

肥満NIDDMモデルラット (OLETF) における脊柱靭帯組織の解析

山崎 正志 (千葉大学医学部, 整形外科), 萩原 義信 (千葉大学医学部, 整形外科),
相庭 温臣 (千葉大学医学部, 整形外科), 中島 新 (千葉大学医学部, 整形外科),
清水 純人 (千葉大学医学部, 整形外科), 大河 昭彦 (千葉大学医学部, 整形外科),
守屋 秀繁 (千葉大学医学部, 整形外科)

KEYWORD=OLETF rat, diabetes mellitus, hyperinsulinemia, hyperglycemia, spinal hyperostosis

【研究要旨】

【目的】脊柱靭帯骨化の発生進展に糖尿病, 高インスリン血症が関わることを, 近年報告されている。本研究では, 自然発症2型糖尿病モデル動物である Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty (OLETF) ラットを用い, 糖尿病と脊柱靭帯骨化の関連について検討した。【方法】OLETF ラットおよび糖尿病非発症対照としての Long-Evans-Tokushima-Otsuka (LETO ラット) の脊椎および下肢を経時的に摘出し, X線学的検討を行った。【結果】生後1年6ヶ月齢まで観察を続けたが, OLETF ラットおよびLETO ラットとも明らかな脊柱靭帯骨化の所見は観察されなかった。【結論】OLETF ラットで生じている高血糖, 高インスリン血症などの糖代謝異常の条件では, 脊柱靭帯に異所性骨化は発生しなかった。

【研究目的】

脊柱靭帯骨化の発生進展に糖尿病が関わることを, 近年報告されている^{1, 2)}。しかし, 糖尿病を発症している患者の大部分に脊柱靭帯骨化が発生するというほどの高い合併率ではなく, 脊柱靭帯骨化の発生進展に両者がどのように関連しているかについては, いまだに不明な点が多い。

ヒトを対象にした場合, 糖尿病の病態は, 病期によって大きく異なる。脊柱靭帯骨化についても, 脊椎における異所性骨化がいつの時点で発生したかを確認することは, ほとんど不可能といえる。さらには, 治療の影響も加わるため, 糖尿病と脊柱靭帯骨化の関連について明確な解析を行いにくい。一方, 高血糖と高インスリン血症などの糖代謝異常を呈するモデル動物が, これまでに数多く報告されている。これらの動物では, 糖尿病の病態と病期が比較的均一であり, 脊柱靭帯骨化についても経時的な観察を行うことで, その発生時期を捉えることができる。このように, モデル動物を用いることにより, 糖尿病と脊柱靭帯骨化の関連について, その詳細についての解析が可能となる。

高血糖と高インスリン血症を呈するモデル動物の一つに, Zucker fatty ラットがあり, その異常形質はレプチン受容体遺伝子のミスセンス変異 (Gln269Pro) によって生じる^{3, 4)}。Zucker fatty

ラットの脊椎では, 10ヶ月齢以降に脊柱靭帯が肥厚し enthesis 部の軟骨増殖が生じること, 13ヶ月齢以降に前縦靭帯が骨化することが明らかにされている⁵⁾。レプチン受容体遺伝子変異によるもう一つのモデル動物として, db/db マウスが知られている。db/db マウスも高血糖と高インスリン血症を呈するが, 遺伝子変異の領域は Zucker fatty ラットとは異なり, Ob-Rb の細胞内領域のイントロン内の点突然変異である⁶⁾。我々は平成10年度および11年度の研究で, db/db マウス脊椎の形態的観察を行った^{7, 8)}。しかし, db/db マウス (バックグラウンドが C57BL/Ks 系) では, 脊柱靭帯骨化の所見は観察されなかった。

本年度の研究では, 自然発症2型糖尿病モデル動物である Otsuka-Long-Evans-Tokushima-Fatty (OLETF) ラットを用い, 糖尿病と脊柱靭帯骨化の関連について同様に検討した。

【研究方法】

OLETF ラット, および糖尿病非発症対照としての Long-Evans-Tokushima-Otsuka (LETO) ラットは大塚製薬 (株) から供与を受けた。雄の OLETF ラット23匹, および雄の LETO ラット12匹を検討に用いた。経時的に屠殺して, 脊椎および下肢を摘出, 軟X線撮影を行い, 異所性骨化の発生を検討し

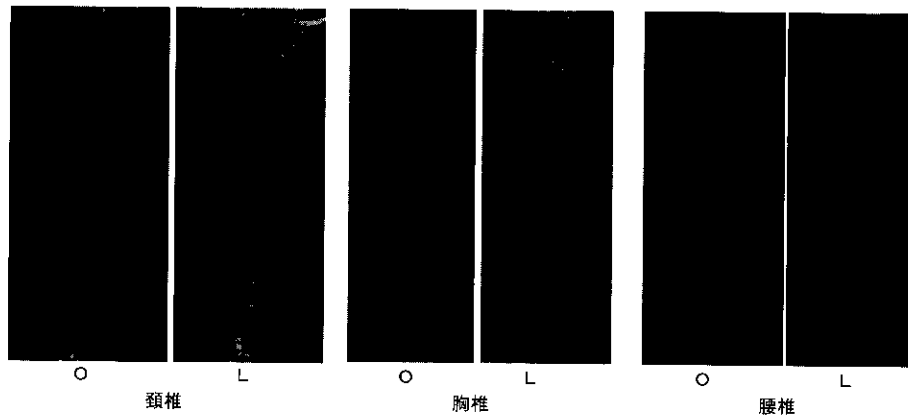


図1 頸椎，胸椎，腰椎の軟X線像（生後1年6ヶ月齢）
O：OLETFラット，L：LETOラット

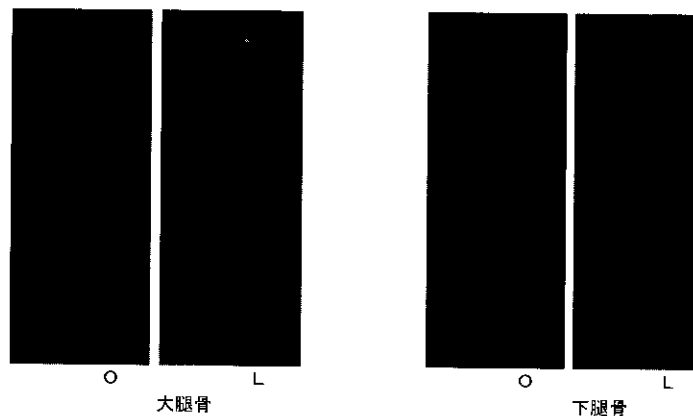


図2 大腿骨，下腿骨の軟X線像（生後1年6ヶ月齢）
O：OLETFラット，L：LETOラット

た。

【研究結果】

生後1年6ヶ月齢まで観察を続けたが、OLETFラットおよびLETOラットの脊椎では、頸椎、胸椎、腰椎のいずれの部位でも、明らかな脊柱靭帯骨化の所見は観察されなかった（図1）。1年6ヶ月齢のOLETFラットおよびLETOラットの大腿骨、下腿骨でも、明らかな異所性骨化は観察されなかった（図2）。OLETFラットでは脊椎および下肢において、LETOラットに比し、骨密度の低下が著しかった（図1，2）。

【考察】

OLETFラットは1992年、大塚製薬徳島研究所で系統化された自然発症2型糖尿病（NIDDM）モデルである⁹⁾。雄OLETFラットは生後数週間より過食、肥満となる。加齢とともに耐糖能は低下し、血中イ

ンスリン反応も過剰となる。生後16週齢でインスリン抵抗性となり、24週齢では明らかな高インスリン血症を呈するようになる。OLETFラットの糖尿病発生率には性差があり、雄OLETFラットは30週齢で、ほぼ90%が糖尿病となるのに対し、雌OLETFラットでは24週未満での糖尿病発生はない。また、糖尿病非発症対照LETOラットでは、高齢になっても糖尿病を発症しない⁹⁾。

今回の研究では、雄OLETFラットと雄LETOラットを長期間飼育し、脊柱靭帯骨化の発生の有無を観察した。生後1年6ヶ月齢まで観察したが、少なくとも軟X線学的検討では、明らかな脊柱靭帯骨化の所見を認めなかった。このことより、OLETFラットで生じている耐糖能異常、高血糖、インスリン抵抗性、高インスリン血症といった糖代謝異常の条件は、脊柱靭帯に異所性骨化を発生させるのには不十分であるという結論が得られた。脊柱靭帯骨化の発生には、OLETFラットでの糖代謝異常とは異

なる別の条件の糖代謝異常が必要である,あるいは,糖代謝異常のみでは脊柱靭帯骨化は発生せず,糖代謝異常に加え何か別の因子が必要である,などの可能性が考えられた。脊柱靭帯骨化の発生が確認されている Zucker fatty ラットでは高血糖,高インスリン血症に加え,レプチン受容体遺伝子異常が存在する。糖代謝異常とレプチン受容体機能異常の相互作用が脊柱靭帯骨化の発生に関与している可能性についても検討を進める必要がある。

臨床データでは,川岸らが糖尿病患者511例中81例(15.9%)に頸椎 OPLL を認めたと報告している¹⁾。また,Shingyouchiらは糖負荷試験の結果,OPLL患者は対照に比べ糖尿病または耐糖能異常の割合が有意に高いとしている²⁾。以上の報告からも明らかなように,糖尿病と脊柱靭帯骨化の発生に関連があることは疑う余地がない。ただ,大部分の糖尿病患者に脊柱靭帯骨化が発生するというほどの合併率ではない。また,糖尿病の罹病期間が長いほど,あるいは,糖尿病のコントロールが不良であればあるほど脊柱靭帯骨化の発生頻度が上がるというデータも,これまでに報告されてはいない。このことより,糖尿病患者の,ある特殊な一群が脊柱靭帯骨化を発生すると考えるべきであろう。これには,ある特殊な糖代謝異常の条件で脊柱靭帯骨化が発生する,あるいは,糖尿病に別の因子が加わることにより脊柱靭帯骨化が発生する,といった可能性が考えられる。BabaらはOPLLモデル動物である twy マウスを streptozotocin を用いて糖尿病にすることにより,より骨化が著しくなると報告している¹⁰⁾。脊柱靭帯骨化の素因を患者が有している場合,糖尿病(あるいは高血糖,高インスリン血症)は骨化の促進因子として作用している,という可能性も考えられる。

【結論】

自然発症2型糖尿病モデル動物・OLETF ラットで生じる高血糖,高インスリン血症などの糖代謝異常の条件では,脊柱靭帯に異所性骨化は発生しなかった。

〔参考文献〕

- 1) 川岸利光,原田征行:糖尿病患者における頸椎後縦靭帯骨化症の疫学的調査. 臨床整形外科 14: 718-722, 1979.
- 2) Shingyouchi Y, Nagahama A, Niida M: Ligamentous Ossification of the Cervical Spine

in the Late Middle-Aged Japanese Men. Its Relation to Body Mass Index and Glucose Metabolism. SPINE 21, 2474-2478, 1996.

- 3) Iida M, Murakami T, Ishida K, Mizuno A, Kuwajima M, Shima K: Substitution at codon 269 (glutamine-proline) of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. Biochem Biophys Res Commun 224: 597-604, 1996.
- 4) Takaya K, Ogawa Y, Isse N, Okazaki T, Satoh N, Masuzaki H, Mori K, Tamura N, Hosoda K, Nakao K: Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs: identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats. Biochem Biophys Res Commun 225: 75-83, 1996.
- 5) 田中 恵: Zucker fatty ratによる実験的脊柱靭帯骨化に関する研究. 東医大誌 52: 19-32, 1994.
- 6) Lee GH, Proenca R, Montez JM, Carroll KM, Darvishzadeh JG, Lee JI, Friedman JM: Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetes mice. Nature 379: 632-635, 1996.
- 7) 中島 新, 山崎正志, 小笠原明, 清水純人, 相庭温臣, 中島文毅, 後藤憲一郎, 守屋秀繁: db/db マウスにおける脊柱靭帯の形態的観察. 厚生省特定疾患 脊柱靭帯骨化症調査研究班 平成10年度研究報告書: 53-56, 1999.
- 8) 中島 新, 山崎正志, 相庭温臣, 清水純人, 大河昭彦, 守屋秀繁: レプチン受容体 (OB-Rb) 欠損マウス・db/dbにおける脊柱靭帯の形態的観察(第2報). 厚生省特定疾患対策研究事業 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班 平成11年度研究報告書, pp. 47-49, 2000.
- 9) 島 健二: OLETF ラット. 日本臨床 56: 725-731, 1998.
- 10) Baba H, Furusawa M, Fukuda M, Maezawa Y, Imura S, Kawahara N, Nakahashi K, Tomita K: Potential role of streptozotocin in enhancing ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (twy/twy). Eur. J. Histochem. 41: 191-202, 1997.

頸椎黄色靱帯の光顕・電顕・免疫組織化学的検討

中間 季雄 (自治医科大学附属大宮医療センター整形外科), 星野 雄一 (自治医科大学整形外科),
税田 和夫 (自治医科大学整形外科), 大上 仁志 (自治医科大学整形外科),
吉川 一郎 (自治医科大学整形外科), 萩原 佳代 (自治医科大学整形外科),
二瓶 あき (自治医科大学整形外科), 菅又 昌雄 (栃木臨床病理研究所),
井原 智美 (栃木臨床病理研究所)

【研究要旨】

脊椎靱帯の微細構造, 細胞外マトリックス, 及びこれらの産生細胞等に関する検討は充分ではなく, 靱帯骨化の病態を解明するにはこれらの基本構造を明らかにする必要がある。本研究では, 頸椎黄色靱帯における fibroblasts のアポトーシス発現に注目し, 頸椎症性脊髄症, OPLL 症例において椎弓形成術時に C2/3 から C7/Th1 各椎弓間より黄色靱帯を採取し, 光顕, 電顕及び免疫組織化学 (TUNEL 法) による検討を行なった。アポトーシスの発現頻度は上位頸椎ほど多く, 弾性線維及び fibroblasts 周囲の collagen fibers は下位頸椎に至るにつれ太く密となり明確に認められた。OPLL では弾性線維内に電子密度の異なる物質が下位にいく程多数認められた。黄色靱帯の基本構造は従来の報告どおりであるが, fibroblasts の life span は上位・下位頸椎間で異なると考えられる。また上位頸椎と下位頸椎における弾性線維周囲の collagen fibers の基本構造の違いは, 頸椎の柔軟性, 強度, 骨化傾向に高位により差があることと関連性している可能性がある。

A. 研究目的

圧迫性脊髄症の原因としては黄色靱帯の肥厚, 骨化, 石灰化などが挙げられる。なかでも黄色靱帯骨化症は胸腰椎に多発し頸椎に発生することは極めてまれである。このような特徴のある黄色靱帯にもかかわらず, 靱帯の微細構造, 細胞外マトリックス, 及びこれらの産生細胞等の解剖, 生理に関する検討は充分ではなく, 後縦靱帯骨化症なども含めて, 靱帯骨化の病態を解明するにはこれらの基本構造を明らかにする必要がある。

近年, 細胞制御のメカニズムとしてアポトーシスが注目され, 新しい知見が得られつつある。アポトーシスはいかなる臓器にも生理的状態で起きている現象で, そのメカニズムの破綻は様々な病的状態を作り出す。

本研究では, 頸椎黄色靱帯の細胞生理を明らかにし靱帯骨化のメカニズムを探る目的で, 頸椎黄色靱帯の微細構造と靱帯の fibroblasts のアポトーシス発現に特に注目し検討を行なった。

B. 研究方法

棘突起縦剖法頸椎椎弓形成術を行なった頸椎症性脊髄症 (CSM) 11 例 (男 8 例, 女 3 例, 手術時平均年齢 60 歳), 後縦靱帯骨化症 (OPLL) 1 例 (男 72 歳) を対象とし, 手術時に C2/3 から C7/Th1 各椎弓間

において靱帯中央部より黄色靱帯の小片を採取, ただちに 1 % glutaraldehyde- 4 % formalin-0.1 M cacodylate buffer に浸し 4 °C で 6 時間以上固定した。光顕的観察のためにはアルコール系列で脱水の後パラフィンに包埋, 薄切片を作製し光顕用標本とした。電顕的観察のためには, 1 % オスミウム酸で後固定の後アルコールで脱水, Epon812 に包埋, 超薄切片を作製した。アポトーシスの観察には免疫組織化学染色 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5-triphosphate (dUTP) nick-end labeled method, TUNEL 法) による検討を行なった。各椎間レベルにおいて TUNEL 陽性細胞を数え, 解析した。

C. 研究結果

a. 光顕的観察

HE 染色では弾性線維が平行に走りそれらの間隙に散在性に細胞核が観察された。これらはどの椎間においても同様の傾向であったが, OPLL 症例においては弾性線維が細くなりその間隙が増大し, 線維の走行も乱れていた。

b. 電顕的観察

CSM 例においては, 上位頸椎では弾性線維の間隙はコラーゲン線維と filamentous な線維で充填さ

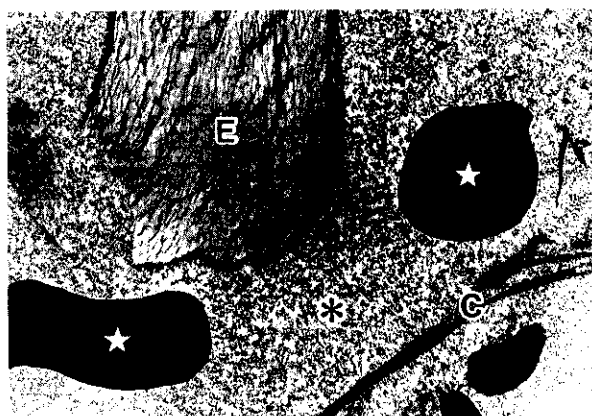


図1 CSM例, C3/4間

E : 弾性線維 C : conagenfibers
 ☆ : アポトーシス小体 * : filamentousな線維

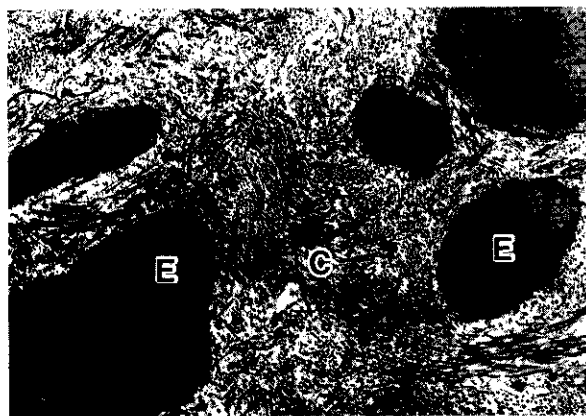


図2 CSM例, C6/7間

E : 弾性線維 C : collagenfibers

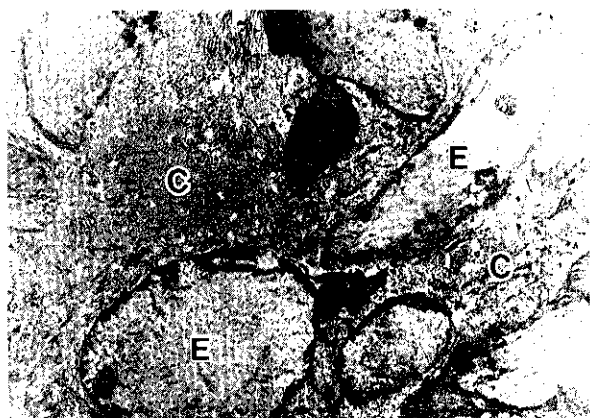


図3 OPLL例, C3/4間

E : 弾性線維 C : conagenfibers

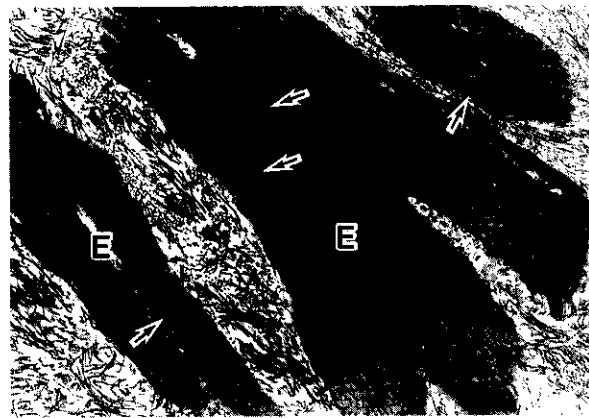


図4 OPLL例, C7/Th1間

E : 弾性線維 → : 電子密度の高い物質

れ、それらの間に濃染するアポトーシス小体を多数認めた(図1)。アポトーシスの発現頻度は上位頸椎ほど多く、弾性線維及びfibroblasts周囲のcollagen fibersは下位頸椎に至るにつれ太く密となり明確に認められた(図2)。

OPLL例では、CSM例と対照的に上位頸椎において弾性線維の間隙はコラーゲン線維が豊富でfilamentousな線維は少なく(図3)、下位頸椎においてはアポトーシスが減少し、弾性線維内に電子密度の異なる物質が多数認められた(図4)。

C. 免疫組織化学染色

CSM例においては、TUNEL陽性細胞は上位頸椎では多数認められ(図5)、下位頸椎ではその頻度は減少した(図6)。5視野当たりのTUNEL陽性細胞の比率をカウントすると、上位から下位に至るにつ

れ段階的に低下し、特にC2/3とC4/5、C6/7、C7/Th1間、C3/4とC4/5、C5/6、C6/7、C7/Th1間では有意差($p < 0.01$)を認めた(図7)。この傾向はOPLLにおいても同様で、特にC7/Th1間では陽性率が低かった(図8)。

D. 考察

本研究により、頸椎黄色靭帯においては靭帯細胞も他の組織、臓器と同様にアポトーシスを介したメカニズムにより制御を受けていることが明らかとなった。アポトーシスは、役割を終えた細胞や老化した細胞を除去すること、あるいは生存すれば有害となる細胞を除去するための能動的なプログラムされた細胞死であることを考えると、脊椎の靭帯細胞も効率よくターンオーバーしていると考えられる。しかも、上位頸椎と下位頸椎ではアポトーシスの頻

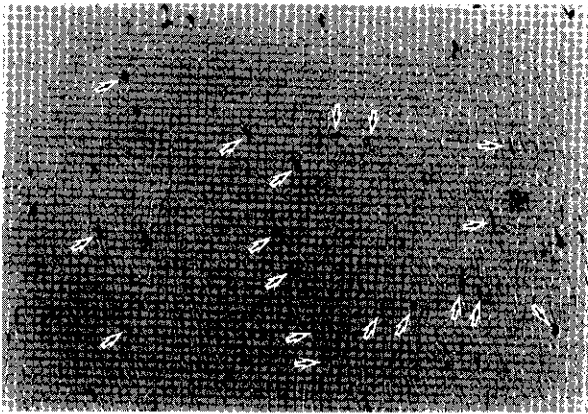


図5 TUNEL法 (CSM例, C2/3間)
 → : TUNEL陽性細胞



図6 TUNEL法 (CSM例, C7/Th1間)
 → : TUNEL陽性細胞

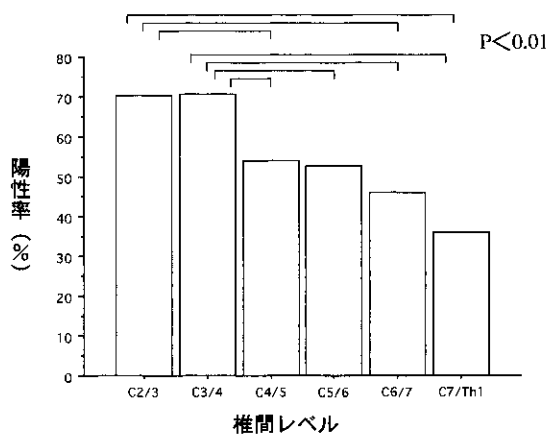


図7 CSM例のTUNEL陽性細胞率

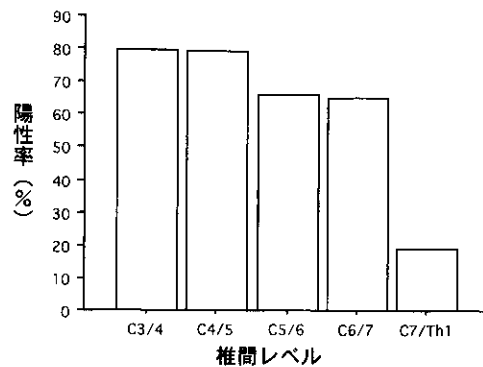


図8 OPLL例のTUNEL陽性細胞率

度が異なることが明らかとなった。すなわち上位と下位における細胞の life span の差が靭帯の超微細構造の違いとなって発現されている可能性が高い。微細構造の違いは靭帯の elasticity にも関与すると考えられ、脊椎の動きを論ずる場合には微細構造からの検討が今後は必要である。

さらに、OPLLの症例においては、下位頸椎においては細胞数も少なくアポトーシスの割合も低下していることを考えると、細胞の life span の差が黄色靭帯の部位による骨化傾向の違いを解明する手掛かりとなる可能性がある。すなわち下位に至るほど細胞のターンオーバーが低下しているため靭帯組織の老化、変性が起こりやすく、骨化の起きやすい環境となり靭帯骨化は胸椎に多いとも考えられる。また、下位頸椎においては弾性線維内の変化が著明で、この変化が何を意味しているのかは不明であるが、今後は頸椎のみならず胸椎、腰椎においても靭帯の微細構造及びアポトーシスの面からみた検討が必要と

思われる。

E. 結論

黄色靭帯の基本構造は従来の報告どおりであるが、fibroblastsの life spanは上位・下位頸椎間で異なると考えられる。また弾性線維周囲の上位頸椎と下位頸椎における collagen fibers の基本構造の違いは、頸椎の柔軟性、強度、骨化傾向に高位により差があることと関連性している可能性がある。

[参考文献]

- 1) Kerr J.F., Wyllie A.H. and Currie A.R. : Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br. J. Cancer 26 : 239-257, 1972
- 2) Kudo S., Ono M. and Russel W.J. : Ossification of thoracic ligamenta flava. AJR 141 : 117-121, 1983

- 3) Kubota T., Kawano H., Yamashita T., Ikeda K., Hayashi M. and Yamamoto S. :
Ultrastructural study of calcification process
in the ligamentum flavum of the cervical spine.
Spine 4 : 317-323, 1987

F. 研究発表

1. 学会発表

Sueo Nakama, Tomomi Ihara, Masao Sugamata, Ichiro Kikkawa, Kayoko Matsumoto, Yuichi Hoshino: Appearance of apoptotic cell death in human ligamentum flavum of cervical spine, BOA/JOA combined conngress 2000, London, Oct. 4-6, 2000.

Nucleotide pyrophosphatase (NPPS) 遺伝子多型と OPLL の発症 およびその重症度との相関

腰塚 裕 (東京大学医学部整形外科), 川口 浩 (東京大学医学部整形外科),
池川 志郎 (理化学研究所 SNP 解析センター), 緒方 直史 (東京大学医学部整形外科),
星地亜都司 (東京大学医学部整形外科), 中村 祐輔 (東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター),
中村 耕三 (東京大学医学部整形外科)

【研究要旨】

Nucleotide pyrophosphatase (NPPS) の遺伝子多型のうちでイントロン 15 に新たに見いだした多型, IVS15-14T → C と OPLL の発症およびその重症度との相関について検討した。OPLL 症例 (180 例) では対照群 (265 例) に比べて C allele を持つものが有意に多かった ($p = 0.022$)。C allele は, 骨化椎体数の多い重症例 ($p < 0.0001$) や若年発症例 ($p = 0.002$) において, さらに強い相関を示した。OPLL 症例の骨化椎体数は, C allele を持つ症例 ($p = 0.013$) で, 女性症例 ($p = 0.006$), 若年発症例 ($p = 0.046$) とともに有意に多かった。C allele の有無で比較すると, 女性と若年発症者で骨化椎体数が有意に多かったが, 男性では有意差はみられなかった。NPPS 遺伝子はヒトにおいても異所性骨化に深く関与している可能性があると考えられた。

A. 研究目的

近年 OPLL のモデルマウスである *ttw* (tiptoe walking) の原因が Nucleotide pyrophosphatase 遺伝子 (以下 *Npps*) の mutation であることが Okawa ら¹⁾ により明らかにされた。また, Nakamura ら²⁾ により, 患者・対照関連試験で OPLL と相関がみられたヒトの NPPS 遺伝子多型が報告され, ヒトにおいても NPPS と OPLL との関連性が示唆された。しかし, Nakamura らの報告については, その後の検討により対照群に Hardy-Weinberg 平衡からの解離があることが明らかとなった。我々は, 適切な対照群を用いて, その遺伝子多型と OPLL の相関について再検討をしたが, 有意差は認められなかった。本研究では, OPLL 症例の中で骨化椎体数が多い骨化の非常に強い症例, あるいは 35 歳未満で発症した若年発症例を用いて再度 → NPPS 遺伝子の多型を検索し, 新規に同定した → NPPS 遺伝子多型と OPLL の発症およびその重症度との相関について検討した。

B. 研究方法

東京大学医学部附属病院において採血された OPLL 群 180 例と対照群 265 例を用いた。OPLL 群は発症後 6 ヶ月以内に当科を受診し, 頸・胸・腰椎単純レントゲンにより OPLL が確認されたものを対象とした。OPLL 群の中で骨化椎体数が 11 以上の骨化の非常に強い症例, あるいは 35 歳未満で発症した

若年発症例 25 例を用いて Nakamura ら²⁾ の報告と同一のプライマーセットを用いて, PCR-SSCP 法により新規の多型のスクリーニングを行った。新規に同定された多型について上記のサンプルを用い, 患者・対照関連試験を行った。OPLL 群, 対照群ともに Hardy-Weinberg 平衡からの解離はみられなかった。また, OPLL 群については, SNP と単純レントゲンにより計測した骨化椎体数を用いた重症度や年齢との関連についても検討した。骨化椎体数が 11 以上の症例を severe, 11 未満の症例を mild とした。また, 年齢を平均年齢 52 歳で 2 群 (若年群, 老年群) に分け, それぞれ検討した。

(倫理面への配慮)

すべての血液サンプルは十分な口頭と文書による説明ののち, 同意を得て同意書を作成した。また, 本研究は東京大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果および D. 考察

スクリーニングにより新規に 3 ヶ所の多型 (973T → C, IVS15-14T → C, IVS20-10delT) を同定した。973T → C と IVS20-10delT では OPLL 症例と対照群の間で Allele の頻度に有意差はみられなかったが, IVS15-14T → C (以下 IVS15 とする) では minor allele の C allele が OPLL 症例において対照群より有意に多かった ($p = 0.022$) が, 男女別の比較では有意差はみられなかった (Table

Table 1. IVS15 → C 多型の患者・対照関連試験

Subjects (n)	Genotype			Allele type (%)		χ^2	p-value	Odds ratio (95%CI)
	C/C	C/T	T/T	C	T			
OPLL All (180)	1	10	169	12 (3.3)	348 (96.7)	5.24	0.022	3.01 (1.1-8.1)
Male (136)	0	7	129	7 (2.6)	265 (97.4)	2.32	0.128	2.31 (0.8-6.9)
Female (44)	1	3	40	5 (5.7)	83 (94.3)	3.36	0.067	5.26 (1.6-17.6)
Control All (265)	0	6	259	6 (1.1)	524 (98.9)			
Male (194)	0	4	190	4 (1)	384 (99)			
Female (71)	0	2	69	2 (1.4)	140 (98.6)			

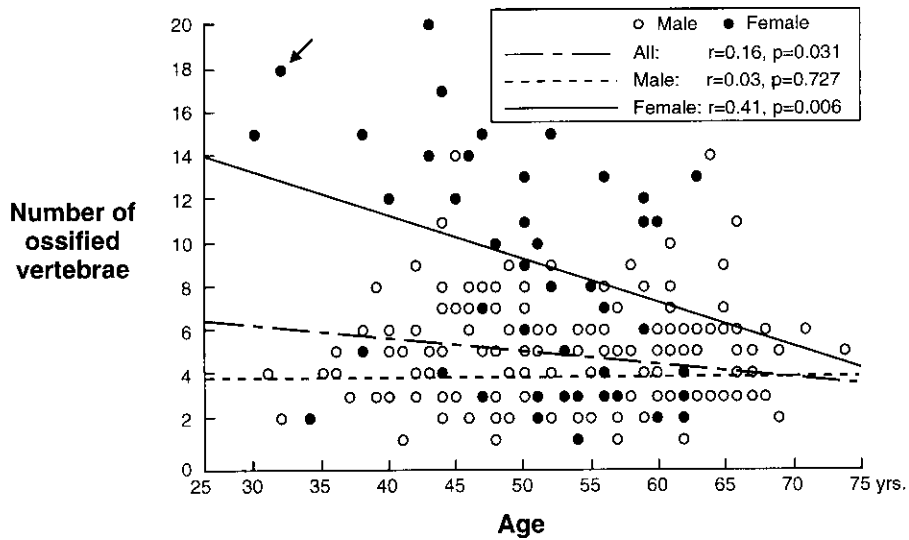


Figure 1. OPLL 症例における骨化椎体数と年齢および性別の関係
 データは、当科初診時のもので、矢印は唯一の CC homozygous の症例を示している。

1). C Allele の有無と性別および年齢との間には、いずれも互いに有意な相関はみられなかった。

OPLLの重症度に対する risk factor を検討するため、骨化椎体数と年齢および性別との関係について解析した (Figure 1)。OPLLの自然経過は、脊椎が受けるメカニカルストレスなどの環境因子を考慮すると、個人レベルで加齢とともに増加すると考えられる。しかし、今回の結果では、OPLL症例全体では加齢とともに骨化椎体数が減少する逆相関の関係にあった。男性で加齢とともに骨化椎体数がわずかに増加しているのに対し、女性では加齢とともに骨化椎体数が減少していることから、この逆相関の原因が女性にあることがわかる。これは、OPLL症例に、重症な若年発症例の群と、軽症な老年発症例の群があることを示しており、遺伝的要因が特に女性の若年発症例において、その骨化の程度に関与している可能性を示唆している。

OPLL症例を性別、年齢、重症度で分類し、IVS15

の C Allele の頻度について検討した (Table 2)。OPLL 群と対照群の比較で、C Allele の頻度は Severe 群と若年群において有意差がみられたが、Mild 群および老年群では、有意差はみられなかった。C Allele は、severe 群 ($p < 0.0001$, odds ratio 11.21, [95% CI 3.3-38.3]) と若年群 ($p < 0.002$, 4.44, [1.6-12.7]) において OPLL 群に多くみられた。男女別に比較すると、男性症例では severe 群 ($p = 0.005$, 12.48, [1.3-117.7]) において、女性症例では severe 群 ($p < 0.0001$, 10.92, [2.9-40.6]) と若年群 ($p < 0.0001$, 9.7, [2.8-33.1]) で有意差がみられた。これらは、IVS15 が、OPLL の発症と有意な相関があり、特に骨化椎体数が 11 椎体以上ある重症例や若年症例と強い相関があることを示している。

さらに、OPLL 症例における骨化椎体数と性別、年齢、IVS15 の C Allele の有無との関係について検討した (Figure 2)。C Allele を持つ症例 ($p = 0.013$),

Table 2. IVS15 → C多型のOPLL症例における重症度および年齢別の解析

Subjects (n)	Genotype			Allele type (%)		χ^2 *	p-value*	Odds ratio (95%CI)*	
	C/C	C/T	T/T	C	T				
Severe	All (22)	1	3	18	5 (11.4)	39 (88.6)	22.63	<0.0001	11.21 (3.3-38.3)
	Male (4)	0	1	3	1 (12.5)	7 (87.5)	7.93	0.005	12.48 (1.3-117.7)
	Female (18)	1	2	15	4 (11.1)	32 (88.9)	19.34	<0.0001	10.92 (2.9-40.6)
Mild	All (158)	0	7	151	7 (2.2)	309 (97.8)	1.54	0.215	1.98 (0.7-5.9)
	Male (132)	0	6	126	6 (2.3)	258 (97.7)	1.54	0.215	2.03 (0.6-6.4)
	Female (26)	0	1	25	1 (1.9)	51 (98.1)	0.25	0.618	1.71 (0.2-14.5)
Young	All (93)	1	7	85	9 (4.8)	177 (95.2)	9.22	0.002	4.44 (1.6-12.7)
	Male (68)	0	4	64	4 (2.9)	132 (97.1)	2.39	0.122	2.65 (0.7-9.5)
	Female (25)	1	3	21	5 (10)	45 (90)	19.31	<0.0001	9.7 (2.8-33.1)
Old	All (87)	0	3	84	3 (1.7)	171 (98.3)	0.36	0.546	1.53 (0.4-6.2)
	Male (68)	0	3	65	3 (2.2)	133 (97.8)	0.94	0.333	1.97 (0.5-7.9)
	Female (19)	0	0	19	0 (0)	38 (100)	0.44	0.509	1.05 (0.06-18.9)

*コントロール群と比較した。

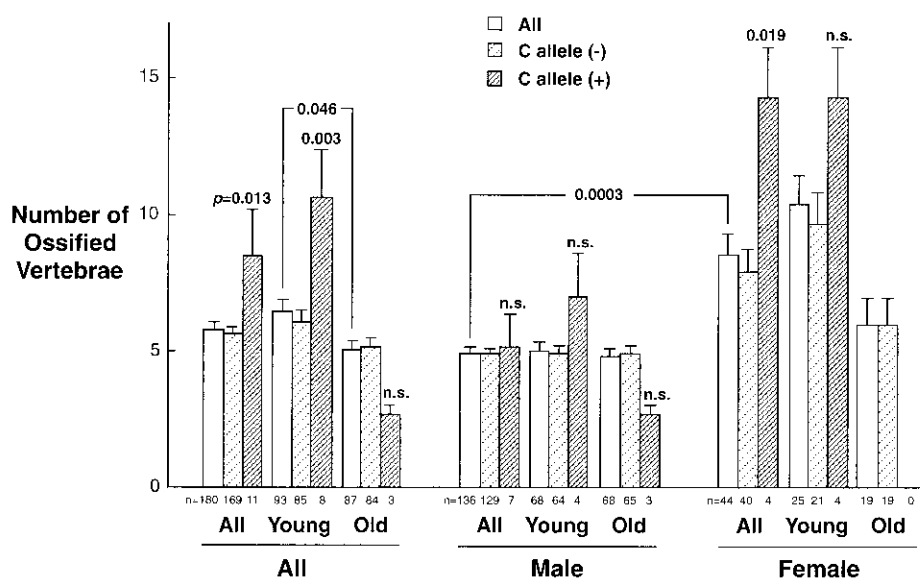


Figure 2. OPLL症例における性別、年齢、IVS15のアレルタイプによる分類と骨化椎体数の関係

女性群 ($p = 0.0003$), 若年群 ($p = 0.046$) は, それぞれ, C Alleleを持たない症例, 男性群, 老年群に比べて骨化椎体数が有意に多かった。これより, C Allele, 女性, 若年発症は骨化椎体数増加の risk factorと考えられた。C Alleleを持つ症例の中で比較すると, 若年群 ($p = 0.003$) と女性群 ($p = 0.019$) においては有意差がみられたが, 男性群では有意差はみられなかった。また, C Alleleを持つ女性症例は全例若年発症であった。全症例中に C Allele の Homozygousは1例のみで32歳女性, 18椎体にわたって骨化がある非常に重症な症例だった (Figure 1, 矢印)。これらから, IVS15は, 若年発症や女性とともにOPLL症例の骨化椎体数増加の risk factor

の1つであり, 特に若年発症例や女性症例において強く関与していると考えられた。

E. 結論

NPPS遺伝子において, OPLLの発症のみならず, その重症度と関連している SNPを同定した。この SNPは若年発症例と女性でOPLLの重症度と強い相関を示した。これらからNPPS遺伝子はヒトにおいても異所性骨化に深く関与している可能性があると考えらる。

[参考文献]

1) Okawa, A., Nakamura, I., Goto, S., Moriya, H.,

Nakamura, Y., and Ikegawa, S. 1998. Mutation in *NPPS* in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat. Genet.* **19** : 271-273.

- 2) Nakamura, I., Ikegawa, S., Okawa, A., Okuda, S., Koshizuka, Y., Kawaguchi, H., Nakamura, K., Koyama, T., Goto, S., Toguchida, J., et al. 1999. Association of the human *NPPS* gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). *Hum. Genet.* **104** : 492-497.

F. 研究発表

1. 論文発表

Journal of Bone and Mineral Research 投稿中

2. 学会発表

Association of a Single Nucleotide Polymorphism (SNP) of Nucleotide Pyrophosphatase (*NPPS*) with Ossification of the Spinal Ligament

Y. Koshizuka, H. Kawaguchi, N. Ogata, K. Nakamura, Y. Nakamura, S. Ikegawa.

Twenty second Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Ontario, Canada, 2000.9.25

インスリン受容体基質 (IRS) を介するシグナルの骨代謝調節機構における役割の解明

—IRS-2ノックアウトマウスを用いた検討—

阿久根 徹 (東京大学整形外科), 川口 浩 (東京大学整形外科),
緒方 直史 (東京大学整形外科), 竹下 克志 (東京大学整形外科),
星地亜都司 (東京大学整形外科), 大西五三男 (東京大学整形外科),
中村 耕三 (東京大学整形外科)

【研究要旨】

インスリン, IGF-I受容体キナーゼの共通の基質であるインスリン受容体基質-2 (IRS-2) ノックアウトマウスの骨組織を解析した結果, *in vivo* では骨密度が減少し, 骨組織形態計測で破骨細胞数の増加と石灰化速度の低下を特徴とする皮質骨・海綿骨骨量減少がみられた。In vitro の解析では, IRS-2は骨芽細胞と破骨細胞の両者に発現がみられたが, IRS-2欠損骨芽細胞において, 分化能および基質合成能が低下しており, かつ, RANKL/ODF発現レベル上昇を伴う破骨細胞形成支持能の亢進があり, 同時に検討した骨髄細胞が野生型, IRS-2欠損由来の細胞間で差がなかったことより, IRS-2を介するシグナルは骨芽細胞において重要で, 骨芽細胞の分化・基質合成を促進し破骨細胞形成支持能を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は, 耐糖能異常者にその発生頻度が高いことが知られている。糖代謝関連因子の中では, インスリンが OPLL と関連があり, OPLL 患者において, インスリン分泌反応性が亢進していることが, OPLL の骨化の重症度と関連することを我々は報告してきた。そこで, インスリンなどの骨形成因子が骨代謝調節機構に及ぼす作用を細胞・分子レベルで更に解明するため, インスリン受容体基質 (IRS) に着目した。インスリン受容体基質 (IRS-1およびIRS-2) は, インスリンおよびIGF-Iの受容体キナーゼの共通の基質であり, 細胞内情報伝達に必須の分子である。IRS-1 に関して我々はその欠損マウスの解析により, 骨芽細胞における IRS-1シグナルが骨代謝回転の維持に必須であることを報告した。一方IRS-2については, 単にIRS-1を代償するのみならず, IRS-1とは異なる作用がある可能性が示唆されている。本研究の目的は, 最近作製された IRS-2 欠損マウスの骨組織の *in vivo* および *in vitro* の解析により, IRS-2シグナルの骨代謝調節機構における役割を解明することである。

B. 研究方法

① *In vivo* での解析: 野生型 (+/+) およびIRS-2欠損 (-/-) マウスの長管骨 (大腿骨および脛骨) 骨密度を測定し, 更に長軸方向に20分割した各分画の骨密度を測定し, 比較検討した。3次元マイクロ

CT による骨組織の解析をおこなった。8週齢の野生型 (+/+) およびIRS-2欠損 (-/-) マウスの脛骨標本を用いて, 骨組織形態計測をおこなった。また, Villanueva-Goldner染色, TRAP染色をおこない組織学的に検討した。

② IRSの発現パターン: 新生仔マウス頭蓋骨由来の骨芽細胞 (POB), POBと骨髄細胞の共存培養から形成した成熟破骨細胞 (OCL), および破骨細胞前駆細胞株である C7細胞における IRS-1 および IRS-2の発現を RT-PCR にて検討した。

③骨芽細胞の増殖・機能における IRS-2の関与: POBの増殖能を3日後の [³H]-TdRの取り込みと10日間の増殖曲線, 分化能を14日後のALP活性, 基質合成能は21日後のAlizarin red染色および28日後のvon Kossa染色によって解析した。

④破骨細胞の形成・機能における IRS-2の関与: 1,25(OH)₂D₃, PGE₂ およびIL-11存在下での, +/+または-/-由来の, POBと造血系細胞 (骨髄細胞または脾細胞) の共存培養系におけるTRAP陽性OCL形成能および形成されたOCL分画による骨吸収窩形成能を測定した。また, POBにおけるRANKL/ODFの発現をNorthern blottingで検討した。

C. 研究結果

① *In vivo* での解析: IRS-2欠損 (-/-) マウス (8週齢) の骨密度は, 野生型 (+/+) マウスに比べて,

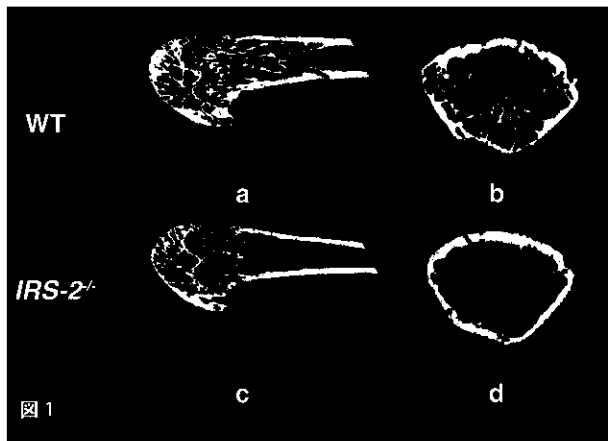


図1. 野生型 (WT) および IRS-2 ノックアウトマウス (*IRS-2^{-/-}*) の大腿骨 3次元マイクロCT画像 (a および b: WT, c および d: *IRS-2^{-/-}*)

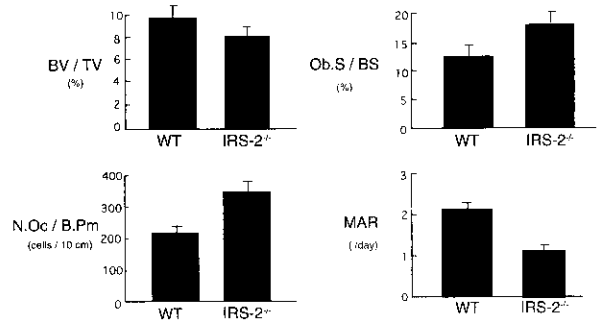


図2. 野生型 (WT) および IRS-2 ノックアウトマウス (*IRS-2^{-/-}*) の骨組織形態計測。BV/TV (単位骨量), Ob.S/BS (骨芽細胞面), N.Oc/B.Pm (破骨細胞数), MAR (石灰化速度)

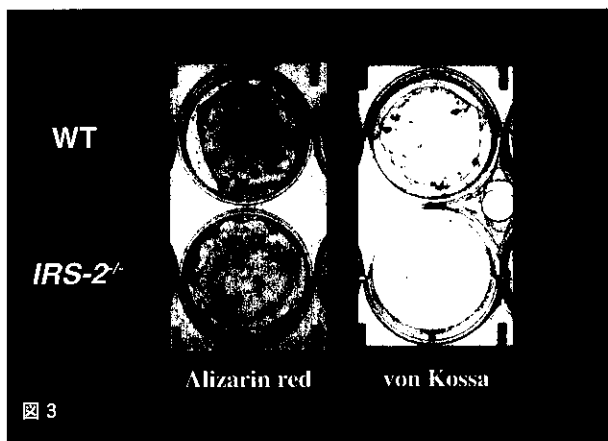


図3. 野生型 (WT) および IRS-2 ノックアウトマウス (*IRS-2^{-/-}*) 由来骨芽細胞の Alizarin red 染色および von Kossa 染色による基質合成能・石灰化能 (上段: WT, 下段: *IRS-2^{-/-}*)

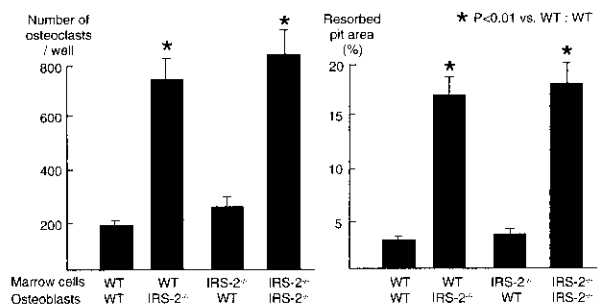


図4. 野生型 (WT) および IRS-2 ノックアウトマウス (*IRS-2^{-/-}*) 由来の骨芽細胞と骨髄細胞共存培養系における破骨細胞形成能 (図左) および骨吸収活性 (図右)

大腿骨および脛骨全体で10~15%低下していた。長軸方向に20分割したどの分画の骨密度も、-/-マウスにおいて同程度の低下がみられ部位による差は認められなかった。3次元マイクロCT画像でも、骨幹端部における海綿骨梁の減少と骨幹部における皮質骨の菲薄化が認められた (図1)。骨組織形態計測では、破骨細胞と骨吸収窩は高値を示し、骨芽細胞数もこれに応じて増加していた。しかし個々の骨芽細胞機能 (石灰化速度) は抑制されていた (図2)。

② IRSの発現パターン: IRS-1の発現はPOBのみに認められたが、-/-由来のPOBでの発現は+/+と同程度で代償性のIRS-1の発現促進は見られなかった。一方、IRS-2はすべての+/+由来の細胞に発現が認められた。

③ 骨芽細胞の増殖・機能におけるIRS-2の関与: -/-由来のPOBは+/+POBと比べて、増殖能は同程度に保たれていたが、分化能、基質合成能とも著明に低下していた (図3)。

④ 破骨細胞の形成・機能におけるIRS-2の関与: 1,25-(OH)₂D₃, PGE₂, IL-11いずれの存在下においても、造血系の細胞が+/+由来-/-由来に関わらず、POBが-/-由来の場合に限り、破骨細胞形成および吸収窩形成が著明に亢進していた (図4)。そこで、POBにおけるRANKL/ODFの発現をNorthern blottingで検討したところ、-/-POBで+/+POBよりも強い発現が見られた。

D. 考察

IRS-2 欠損マウスでは皮質骨・海綿骨両者の骨量減少があり、その背景には骨芽細胞の分化・基質合成の低下と RANKL/ODF 発現の亢進による骨吸収の促進が存在した。IRS-2 は骨芽細胞のみならず破骨細胞系細胞にも発現していたが、骨芽細胞内のシグナルが骨代謝調節により重要であった。この骨芽細胞における IRS-2 は、インスリン/IGF-I のシグナル分子として骨芽細胞の機能促進に作用する一方、これとは独立したメカニズムで RANKL/ODF 発現を抑制することによって、骨の形成と形成された骨量の維持に関与している分子と考えられる。

E. 結論

骨芽細胞のインスリン受容体基質-2 (IRS-2) シグナルはその分化・基質合成を促進し破骨細胞形成支持能を抑制する。

[参考文献]

- 1) Ogata N, et al : Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest.* 105 : 935-943, 2000.
- 2) Tamemoto H, et al : Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372 : 182-186, 1994.
- 3) Withers DJ, et al : Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391 : 900-904, 1998.
- 4) Kubota N, et al : Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49 : 1880-1889, 2000.

BMPシグナルの多様性と協調

宮園 浩平 (東京大学大学院医学系研究科)

【研究要旨】

骨形成因子 (BMP) は骨形成に重要な役割を持つ生理活性物質である。脊柱靭帯骨化症において BMP の受容体の発現が上昇することから、我々は C2C12 細胞の骨芽細胞様分化誘導において、異なったグループに属する BMP-4 と BMP-6 のシグナル経路を解析した。BMP-4 は主に ALK-3 に結合して Smad1/5/8 を活性化するのに対し、BMP-6 は主に ALK-2 に結合し Smad1/5 を活性化した。また、BMP-4 と BMP-6 の両者を加えることにより、いずれか一方よりも強力な分化誘導作用が見られた。また骨形成に関与する転写因子 PEBP2 α A と Smad1/5 は互いに結合し、両者の間に骨芽細胞の分化に関して協調作用があることが確認された。

A. 研究目的

BMP は骨や軟骨の形成を促進するなど多彩な作用をもったタンパク質の一群である。脊柱靭帯骨化症においては病変部で BMP の受容体の発現が上昇が確認されており、BMP やその受容体が脊柱靭帯骨化症の進展に関与しているものと考えられる。BMP には 20 種類以上のタンパク質が知られ、その作用の相違については十分には明らかとなっていない。また BMP と構造の類似した TGF- β は転写因子 PEBP2 α C と協調して IgA の産生を促進することから、骨の形成に関わる転写因子 PEBP2 α A (Runx2/Cbfa1) と BMP の作用について研究を行った。

B. 研究方法

マウスの未分化な間葉系細胞 C2C12 細胞にアデノウイルスベクターに組み込んだ Smad などさまざまな遺伝子を発現させ、BMP 刺激後の骨芽細胞への分化や luciferase assay を用いた転写活性の変動などを観察した。以上の実験はすべて *in vitro* の培養細胞を用いた実験であり、倫理面の問題はないと考える。

C. 研究結果

1) BMP は 20 種類以上のファミリー蛋白からなり、いくつかのグループに分けられる。我々は、C2C12 細胞の骨芽細胞様分化誘導において、異なったグループに属する BMP-4 と BMP-6 のシグナル経路を解析した。BMP-4 は主に ALK-3 に結合して Smad1/5/8 を活性化するのに対し、BMP-6 は主に ALK-2 に結合し Smad1/5 を活性化した。また、BMP-4 と BMP-6 の両者を加えることにより、いずれ

か一方よりも強力な分化誘導作用が見られ、同様の協調作用は活性型の ALK-2 と ALK-3 を同時に発現させることによっても再現された。さらに 3GC2-Lux を使ったレポーターアッセイでも同様のことが確認された。

2) PEBP2 α A は骨の形成に関与する転写因子である。我々は BMP のシグナル伝達因子 Smad1 や Smad5 と PEBP2 α A の協調作用を検討した。その結果、PEBP2 α A は、Smad1, 5 と直接結合し、C2C12 細胞の骨芽細胞への分化を促進することが明らかとなった。

D. 考察

異なったグループに属する BMP-4 と BMP-6 は異なった受容体に結合し、少なくとも部分的に異なったシグナル経路を介して C2C12 細胞の骨芽細胞様分化を誘導し、両者の活性化によってより強力な作用が得られることが示された。

骨の分化に関与する PEBP2 α A は Smad1 や Smad5 と協調して骨芽細胞の分化を促進することが明らかとなった。今後は Smad1/5 や PEBP2 α A の標的となる遺伝子群の同定が重要であると考えられた。

E. 結論

BMP は骨芽細胞への分化を促進する因子である。本研究で異なったサブファミリーの BMP の協調作用や、転写因子 PEBP2 α A との共同作用が明らかとなった。これらの成果は脊柱靭帯骨化症の進展のメカニズムの解明や治療法の開発のために重要な情報となると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyazono, K. : Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J. Cell Sci.*, 113(7) : 1101-1109, 2000.
2. Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T., and Miyazono, K. : BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev. Biol.*, 221(1) : 249-258, 2000.
3. Zhang, Y.-W., Yasui, N., Huang, G., Fujii, M., Hanai, J.-i., Nogami, H., Ochi, T., Miyazono, K., and Ito, Y. : A RUNX2/PEBP2 α A/CBFA1 mutation displaying impaired transactivation and Smad interaction in cleidocranial dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(19) : 10549-10554 (2000).
4. Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K. : Smurf1 interacts with transforming growth factor- β type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, in press, 2001.
5. Miyazono, K., Kusanagi, K., and Inoue, H. : Divergence and convergence of TGF- β /BMP signaling. *J. Cell. Physiol.* in press, 2001.

IV

軟 骨 基 質

ヒト黄色靭帯プロテオグリカンの特性とエラスチンとの親和性

板橋 泰斗 (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), 湯川 昌弘 (弘前大学整形外科),
高垣 啓一 (弘前大学第一生化学), 遠藤 正彦 (弘前大学第一生化学)

【研究要旨】

ヒト黄色靭帯において, 主要な構成成分であるプロテオグリカン (PG) とエラスチンに着目し, その構造的特性及び分子間の親和性を検討した。ヒト黄色靭帯 200g より, 超遠心, 各種クロマトグラフィーにて, 3つのコアタンパクの異なる小型PG (デコリン, デコリンの亜型 (デコリン-2), パイグリカン) を分離・精製し, 免疫染色, アミノ酸配列分析, HPLC分析等により解析した。PGを構築するグリコサミノグリカン糖鎖は各々異なり, 細胞外マトリックス構築及び他の分子との相互作用において異なる機能を有すると考えられた。デコリン-2は主にデルマタン硫酸鎖で構成されており, 靭帯骨化に対して抑制的な作用を有している可能性が示唆された。また, 熱アルカリ抽出法により α -エラスチンを精製し, 表面プラスモン共鳴バイオセンサーでPGとの親和性を検討した。その結果, 両者の親和性が認められたことから, 組織構築において両者が密接に関連していることが示唆された。

【はじめに】

ヒト黄色靭帯の細胞外マトリックス (ECM) には多くの弾性線維と膠原線維が含まれる。弾性線維は動脈, 肺, 皮膚, 靭帯など体内に広く分布する。その構造は電子顕微鏡においてトロポエラスチンとそれを取り巻くマイクロフィブリルから成り立っており, 架橋結合を形成してより強靱な不溶性物質を構築している。また, ECMの主要な構成成分であるプロテオグリカン (PG) は, エラスチンやコラーゲンの構造を制御し, ECMの構築に重要な役割を果たしていると考えられる。これまで我々の研究で, 新規PGを含めた4種の低分子PGの加齢変化, 構造解析及び骨化のメカニズムの解明を行ってきた^{1) 2)}。さらに, 近年, PGとコラーゲン (I, II, III, IV, XIV型) の結合性が報告され, PGとその周囲の分子との関係も明らかになりつつある。しかし, ヒト黄色靭帯に豊富に含まれるエラスチンと相互関係を生化学的に明確に報告した例はない。我々はこの両者に着目し, 表面プラスモン共鳴バイオセンサーを用いてその親和性を検討した。

【実験方法】

材料

腰椎手術時に摘出された黄色靭帯 70g を用いた。PG及びエラスチンの調整

PGの精製方法は, 岡田らの方法¹⁾ に準じて行った。黄色靭帯を Physcotron (Niti-on, Funabashi, Japan) によって液体窒素下に細粉化し, プロテアー

ゼ阻害剤 (10mM EDTA, 10mM NEM, 5mM ベンズアミジン塩酸塩, 1mM PMSF) の存在下で質量量の10倍量の4M グアニジン塩酸 / 50mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) (以下4M グアニジン塩酸と略記する) により抽出した。抽出液を遠心後, 密度調整 (1.45g/ml) し, PG画分を回収した。つづいて, このサンプルを透析により7M 尿素 / 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) に置換し, DEAE-Sephacel イオン交換カラム (4.6 × 35.5cm) で溶出した。溶出液をカルバゾール硫酸法³⁾ 及び Bio-Rad protein assay法⁴⁾ で検出した。カルバゾール硫酸法にて得たウロン酸陽性分画をPG分画とし, 4M グアニジン塩酸により平衡化した Sepharose CL-4B ゲル濾過カラム (3.3 × 175cm) で溶出し, 溶出液を再度カルバゾール硫酸法にて高ウロン酸分画を得た。この画分を2M グアニジン塩酸に24時間透析し, 同緩衝液で平衡化した Octyl-Sepharose CL-4B 疎水性カラム (2.4 × 100cm) にアプライした⁵⁾。そして, 2—6M グアニジン塩酸の直線的濃度勾配を利用して溶出し, 低分子PG画分を回収した。

また, 4M グアニジン塩酸での不溶画分を熱アルカリ抽出法⁷⁾ に従い, 0.1N NaOHで加水分解し, 生じた不溶性エラスチンを0.25M シュウ酸で可溶化し, α -エラスチンと β -エラスチンを精製した。

電気泳動

ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は, 5—20% acrylamide gradient slab gel を用い, 泳動後, ゲルを

Coomassie brilliant blue R-250, つづいて Allcian blue で染色した⁶⁾。

アミノ酸組成分析

PG 及びエラスチンを 6N 塩酸を用いて, 各々 135 °C で 3 時間, 110 °C で 24 時間, 減圧シール下に塩酸加水分解処理を行った。その加水分解液を減圧凝固し, 蒸留水に再溶解した。これらの溶液をアミノ酸自動分析計 (日立 L-8500) を用いて分析した。

表面プラズモン共鳴バイオセンサー

α -エラスチンを CM-5 センサーチップに固定化し, PG を緩衝液 (HEPES, 0.005 % polysorbate 20, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, pH7.4) に溶解後, 解析した。また, 親和性に及ぼす金属イオンの影響を知るために, ZnCl₂, CoCl₂, MgCl₂, CaCl₂ を EDTA を除去した緩衝液に溶解させ, PG を金属イオンで飽和後, 同様に解析した。

【結果】

低分子 PG の分離, 精製

4M グアニジン塩酸により PG を抽出後, 超遠心, DEAE-Sepacel イオン交換クロマトグラフィー, Sepharose CL-4B ゲル濾過クロマトグラフィー, Octyl-Sepharose CL-4B 疎水性クロマトグラフィーにより, 低分子 PG 画分を回収した。疎水性クロマトグラフィーにより, カルバゾール反応陽性の 3 つの低分子 PG のピークが見られた。カラムサイズを長くすることにより 3 つの PG を分離することができ, それぞれピーク 1, ピーク 2, ピーク 3 とした。PG 及びエラスチンの SDS-PAGE による分析

各 PG の分子量を測定するため, ピーク 1, 2, 3 の PG を SDS-PAGE を用いて分析した。ピーク 1, 2 は 70000 — 95000, ピーク 3 は 180000 — 200000 にバンドを示し, それぞれを PG1, PG2, PG3 と称した。また, 0.25 M シュウ酸によって可溶化されたエラスチンを SDS-PAGE で分析したところ, 分子量 70000 — 85000 に単一のバンドが現れ, 過去に報告されている α -エラスチンであることが示唆された。

PG のコアタンパクアミノ酸組成及びアミノ酸配列解析

PG1 のアミノ酸組成分析の結果, ヒト骨デコリン及びヒト胎児膜と比較的相似性を有していた。

エラスチンのアミノ酸組成分析

アミノ酸組成自動分析計での測定結果は, 後縦靱帯におけるエラスチンの組成とほぼ一致していた。表面プラズモン共鳴バイオセンサーによる分析

PG とエラスチンとの親和性の存在が認められた。また, ZnCl₂ を溶解した緩衝液を使用して両者の関係を検討したところ, 両者の親和性が増大した。CaCl₂, MgCl₂, CoCl₂ による親和性の変化は認められなかった。

【考察】

ヒト黄色靱帯より, 3 種の PG を精製し, その構造を解析した。PG1 はデコリン, PG3 はバイグリカンであると同定された。PG2 の分子サイズはデコリンと同程度で, バイグリカンよりも小さく, 約 85000 Da であった。しかし, デコリンとはクロマトグラフィー上の挙動が異なり, そのコアタンパクは抗デコリン抗体とは反応しなかった。またこの PG の GAG 糖鎖は, デルマタン硫酸とコンドロイチン硫酸で構成され, 前者の割合が増加していた。したがってデコリンとは異なる PG であることが, 示唆された。

黄色靱帯, 後縦靱帯にはエラスチンがそれぞれ約 46 %, 7 % 含まれ, 弾性線維としての役割を担っている⁸⁾。特に黄色靱帯ではその量が多いことにより, 石灰化, 骨化にも何らかの関係があると考えられる。PG がエラスチンの構造を制御し, また加齢によって弾性線維にカルシウムが沈着するとの報告もあることから⁹⁾, 弾性線維が骨化の場を提供していることが示唆された。

ZnCl₂ を含む緩衝液で PG をインキュベートし, エラスチンとの相互関係を調べた結果, ZnCl₂ 非存在下での親和性が増大した。Zn²⁺ は生体内に存在する極微量な陽イオンで, matrix metalloproteinase のような酵素の触媒作用を活性化させたり, タンパク質の特定部位に結合し, コンフォメーションを安定化させるなどの重要な役割を果たしている¹⁰⁾。このことから, エラスチンまたは PG に結合した Zn²⁺ が, 各々のタンパク質のコンフォメーションを変化させ, 両者の親和性を増大させたと考えられた。

【結論】

1. ヒト黄色靱帯より異なる 3 つの低分子 PG 及び α -エラスチンを分離した。
2. 表面プラズモン共鳴バイオセンサーにより, PG と α -エラスチンの結合性が示唆された。
3. PG と α -エラスチンの結合性に Zn²⁺ の関連性が示唆された。

【参考文献】

- 1) 岡田晶博, 原田征行, 植山和正ほか: 年代別黄色靭帯の生化学的分析—加齢に伴うプロテオグリカンの変化—. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成2年度報告書: 124-132, 1991.
- 2) 成田穂積, 原田征行, 植山和正ほか: 黄色靭帯のプロテオグリカン. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成6年度報告書: 98-100, 1995.
- 3) 竹内和成, 原田征行, 植山和正ほか: 黄色靭帯骨化症に伴う細胞外マトリックスの変化. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成7年度報告書: 123-126, 1996.
- 4) 湯川昌広, 原田征行, 植山和正ほか: ヒト黄色靭帯の新規小型プロテオグリカン. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成10年度報告書: 87-90, 1998.
- 5) Bitter, T., Muir, H.M.: A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, 4, 330-334, 1962.
- 6) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254, 1976.
- 7) Choi, H.U., Johnson, T.L. et al.: Characterization of the dermatan sulfate proteoglycans, DS-PGI and DS-PGII, from bovine articular cartilage and skin isolated by octyl-sepharose chromatography. *J. Biol. Chem.*, 264, 2876-2884, 1989.
- 8) Fisher, L.W., Termine, J.D. et al.: Proteoglycans of developing bone. *J. Biol. Chem.*, 258, 6588-6594, 1983.
- 9) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76, 4350-4354, 1979.
- 10) Lansing AI, Rosenthal TB, et al.: The structure and chemical characterization of elastic fibers as revealed by elastase and by electron microscopy. *Anat Rec.*, 114, 555-575, 1952.
- 11) Hiroshi Nakagawa, Yoshihiro Mikawa et al.: elastin in the human posterior longitudinal ligament and spinal dura. *Spine*, 19, 2164-2169, 1994.
- 12) V. Podrazky, S. Stokrova et al.: Elastin-proteoglycan interaction. *Connective tissue res.*, 4, 51-54, 1975.
- 13) Vivian W-C Yang, Steven R et al.: Decorin is a Zn²⁺ Metalloprotein. *J. Biol. Chem.*, 274, 12454-12460, 1999.