

200/0254

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13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井ノ上 逸朗

平成14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 | 9 |
| 原田征行 | |

| | |
|---|----|
| 2. OPLLの進展予防・治療を目的とした間葉系幹細胞の骨芽細胞分化制御機構 の解明 | 12 |
| 米 和徳 | |

| | |
|-------------------------------|----|
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 16 |
|-------------------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 21 |
|---------------------------|----|

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異所性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。その成因が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、とりわけ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マイクロパチーの第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。疾患感受性遺伝子同定は直接成因と関連しており、遺伝子同定が成因解明のみならず新規治療法開発にも大きく寄与する。本研究では OPLL 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10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できゲノム全域での連鎖解析を完了している。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 (SNP) をもちいたアソシエーション・スタディをおこなっている。連鎖領域には189個の遺伝子が存在しており、そのうち100個についてアソシエーション・スタディを終了し、カイ検定により10個の SNP で有意差を認めている。これらには偽陽性も含まれているものの、真の感受性遺伝子同定に近づいているといえるだろう。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 青森県立中央病院 院長
米 和徳 鹿児島大学・医学部整形外科 助教授

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状態という捉え方もでき、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(米、原田担当)

疾患遺伝子同定のために、サンプル収集が重要であり、成功にいたるかどうかは収集されたサンプルの数、質に負うところが大きい。OPLL 遺伝子座同定のため、罹患同胞対連鎖解析による、染色体上での遺伝子座の特定を試みた。OPLL に罹患している同胞対は鹿児島大学(米)、弘前大学(原田(現青森県立中央病院))により収集された。現在までのところ141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・スタディに必要となる 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、200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)、骨化している頰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で管理している。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。

遺伝子と疾患関連については人種差があることがよく知られている。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。

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400個のマーカーから成る Linkage mapping set version II をもちいた。ゲノム全域を平均8センチモルガン間隔で網羅できる。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8.7 cM、最大インターバルは26.8 cM 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、浸透度、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) SNP によるアソシエーション・スタディ

連鎖領域に存在する189個の遺伝子すべての解析をおこなっている。Single nucleotide polymorphism (SNP) を用いたアソシエーション・スタディによる感受性遺伝子同定を試みた。SNP は以下のデータベースから得た。

<http://snp.cshl.org>

http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html

データベースに SNP が存在していない遺伝子については独自に SNP を直接シーケンスにより開発した。データベース SNP は日本人において多型性が認められないことが多いので、直接シーケンスにより随時多型性を確認した。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。SNP

タイピングは化学発光反応によりシーケンスをおこなう PYROSEQUENCING 法を採用している。この方法により、1600タイピング/1日が可能である。かつそのタイピング精度は高い。SNP 頻度は患者・対照関連解析にてカイ検定を用い解析した。必要に応じて Odds 比をだしている。有意差を認めた SNP については、さらにいくつかの遺伝子内 SNP を検討し、ハプロタイプ、連鎖不平衡解析を用い、詳細な遺伝解析をおこなっている。ハプロタイプ解析は Arlequin プログラムおよび, SNPalyze プログラム(Dynacom)を用いた。

B-4) 靱帯細胞培養(米、原田担当)

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、処理される棘間靱帯を採取し、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 (hMSC)培養および分化誘導

MSCは骨、軟骨、靱帯、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8300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(141対)。OPLL の相対危険率は10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う検定力を有すると判断できた。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。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 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、20センチモルガンにわたる連鎖領域からの感受性遺伝子同定を試みた。

C-2)21番染色体長腕での OPLL 感受性遺伝子探索

OPLL で連鎖を認めた領域(21q22)は東京大医科研 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解読されている。これらの遺伝情報に従うと、連鎖領域に189個の遺伝子が存在していた。ポジショナルクローニングを目的とし、すべての遺伝子について SNP によるアソシエーション・スタディをお

こなうことを計画している。これまで100遺伝子、400SNP についてアソシエーション・スタディを終了している。そのうち10カ所の SNP でカイ検定による有意差を得ている。これまでのところもっとも強い有意差は $P=0.0005$ である。当然、その中には偽陽性が含まれるものと予想されるので、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い、感受性遺伝子同定を目指している。

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 -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

近年、いくつもの 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ものの、Common Disease の責任遺伝子同定はまだ

まだ遠い道りである。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 のみであろう。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。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)からのポジショナルクローニングによる遺伝子同定を目指す。連鎖領域に存在する189遺伝子のうち100遺伝子、400SNP についてアソシエーション・スタディを完了している。有意な結果を得た SNP をいくつか同定できているので、感受性遺伝子同定に必ず結実するものと信じている。得られた有意差については偽陽性の可能性があるので、ハプロタイプ、連鎖不平衡解析を組み合わせて、確実な遺伝子同定を試みている。

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。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 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る。

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21番染色体で強い連鎖を得た(最大LOD=3.6 at D21S263)。連鎖領域からのポジショナルクローニングを目的に領域遺伝子189個のうち100個について解析終了した。これまでのところある遺伝子でP=0.0005という非常に強い有意差を得ている。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

Nakajima, T., Inoue, I., Cheng, T., Lalouel, J-M. 2002. Molecular cloning and functional analysis of a factor that binds to the proximal promoter of human angiotensinogen. *J. Hum. Genet.* 47, 7-13.

Nakajima, T., Jorde, L.B., Ishigami, T., Umemura, S., Emi, M., Lalouel, J-M., Inoue, I. 2002. Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am. J. Hum. Genet.* 70, 108-123.

Onda, H., Kasuya, H., Yoneyama, T., Takakura, K., Hori, T., Takeda, J., Nakajima, T., Inoue, I. 2001. Genome wide linkage and haplotype association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7q11. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 804-819.

Furushima, K., Shimo-onoda, K., Maeda, S., Nobukuni, T., Ikari, K., Koga, H., Komiya, S., Nakajima, T., Harata, S., Inoue, I. 2001. Large scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Miner. Res.* 17, 128-137.

Mori, H., Ikegami, H., Kawaguchi, Y., Seino, S., Yokoi, N., Takeda, J., Inoue, I., 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 γ 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, I., 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* 44, 906-9.

Maeda, S., Ishidou, Y., Koga, H., Taketomi, E., Ikari, K., Komiya, S., Takeda, J., Sakou, T., Inoue, I. 2001. Functional impact of human collagen α 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., Takeda, J. 2001. Assignment of SLC17A6 (alias DNPI), the gene encoding brain/pancreatic islet-type Na^+ -dependent inorganic phosphate cotransporter to human chromosome 11p14.3. *Cytogenet. Cell Genet.* 92, 167-169.

Havelka, S., Vesela, M., Pavelkova, A., Halman, L., Ruzickova, S., Koga, H., Maeda, S., Inoue, I.,

2001. Are diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) and ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL) genetically related? *Annal. Rheum. Dis.* ARD: 118.
- 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., 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., 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.
- 井ノ上逸朗 多因子病の遺伝子解析の進め方
内分泌・糖尿病科 科学評論社 14(1)3-10, 2002.
- 井ノ上逸朗 後縦靭帯骨化症とコラーゲン11A2 遺伝子
整形・災害外科 金原出版 44(11)1251-1253, 2001.
- 古島弘三 井ノ上逸朗 後縦靭帯骨化症の原因遺伝子解明に向けて
BIO Clinica 北隆館 16(9)28-33, 2001.
- 井ノ上逸朗 罹患同胞対連鎖解析法による疾患遺伝子研究
アレルギー科 化学評論科 11(6)554-560, 2001.
- 井ノ上逸朗 SNP 解析の実際
血液・免疫・腫瘍 メディカルレビュー社 6(4)347-352, 2001.
- 井ノ上逸朗 くも膜下出血の SNP 解析
日医大誌 68(5)422-425, 2001.
- 坂上拓郎 井ノ上逸朗 SNPs タイピング技術の進歩と SNPs の今後
ゲノム医学がわかる 羊土社 108-114, 2001.
- 井ノ上逸朗 後縦靭帯骨化症の責任遺伝子解明に向けて
蛋白質 核酸 酵素 46(16)2289-2294, 2001.
- 坂上拓郎 井ノ上逸朗 SNP を用いた遺伝子解析の実際と展望
アレルギー・免疫 8(10)12-19, 2001
2. 学会発表
23rd Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research
【Phoenix, Arizona, USA】October 12-16, 2001
Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell could be regulated by b-catenin pathway.

S. Maeda^{1,2}, K. Shimo-Onoda^{1,2}, T. Nobukuni¹, K. Hayashi², H. Koga², S. Matsunaga², K. Yone², S. Komiya², I. Ituro¹.

¹Division of Genetic Diagnosis, The Institute for Medical Science, The University of Tokyo.

²Department of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine, Kagoshima University.

51st Annual Meeting of the American Society of Human Genetics

【San Diego, USA】October 12-16, 2001

A thorough linkage disequilibrium analysis within the human angiotensinogen gene (*AGT*)

T. Nakajima¹, T. Ishigami², S. Umemura³, M. Emi⁴, J-M Lalouel², I. Inoue¹.

¹Division of Genetic Diagnosis, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan; ²Department of Human Genetics, University of Utah Health Sciences Center, Salt Lake City, UT; ³Internal Medicine, Yokohama City University, Yokohama, Japan; ⁴Department of Molecular Biology, Institute of Gerontology, Nippon Medical School, Kawasaki, Japan;

第19回日本骨代謝学会

【名古屋市】名古屋国際会議場 8月10, 11日

ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化におけるβ-cateninの関与

前田真吾^{1,2}、下小野田一騎^{1,2}、信国宇洋²、古賀公明¹、林協司¹、松永俊二¹、米和徳¹、小宮節郎¹、井ノ上逸朗²

¹ 鹿児島大学医学部整形外科学教室

² 東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断

第16回日本整形外科学会基礎学術集会

【広島市】広島国際会議場 10月18, 19日 (広島大学医学部整形外科)

ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化とβ-cateninの機能的関連

前田真吾^{1,2}、下小野田一騎^{1,2}、信国宇洋²、古

賀公明¹、林協司¹、松永俊二¹、米和徳¹、小宮節郎¹、井ノ上逸朗²

¹ 鹿児島大学医学部整形外科学教室

² 東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断

平成 13 年度 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班第 2 回班会議

【東京都】東京医科大学病院 平成 14 年 2 月 2 日

間葉系幹細胞の骨芽細胞分化におけるWntシグナル系の関与

前田真吾^{1,2}、信国宇洋¹、下小野田一騎^{1,2}、林協司²、古賀公明²、松永俊二²、米和徳²、小宮節郎²、井ノ上逸朗¹

¹ 東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断

² 鹿児島大学医学部整形外科学教室

平成 13 年度脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 第 2 回班会議

【東京】東京医科大学 平成 14 年 2 月 2 日

連鎖不平衡マッピングを用いた脊椎後縦靭帯骨化症の感受性遺伝子同定

田中利弘^{1,2}、古島弘三^{1,2}、藤哲²、前田真吾^{1,3}、下小野田一騎^{1,3}、小宮節郎³、原田征行²、井ノ上逸朗¹

¹ 東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断

² 弘前大学医学部整形外科学教室

³ 鹿児島大学医学部整形外科学教室

第 16 回日本整形外科学会基礎学術集会

【広島市】平成 13 年 10 月 18, 19 日

マイクロアレイによるヒト間葉系幹細胞での骨分化関連遺伝子の包括的発現検討

下小野田一騎^{1,2}、前田真吾^{1,2}、信国宇洋²、古賀公明¹、林協司¹、松永俊二¹、米和徳¹、小宮節郎¹、井ノ上逸朗²

¹ 鹿児島大学医学部整形外科

² 東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断

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 青森県立中央病院 院長

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。現在のところ、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、トランスレーショナル・リサーチの必要性がある。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。以下の2点で主任研究者への協力体制を築く。

- 1) OPLL 患者、非患者対照の収集
- 2) 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および青森県下にて罹患同胞対 40 対、OPLL 患者 80 例、対照 60 例ほど収集できており、現在も継続中である。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 患者および対照として頸椎症性脊髄症患者の手術時に摘出、処理される棘間靭帯を採取し、初代培養系を確立した。靭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。OPLL 患者靭帯細胞において、エラスチンとプロテオグリカンの相互作用が弱くなっていることを見出し、骨化傾向との関連が示唆された。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症(OPLL)は脊柱管内の後縦靭帯が異所性骨化し、脊髄を圧迫することで重篤な脊髄麻痺を起こす疾患である。発症には遺伝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。OPLL 患者 DNA 収集が重要であり、OPLL 患者について遺伝子型と表現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。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、処理される棘間靭帯を培養細胞とし、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靭帯細胞を準備することで、将来の解析に対応する。

B. 研究方法

B-1) 日本人サンプル収集

頰椎単純 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(50歳以上)で頰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および青森県下において、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) 靭帯細胞培養

椎弓切除手術時に摘出される靭帯を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ている。主要成分である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、両者に差を認めない。しかしながら、エラスチンと細胞外マトリックスのプロテオグリカンとの相互作用において、患者細胞では弱い結合を認め、骨化傾向とのなんらかの関連があるものと示唆された。

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る、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

【論文発表】

赤石孝一、古川賢一、山本祐司、植山和正、丹野雅彦、原田征行：後縦靭帯骨化症患者由来の靭帯細胞において CTGF/Hcs24 により発現調節される遺伝子の解析。弘前医学 Vol.52 (2):66-71 2001

植山和正、岡田晶博、越後谷直樹、横山徹、

原田征行：脊髄髄内腫瘍の治療。臨床整形外科 Vol.36(4):373-378 2001

猪狩勝則、古島弘三、原田征行、前田真吾、古賀公明、井ノ上逸朗：後縦靭帯骨化症のゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析-ヒト 21 番染色体への局在同定-。臨床整形外科 Vol.36(4):555-558 2001

植山和正、岡田晶博、越後谷直樹、横山徹、原田征行：頭蓋頸椎移行部異常-硬膜外病変・脊椎先天奇形-。脊椎脊髄ジャーナル Vol14(6):520-524

【学会発表】

K. Ikari,J. Furusima,S. Maeda,H. Koga,S. Komiya,S. Harata and I. Inoue. Gene Mapping of the Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine by Genome Screen. Orthopaedic Research Society 48th Annual Meeting, Feb.10-13,2002 Dallas.

Y. Yamamoto,K. Fukawa,K. Ueyama,M. Tanno,K. Akaishi,T. Takanashi,M. Takigawa,S. Harata. Roles of CTGF/Hcs24 in the initiation and development of the posterior longitudinal ligament of the spine. Orthopaedic Research Society 48th Annual Meeting, Feb.10-13,2002 Dallas.

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 の進展予防・治療を目的とした間葉系幹細胞の骨芽細胞分化制御機構の解明

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

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は肥厚した後縦靭帯が骨化することが基本的な病態であるが、なぜ靭帯細胞あるいは繊維芽細胞が骨に分化するのかはほとんど分かっていないし、そのメカニズムの解明こそが OPLL の進展予防と治療に結びつくだらう。我々は骨芽細胞を始め、軟骨細胞、繊維芽細胞、脂肪細胞など多様な間葉系細胞への分化能を有するヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell : hMSC) の OPLL への関与を疑い、MSC の分化を骨に向かわせる因子を同定すべく、特に近い関係にある脂肪への分化と比較しながら遺伝子発現の変化を観察した。分化誘導前と後 24 時間の遺伝子発現変化をマイクロアレイをもちいて網羅的に観察した。その結果骨芽細胞分化誘導でのみ発現が増加した遺伝子数 10 個につきその発現レベルの経時的パターンを観察すべく定量的 RT-PCR を分化誘導 0 日から 11 日まで行った。骨芽細胞分化初期特異的に発現パターンが増加傾向を呈する遺伝子を抽出し、その中からソルチリンに着目しその機能的影響について検討した。ソルチリン cDNA を相同組換えにより導入したアデノウイルスを作成し MSC に感染させ、その骨芽細胞分化への影響を検討した。骨芽細胞分化のマーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性には影響はなかった、ところがコッサ染色で観察した細胞外マトリックスの石灰化はソルチリンにより亢進していた。この作用機序を理解する為、リガンドの一つリポプロテイン・リパーゼ (LpL) を MSC 培養液に添加して骨芽細胞分化を観察したところ、やはり ALP 活性には影響がなかったが、石灰化はソルチリンとは逆に量依存的に抑制された。そこでこの作用がソルチリンと関係あるか LpL とソルチリンを MSC に同時に作用させ骨芽細胞分化を検討したところ、ソルチリン発現細胞は LpL による石灰化抑制を受けなかった。LpL は主に脂肪細胞で産生されヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合してあるいは遊離して骨髄内に豊富に存在すると考えられる。骨芽細胞分化が進むと石灰化の場である細胞外マトリックスを構成するプロテオグリカンや ALP、オステオポンチン、オステオカルシンなどが産生される。LpL はそのプロテオグリカンとの親和性から骨芽細胞が構築するマトリックスに結合し正常な石灰化を阻害するのではないかと予想された。ソルチリンは LpL との結合後細胞内に取り込まれ LpL はリソソームで分解されるとの報告があることから、ソルチリンは骨芽細胞分化初期に発現量を増やして LpL を取り込み、石灰化を進行させやすくする役割があるのではないかと考えられた。ソルチリンの石灰化促進作用を阻害するか、LpL の作用を亢進させることが OPLL の進展予防や治療につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

OPLL の組織学的検討から内軟骨性骨化と膜性骨化の両者の関与が指摘されているが、いずれにしても繊維芽細胞から OPLL に進展するには二つの可能性が考えられる。一つは繊維芽細胞が直接骨に分化する可能性、もう一つは靭帯組織に含まれる、あるいは血流によって運ばれて来る未分化な細胞が分化する可能性である。骨芽細胞と脂肪細胞はヒト間葉系幹細胞 (hMSC) 由来の共通の前駆細胞から分化する。OPLL と対極にある骨粗鬆症や加齢に伴う骨塩量の減少は骨芽細胞の減少と脂肪細胞の増加と関係があると報告されており、骨量が多いとされる OPLL 患者はその逆の状態にあることが予想できる。後縦靭帯において骨芽細胞に分化しようとする細胞を脂肪細胞への分化に振り向けることができれば OPLL の治療につながると期待され、これらの分化方向決定因子を見出すことが本研究の目的である。

B. 研究方法

hMSC の骨芽細胞と脂肪細胞の分化に伴う遺伝子発現変化を網羅的にマイクロアレイにより検討した。解析した遺伝子は約 8000 遺伝子である。また分化に伴う経時的遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR を用いて検討した。骨芽細胞分化誘導には、0.1 μM デキサメタゾン、0.05 mM アスコルビン酸 そして 10 mM β -グリセロフォスフェートを、脂肪細胞分化誘導には 1 μM デキサメタゾン、0.2 mM インドメタシン、0.01 mg/ml インシュリンそして 0.5 mM 3-イソブチル-1-メチルキサンチンを添加した。骨芽細胞分化初期でのみ発現が増加する遺伝子を抽出した中にソルチリンを認めた。hMSC はプラスミドによるトランスフェクションがほぼ不可能なので、導入効率を考えソルチリンを強制発現させるア

デノ・ウイルスを作成して hMSC に誘導し骨芽細胞分化を観察した。LpL を 0, 1, 10, 100 ng/ml で添加し骨芽細胞分化への影響を検討した。LpL とソルチリンの相互作用を検討する目的で、LpL 添加と同時にソルチリンを発現させ、骨芽細胞分化誘導をおこなった。ALP 染色とコッサ染色により骨芽細胞分化度を観察し、染色強度は NIH イメージ 1.62 をもちいて定量化した。

C. 研究結果

ソルチリン遺伝子発現は骨芽細胞分化 1 日目より増加して 1 週間持続、以後減少した。LPL は脂肪細胞分化で徐々に強く増加したが骨芽細胞分化でも 3 日目より弱い発現を認めた。ソルチリンのアデノ・ウイルスによる発現は RT-PCR で確認された。ソルチリン強制発現により ALP には変化がなかったが、骨芽細胞分化に伴う石灰化が 2 倍近く促進された。逆に LPL 添加により石灰化は量依存的に抑制された。すなわち LpL 添加により細胞の形は丸みを帯び脂肪細胞様に変化し、石灰化は 100ng/ml で 1/2 以下に減少した。LpL もまた ALP 活性には影響を与えなかった。ソルチリンと LPL を同時に作用させると、ソルチリンは LPL による石灰化抑制の影響を受けず、LPL 無添加細胞と同程度の石灰化を維持した。

D. 考察

LpL は脂肪細胞により産生されその表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合して、あるいは細胞外に遊離して存在すると考えられている。一方、骨芽細胞分化が進むとプロテオグリカンや ALP を含む緻密な細胞外マトリックスが構築され、ここにリン酸カルシウム結晶が沈着して骨形成が進行する。ALP 活性に影響を認めなかったことと、そのプロテオ

グリカンへの親和性からLpLによる石灰化抑制は石灰化の場である細胞外マトリックスへの作用が考えられた。ソルチリンはLpLを細胞質内に取り込みその量を減少させるとの報告があり、骨芽細胞分化開始に際し石灰化抑制因子であるLpLを取り込み石灰化に適した環境を整えるのではないかと予想された。ソルチリンとLpLとの結合はヘパリンや Receptor-associated protein (RAP)で阻害されることが報告されており、OPLLの治療を考える時、これらを通してソルチリンによるLpLの取込みを抑制、あるいはLpLの作用を促進させることが後縦靭帯において出来れば、新たな治療へのアプローチとして有用性があるだろう。

E. 結論

1. LpLはhMSC骨芽細胞分化に伴う石灰化を抑制する。それは石灰化に必要な細胞外マトリックスの構築に影響を与える結果であることが予想された。
2. ソルチリンはおそらくLpLを取り込むことで石灰化を促進する作用を担う。

F. 研究発表

1. 論文発表

Setoguchi, T., Yone, K., Matsuoka, E., Takenouchi H., Nakashima, K., Sakou, T., Komiya, S., Izumo, S. 2001. Traumatic injury-induced BMP7 expression in the adult rat spinal cord. *Brain Res.* 921, 219-225

Yamamura, I., Yone, K., Nakahara, S., Nagamine, T., Baba, H., Uchida, K., Komiya, S. 2002. Mechanism of destructive pathologic changes in the spinal cord under chronic mechanical compression. *Spine* 27, 21-26.

米和徳、小宮節郎 MRIのすべて Up to date II. 各疾患の画像診断、頰椎後縦靭帯骨化症 脊椎脊髄ジャーナル 14:542-544, 2001

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

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の 編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|----------------|-------------------------------------|---------------|------------|------|-----|------|---------|
| 坂上拓郎, 井ノ上逸朗 | 1. SNPs タイピング技術の 進歩と SNPs の今後 | | ゲノム医科学がわかる | 羊土社 | 東京 | 2001 | 108-114 |

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻名 | ページ | 出版年 |
|--|--|----------------------------|----|---------|------|
| Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel JM, Inoue I | Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations | <i>Am. J. Hum. Genet.</i> | 70 | 108-123 | 2002 |
| 井ノ上逸朗 | 多因子病の遺伝子解析の 進め方 | 内分泌・糖尿病科 | 14 | 3-10 | 2002 |
| Furushima K, Shimo-onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiyama S, Nakajima T, Harata S, Inoue I | Large-Scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine | <i>J. Bone Miner. Res.</i> | 17 | 128-137 | 2002 |
| Maeda S, Ishidou Y, Koga H, Taketomi E, Ikari K, Komiyama S, Takeda J, Sakou T, Inoue I | Functional impact of human collagen $\alpha 2$ (XI) gene polymorphism in pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine | <i>J. Bone Miner. Res.</i> | 16 | 948-957 | 2001 |
| 井ノ上逸朗 | SNP 解析の実際 | 血液・免疫・腫瘍 | 6 | 19-24 | 2001 |
| Yabe I, Sasaki H, Yamashita I, Tashiro K, Tatei A, Suzuki Y, Kida H, Takiyama Y, Nishizawa M, Hokezu Y, Nagamatsu K, Oda T, | Predisposing chromosome of spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) in Japanese | <i>J. Med. Genet</i> | 38 | 328-333 | 2001 |

| | | | | | |
|--|--|-------------------------------|-----|---------|------|
| Ohnishi A, Inoue I, Hata A | | | | | |
| Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Takakura K, Hori T, Takeda J, Nakajima T, Inoue, I | Genome-wide linkage and haplotype association studies map intracranial aneurysm to chromosome 7 | <i>Am. J. Hum. Genet.</i> | 69 | 804-819 | 2001 |
| Nakajima, T., Inoue, I., Cheng, T., Lalouel, J-M. | Molecular cloning and functional analysis of a factor that binds to the proximal promoter of human angiotensinogen. | <i>J. Hum. Genet.</i> | 47 | 7-13. | 2002 |
| Mori, H., Ikegami, H., Kawaguchi, Y., Seino, S., Yokoi, N., Takeda, J., Inoue, I., 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. | 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. | <i>Diabetes</i> | 50 | 891-894 | 2001 |
| Aihara, Y., Onda, H., Teraoka, H., Yokoyama, Y., Seino, Y., Kasuya, H., Hori, T., Tomura, H., Inoue, I., Kojima, I., Takeda, J. | Assignment of SLC17A6 (alias DNPI), the gene encoding brain/pancreatic islet-type Na ⁺ - dependent inorganic phosphate cotransporter to human chromosome 11p14.3. | <i>Cytogenet. Cell Genet.</i> | 92 | 167-169 | 2001 |
| Havelka, S., Vesela, M., Pavelkova, A., Halman, L., Ruzickova, S., Koga, H., Maeda, S., Inoue, I., | Assignment of SLC17A6 (alias DNPI), the gene encoding brain/pancreatic islet-type Na ⁺ - dependent inorganic phosphate cotransporter to human | <i>Cytogenet. Cell Genet.</i> | ARD | 118 | 2001 |

| | | | | | |
|---|---|-----------------------------------|--------|-----------|------|
| | chromosome 11p14.3. | | | | |
| 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. | Mutations in the small heterodimer partner gene are associated with mild obesity in Japan. | <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> | 98 | 575-580 | 2001 |
| Maeda, S., Koga, H., Matsunaga, S., Numasawa, T., Takeda, J., Harata, S., Sakou, T., Inoue, I. | Gender-specific haplotype association of collagen $\alpha 2$ (X1) gene in ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. | <i>J. Hum. Genet.</i> | 46 | 1-4 | 2001 |
| 井ノ上逸朗 | 後縦靭帯骨化症とコラーゲン 11A2 遺伝子 | 整形・災害外科 | 44 | 1251-1253 | 2001 |
| 古島弘三, 井ノ上逸朗 | 後縦靭帯骨化症の原因遺伝子 解明に向けて | <i>BIO Clinica</i> | 16 | 28-33 | 2001 |
| 井ノ上逸朗 | 罹患同胞対連鎖解析法による 疾患遺伝子研究 | アレルギー科 | 11 | 554-560 | 2001 |
| 井ノ上逸朗 | くも膜下出血の SNP 解析 | 日医大誌 | 68 | 422-425 | 2001 |
| 井ノ上逸朗 | 後縦靭帯骨化症の責任遺伝子 解明に向けて | 蛋白質 核酸 酵素 | 46 | 2289-2294 | 2001 |
| 坂上拓郎, 井ノ上逸朗 | 2. SNPs タイピング技術の 進歩と SNPs の今後 ゲノム医学がわかる | 羊土社 | | 108-114 | 2001 |
| 坂上拓郎, 井ノ上逸朗 | SNP を用いた遺伝子解析の 実際と展望 | アレルギー・免疫 | 8 | 1100-1107 | 2001 |
| | | | | | |
| 赤石孝一、古川賢一、山本祐司、植山和正、丹野雅彦、原田征行 | 後縦靭帯骨化症患者由来の靭帯細胞において CTGF/Hcs24 により発現調節される遺伝子の解析 | 弘前医学 | 52 (2) | 66-71 | 2001 |
| 植山和正、岡田晶博、越 | 脊髄髄内腫瘍の治療. | 臨床整形外科 | 36(4) | 373-378 | 2001 |

| | | | | | |
|--|---|------------|--------|---------|------|
| 後谷直樹、横山徹、原田 征行 | | | | | |
| 猪狩勝則、古島弘三、原 田征行、前田真吾、古賀 公明、井ノ上逸朗 | 後縦靱帯骨化症のゲノム全域 での罹患同胞対連鎖解析-ヒ ト 21 番染色体への局在同定- | 臨床整形外科 | 36(4) | 555-558 | 2001 |
| 植山和正、岡田晶博、越 後谷直樹、横山徹、原田 征行 | 頭蓋頸椎移行部異常-硬膜外 病変・脊椎先天奇形- | 脊椎脊髄ジャーナル | 014(6) | 520-524 | 2001 |
| | | | | | |
| Setoguchi, T., Yone, K., Matsuoka, E., Takenouchi H., Nakashima, K., Sakou, T., Komiya, S., Izumo, S. | Traumatic injury-induced BMP7 expression in the adult rat spinal cord. | Brain Res. | 921 | 219-225 | 2001 |
| Yamamura, I., Yone, K., Nakahara, S., Nagamine, T., Baba, H., Uchida, K., Komiya, S. | Mechanism of destructive pathologic changes in the spinal cord under chronic mechanical compression. | Spine | 27 | 21-26 | 2002 |
| 米和徳、小宮節郎 | MRI のすべて Up to date II. 各疾患の画像診断、頸椎後 縦靱帯骨化症 | 脊椎脊髄ジャーナル | 14 | 542-544 | 2001 |