chicken chondromodulin-I gene and their expression during embryonic development. *FFBS* 456 : 165-170.
- 25) Suzuki T, Segami N, Nishimura M, Hattori H, Nojima T (2000) Analysis of 70 Kd heat shock protein expression in patients with internal degeneration of the temporomandibular joint. *Int J Oral Maxillofac Surg* 29 : 301-4.
- 26) Takahashi K, Kubo T, Goomert RS, Amiel D, Kobayashi K, Imanishi J, Teshima R, Hirasawa Y (1997) Analysis of heat shock proteins and cytokines expressed during early stages of osteoarthritis in a mouse model. *Osteoarthritis Cartilage* 5 : 321-9.
- 27) Tammi R, Agren U, Tuhkanen A-L, Tammi M (1994) Hyaluronan metabolism in skin. *Progr Histochem Cytochem* 29 : 1-81.
- 28) Vanmuylder N, Evard L, Dourov N (1997) Strong expression of heat shock proteins in growth plate cartilage, an immunohistochemical study of HSP28, HSP70 and HSP110.

- Anat Embryol 195 : 359-362.
- 29) Wei Y, Zhao X, Kariya Y, et al (1995)
Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by abrogation of heat shock protein (HSP) 70 expression in tumor cells. *Cancer Immunol Immunother* 40 : 73-78.
- 30) Welch W. (1993) How cells respond to stress. *Sci Am* 268 : 34-41.
- 31) Welsh MJ, Wu W, Parvinen M, et al (1996)
Variation in expression of HSP27 messenger ribonucleic acid during the cycle of the seminiferous epithelium and co-localization of HSP27 and microfilaments in Sertoli cells of the rat. *Biol Reproduction* 55 ; 141-151.
- 32) Yasuma T, Yamauchi Y, Arai K, Makino E (1989) Histopathologic study on tumor infiltration into the intervertebral disc. *Spine* 14 : 1245-1248.

後縦靱帯骨化症における血中骨形成マーカーの意義

川口 善治 (富山医科薬科大学整形外科), 杉森 一仁 (富山医科薬科大学整形外科),
大森 一生 (富山医科薬科大学整形外科), 金森 昌彦 (富山医科薬科大学整形外科),
石原 裕和 (富山医科薬科大学整形外科), 木村 友厚 (富山医科薬科大学整形外科)

【研究要旨】

頚椎 en bloc laminoplasty を施行し、10 年以上を経過した (平均追跡期間 13.8 年) 43 例を対象とし、頚椎の骨化タイプ、術後の変化、骨化伸展、および頚椎部以外の骨化巣と血清中の骨形成マーカーとしてインタクトオステオカルシン、オステオカルシン、I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (PICP)、骨型アルカリフォスファターゼ (骨型 ALP) との関連を調べた。その結果、頚椎部の骨化タイプ、骨化タイプの変化、および骨化伸展と骨形成マーカーには有意差は認められなかった。一方、頚椎部以外に骨化巣が及んでいる例では、頚椎部のみに骨化巣がみられる例に比較し、インタクトオステオカルシン、オステオカルシンおよび PICP が高値をとった。以上より、OPLL においては全身的な骨化傾向とインタクトオステオカルシン、オステオカルシンおよび PICP が関連していると考えられ、これらのマーカーが OPLL の骨化の特徴を示す指標になりうる可能性があると考えられた。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化症 (OPLL) は頚椎に好発し、その骨化のタイプは連続型、混合型、分節型、その他型などに分類される。さらにその骨化は時に胸椎や腰椎にも及んでいることがある¹⁾。一方、種々の骨代謝マーカーは骨形成や吸収を示す生化学的な指標としての重要性が報告されている²⁾。OPLL 患者の骨代謝マーカーを調べたこれまでの報告では、OPLL 患者はコントロールに比較し骨形成マーカーが増加しているというもの³⁾や、一方でいずれの骨代謝マーカーとも増加がみられないというもの⁴⁾があり、その詳細は不明である。そこで今回は OPLL の骨化形態の特徴と骨形成マーカーの関連を調べ、OPLL におけるこれらマーカーの意義について検討することを目的とした。

B. 研究方法

頚椎 en bloc laminoplasty を施行し、10 年以上を経過した (平均追跡期間 13.8 年) 43 例を対象とした。男 28 例、女 15 例、手術時平均年齢は 53.9 歳 (40—75 歳) であり、最終追跡時の平均年齢は 67.7 歳であった。頚椎部の X 線学的評価には単純側面像および断層像を用いた。まず、OPLL を厚生省研究班 X 線分類に従い連続型、分節型、混合型にタイプ分類し、術前と術後 10 年以上を経過した骨化巣の変化を評価した。また骨化巣の長軸方向の長さを計測し、術前からの伸展を経時的に検討した。胸椎部、腰椎部の X 線学的評価には単純側面像を用いそれぞれの

部位での骨化巣の有無について調べた。これら全例において、最終追跡時に血清中の骨形成マーカーとしてインタクトオステオカルシン、オステオカルシン、I 型プロコラーゲン C 末端プロペプチド (PICP) および骨型アルカリフォスファターゼ (骨型 ALP) を測定し、OPLL の骨化巣タイプ、伸展および頚椎以外の骨化巣との関連を調べた。尚、インタクトオステオカルシンは IRMA 法にて、オステオカルシンは RIA 固相法にて、PICP は RIA 固相法にて、骨型 ALP は IRMA 法にて測定した。

C. 研究結果

頚椎部の骨化は、術前、連続型が 13 例、分節型が 9 例、混合型が 19 例、その他型が 2 例であった。術後に頚椎の骨化タイプが変化したものが 17 例 (40%) に認められ、このうち混合型から連続型に移行したものが最も多く 12 例いた。最終追跡時の骨化タイプは連続型が 28 例、分節型が 5 例、混合型が 9 例、その他型が 1 例であった。また、骨化巣の長軸方向の伸展は 33 例 (77%) に認められ、平均 11.1 ± 11.5 mm であった。頚椎部以外に骨化巣がみられたものは 23 例存在し、その内訳は、頚椎と胸椎と腰椎部の骨化巣 9 例、頚椎と胸椎 10 例、頚椎と腰椎 4 例であった。

これら頚椎部の骨化巣形態、術前後における骨化タイプの変化、および骨化巣の伸展と骨形成マーカーとの値を検討したところ、いずれにも有意差は認められなかった。そこで骨化巣部位別に比較を

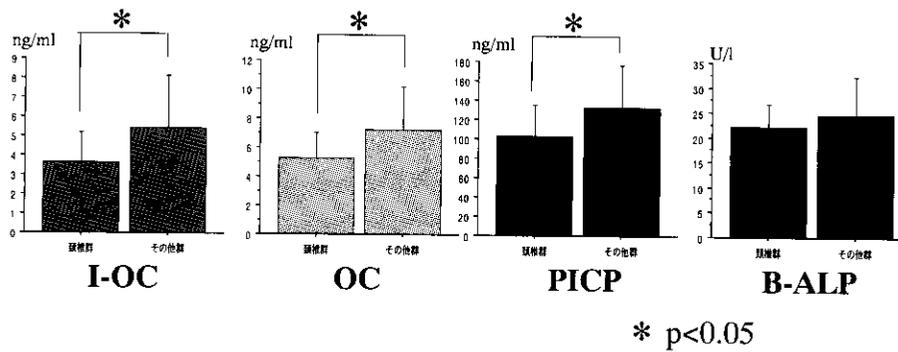


図 1. OPLLが頸椎部にのみ認められる群（頸椎群）と、その他にも認められる群（その他群）での各種骨形成マーカーの比較

行ったところ、頸椎部のみに骨化巣がみられた 23 例では intact オステオカルシン 3.60 ± 1.61 ng/ml, オステオカルシン 5.23 ± 1.76 ng/ml, PICP 102.9 ± 37.8 ng/ml, 骨型 ALP 22.1 ± 7.68 U/L であった。一方、頸椎部以外にも骨化巣がみられた 20 例では intact オステオカルシン 5.45 ± 2.68 ng/ml, オステオカルシン 7.17 ± 3.02 ng/ml, PICP 132.4 ± 43.6 ng/ml, 骨型 ALP 24.6 ± 7.68 U/L であり、intact オステオカルシン、オステオカルシンおよび PICP の値が頸椎部のみに骨化巣がみられた例に比較し有意に高かった (intact オステオカルシン: $p = 0.011$, オステオカルシン: $p = 0.016$, PICP: $p = 0.018$) (図 1)。

D. 考察

骨代謝マーカーは非侵襲的な骨代謝状態の評価法として広く用いられている。今回の検討では OPLL の骨化形態の特徴との関連を調べたが、頸椎部以外にも骨化巣が及んでいる場合に intact オステオカルシン、オステオカルシンおよび PICP が高値をとることがわかった。オステオカルシンは非コラーゲン性骨基質蛋白で、骨芽細胞より合成され血中に分泌されており、血中のオステオカルシンは骨形成の状態を反映する指標と考えられている²⁾。PICP は I 型コラーゲンの生成段階で血中に放出され、この血中濃度は骨芽細胞機能を反映しうる。このことから OPLL においては全身的な骨化傾向とオステオカルシンおよび PICP が関連していると考えられ、これらのマーカーが OPLL の骨化の特徴を示す指標になりうる可能性があると考えられた。一方、これまで指摘のあった骨化巣の伸展と骨形成マーカーの値については^{3), 4)}、今回の検討では明らかな関連は認められず、定期的なフォローアップによる経時

的検討が必要であると考えられた。

E. 結論

OPLL が頸椎のみでなくそれ以外の部位にも及んでいる例では、骨化巣が頸椎部のみにみられる例に比較し、血清中の intact オステオカルシン、オステオカルシンおよび PICP が高値をとった。

[参考文献]

- 1) Hukuda S, Mochizuki T, Ogata M, Shichikawa K : The pattern of spinal and extraspinal hyperostosis in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament and the ligamentum flavum causing myelopathy. *Skeletal Radiol* 10 : 79-85, 1983.
- 2) Eyre DR : Bone biomarkers as tools in osteoporosis management. *Spine* 22 : 175-245, 1997.
- 3) Matsui H, Yudoh K, Tsuji H : Significance of serum levels of type I procollagen peptide and intact osteocalcin and bone mineral density in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Calcif Tissue Int* 59 : 397-400, 1996.
- 4) Ishihara C, Kushida K, Takahashi M, Ohishi T, Murata H, Nagano A, Goto S : The efficacy of biochemical markers in patients with ossification of posterior longitudinal ligament of the spine. *Spinal Cord* 38 : 211-213, 2000.

脊柱靱帯骨化 (OPLL) の成因における ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonete (EHDP) の影響とエストロゲンの関与 (経過報告)

香取 勲 (東邦大学整形外科), 和田 明人 (東邦大学整形外科),
武者 芳朗 (東邦大学整形外科), 岡島 行一 (東邦大学整形外科),
岡田 弥生 (東邦大学免疫学)

【研究要旨】

頸椎後縦靱帯骨化症 (以下 OPLL) に対し当教室では現在までの研究から, OPLL 患者は女性ホルモン優位の性ホルモン不均衡状態にあること, および OPLL 由来培養細胞におけるエストロゲン親和性ホルモンレセプターの存在を確認してきた。本研究では, 病変部に対する EHDP の骨化抑制作用とその抑制作用にエストロゲンがどのように関与するかを調査し, 考察を加えて報告する。検討には, 頸椎手術時に脊柱靱帯組織を取り出し, 3 継代培養した靱帯細胞を用いた。EHDP 非添加群に対し, EHDP 添加群の TGF- β 1 および basicFGF の産生は抑制よりむしろわずかに促進する傾向がみられた。これは OPLL で起こる骨化が他の骨化機構と何らかの相違があることによると考えられた。

A. 研究目的

頸椎後縦靱帯骨化症 (以下 OPLL) に対し当教室では現在までの研究から, OPLL 患者は女性ホルモン優位の性ホルモン不均衡状態にあること, および OPLL 由来培養細胞におけるエストロゲン親和性ホルモンレセプターの存在を確認してきた^{1) 2) 3)}。また OPLL 患者由来の培養靱帯細胞がエストロゲン添加により TGF- β , basicFGF を活発に増加させると報告してきた⁴⁾。一方, 骨化を抑制する薬剤として, 諸外国では ethane-1-hydroxy-1, 1-diphosphonete (以下 EHDP) が使用されている。この薬剤は以前より人工関節全置換術後などに起こる異所性骨化で抑制作用が証明されており⁵⁾, リン酸カルシウム結晶の形成を抑制すること⁶⁾, 低容量で破骨細胞の活動抑制による骨吸収抑制作用が見られること⁷⁾, 幼若ラットにおいて大量投与で高度の石灰化障害を来すこと⁸⁾, OPLL モデルラットにおいて EHDP 投与で脊柱靱帯での一連の石灰化, 骨化過程の抑制⁹⁾ が組織学的に証明されている。本研究では, 病変部に対する EHDP の作用と骨化抑制の作用機序にエストロゲンが関与するかを調査し, 考察を加えて報告する。

B. 研究方法

対象は OPLL 患者 3 名, 非 OPLL 患者 1 名で, 頸椎手術時に脊柱靱帯組織を採取した。靱帯組織を RPMI-1640 (Sigma Co. LTD) 培養液中で細切後, 10 % Fetal Bovine Serum (FBS, Summit

Biotechnorology Inc.) 添加 RPMI-1640 中に浮遊させ, 培養を開始した。約 14 日後に増殖がみられた細胞を, Trypsin-EDTA 処理 (0.05 % Trypsin, 0.53 mM EDTA, GIBCO Co. LTD) によって回収し, 継代培養した。以下の検討には 3 代継代培養後の細胞を用いた。培養靱帯細胞を 5×10^5 個/ml に調整し, 24-well plate の well に 1 ml ずつ分注し 7 日間培養した。また, EHDP の影響をみるために, EHDP (住友製薬) を最終濃度が 0 (コントロール群), 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M になるように RPMI-1640 で希釈し, それぞれの Well に添加し, 6, 12, 18, 24 時間および 3, 5, 7 日後の培養上清を採取 - 20°C で保管した。各 Well より採取した培養上清中の TGF- β 1 および basic-FGF を ELISA 法 (Amersham 社製, TGF β 1 human, ELISA system, R&D system 社製 Quantikine, human FGF basic ELISA kit) により測定した。測定は全て二重検定で行った。

C. 結果

今回は症例数が少なかったため, 各症例ごとの結果をグラフに示した。まず TGF- β 産生量を検討した (図 1)。症例によって症状の違いなどから結果に多少の相違はあるものの 2 例では, 10^{-6} , 10^{-7} M で 6 ~ 12 時間と 5 日に二相性のピークが見られた。24 時間以内では EHDP 非添加群でも 6 又は 12 時間でピークが見られた。増殖因子の産生で二相性のピークを示すことは興味深い結果であると思われる。

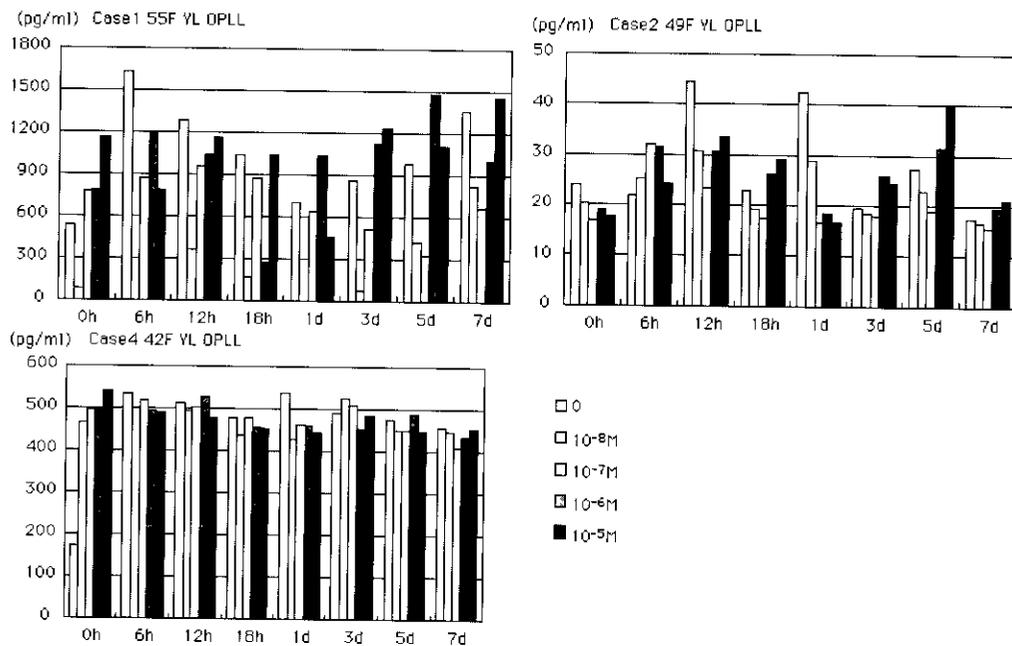


図 1. EHDP 添加時の TGF-β, 産生能の変化

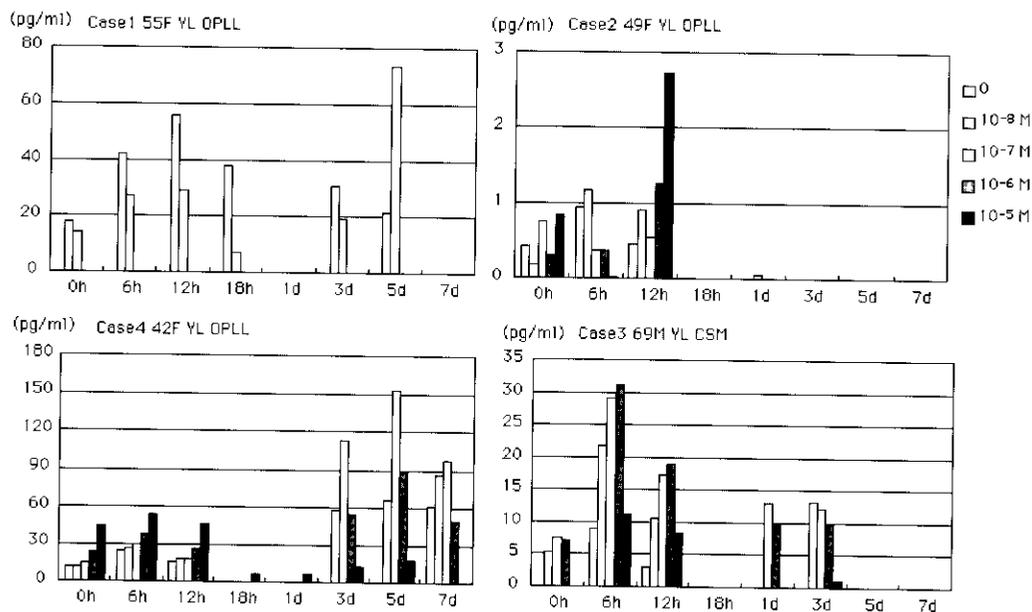


図 2. EHDP 添加時の bFGF 産生能の変化

た。また、24時間以内では特にピーク時にEHDPが抑制傾向を示すのに対し、24時間以降は逆に促進傾向を示した。次にb-FGFを検討したところ(図2)、やはり症例によって若干の相違はあるものの、10⁻⁶、10⁻⁷Mで同様に二相性のピークが得られ、EHDPにより増殖因子が誘導される傾向が見られた。

D. 考察

EHDPがOPLL患者の骨化抑制に有効であるなら骨増殖因子は逆に抑制されるはずである。しかし、動物実験では有効性が報告されているにもかかわらず、臨床研究ではその効果は明らかにされておらず、我々の研究でも増殖因子の抑制効果は得られなかった。この原因としてOPLL患者では血清中のエストロゲンが高値であることから、エストロゲンが何ら

かの影響をおよぼし、EHDPの骨化抑制作用に対する有効性が阻止されているのではないかと考えた。すなわち、エストロゲンによって増殖因子が誘導され、これによって骨化が起こる骨化機構とエストロゲンとは無関係に起こる骨化機構の違いがこのような結果を招いているのではないかと考えた。今回は症例数が少ないが、今後は症例数を増やし、エストロゲン添加群を作製し、検討することが必要である。

E. 結論

骨化抑制作用を示す EHDP は OPLL 患者由来靱帯細胞における増殖因子産生の抑制効果を示さなかった。このことは OPLL で起こる骨化が他の骨化機構と何らかの相違があることによると考えられた。今後、24時間以内の増殖因子誘導とそれ以降の誘導機構の相違と、これに対するエストロゲン、EHDP の作用機構などを詳細に検討していく予定である。

[参考文献]

- 1) 茂手木三男, 武者芳朗, 森須正孝ほか: 脊柱靱帯骨化の成因—食品摂取傾向と性ホルモン—. 整形外科 44 : 1017-1026, 1993
- 2) 武者芳朗, 森須正孝, 和田明人ほか: 脊柱靱帯骨化の成因—血清性ホルモンを中心に—. 脊椎脊髄 6 : 787-794, 1993
- 3) 和田明人: 脊柱靱帯骨化症の培養靱帯細胞におけるエストロゲン親和性. 日整会誌 69:440-449, 1995
- 4) 馬目晃匡: 脊柱靱帯骨化の成因に関する免疫学的検討—骨化発生に関するエストロゲンの役割について—. 脊椎外科学会誌 7 : 348-355, 1996
- 5) 根本敏成, 三浦幸雄, 今給黎篤弘ほか: 股関節形成術後の異所性骨化における EHDP の臨床効果の検討. 関東整災誌 28 : 368-373, 1997
- 6) Fleish HA et al : Disphosphonates inhibit hydroxyapatite dissolution in vitro and in vivo. Science 165 : 1262-1264, 1969
- 7) Gasser AB et al : The influence of two disphosphonate on calcium metabolism in the rat. Clin Sci 43 : 31-45, 1972
- 8) 塩田悦二ほか: Disphosphonateによる骨, 軟骨石灰化障害及び骨吸収障害に関する実験的研究. 整外と災外 30 : 175-179, 1981
- 9) 山本謙吾, 河合 清, 三浦幸雄: Zucker fatty rat の実験的 OPLL に対する EHDP の効果. 整形

細胞内蛋白分解系を介する骨吸収調節のメカニズム

横内 雅博 (鹿児島大学整形外科学教室), 松永 俊二 (鹿児島大学整形外科学教室),
米 和徳 (鹿児島大学整形外科学教室), 小宮 節郎 (鹿児島大学整形外科学教室),
吉村 昭彦 (久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報部門)

【研究要旨】

破骨細胞のシグナル伝達において重要な分子である c-Cbl¹⁾ は細胞内情報伝達系における負の調節因子であることが示されていたが, その抑制機構は不明であった。近年我々は c-Cbl の RING finger 領域がユビキチン転移酵素 E2 と会合し, 活性化型の受容体型チロシンキナーゼに特異的にユビキチンを付加するユビキチンリガーゼ E3 であることを発見し^{2), 3), 4)}, これが c-Cbl の抑制因子としてのメカニズムであることを報告した。本研究では c-Cbl が同じく破骨細胞の骨吸収能獲得に重要な分子である Src kinase⁵⁾ に対しても E3 として働き, その負の調節因子として働くことを明らかにした。この際に活性化された Src は c-Cbl をリン酸化させることによりそのユビキチン結合能を獲得させ, それにより活性型の Src のみが選択的にユビキチン化, 分解をうけると考えられる。これは c-Cbl を介したタンパク質分解系による活性型 Src に対する新しい Down Regulation のメカニズムであり, 破骨細胞の骨吸収能を制御する新しい細胞内情報伝達調節機構と考えられる。

A. 目的

近年, 細胞内における蛋白質分解機構が蛋白質合成機構と遜色のない複雑系を擁し, ささまざまな生体機能を調節していることが明らかになってきている。その細胞内蛋白分解の中心的役割を果たしているのがユビキチンとプロテアゾームから構成されたエネルギー依存性の蛋白分解システムである。このシステムはすべての細胞において普遍的に存在すると考えられるが, しかし破骨細胞におけるユビキチンシステムの役割というものは現在殆ど解明されていない。我々は蛋白の合成と共にその分解シグナルの解明無くしては破骨細胞のシグナルの全容は解明できないと考え, 破骨細胞の機能獲得に重要な分子である Src tyrosine kinase の signal における蛋白分解系の関与について分析を進めた。

B. 方法

Baculovirus を用い昆虫細胞より purify した c-Cbl protein, 及び Src を stable に発現させた NIH3T3 の cell extracts を用いた in vitro ubiquitination assay を行った。その結果 c-Cbl の存在下で活性型の Src がその kinase activity dependent にユビキチン化されることが分かった。次に実際にそれが Src を介する細胞内情報伝達をどのように調節しているかを Src の標的遺伝子である STAT3 の活性を指標に Luciferase reporter assay を用いて明らかにした。同時に酵母 Two-hybrid 法

により Src-Cbl とともに複合体を形成しユビキチンシステムの調節を行っている可能性のある新規遺伝子のクローニングを行った。

C. 結果

組み換え体 c-Cbl 及び Src を用いて in vitro で src のユビキチン化を示すことに成功した。詳細な解析の結果 c-Cbl は RING finger 依存的に活性型の Src のみユビキチン化を促進し, キナーゼ活性がない Src をユビキチン化しないことが明らかとなった。また kinase inactive, open conformation (K295M/Y527F) の Src mutant を用いた実験からも Src の open conformation は十分ではなくその kinase 活性が c-Cbl を介する Src のユビキチン化に重要であることが分かった。また Src によって c-Cbl はチロシンリン酸化をうけ, c-Cbl 自身もユビキチン化をうけることが分かった。この c-Cbl のリン酸化は c-Cbl 自身および Src のユビキチン化に必須であった。これらの結果より c-Cbl のリン酸化が標的にユビキチンを結合させるためのトリガーと考えられる。更に我々は c-Cbl が v-Src による STAT3 の活性化を抑制し, 逆に 70Z-Cbl や Y371F 変異体が STAT3 活性化を増強するという結果を得ており, 70Z-Cbl の癌化への寄与が c-Src-STAT3 を介している可能性が示唆された。

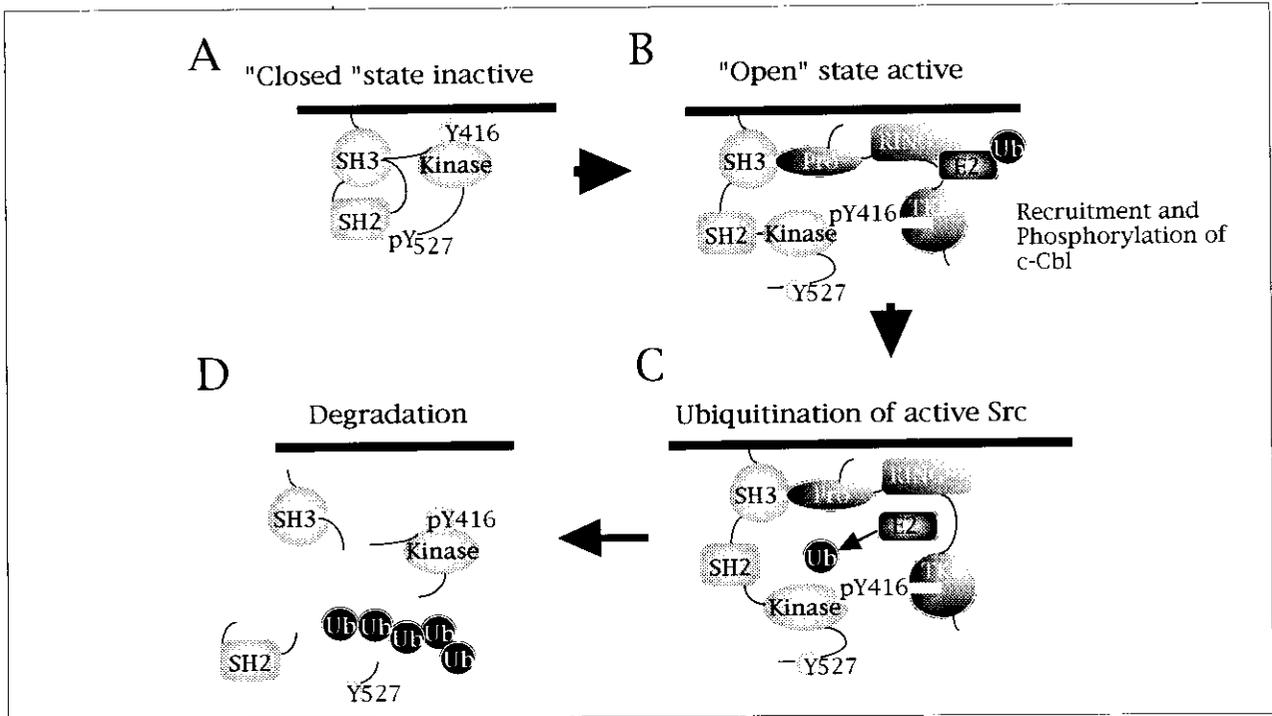


図 1. A, Src の tyrosine527 がリン酸化されている状態。Src は分子内結合を起こし, closed conformation をとることにより kinase 活性が負に調節されている。B, Open conformation をとり kinase 活性を獲得した Src に c-Cbl がリクルートされる。C, c-Cbl はユビキチンシステムをリクルートし, 活性型 Src にユビキチンを付加する。D, ポリユビキチン化された Src はプロテアゾームで分解を受ける。

D. 考察

Src kinase のシグナルの on/off 機構は解明がよく進んでおり, Src の tyrosine527 が選択的に CSK によりリン酸化されることにより分子内結合を起こし, closed conformation をとることにより kinase 活性が負に調節されていると考えられている (図 1)。しかし近年 2 つのグループから独立に活性型 Src が選択的に分解を受けるという報告, また Src family の一つである BLK が E6AP の標的であるという報告もなされ, 活性型 Src の新しい負の調節機構としてユビキチン-プロテアゾームによる蛋白分解のシステムが示された。しかしどのようにして活性型 Src が選択的にユビキチン化を受けるのかそのメカニズムは不明であった。本研究により c-Cbl が Src kinase にも E3 として働き, その負の調節因子として働くことが明らかとなった。これは活性型 Src の新しい Down regulation のメカニズムであり, 骨吸収能獲得のための破骨細胞内情報伝達機構における Src-Cbl による新しい調節機構と考えられる (図 1)。今後 c-Cbl を過剰発現することで破骨細胞の骨吸収能を抑制することも考えられる。この点を視野

にいれ, 我々は更にユビキチン-プロテアゾーム系の阻害による細胞の増殖, 分化, 走化性を細胞レベルで明らかにすると共にその骨吸収能における生理機能を明らかにしていく予定である。

E. 結論

活性型 Src に対する細胞内蛋白分解系による新しい Down Regulation のメカニズムを示した。

[参考文献]

- 1) Tanaka, S., Amling, M., Neff, L., Peyman, A., Uhlmann, E., Levy, J.B., and Baron, R. (1996) *Nature* **383**, 528-531
- 2) Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Bartkiewicz, M., Horne, W.C., Zhang, H., Yoshimura, A., and Baron, R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 31707-31712
- 3) Joazeiro, C. A., Wing, S.S., Huang, H., Leverson, J. D., Hunter, T., and Liu, Y. C. (1999) *Science* **286**, 309-312
- 4) Levkowitz, G., Waterman, H., ettenberg, S.

A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S., and Yarden, Y. (1999) *Mol. Cell.* **4**, 1029-1040

5) Soriano, P., Montgomery, C., Geske, R., and Bradley, A. (1991) *Cell* **64**, 693-702

F. 研究発表

1. 論文

横内雅博, Roland Baron, 吉村昭彦
ユビキチンと癌化を結ぶRINGフィンガー：実験医学 Vol.18 3月号 p.464-467 (2000)
横内雅博, Roland Baron, 吉村昭彦
c-Cbl の RING フィンガー依存性ユビキチンリガーゼ活性と癌化：実験医学増刊 Vol.19 No. 2 p57-63 (2001)

2. 学会発表

横内雅博
ユビキチン化と癌化を結ぶRINGフィンガー：
学術振興会科学研究費「企画」公開ワークショップ。「ユビキチンワールド：新しい生体反応制御システム」北海道 2000/9/7-8 (講演)
Yokouchi, M., Kondo, T., Houghton, A., Yoshimura, A., Zhang, H., and Baron, R.
Src-mediated Phosphorylation- and RING finger- dependent E3 ligase Activity of c-Cbl leads to the Ubiquitination of Src and Cbl
~ c-Cbl is a RING-type E3 ubiquitin ligase for active Src ~
The ASBMR 22nd Annual Meeting, September 22-26, 2000, Toronto, Canada,