

厚生労働省特定疾患対策研究事業

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

平成13年度研究報告書

主任研究者 原 田 征 行

目 次

班員構成

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班	1
------------------------	---

総合研究報告書

主任研究者 原田征行	3
------------------	---

総括研究報告書

主任研究者 原田征行	7
------------------	---

分担研究報告書

I. 遺伝子解析

後縦靱帯骨化に関する遺伝子の検索	11
------------------------	----

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脊椎脊髄神経外科学

加藤 剛, 波呂 浩孝, 四宮 謙一

脊柱靱帯骨化症におけるプロテオーム解析	14
---------------------------	----

久留米大学医学部整形外科

永田 見生, 津留美智代, 安藤 則行, 佐藤 公昭

脊椎後縦靱帯骨化症の感受性遺伝子解析	20
--------------------------	----

弘前大学整形外科

田中 利弘, 古島 弘三, 藤 哲

鹿児島大学整形外科

下小野田一騎, 前田 真吾, 小宮 節郎

青森県立中央病院

原田 征行

東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門

井ノ上逸朗

脊椎後靱帯骨化症の相関解析：マイクロサテライトマーカーによる原因遺伝子探索	23
---	----

東海大学分子生命化学2

山形 哲司, 猪子 英俊

信州大学法医学教室

太田 正穂

信州大学病院薬剤部

勝山 善彦

鹿児島大学ウイルス学

屋敷 伸治, 園田 俊郎

鹿児島大学整形外科

古賀 公明, 松永 俊二, 武富 栄二, 酒匂 崇

老化促進モデルマウスを用いた第11骨量制御遺伝子座の解析及び後縦靱帯骨化の検索	29
---	----

京都大学大学院医学研究科筋・骨格系病態学分野

清水 基行, 松下 睦, 松村 拓郎, 奥平 修三, 中村 孝志

京都大学再生医科学研究所再生統御学部門

細川 昌則

脊柱靱帯骨化症におけるPTH/PTHrP受容体遺伝子多型の解析	33
千葉大学整形外科	
山崎 正志, 大河 昭彦, 相庭 温臣, 守屋 秀繁	
千葉大学小児科	
皆川 真規	
TGF- β 1 遺伝子多型と脊椎後縦靱帯骨化症との関連	36
富山医科薬科大学整形外科	
川口 善治, 木村 友厚	
東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門	
古島 弘三, 井ノ上逸朗	
脊柱靱帯骨化症症例におけるレプチン受容体遺伝子多型およびNPPS遺伝子多型の解析	38
千葉大学大学院医学研究院整形外科	
大河 昭彦, 相庭 温臣, 池田 義和, 田原 正道, 後藤 澄雄, 山崎 正志	
守屋 秀繁	

II. 脊髄機能

培養脊髄細胞における機械的周期的牽引ストレスの影響	43
福井医科大学医学部整形外科	
内田 研造, 馬場 久敏, 前澤 靖久, 久保田 力, 中嶋 秀明	
実験的脊髄損傷に対するアデノウィルスベクターを用いたBDNF遺伝子導入	47
千葉大学医学部整形外科	
国府田正雄, 山崎 正志, 橋本 将行, 村上 正純, 守屋 秀繁	
千葉大学分子ウィルス	
白澤 浩	
急性脊髄損傷後に発現増加するBMPsは神経幹細胞のアストロサイトへの分化を運命付ける	53
鹿児島大学整形外科・鹿児島大学難治性ウイルス性疾患研究センター分子病理部門・熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野	
瀬戸口啓夫	
鹿児島大学整形外科	
米 和徳, 松永 俊二, 小宮 節郎	
熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野	
柳沢 亮, 落合 和, 中島 欽一, 田賀 哲也	
熊本大学発生医学研究センター胚形成部門転写制御分野・群馬大学小児科	
滝沢 琢己	
鹿児島大学難治性ウイルス性疾患研究センター分子病理部門	
出雲 周二	

III. 骨形成因子

脊柱靱帯骨化症の成因におけるetidronateの影響とestrogenの関与	57
東邦大学整形外科	
香取 勲, 和田 明人, 武者 芳朗, 岡島 行一	
東邦大学免疫学	
岡田 弥生	

RB遺伝子とp21 ^{Cip1} 遺伝子の発現による骨肉腫細胞株Saos-2でのE2F-1の発現変化	62
弘前大学医学部生化学第二	
大川 恵三, 佐藤 衛, 土田 成紀	
弘前大学医学部整形外科	
神 裕道	
骨の力学的刺激に対する応答のシグナリング	66
神奈川歯科大学口腔生化学教室・歯科生体工学教室	
高垣 裕子, 川瀬 俊夫	
骨格成長と骨折治癒過程におけるCTGF/Hcs24の遺伝子発現	69
岡山大学大学院医歯学総合研究科, 口腔生化・分子歯科学	
滝川 正春, 中西 徹, 西田 崇, 縄稚久美子	
岡山大学大学院医歯学総合研究科, 整形外科	
中田 英二	
Histone deacetylase inhibitorによるosteopontin発現の検討	77
和歌山県立医科大学整形外科教室	
南 晋司, 坂田 亮介, 松崎 交作, 玉置 哲也	
ヒト黄色靭帯の細胞外マトリックス構築におけるプロテオグリカンとエラスチンの相互関係	79
弘前大学整形外科・弘前大学医学部第一生化学	
板橋 泰斗	
弘前大学医学部第一生化学	
高垣 啓一, 遠藤 正彦	
弘前大学整形外科	
湯川 昌広, 植山 和正, 藤 哲	
青森県立中央病院	
原田 征行	
後縦靭帯骨化症患者由来の培養脊柱靭帯細胞が産出するグリコサミノグリカン糖鎖の性状	86
弘前大学整形外科	
菊池 明, 原田 征行, 植山 和正, 藤 哲	
弘前大学第一生化学	
高垣 啓一, 遠藤 正彦	
BMPの制御機構	93
東京大学大学院医学系研究科病因・病理学専攻分子病理学	
宮園 浩平	
インスリンシグナルの骨軟骨形成過程における役割の解明	
—IRS-1ノックアウトマウス骨折モデルを用いた検討—	95
東京大学整形外科	
阿久根 徹, 川口 浩, 緒方 直史, 星 和人, 下赤 隆, 星地亜都司	
中村 耕三	
満腹中枢破壊ラットの脊柱靭帯における骨化関連因子に関する免疫組織学的検討(経過報告)	102
東京医科大学整形外科教室	
木村 大, 今給黎篤弘, 山本 謙吾, 町田 英明, 中谷 知薫, 反町 武史	
東京医科大学第二病理学教室	
海老原善郎	

脊柱靱帯骨化症の起点となる石灰化機構に関する微細形態学的・分子生物学的研究	105
東京大学医学部整形外科	
星 和人, 川口 浩, 星地亜都司, 中村 耕三	

IV. 骨・軟骨組成

後縦靱帯骨化症における黄色靱帯の電顕的検討	113
自治医科大学附属大宮医療センター整形外科	
中間 季雄	
自治医科大学整形外科	
星野 雄一, 二瓶 あき	
栃木臨床病理研究所	
菅又 昌雄, 井原 智美	
メカニカルストレスによる後縦靱帯骨化症患者由来靱帯細胞の遺伝子発現の変化 (Differential Display 法を用いて)	117
弘前大学整形外科	
岩崎 弘英, 丹野 雅彦, 植山 和正, 藤 哲	
弘前大学薬理学	
古川 賢一, 元村 成	
青森県立中央病院	
原田 征行	

V. 臨 床

頚椎後縦靱帯骨化症に対する骨化形態と責任高位の電気生理学的検討	123
山口大学整形外科	
金子 和生, 田口 敏彦, 田中 浩, 豊田耕一郎, 河合 伸也	
頚椎 OPLL に対し棘突起形成を併用した頚椎椎弓形成術 (平林変法) の手術成績	127
国立病院岡山医療センター整形外科	
中原進之介, 田中 雅人, 甲斐 信生, 国定 俊之	
頚椎後縦靱帯骨化症患者の術後職業復帰について	130
鹿児島大学医学部整形外科	
神岡 純一, 松永 俊二, 林 協司, 泉 俊彦, 小宮 節郎	
低リン血症性ビタミンD抵抗性くる病に合併した頚椎後縦靱帯骨化症	133
鹿児島大学整形外科	
林 協司, 松永 俊二, 米 和徳, 小宮 節郎	
¹⁸ F-DG-PET による除圧術後の脊髓機能評価と上肢機能の検討	136
福井医科大学整形外科	
前澤 靖久, 内田 研造, 小久保安朗, 久保田 力, 藤本 理代, 竹野 健一 馬場 久敏	
福井医科大学整形外科, リハビリテーション部	
野瀬 恭代	
後弯を伴う頚椎 OPLL および頚椎症による脊髓症の治療: 後方除圧と椎弓根スクリューによる矯正固定	139
北海道大学保健管理センター	
鏡 邦芳	
北海道大学医学部整形外科	
須田 浩太, 伊東 学, 小谷 善久	

頸椎脊柱管拡大術における脊椎アライメントの影響—第2報	141
北海道大学大学院医学研究科機能回復医学講座運動器再建医学分野（整形外科）	
須田 浩太, 鏡 邦芳	
胸椎後縦靭帯骨化症における術中脊髄モニタリングの検討	144
千葉大学医学部整形外科	
新初 正明, 村上 正純, 山崎 正志, 大河 昭彦, 天野 景治, 田村 晋	
橋本 光宏, 守屋 秀繁	
胸椎後縦靭帯骨化症に対する前方除圧固定術の長期成績	150
慶應義塾大学医学部整形外科	
藤村 祥一	
頸椎後縦靭帯骨化症に対する片開き式脊柱管拡大術の長期成績	154
慶應義塾大学医学部整形外科	
丸岩 博文, 藤村 祥一, 千葉 一裕, 戸山 芳昭	
コンピュータを活用した頸椎後縦靭帯骨化巣計測法	157
国立大阪南病院	
米延 策雄	
埼玉医科大学総合医療センター整形外科	
都築 暢之	
久留米大学医学部整形外科学教室	
永田 見生	
慶應義塾大学医学部整形外科学教室	
戸山 芳昭	
東京女子医大整形外科学教室	
加藤 義治	
大阪労災病院整形外科	
岩崎 幹季	
脊柱靭帯骨化症に対するコンピュータ支援手術	162
東京大学医学部整形外科	
星地亜都司, 中島 勲, 岩崎 元重, 竹下 克志, 川口 浩, 中村 耕三	
胸椎黄色靭帯骨化症の手術治療成績	166
九州大学大学院医学系研究院整形外科	
播広谷勝三, 前山 健, 斉藤 太一, 神宮司誠也, 岩本 幸英	

VI. 疫学調査

後縦靭帯骨化症患者がかかえる問題点について —平成12年度実施の調査より—	169
名古屋市立大学看護学部	藤原奈佳子
山口大学医学部整形外科	河合 伸也
青森県立中央病院	原田 征行
徳島大学医学部整形外科	井形 高明
東京医科大学整形外科	今給黎篤弘
名古屋大学医学部整形外科	岩田 久
弘前大学医学部整形外科	植山 和正
東邦大学医学部整形外科	岡島 行一
北海道大学医学部整形外科	金田 清志
富山医科薬科大学整形外科	木村 友厚
東京医科歯科大学整形外科	四宮 謙一

九州大学医学部整形外科	神宮司誠也
和歌山県立医科大学整形外科	玉置 哲也
国立病院岡山医療センター整形外科	中原進之介
東京大学医学部整形外科	中村 耕三
京都大学医学部整形外科	中村 孝志
福井医科大学整形外科	馬場 久敏
北海道大学医学部脳神経外科	飛驒 一利
東京慈恵会医科大学整形外科	藤井 克之
慶應義塾大学医学部整形外科	藤村 祥一
鹿児島大学医学部整形外科	松永 俊二
千葉大学医学部整形外科	守屋 秀繁
国立大阪南病院	米延 策雄

研究成果の刊行に関する一覧表	189
----------------------	-----

参考：平成13年度班会議プログラム	195
-------------------------	-----

班 員 構 成

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

区 分	氏 名	所 属	職 名
主任研究者	原田 征行	青森県立中央病院	院 長
分担研究者	猪子 英俊	東海大学医学部分子生命科学2	教 授
	今給黎篤弘	東京医科大学整形外科	"
	河合 伸也	山口大学医学部整形外科	"
	中村 耕三	東京大学医学部整形外科	"
	馬場 久敏	福井医科大学整形外科	"
	松永 俊二	鹿児島大学医学部整形外科	講 師
	宮園 浩平	東京大学大学院医学研究科分子病理学	教 授
	守屋 秀繁	千葉大学医学部整形外科	"
	米延 策雄	国立大阪南病院	副 院 長
	井ノ上逸朗	東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門	助 教 授
研究協力者	鏡 邦芳	北海道大学保健管理センター整形外科	教 授
	岩田 久	名古屋共立病院リウマチ・人工関節センター	センター長
	植山 和正	弘前大学医学部整形外科	講 師
	遠藤 正彦	弘前大学医学部生化学第一	教 授
	岡島 行一	東邦大学医学部整形外科	"
	木村 友厚	富山医科薬科大学整形外科	"
	四宮 謙一	東京医科歯科大学整形外科	"
	神宮司誠也	九州大学医学部整形外科	助 教 授
	高垣 裕子	神奈川歯科大学口腔化学	講 師
	滝川 正春	岡山大学歯学部口腔生化学	教 授
	玉置 哲也	和歌山県立医科大学整形外科	"
	土田 成紀	弘前大学生化学第二	"
	中原進之介	国立病院岡山医療センター整形外科	部 長
	中村 孝志	京都大学医学部整形外科	教 授
	永山 見生	久留米大学医学部整形外科	"
	藤村 祥一	慶應義塾大学医学部整形外科	助 教 授
	藤原奈佳子	名古屋市立大学看護学部	"
	藤井 克之	東京慈恵会医科大学整形外科	教 授
	星野 雄一	自治医科大学整形外科	"
	元村 成	弘前大学医学部薬理学	"
経理事務 連絡責任者	原田 征行	青森県立中央病院 〒030-8553 青森市東造道2-1-1 TEL : 017-726-8111 FAX : 017-726-8325	院 長

総合研究報告書

総合研究報告書

主任研究者 原 田 征 行

研究目的

平成11年、12年、13年に亘り、本疾患の原因究明のために遺伝子解析、骨形成因子と吸収因子について、分子生物・細胞学的研究、脊髄の可塑性に関わる研究とさらには臨床的検討を行うことを目的とした。

ヒト遺伝子の同定を目的に検索してきたが、原因遺伝子は同定されず多因子遺伝形式であることが推測されている。骨形成の機序について、全身的要因、局所的要因についても明らかにし、骨吸収機序と吸収因子について解明しようとした。動物実験、靭帯細胞培養等の手法を用い、細胞生物学的、分子細胞学的に各種の骨形成因子及びサイトカインの発現、蛋白、軟骨基質の分析、細胞とメカニカルストレスに関する骨形成と各遺伝子発現を検討した。

骨化によって慢性圧迫を受けた脊髄変形と、機能回復について脊髄可塑性について検討する。平成11年以前から中国の疫学調査を行ってきたが、中国全土に亘る発生状況を調査する。

臨床症状について JOA スコアに基づき 5 段階に分析し、更に実状に見合った評価法を確立し、Evidence Based Medicine の臨床評価を行う。

患者への全国的アンケート調査を行い、ADL、QOL を含めた患者のアメニティの分析から、社会資源の活用を図る。患者・家族の会と公開講座を通じて緊密な連絡のうえで、患者の同意のもとに DNA の簡易分析を行う。

研究方法

遺伝子解析、骨形成因子、軟骨基質、細胞とメカニカルストレス、脊髄の可塑性および QOL ならびに ADL 調査および疫学調査グループに大きく分け、班員同士での資料・情報の提供等により共同研究を行ってきた。また班員以外との研究者とも情報交換を行い、サンプル等の融通によりそれぞれの研究を進めた。個々の研究成果を研究班会議において発表した。

遺伝子解析は、第6染色体上のコラーゲン A2 と、その近傍の Retinoin X Receptor β (RXR- β) を同定し、これを原因遺伝子の1つとしたが、さらに 21q21.3 領域に BMP4, TGF β 3, IGF1, PTHR1, OPN (オステオポンチン), PRG1 (プロテオグリカン), α B-Crystallin などに強い連鎖を認め、更に詳細な分析を進めた。また 21q21.3 領域にも最も強い連鎖を認めたが確定は出来ていない。我々はあくまでもヒト遺伝子解析を目標としている。

骨形成因子については、全身的要因としてインスリンの作用について検討しその他、レプチン、ビタミン A と靭帯骨化について検討した。局所因子とした、BMP, TGF- β , b-FGF, IGF-1 などの骨形成サイトカインについて添加実験、及び遺伝子発現を検討した。

軟骨基質の研究については、プロテオグリカンの詳細な分析を続け、骨化過程において3つのデコリンを同定し、分子構造を解明しようとした。またハイドロキシアパタイトとの結合性を検討した。

培養されたヒト靭帯骨化細胞は、メカニカルストレスに対して変質する事が判明している。

慢性圧迫された脊髄の変形と脊髄機能について、動物実験免疫組織化学的検討を行った。

脊柱靭帯骨化症の治療方法ないし治療経過について、患者 1,420 名に対してアンケート調査を行い、1,166 名から回答を得た。この結果をもとに、患者の QOL, ADL を分析した。

結果と考察

1. 遺伝子解析

ヒト遺伝子同定に向けて検索中であるが、既に Genome Wide Screening により 21 番染色体に強い連鎖反応を認めており、21q21.3 の領域を中心に解析を進めている。その検索中に、BMP4, TGF β 3, IGF1, PTHR1,

OPN (オステオポンチン), PRG1 (プロテオグリカン), α B-Crystallinなどの遺伝子にp-value < 0.05の有意差を認めた。21q21.3領域に最も強い連鎖を認めたが確定は出来ていない。近傍領域の既知の遺伝子について、ハプロタイプ解析を加えて感受性遺伝子同定の有力な手段を獲得した。

また、Nucleotide pyrophosphatase (NPPS) geneの遺伝子多型のうちでイントロン15に見いだした。IVS15-14T->CとOPLLの発症およびその重症度については、OPLL症例ではコントロールに比べてminor alleleであるC alleleを持つものが有意に多く、C alleleを持つOPLL症例群は、持たない症例群に比べて、骨化椎体数が有意に多い。

ヒト間葉系幹細胞は、骨髄間質に含まれる多分化能を持つ細胞で、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などに分化する性質を持つ。ヒト骨髄液から分離した細胞から、細胞分化に伴うhMSCの変化を検討した。OPLLにおける骨化形態としての内軟骨性骨化と、膜性骨化の混在が考えられ、骨化発症メカニズムを検討した。軟骨細胞層にCTGF-b (Connective Tissue TGF- β)を検出したことから、靭帯骨化は内軟骨性骨化形態を取ることが証明された。

OPLL患者由来の靭帯細胞培養から、CTGF/Hcs24により発現調節される遺伝子の解析を行い、乳癌細胞と一致する細胞を同定することができた。OPLL細胞ではPN-1発現が増加し、thrombinを介したProtease-activate receptor1 (PAR-1)の活性が抑制されてALP活性が上昇し、靭帯骨化が生じる可能性が示唆された。

2. 骨形成因子について

骨形成因子として認められている各種サイトカインについての研究を進めている。その中で、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ついては、IRS-2ノックアウトマウスを用い、in vitroでの解析で骨芽細胞の増殖・分化能は低下していたが、破骨細胞形成指示能は亢進しており、IRS-2を介するシグナルは骨代謝基調

これまで骨吸収についての研究は少なかったが、細胞内蛋白質分解系によって骨吸収調節のメカニズムについて、c-Cblが蛋白質分解系を介し新しいメカニズムでSrcを調節していることを明らかにした。

3. 軟骨基質について

プロテオグリカンの一連の研究から、黄色靭帯において分析した3つのプロテオグリカンを分離し、その中でデコリン-2は主にデルマトン硫酸鎖で構成されており、抑制的な作用が示唆された。小型PGsと α -elastinはとの結合性は靭帯骨化の方が低かった。

黄色靭帯骨化組織からIndian hedgehog (Ihh), Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)の存在が免疫組織化学的に確認された。靭帯骨化においても、内軟骨性骨形成と同様にIhh, PTHrPによる細胞分化制御機構の存在が示唆された。

4. 細胞とメカニカルストレス

ストレスを与えるとコントロールに比べOPLL細胞ではALP, osteopontin, BMP-2とその受容体のmRNA発現量だけでなく、ALP活性およびBMP2/4分泌のいずれも伸展刺激により増大する傾向にあった。OPLL細胞ではPN-1発現が増加し、thrombinを介したProtease-activate receptor1 (PAR-1)の活性が抑制されてALP活性が上昇し、靭帯骨化が生じる可能性が示唆された。

5. 脊髄の可塑性と脊髄機能

脊髄に対する機械的ストレスと脊髄グリア細胞についての検討を行った。培養細胞で、機械的ストレスに対するアストロサイトが生存維持、機能修復に密接に関係していることが示唆された。脊髄への伸展ストレスで反応性アストロサイトがNeurotrophin発現を増加させ神経細胞の生存、維持に関与していた。

6. 中国の疫学調査

中国での疫学調査では開始して8年目である。即ち東北部の長春、内モンゴルの赤峰、ウランホット、中心部に近い北京、南部の海南島、西方の昆明で、漢民族を中心に各民族を調査した。中国全体の発生率は本邦とほぼ同様であった、中国内ではモンゴル民族に多く、地域性では東北で多く南方では少ない傾向であった。

7. QOLと機能評価

現在使用されている日本整形外科学会脊髄機能評価表 (JOAスコア) を用いて脊髄機能評価を5段階にし、Evidence Based Medicineにもとにした分類を行った。

後縦靭帯骨化症患者 1,420 名に対してアンケート調査を行い、1,166 名の回答から、日常生活動作制約がある者の外出は 15.1% など普段の生活に支障があることが分かった。その他では公費負担、福祉対策への不満があった。脊柱靭帯骨化症患者・家族の会と密接な連携をもち、平成 11 年度 3 回、平成 12 年度 2 回、平成 13 年度 3 回の公開講座を行い、研究班の研究状況を逐次提供し、患者の理解と臨床的研究への協力を求めた。次年度に向けて患者の唾液から DNA を分析することに同意を得ることが出来た。

結 論

研究グループのヒト遺伝子解析については、多因子遺伝子を原因として発症するものと判明した。すでに 21q21.3 領域の中で、BMP4、TGF β 3、IGF1、PTHR1、OPN、 α B-Crystallin などの遺伝子に強い連鎖反応を認め、21q21.3 領域に最も強い連鎖を認めたが確定は出来ていない。近傍領域の既知の遺伝子について、ハプロタイプ解析を加えて感受性遺伝子同定の有力な手段を獲得した。

細胞基質の中で、すでに分析された 3 つのデコリンについて、小型 PGs と α -elastin との結合性は靭帯骨化の方が低かった。

内軟骨性骨化形態をとる靭帯骨化には、メカニカルストレスの関与が強く示唆された。OPLL 細胞では PN-1 発現が増加し、thrombin を介した Protease-activate receptor1 (PAR-1) の活性が抑制されて ALP 活性が上昇し、靭帯骨化が生じる可能性が示唆された。

脊髄機能回復機序と脊髄の可塑性については、分子生物学的、細胞生物学的研究が行われ、圧迫された脊髄グリア細胞は、アストロサイトが生存維持、機能回復に強く関連していることが判明した。中国での OPLL 発生頻度は本邦とほぼ同じであった。全国 1,420 名にアンケート調査をし、1,166 名から回答を受け、QOL、ADL ならびに社会資源について分析した。患者家族の会と公開講座を開催し、研究成果を伝えると共に、協力を求めることが本研究班の更なる発展を助長するものであると考えられた。本年度も学際的研究が成果をあげた。

総括研究報告書

総括研究報告書

主任研究者 原 田 征 行

研究目的

本疾患の原因究明のために遺伝子解析、骨形成因子と吸収因子について、分子生物・細胞学的研究、脊髄の可塑性に関わる研究とさらには臨床的検討を行う。

脊柱靭帯骨化症の発症原因は不明である。多因子遺伝形式であることが推測され、これまで保管されているサンプルを用いヒト遺伝子の同定を目指した。骨形成の機序について、全身的要因、局所要因についても明らかにし、骨吸収機序と吸収因子について解明しようとした。動物実験、靭帯細胞培養等の手法を用い、細胞生物学的、分子細胞学的に各種の骨形成因子及びサイトカインの発現、蛋白軟骨基質の分析、細胞とメカニカルストレスに関する骨形成と各遺伝子発現を検討した。臨床的研究では、患者へのアンケート調査を行い、ADL、QOLを含めた患者のアメニティの調査から、社会資源の活用を図ることを目的とした。患者・家族の会と公開講座を通じて緊密な連絡のうえで、患者の同意のもとに唾液からDNA分析を目的とした。

研究方法

遺伝子解析、骨形成因子、軟骨基質、細胞とメカニカルストレス、脊髄の可塑性およびQOLならびにADL調査のグループに大きく分け、班員同士での資料・情報の提供等により共同研究を行ってきた。また各班員が班員以外との研究者とも情報交換を行い、サンプル等の融通によりそれぞれの研究を進めた。研究グループ以外で、個々の研究も行っており、その成果を研究班会議において発表した。

第6染色体上のコラーゲンA2と、その近傍のRetinoinn X Rceptor β (RXR- β)を同定し、これを原因遺伝子の1つとしたが、さらに21q21.3領域にBMP4, TGF β 3, IGF1, PTHR1, OPN (オステオポンチン), PRG1 (プロテオグリカン), α B-Crystallinなどに強い連鎖を認め、更に詳細な分析を進めた。また21q21.3領域にも最も強い連鎖を認めたが確定は出来ていない。我々はあくまでもヒト遺伝子解析を目標としている。

骨形成因子については、全身的要因、局所要因について、動物実験ないし靭帯細胞培養の手法を用いて、各種サイトカインの添加、あるいは遺伝子発現について検討した。全身的要因としては、インスリンの作用について検討し、レプチン、BMPファミリーについても検討を行った。

軟骨基質の研究については、プロテオグリカンの詳細な分析を続け、骨化過程において3つのデコリンを同定し、分子構造を分析し、ハイドロキシアパタイトとの結合性を検討した。

培養されたヒト靭帯骨化細胞は、メカニカルストレスに対して変質する。

慢性圧迫された脊髄の変形と脊髄機能について、動物実験免疫組織化学的検討を行った。

脊柱靭帯骨化症の治療方法ないし治療経過について、患者1,420名に対してアンケート調査を行い、1,166名から回答を得た。この結果をもとに、患者のQOL、ADLを分析した。

結果と考察

1. 遺伝子解析

責任遺伝子同定に向けて検索中であるが、既にGenome Wide Screeningにより21番染色体に強い連鎖反応を認めており、21q21.3の領域を中心に解析を進めている。その検索中に、BMP4, TGF β 3, IGF1, PTHR1, OPN (オステオポンチン), PRG1 (プロテオグリカン), α B-Crystallinなどの遺伝子にp-value < 0.05の有意差を認めた。21q21.3領域に最も強い連鎖を認めたが確定は出来ていない。近傍領域の既知の遺伝子について、ハプロタイプ解析を加えて感受性遺伝子同定の有力な手段を獲得した。

また、Nucleotide pyrophosphatase (NPPS) geneの遺伝子多型のうちでイントロン15に見いだした。IVS15-14T->CとOPLLの発症およびその重症度については、OPLL症例ではコントロールに比べてminor alleleであるC alleleを持つものが有意に多く、C alleleを持つOPLL症例群は、持たない症例群に比べて、

骨化椎体数が有意に多い。

ヒト間葉系幹細胞は、骨髄間質に含まれる多分化能を持つ細胞で、骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞などに分化する性質を持つ。ヒト骨髄液から分離した細胞から、細胞分化に伴うhMSCの変化を検討した。OPLLにおける骨化形態としての内軟骨性骨化と、膜性骨化の混在が考えられ、骨化発症メカニズムを検討した。

OPLL患者由来の靭帯細胞培養から、CTGF/Hcs24により発現調節される遺伝子の解析を行い、乳癌細胞と一致する細胞を同定することができた。OPLL細胞ではPN-1発現が増加し、thrombinを介したProtease-activate receptor1 (PAR-1)の活性が抑制されてALP活性が上昇し、靭帯骨化が生じる可能性が示唆された。

2. 骨形成因子について

骨形成因子として認められている各種サイトカインについての研究を進めている。その中で、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ついては、IRS-2ノックアウトマウスを用い、in vitroでの解析で骨芽細胞の増殖・分化能は低下していたが、破骨細胞形成指示能は亢進しており、IRS-2を介するシグナルは骨代謝基調

これまで骨吸収についての研究は少なかったが、細胞内蛋白質分解系によって骨吸収調節のメカニズムについて、c-Cblが蛋白分解系を介し新しいメカニズムでSrcを調節していることを明らかにした。

3. 軟骨基質について

プロテオグリカンの一連の研究から、黄色靭帯において分析した3つのプロテオグリカンを分離し、その中でデコリン-2は主にデルマトン硫酸鎖で構成されており、抑制的な作用が示唆された。小型PGsと α -elastinはとの結合性は靭帯骨化の方が低かった。黄色靭帯骨化組織からIndian hedgehog (Ihh), Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP)の存在が免疫組織化学的に確認された。靭帯骨化においても、内軟骨性骨形成と同様にIhh, PTHrPによる細胞分化制御機構の存在が示唆された。

4. 細胞とメカニカルストレス

ストレスを与えるとコントロールに比べOPLL細胞ではALP, osteopontin, BMP-2とその受容体のmRNA発現量だけでなく、ALP活性およびBMP2/4分泌のいずれも伸展刺激により増大する傾向にあった。OPLL細胞ではPN-1発現が増加し、thrombinを介したProtease-activate receptor1 (PAR-1)の活性が抑制されてALP活性が上昇し、靭帯骨化が生じる可能性が示唆された。

5. 脊髄の可塑性と脊髄機能

脊髄に対する機械的ストレスと脊髄グリア細胞についての検討を行った。培養細胞で、機械的ストレスに対するアストロサイトが生存維持、機能修復に密接に関係していることが示唆された。脊髄への伸展ストレスで反応性アストロサイトがNeurotrophin発現を増加させ神経細胞の生存、維持に関与していた。

6. QOLと機能評価

後縦靭帯骨化症患者1,420名に対してアンケート調査を行い、1,166名の回答から、日常生活動作制約がある者の外出は15.1%など普通の生活に支障があることが分かった。その他では公費負担、福祉対策への不満があった。脊柱靭帯骨化症患者・家族の会と密接な連携をもち、全国で平成11年度3回、平成12年度は2回、平成13年度は3回の公開講座を行い、研究班の研究状況を逐次提供し、患者の理解と臨床的研究への協力を求めた。次年度に向けて患者の唾液からDNAを分析することに同意を得ることが出来た。

結 論

研究グループのヒト遺伝子解析については、多因子遺伝子を原因として発症するものと判明した。すでに21q21.3領域の中で、BMP4, TGF β 3, IGF1, PTHR1, OPN, α B-Crystallinなどの遺伝子に強い連鎖反応を認め、21q21.3領域に最も強い連鎖を認めたが確定は出来ていない。近傍領域の既知の遺伝子について、ハプロタイプ解析を加えて感受性遺伝子同定の有力な手段を獲得した。

細胞基質の中で、すでに分析された3つのデコリンについて、小型PGsと α -elastinはとの結合性は靭帯骨化の方が低かった。

内軟骨性骨化形態をとる靭帯骨化には、メカニカルストレスの関与が強く示唆された。OPLL細胞ではPN-1発現が増加し、thrombinを介したProtease-activate receptor1 (PAR-1)の活性が抑制されてALP活

性が上昇し。靭帯骨化が生じる可能性が示唆された。

脊髄機能回復機序と脊髄の可塑性については、分子生物学的、細胞生物学的研究が行われ、圧迫された脊髄グリア細胞は、アストロサイトが生存維持、機能回復に強く関連していることが判明した。疫学的検討は、全国1,420名にアンケート調査をし、1,166名から回答を受け、QOL、ADLならびに社会資源について分析した。患者家族の会と公開講座を開催し、研究成果を伝えると共に、協力を求めることが本研究班の更なる発展を助長するものであると考えられた。本年度も学際的研究が成果をあげた。

分担研究報告書

I

遺 伝 子 解 析

後縦靱帯骨化に関する遺伝子の検索

加藤 剛 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脊椎髄神経外科学),
波呂 浩孝 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脊椎髄神経外科学),
四宮 謙一 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脊椎髄神経外科学)

【研究要旨】

後縦靱帯骨化の成立には、全身的因子と局所的因子を要し、いわゆる多因子疾患である OPLL の成因や骨化のメカニズムを知るための解析は、困難な点が多い。今回 OPLL 手術検体を用いて DNA アレイによる遺伝子の検出、および正常靱帯との比較による発現遺伝子解析を行った。しかし、強く発現していた遺伝子の中に、これまで骨形成関連因子として報告されているものはなかった。また、骨形成関連遺伝子の顕著な発現も認めず、本研究では靱帯骨化の成因となる遺伝子をはっきりと特定できることは出来なかった。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化症 (以下、OPLL) の成因は依然として不明である。これまでの研究より、OPLL の本質は靱帯の骨化が異常に増大することであると言われている。骨化の成立には、全身的因子と局所的因子を要し、いわゆる多因子疾患である OPLL の成因や骨化のメカニズムを知るための解析は、困難な点が多い。近年、ゲノム全域での遺伝子解析によりヒト染色体 6 番や 21 番での強い連鎖が認められ、また局所的に BMP-2, TGF-beta などの骨形成促進因子の関与が報告されている。今回我々は手術時に採取した OPLL サンプルを用いて、DNA アレイによりどのような骨形成促進因子が関与しているかを調査した。

B. 研究方法

当大学にて頷椎 OPLL の手術を受けた患者の中で、インフォームドコンセントを行い同意していただいた方の、OPLL 病変および近隣の正常靱帯を術中に採取した。迅速に液体窒素中に入れ、-80 度保存の後、AGPC 法にて RNA 抽出を行った。7 症例につき RNA 採取を行った (Fig. 1)。今回は、病変部位と正常部位とで遺伝子発現の比較を行った。

クロンテック社 Atlas™ Glass Microarray を用いた。検出された遺伝子について、1,081 個のヒト既知遺伝子による Array Gauge を用いた解析を行った (Fig. 2)。

C. 研究結果

解析の結果、正常靱帯より 2.5 倍以上の強い発現を見せた遺伝子が 7 種類 (IMP dehydrogenase-1,

KIAA0175, DOC-1, HTK-L, transducin beta-2 subunit, prostaglandin E2 receptor (EP3) subunit, T cell receptor variable region), 逆に減弱したものが 1 種類 (regulated on activation normal T-cell-expressed & secreted protein: RANTES) 見つかった。また、2 倍以上の比を持つものとする 16 遺伝子が認められた (Table 1)。しかし、いずれにしても我々の注目していたヒト染色体遺伝子座 6 番や 21 番に存在するもの、BMPs, TGF-beta などの骨形成関連遺伝子は含まれていなかった (Table 2)。

D. 考察

今回正常靱帯に比較して、OPLL で最も強く発現していた遺伝子は、IMP dehydrogenase-1 であった。この遺伝子は Leukocyte で多く発現するといわれているが、骨形成に関わるという報告はない。遺伝子座も 16p13.13 であり、OPLL、骨形成の関連遺

28S

18S

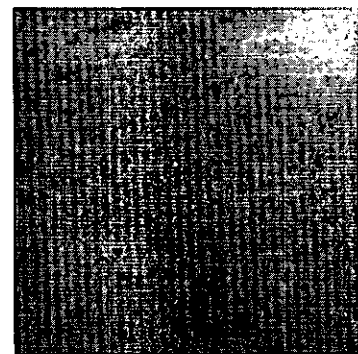


Fig. 1 RNA quality

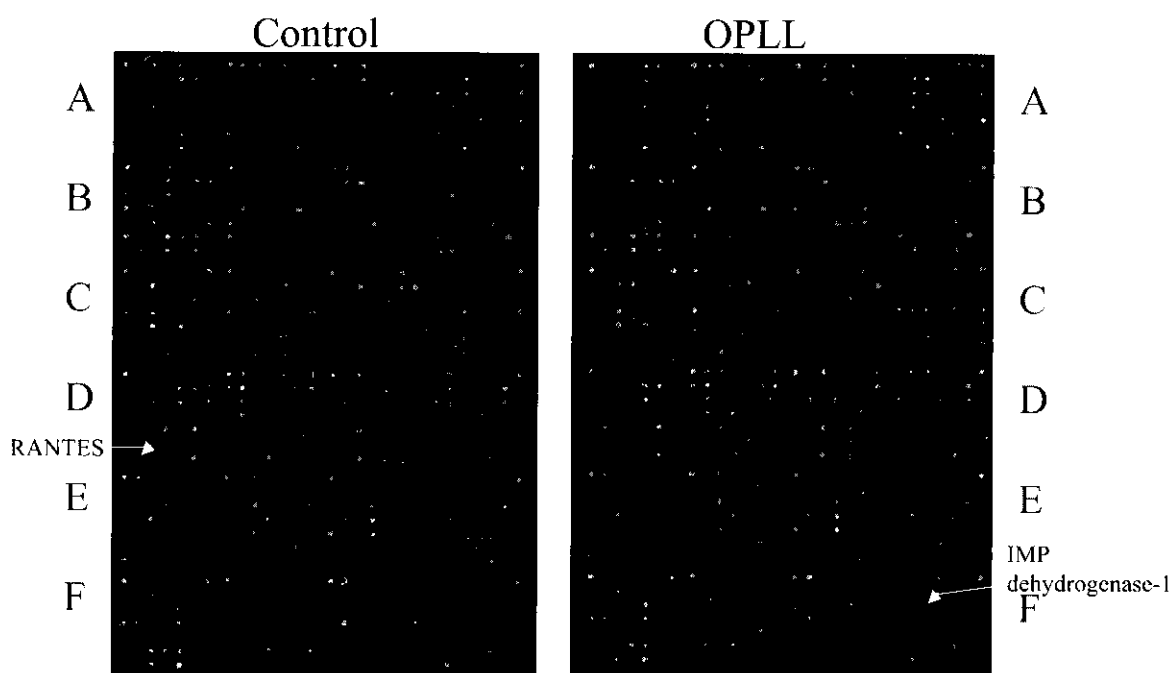


Fig. 2 ← : 発現変動のみられる代表的な遺伝子

Table 1

<Spot Intensity>		比較			Gene	Gene Bank
control	OPLL	Ratio	up比	down比		
131	366	2.80	up比		DOC-1	AF006484
120	290	2.42	up比		CDC2-related protein kinase PISSLRE	L33264
109	381	3.50	up比		KIAA0175	D79997
374	766	2.05	up比		phospholipase C delta-1 (PLCD1)	U09117
792	1717	2.17	up比		ras-related protein RAB5A	M28215
128	334	2.61	UP		Transducin beta-2 subunit	M36429
304	793	2.61	2.6		prostaglandin E2 receptor EP3 subtype (PTGER3)	S69200
123	265	2.16	UP		neuronal acetylcholine receptor protein beta 4 subunit (NACHRB4)	U62439
509	183	0.36		DOWN	semaphorin III/F (SEMA3F)	U33920
811	1643	2.02	2.0		high mobility group protein isoforms I & Y (HMGIY)	M23619
265	107	0.41		DOWN	tyrosine-protein kinase receptor EHK1	X95425
1765	746	0.42		2.4	regulated on activation normal T-cell-expressed & secreted protein (RANTES)	M21121
136	367	2.71	UP		HTK ligand (HTK-L)	L38734
334	864	2.59	2.6		T cell receptor variable region	M21626
81	396	4.86	UP		IMP dehydrogenase 1	J05272

伝子座として注目されている場所ではなかった。同様に大きな発現差を認めた 16 遺伝子について文献的調査を加えた。KIAA0167 はヒト KG-1 cell line よりクローニングされた遺伝子で、Zn-fingerモチーフを含み、転写因子 GCS1 に似た構造を持つ RhoGAP gene family の 1 つである。ガン遺伝子 ras family と相同性を有し、褐色細胞腫から同定された

rab5A 遺伝子や、逆にガン細胞抑制遺伝子である DOC-1 に強い発現が見られた。また、チロシンキナーゼレセプターの 1 つである HTK, プロスタグランジン E2 のレセプターの 1 つである EP3, CDC2 関連プロテインキナーゼである PISSLRE などが強く発現していた。しかし、これまでに骨形成関連因子として報告されていたものはなかった。