

脊柱靱帯骨化症におけるPTH/PTHrP受容体遺伝子多型の解析

山崎 正志 (千葉大学整形外科), 大河 昭彦 (千葉大学整形外科),
相庭 温臣 (千葉大学整形外科), 守屋 秀繁 (千葉大学整形外科),
皆川 真規 (千葉大学小児科)

KEYWORDS=ossification of the spinal ligaments, PTH/PTHrP receptor, polymorphism

【研究要旨】

【目的】骨格成長との相関が指摘されている PTH/PTHrP 受容体遺伝子 (PTHR1) の P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型について, case-control study により脊柱靱帯骨化症への遺伝的関与を検討した。【方法】脊柱靱帯骨化症例 174 例と, control として非骨化症例 92 例から genomic DNA を抽出し, P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型について, SLP 法を用いて各症例の genotype を決定し, genotype の頻度, allele の頻度と脊柱靱帯骨化の有無との相関をカイ 2 乗検定により検討した。【結果】PTHR1 P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型において両群間の genotype 頻度, allele 頻度に有意な差はみられず, 相関はみられなかった。

A. 研究目的

副甲状腺ホルモン (PTH) はカルシウム代謝を制御する重要なホルモンであり, 骨および腎がその主な target tissue である。また, 副甲状腺ホルモン関連ペプチド (PTHrP) は, 当初, 高カルシウム血症の原因物質として同定された PTH family に属する蛋白である。PTHrP は, 多くの組織で autocrine/paracrine 的に作用することが明らかにされており, 特に成長軟骨では前肥大軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化を制御し, 内軟骨性骨形成に重要な役割を果たすとされている。

脊柱靱帯と副甲状腺機能に関しては, 副甲状腺機能低下症例に脊柱靱帯骨化が高率に合併することが報告されている¹⁾。また, 脊柱靱帯骨化症例では, カルシウム欠乏状態で PTH の分泌が維持されないことから, 副甲状腺機能の予備能低下の可能性が指摘されている²⁾。我々も本研究班の活動として, 後縦靱帯骨化症 (OPLL) 例の血清中 PTH 濃度を測定した。その結果, OPLL 患者では加齢による PTH の上昇傾向を認めず, 特に, 50 歳以上で骨化傾向の強い例で PTH が低値を示し, % TRP が高い例が存在した³⁾。我々はまた, 培養脊柱靱帯細胞を用いた解析を行い, OPLL 症例由来細胞は, 後縦靱帯由来細胞のみならず黄色, 棘間靱帯由来細胞においても, PTH に応答して cAMP 産生量が 200 % 以上に上昇することを示した。一方, 非骨化症由来細胞は PTH にほとんど反応しなかった⁴⁾。このことより, OPLL 症例では PTH に対する受容体が脊柱靱帯細胞に広汎に出現していることを推論した。

PTH あるいは PTHrP は受容体 PTH/PTHrP receptor (PTHR1) を介してその作用を発揮する。PTHR1 遺伝子には 3 つの promoter (P1, P2 および P3) が存在する。このうち, P3 promoter はヒトでのみその存在が確認されており, 腎および骨で主な働きをするとされている。最近の研究で我々は, P3 promoter 領域に (AAAG)_n 多型が存在することを明らかにした。さらに, 健常日本人を対象として genotype を検討すると, 6/6 (AAAG の繰返しが 6 回の allele がホモとして genotype を形成) の多型では, 5/5 (AAAG の繰返しが 5 回の allele がホモとして genotype を形成) に比して身長が高く, 骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリンが低値を示した⁵⁾。したがって, P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型は, 骨格の成長に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

本年度の研究で我々は, この骨代謝に関わる PTHR1 遺伝子多型が脊柱靱帯骨化の発生に関与するかを検討するため, case-control study による相関解析を行った。

B. 研究方法

脊柱靱帯骨化症例 174 例と, コントロールとして非骨化症例 92 例を用いて解析を行った。非骨化症例は, OPLL 発症年齢に達しているが脊柱靱帯骨化のないことが X-P にて確認されたものとした。これらの症例の末梢血から genomic DNA を抽出し, 解析に用いた。

(AAAG)_n 多型の解析は, PTHR1 遺伝子の P3

表1 PTHR1 遺伝子 P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型の genotype 頻度

genotype	骨化症	非骨化症
3/5	0 (0.0%)	2 (2.2%)
3/6	0 (0.0%)	2 (2.2%)
3/8	1 (0.6%)	0 (0.0%)
5/5	81 (46.6%)	46 (50.0%)
5/6	65 (37.4%)	31 (33.7%)
5/7	5 (2.9%)	0 (0.0%)
5/8	0 (0.0%)	1 (1.1%)
6/6	18 (10.3%)	9 (9.8%)
6/7	4 (2.3%)	1 (1.1%)
計	174	92

表2 PTHR1 遺伝子 P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型の allele 頻度

allele	骨化症	非骨化症
3	1 (0.3%)	4 (2.2%)
5	232 (67.0%)	126 (68.5%)
6	105 (30.2%)	52 (28.3%)
7	9 (2.6%)	1 (0.6%)
8	1 (0.3%)	1 (0.6%)
計	348	184

promoter の (AAAG)_n を含む領域を、2度の PCR にて増幅し、SSLP (Simple Sequence Length Polymorphism) 法を用いて解析した。1st PCR の primer は、forward : P3 (-254), 5'-AATAAC AGGTTTCCTGCGCGC-3' ←, reverse : P3R (+205), 5'-GGGTGCAGAGCTGCGTCAGG-3' を用いた。2nd PCR の primer は、forward : P3 (-175), 5'-GAAGCCACAGCTCCCATTTTC-3', reverse : P3R (-34), 5'-TGCCTCGGAGCGAAGAAATC-3' を用いた⁵⁾。各症例の genotype を決定し、genotype の頻度、allele の頻度と脊柱靭帯骨化の有無について、カイ2乗検定により相関を検討した。

C. 結果

P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型に関して、脊柱靭帯骨化症および非骨化症症例の genotype 頻度を表1に、allele 頻度を表2に示す。両群間の genotype 頻度、allele 頻度に統計学的な有意差はみられなかった。

D. 考察

我々の健常日本人を対象としたこれまでの研究

で、(AAAG)_n 多型の genotype 6/6 では genotype 5/5 に比して、有意に身長が高く、骨吸収マーカーが低値を示し⁵⁾、AAAG6 が成長軟骨における骨形成に対し促進的に関与することが推察された。また、ヒト由来の2種類の骨芽細胞様細胞 (SaOS-2 cell, HOS cell) に AAAG3 から AAAG8 までの PTHR P3 promoter を transfect させたところ、両者の細胞にて、promoter 活性が AAAG6 で最も低いという結果が得られた⁵⁾。この事実、および、副甲状腺機能の低下が脊柱靭帯の発生に関与していることを示唆するこれまでの報告 (1, 2, 3) を併せて考慮し、我々は以下の仮説を立てた。すなわち、脊柱靭帯骨化症例では AAAG6 の頻度が高く、このため PTH/PTHrP の作用低下が潜在的に存在し、このところが内軟骨性骨形成の亢進をもたらし、脊柱靭帯骨化の発生につながる。今回は、この仮説を検証するために研究を行った。

しかし、今回の研究結果では、PTHR1 遺伝子の P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型と脊柱靭帯骨化の有無について、有意な相関はみられなかった。したがって、PTHR1 遺伝子の P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型は脊柱靭帯骨化症の発生に関与しな

いという結果が得られた。

今後、罹患椎体数，骨化高位，男女別，骨化の進展について，相関の検討を行う予定である。

E. 結論

PTHr1 遺伝子の P3 promoter 領域の (AAAG)_n 多型と脊柱靭帯骨化の有無について，有意な相関はみられなかった。

[参考文献]

- 1) Okazaki T, Takuwa Y, Yamamoto M, Matsumoto T, Igarashi T, Kurokawa T, Ogata E: Ossification of the paravertebral ligaments: a frequent complication of hypoparathyroidism. *Metabolism* 33 : 710-713, 1984
- 2) 加藤義治, 森田裕司, 辻 陽雄: 脊柱靭帯骨化症におけるカルシウム代謝の一特質. 厚生省特定疾患 脊柱靭帯骨化症調査研究班 平成 3 年度研究報告書 pp. 204-207, 1992
- 3) 丹野隆明, 渡部恒夫, 後藤澄雄, 雄賀多聡, 斉藤康文, 千賀啓功: 後縦靭帯骨化症患者における副甲状腺機能に関する検討. 厚生省特定疾患 脊柱靭帯骨化症調査研究班 昭和 62 年度研究報告書 pp. 31-32, 1990
- 4) 山崎正志, 後藤澄雄, 寺門 淳, 金 民世, 後藤憲一郎, 守屋秀繁: 培養脊柱靭帯細胞に対する成長因子の作用, OPLL の成因と関連して. *整災外* 40 : 789-796, 1997
- 5) Minagawa M, Yasuda T, Watanabe T, Minamitani K, Takahashi Y, Goltzman D, White JH, Hendy GN, Kohno Y: Association between AAAG repeat polymorphism in the P3 promoter of the human parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor gene and adult height, urinary pyridinoline excretion, and promoter activity. *J Clin Endocrinol Metab* (in press).

TGF- β 1 遺伝子多型と脊椎後縦靭帯骨化症との関連

川口 善治 (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)

古島 弘三 (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 (東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門)

KEYWORDS=transforming growth factor-beta gene (TGF- β 遺伝子), polymorphis (多型性), ossification of the posterior longitudinal ligament (後縦靭帯骨化症)

【研究要旨】

369名のOPLL患者およびOPLLが認められないコントロール224名を対象としTGF- β 1遺伝子のシグナルシーケンス領域に存在するT→C多型を調べた。その結果、両群で多型の分布に統計学的有意差はなかったが、頸椎以外の胸腰椎にもOPLLが認められる患者でCCアレルの頻度が有意に高かった。以上より、このTGF- β 1遺伝子多型はOPLL発症の疾患関連因子ではなく、OPLL患者において全身の骨化形態に影響を及ぼす可能性があるものと考えられた。

A. 研究目的

脊椎後縦靭帯骨化症(OPLL)の成因には、多因子の遺伝的要因が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。TGF- β は骨代謝の制御因子として働く重要なサイトカインであり、OPLLの骨化巣にもその局在が証明されている¹⁾。近年、TGF- β 1遺伝子のexon1内のシグナルシーケンス領域にはT→C(Leu→Pro)多型が存在し、この多型が血中のTGF- β 1の濃度および全身の骨量に影響を与えていることが指摘されている^{2,3)}。本研究では、このTGF- β 1遺伝子多型とOPLLとの関連について検討することを目的とした。

B. 研究方法

369名のOPLL患者(男258名,女111名,平均年齢59歳)および60歳以上でOPLLが認められないコントロール224名(男116名,女108名,平均年齢65歳)を対象とした。対象者の末梢血からgenomic DNAを抽出し、TGF- β 1遺伝子のexon1内でT→C多型が存在する領域を2つのsense primerを用いpolymerase chain reaction(PCR)法で増幅した。その後1%アガロースゲルにて電気泳動を行った。

レントゲン学的検討は、全脊椎すなわち頸椎、胸椎および腰椎の撮影が可能であったOPLL患者95例を対象とした。頸椎レントゲン像では、診断基準に従い、骨化形態を連続型、分節型、混合型、その他型に分類した。また、頸椎の最大骨化幅を測定した。さらに胸椎および腰椎レントゲン像で各部位に

おけるOPLLの有無を調べた。

OPLL患者とコントロールにおける多型分布および、胸腰椎部の骨化の有無における多型分布の比較には χ^2 独立性検定を用いた。また、最大骨化幅の比較にはWelch's t-testを用いた。

尚、本研究は当大学の倫理委員会にて承認され、研究を行う以前に全員から内容を説明した上で同意を得た。

C. 研究結果

PCR法では、TGF- β 1遺伝子のチミジンおよびシトシンの変異を観察でき、TT, TCおよびCCの各アレルに分類可能であった。このうち、OPLL患者のアレルはTT:70名, TC:184名, CC:115名であり、コントロールはTT:43名, TC:118名, CC:63名であった。これら両群でアレルの分布に統計学的有意差はなかった($p=0.72$)。

頸椎レントゲン像では、OPLLの骨化形態は連続型30例、分節型30例、混合型33例、その他型1例に分類された。これら群で多型の分布に差はなかった($p=0.31$)。また、最大骨化幅はTT, TC, CCが、それぞれ4.7mm, 5.1mm, 5.5mmであり、差はなかった($p=0.7$)。全脊椎の検討では、95名中43名のOPLL患者で頸椎以外の領域にOPLLが認められた。頸椎にのみOPLLが認められる患者(C群)と頸椎以外にもOPLLが認められる患者(CTL群)でTGF- β 1遺伝子多型の分布を比較したところ、CTL群でCCアレルの頻度が有意に高かった($p=0.0142$)。

D. 考察

TGF- β 1 遺伝子多型と全身の骨量との関連を調べた過去の報告では、CC のアレルを持つものに全身の骨量が多く、血中のTGF- β 1の濃度が高いことが指摘されている^{2,3)}。しかし、今回の検討ではOPLL患者とコントロールとの間に有意差はなく、TGF- β 1 遺伝子多型がOPLL発症の疾患関連因子とは考えにくい。しかし、頸椎以外にもOPLLが認められる患者においてCCアレルを持つものの頻度が高かったことから、この遺伝子多型はOPLL患者において全身の骨化形態に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

E. 結論

TGF- β 1 遺伝子のシグナルシーケンス領域に存在するT→C多型はOPLL発症の関連因子ではないが、OPLL患者において全身の骨化形態に影響を及ぼしている可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

現在投稿中。

2. 学会発表

川口善治, 金森昌彦, 石原裕和, 大森一生, 杉森一仁, 古島弘三, 井ノ上逸朗, 木村友厚 : TGF-beta 遺伝子多型と脊椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) との関連, 第16回日本整形外科基礎学術集会 : 広島2001. 10

1. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y, Kawahara H, Ogata E, Matsumoto T. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine*. 1992 ; 17 : S33-6.

2. Yamada Y, Okuizumi H, Miyauchi A, Takagi Y, Ikeda K, Harada A. : Association of transforming growth factor beta 1 genotype with spinal osteophytosis in Japanese women. *Arthritis Rheum*. 2000 ; 43 : 452-60.

3. Yamada Y, Miyauchi A, Goto J, Takagi Y, Okuizumi H, Kanematsu M, Hase M, Takai H, Harada A, Ikeda K. : Association of a polymorphism of the transforming

growth factor-beta 1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res*. 1998 ; 13 : 1569-76.

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

大河 昭彦 (千葉大学大学院医学研究院整形外科), 相庭 温臣 (千葉大学大学院医学研究院整形外科),
池田 義和 (千葉大学大学院医学研究院整形外科), 田原 正道 (千葉大学大学院医学研究院整形外科),
後藤 澄雄 (千葉大学大学院医学研究院整形外科), 山崎 正志 (千葉大学大学院医学研究院整形外科),
守屋 秀繁 (千葉大学大学院医学研究院整形外科)

KEYWORDS=ossification of the spinal ligaments, polymorphism, Leptin receptor,
Nucleotide pyrophosphatase (NPPS)

【研究要旨】

【目的】脊柱靱帯骨化症のモデル動物の原因遺伝子であるレプチン受容体遺伝子およびNPPS 遺伝子の脊柱靱帯骨化症への関与を検討するため、これら遺伝子の多型と骨化の程度についての相関を解析した。【方法】全脊柱のレントゲンを撮影し、genomic DNA を収集し得た後縦靱帯骨化症症例 130 例を対象とした。レプチン受容体遺伝子 5 ヶ所、およびNPPS 遺伝子 4 ヶ所の SNPs について、各症例の genotype を決定した。頸椎のみに骨化を認める C 群と、頸椎の骨化の有無に関わらず胸椎に骨化を認める TL 群に分類し、両群間の genotype の頻度について相関を検討した。各 genotype における後縦靱帯骨化椎体数について、相関を検討した。【結果】レプチン受容体遺伝子の A861G 多型において、TL 群は C 群に比べ G allele をもつものが多かった。また、genotype が GG の症例は、骨化椎体数が多い傾向にあった。NPPS 遺伝子の IVS20-11delT 多型において、TL 群の男性は C 群の男性に比べ variant allele をもつものが多かった。また、variant allele をもつ症例は、骨化椎体数が多い傾向にあった。以上より、レプチン受容体遺伝子およびNPPS 遺伝子が後縦靱帯骨化の分布や程度に関与する可能性が示唆された。

【はじめに】

脊柱靱帯骨化症の成因には、多因子の遺伝的要因と、局所のメカニカルファクターや代謝などの環境要因の双方が関わると考えられるが、詳細は未だ不明である。

一方、これまで、脊柱靱帯骨化症のモデル動物として、Zucker fatty rat と ttw マウスが知られており、その原因遺伝子はすでに解明されている。

Zucker fatty rat (*fa/fa*) は遺伝性に耐糖能異常、肥満を呈するラットであるが、脊柱靱帯の肥厚、軟骨増殖、骨化が生じることが明らかにされており¹⁾、脊柱靱帯骨化症のモデル動物であると認識されている。本ラットの原因はレプチン受容体遺伝子のミスセンス変異であり^{2,3)}、その結果レプチン受容体に対するリガンドの結合能が低下し、レプチンのシグナル伝達が障害されている⁴⁾。レプチン受容体のリガンドであるレプチンは、脂肪組織において産生されるホルモンで、主に糖代謝、脂質代謝等のエネルギー代謝を調節する因子である。

脊柱靱帯骨化症に耐糖能異常、肥満の合併が多いこと、レプチンのシグナル伝達障害のラットが脊柱

靱帯骨化を呈することから、レプチン—レプチン受容体系の異常が脊柱靱帯骨化の発生に関与する可能性が考えられる。我々は、これまで、臨床症例での血清レプチン値の測定、脊柱靱帯組織および培養細胞でのレプチン受容体遺伝子発現の確認を行い、レプチン—レプチン受容体系と脊柱靱帯骨化の発生進展との関わりについて研究を行ってきた。その結果、脊柱靱帯骨化症女性症例では血清レプチン値が有意に高く脊柱靱帯骨化の発生進展に高レプチン血症が関与する可能性のあること⁵⁾、レプチン受容体遺伝子が脊柱靱帯組織に発現しておりレプチンが脊柱靱帯組織に対して直接の作用を有すること⁶⁾、培養脊柱靱帯細胞においてもレプチン受容体遺伝子が発現しておりこの細胞のIGF-1 添加による増殖促進に対しレプチンが促進的にはたらくこと⁷⁾、を明らかにした。しかしながら、脊柱靱帯骨化症症例:157 例と、control として非骨化症症例:92 例から抽出した genomic DNA を用いて、レプチン受容体遺伝子の coding 領域 5 ヶ所の多型について genotype の頻度、allele 頻度と脊柱靱帯骨化の有無との相関を検討した結果では、有意な相関はみられなかった⁸⁾。

表1 レプチン受容体遺伝子A861G多型C群-TL群間の比較

	genotype				allele frequency		
	GG	GA	AA	A-	A+	G	A
C群 (n = 70)	45	21	4	45	25	0.79	0.21
男性	35	19	2	35	21	0.79	0.21
女性	10	2	2	10	4	0.79	0.21
TL群 (n = 57)	46	10	1	46	11	0.89	0.11
男性	18	3	0	18	3	0.93	0.07
女性	28	7	1	28	8	0.88	0.12

$p = 0.041$ $p = 0.028$

また、もうひとつの脊柱靭帯骨化症モデル動物である *ttw* マウス (*ttw/ttw*) の原因は、Nucleotide pyrophosphatase (NPPS) 遺伝子の nonsense mutation であり⁹⁾、NPPS 遺伝子の機能低下が異所性骨化をきたすと考えられる。中村らはヒト NPPS 遺伝子の SNPs (一塩基多型) の検索を行い 10ヶ所の変異を同定し、イントロン 20 の splice acceptor site の変異が OPLL の有無と相関すると報告した¹⁰⁾。しかし他施設のその後の追試ではその相関は確認されていない。

本年度の研究では、後縦靭帯骨化症の骨化の程度とレプチン受容体遺伝子多型および NPPS 遺伝子多型との相関を検討した。

【方法】

1. レプチン受容体遺伝子の解析

平成 11 年度の報告において⁸⁾、レプチン受容体遺伝子内の coding 領域 5ヶ所の common polymorphism (A519G, A861G, T1222C, G2161C, A3250G) について genotype を決定した 156 例の脊柱靭帯骨化症のうち、全脊柱のレントゲンを撮影し得た後縦靭帯骨化症症例 127 例 (男性 77 例, 女性 50 例) を解析に用いた。頸椎のみに骨化を認める C 群 70 例 (男性 56 例, 女性 14 例) と、頸椎の骨化の有無に関わらず胸椎に骨化を認める TL 群 57 例 (男性 21 例, 女性 36 例) の 2 群に分類し、両群間の genotype の頻度, allele 頻度をカイ二乗検定により比較検討した。また、後縦靭帯骨化の骨化椎体数をカウントし, genotype による骨化椎体数の相違を t 検定を用いて検討した。

2. NPPS 遺伝子の解析

全脊柱のレントゲンを撮影し, 伝子多型のタイプ

ングを行った後縦靭帯骨化症症例 130 例 (男性 79 例, 女性 51 例) を用いた。中村らの報告¹⁰⁾に基づいて NPPS 遺伝子の common polymorphism 4ヶ所 (A533C, IVS + 27T → C, IVS20-11delT, - 596C → T) について, 各症例の genotype を決定した。頸椎のみに骨化を認める C 群 71 例 (男性 57 例, 女性 14 例) と, 頸椎の骨化の有無に関わらず胸椎に骨化を認める TL 群 59 例 (男性 22 例, 女性 37 例) の 2 群に分類し, 両群間の genotype の頻度, allele 頻度をカイ二乗検定により比較検討した。また, 後縦靭帯骨化の骨化椎体数をカウントし, genotype による骨化椎体数の相違を t 検定を用いて検討した。

【結果】

レプチン受容体遺伝子多型では, 検討した 5ヶ所のうち A 861 G 多型において, TL 群は C 群に比べ G allele が多く (0.028), A allele をもたない OPLL 症例は, 骨化が胸椎に及ぶ傾向にあるという相関がみられた ($p = 0.041$) (表 1)。後縦靭帯骨化椎体数との関連では, A861G 多型において, A allele をもたないものすなわち genotype GG の症例は, A allele をもつものに比べ骨化椎体数が多い傾向 ($p = 0.0498$) を認めた (図 1)。以上より, レプチン受容体遺伝子 A 861 G 多型において, A allele は骨化に抑制的に, G allele は骨化に促進的な相関を示した。

NPPS 遺伝子多型では, 検討した 4ヶ所のうち, IVS20-11delT すなわちイントロン 20 の splice acceptor site の T が欠失する多型において, TL 群の男性は C 群の男性に比べ variant allele の allele 頻度が多く ($p = 0.0117$), TL 群の男性は C 群の男性に比べ variant allele をもつものが多かった ($p = 0.0165$)。したがって, この部位の T の欠失のある

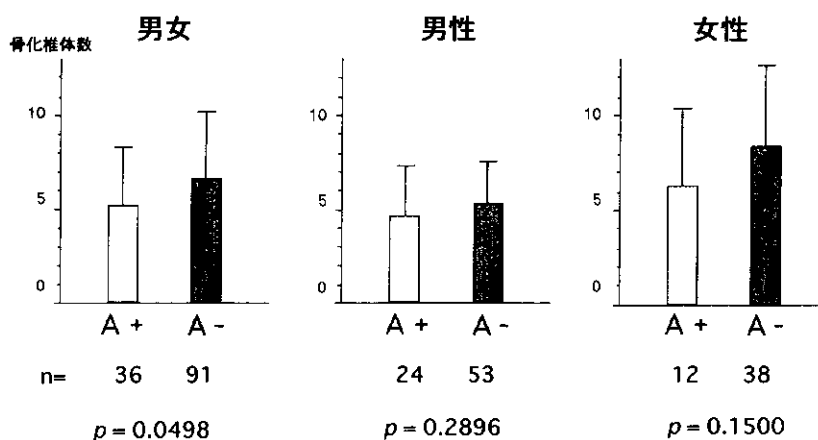


図1 レプチン受容体遺伝子A861G多型とOPLL骨化椎体数

表2 NPPS遺伝子IVS20-11delT多型C群-TL群間の比較

	genotype				allele frequency		
	ww	wv	vv	v-	v+	w	v
C群 (n = 71)	35	26	10	35	36	0.68	0.32
男性	30	19	8	30	27	0.69	0.31
女性	5	7	2	5	9	0.61	0.39
TL群 (n = 59)	21	30	8	21	38	0.61	0.39
男性	5	11	6	5	17	0.48	0.52
女性	16	19	2	16	21	0.69	0.31

w : wild type allele

v : variant allele (del T)

$p = 0.0165$

$p = 0.0117$

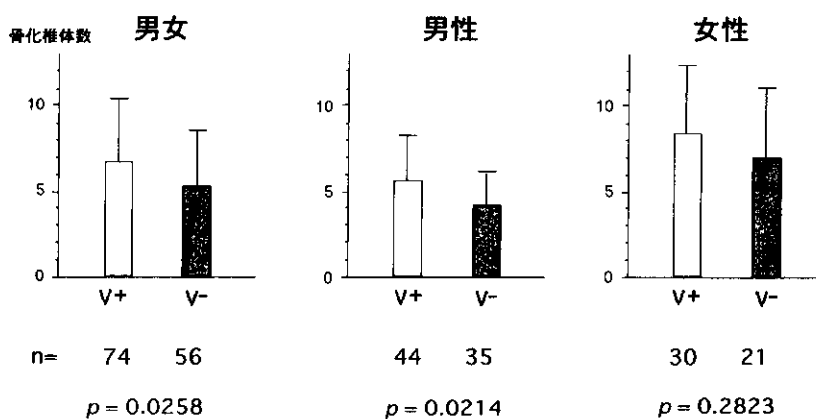


図2 NPPS遺伝子IVS20-11delT多型とOPLL骨化椎体数

OPLL 男性症例は、骨化が胸椎に及ぶ傾向にあるという相関を示した(表2)。後縦靭帯骨化椎体数との関連では、IVS20-11delTにおいて、variant alleleをもつものは、もたないものに比べ骨化椎体数が多い

傾向にあり ($p = 0.0258$)、女性では有意ではないものの、男性により強くこの傾向を認めた ($p = 0.0214$)。以上より、イントロン 20 の splice acceptor site 近傍の多型における T の欠失は、

OPLLにおいて、骨化が胸椎に及ぶことおよび、骨化椎体数が増加することに相関を示した(図2)。

【考察】

今回の検討において、レプチン受容体遺伝子では、A 861 G多型において、A alleleは骨化に抑制的に、G alleleは骨化に促進的な相関を示した。レプチン受容体遺伝子のA861G多型は、1165アミノ酸配列の223番目が、AではGln, GではArgがコードされる。この部位は extracellular domain にあり、Zucker fatty rat のミスセンス変異の46アミノ酸上流と比較的近傍に位置する。

Chagnonらは、A alleleをもつものは、もたないものに比べ、fat free massが少なく、また、G alleleをもつものは、もたないものに比べ、body mass index, 皮下脂肪厚, fat mass, 血中レプチン値が高い、言い換えれば、A alleleは肥満に抑制的に、G alleleは促進的に相関すると報告した^{11,12)}。したがって、レプチンのシグナル伝達は、A alleleでは強く、G alleleは弱くなる方向に関係している可能性が考えられる。

本研究では、A alleleは骨化に抑制的に、G alleleは促進的な相関を示した。これは、Zucker fatty ratにおいてレプチンのシグナル伝達が障害された結果肥満と OPLL をきたすことに矛盾しない結果である。したがって、レプチン受容体遺伝子が骨化の有無ではなく、骨化の程度に関与する可能性が示唆された。

NPPS 遺伝子と OPLL について、近年、腰塚らは IVS15-14T→Cの多型が OPLL の有無に相関し、特に若年例、骨化椎体数の多い症例に強い相関を示すと報告した¹³⁾。今回我々は、NPPS 遺伝子の common polymorphism について骨化の程度との相関を検討したが、IVS20-11delT多型における variant allele は OPLL 男性症例において骨化に促進的な相関を示した。我々のデータからも、骨化の程度に関与する可能性が示唆された。

【結語】

脊柱靭帯骨化症モデル動物の原因遺伝子である、レプチン受容体遺伝子と NPPS 遺伝子が、骨化の程度に関与する因子である可能性が示唆された。

【参考文献】

1) 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

- 2) 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
- 3) 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
- 4) Yamashita T, Murakami T, Iida M, Kuwajima M, Shima K : Leptin receptor of Zucker fatty rat performs reduced signal transduction. *Diabetes* 46 : 1077-1080, 1997
- 5) 池田義和, 山崎正志, 後藤澄雄, 中島文毅, 池田 修, 小笠原明, 後藤憲一郎, 守屋秀繁 : 後縦靭帯骨化症における血清レプチン値の検討. 厚生省特定疾患 骨・関節系疾患調査研究班 平成 9 年度研究報告書
- 6) 相庭温臣, 山崎正志, 池田義和, 池田 修, 小笠原明, 後藤澄雄, 守屋秀繁 : 脊柱靭帯骨化症例における血清レプチン濃度およびレプチン受容体遺伝子発現. 厚生省特定疾患 骨・関節系疾患調査研究班 平成 10 年度研究報告書
- 7) 山崎正志, 相庭温臣, 池田 修, 小笠原明, 国府田正雄, 後藤憲一郎, 金 民世, 守屋秀繁 : 培養脊柱靭帯細胞のレプチン濃度に対する応答性. 厚生省特定疾患 骨・関節系疾患調査研究班 平成 10 年度研究報告書
- 8) 大河昭彦, 山崎正志, 相庭温臣, 池田義和, 後藤澄雄, 守屋秀繁 : 脊柱靭帯骨化症におけるレプチン受容体遺伝子多型の解析. 厚生省特定疾患 脊柱靭帯骨化症調査研究班 平成 11 年度研究報告書
- 9) Okawa A, Nakamura I, Goto S, Moriya H, Nakamura Y, Ikegawa S : Mutation in *Npps* in a mouse model of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nature Genetics* 19 : 271-273, 1998
- 10) Nakamura I, Ikegawa S, Okawa A, Shinya O, Koshizuka Y, Kawaguchi H, Nakamura K, Koyama T, Goto S, Toguchida J, Matsusita M,

- Ochi T, Takaoka K, Nakamura Y : Association of the human *NPDS* gene with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine (OPLL). *Human Genetics* 104 : 492-497, 1999
- 11) Chagnon YC, Wilmore JH, Borecki IB, Gagnon J, Perusse L, Chagnon M, Collier GR, Leon AS, Skinner JS, Rao DC, Bouchard C : Associations between the leptin receptor gene and adiposity in middle-aged caucasian males from the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 85(1) : 29-34, 2000
- 12) Chagnon YC, Chung WK, Perusse L, Chagnon M, Leibel RL, Bouchard C : Linkages and associations between the leptin receptor (LEPR) gene and human body composition in the Quebec Family Study. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 23(3) : 278-86, 1999
- 13) Koshizuka Y, Kawaguchi H, Ogata N, Ikeda T, Mabuchi A, Seichi A, Nakamura Y, Nakamura K, Ikegawa S : Nucleotide pyrophosphatase gene polymorphism associated with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res* 17(1) : 138-144, 2002

II

脊 髓 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

内田 研造 (福井医科大学医学部整形外科), 馬場 久敏 (福井医科大学医学部整形外科),
前沢 靖久 (福井医科大学医学部整形外科), 久保田 力 (福井医科大学医学部整形外科),
中嶋 秀明 (福井医科大学医学部整形外科)

KEYWORDS= メカニカルストレス, 脊髄神経細胞, 神経栄養因子

【研究要旨】

脊柱管内臓器としての脊髄は脊柱運動により常時力学的影響に曝されている。即ち生理的には脊柱伸展, 特に屈曲の際には脊髄に加わる伸張力により軸方向への移動および脊髄内に緊張帯が生じる。また後縦靭帯骨化などの圧迫要素の存在がこの動態現象を更に増強すると考えられる。今回, 脊髄神経細胞, グリア細胞の mechanical stress の応答を in vitro で観察した。細胞の機械的ストレスには FX-3000TM-Flexercell Strain Unit を使用した。二重染色の結果では, 抗 GFAP/BDNF 抗体陽性細胞, 抗 GFAP/NT-3 抗体陽性細胞共に細胞障害が生じる前の約 6 時間の時点での immuno-reactivity が増加していた。この変化は機械的ストレスに対して, 特に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, 維持に関与していることが示唆された。

【はじめに】

脊柱管内臓器としての脊髄は静的状態においても脳脊髄液, 血液循環によりメカニカルな刺激を受け, 脊柱運動により更に大きな力学的影響に曝されていると考えられる。即ち生理的には脊柱伸展, 特に屈曲の際には脊髄に加わる伸張力により軸方向への移動および脊髄内に緊張帯が生じる。後縦靭帯骨化などの圧迫要素の存在があればこの動態現象は更に増強する。我々は過去に, 慢性に圧迫を受ける脊髄組織を観察し, 圧迫に対して, 脱落, 萎縮といった組織学的変化を伴いながらも, 生き残った神経細胞は, その吻側尾側に再分布し, しかも soma size, dendritic tree 増大といった形態学的変化を報告してきた^{1,2)}。また神経細胞周囲のグリア細胞も Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) を産生し, 組織の修復, 再生に関与している可能性を in vivo で証明した³⁾。しかし, 組織に対する損傷圧迫は, 組織の虚血および炎症など神経細胞周囲の環境の影響が生じているため, 細胞単独での生物学的活性を知ることは不可能であり, 細胞レベルでの機械的ストレスの変化を観察した報告はいまだ見受けられない。Flexercell strain unit は培養細胞に周期的牽引負荷を与えることができる細胞伸縮装置⁴⁾であり, 筋肉細胞, 血管内皮細胞, 造骨細胞の mechanical signal のメカニズム解明に応用されている⁵⁾。

今回, 我々はこの装置を用いて, 脊髄神経細胞,

グリア細胞の mechanical stress の応答に神経栄養因子 (BDNF, NT-3) が関与しているかを in vitro で明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

a) メカニカルストレスによる培養脊髄細胞の形態変化 (figure 1)

培養脊髄細胞は生後 1 - 2 日 Sprague-Dawley ラットより摘出した。Hank 液排出後, 5 ml の 0.25 % トリプシンと 5 滴の 0.2 % DNase 液を加え, 37°C で 30 分間保温した。培養液は Dulbecco's Modified Eagle Medium (MEM) で, これに 10 % 非働化ウマ血清, 5 mg/mL グルコース, ペニシリン 100 U/ml, 100 ug/ml ストレプトマイシンを添加し 6 日間培養した。細胞の機械的ストレスには FX-3000TM-Flexercell Strain Unit (Flexercell International Corporation, Hillsborough, NC) を使用した。細胞は 3×10^4 /well にて Flex I flexible bottomed plate (ストレス処置群), Flex II flexible control plate (コントロール群) に播種し, 5 % CO₂ incubator 内で機械的刺激を開始した。機械的ストレスは ELLIS ら⁴⁾の報告を参考に 1 秒間伸展/弛緩 (最大 20 % 牽引) を継続的に加えた。細胞障害の指標として Hank 液中の nitric oxide (NO), Lactate dehydrogenase (LDH) を測定した。NO は Griess 法⁶⁾に準じ測定しそれぞれ経時的に観察した。刺激開始後, 経時的に (1, 2, 6, 24, 48 時間) 細胞形

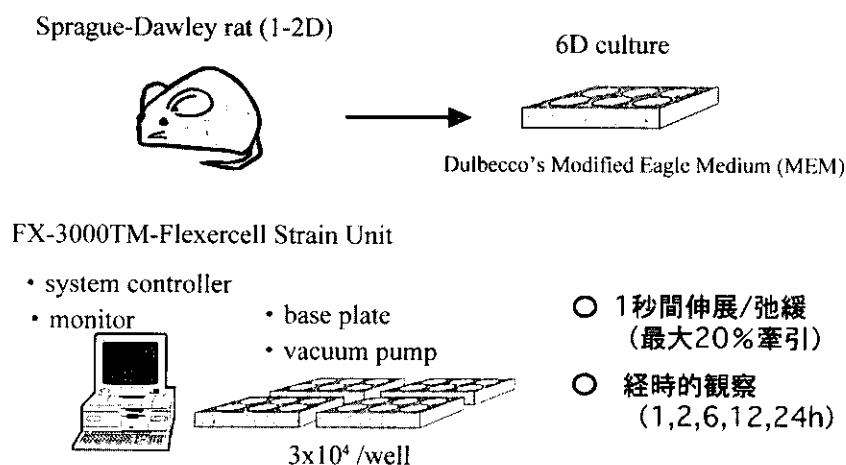


Figure 1 METHODS

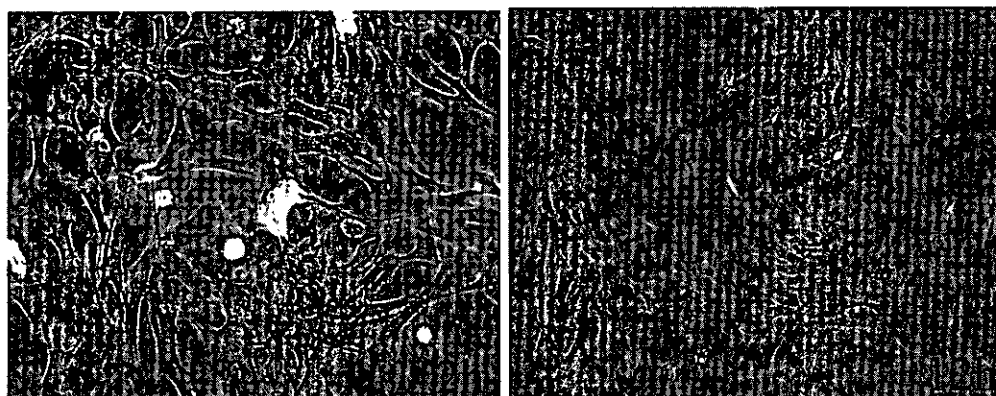


Figure 2 stress group

態を観察した。

c) 免疫染色

細胞特異型マーカーとして、神経細胞は、Microtubule-Associated Protein 2a, b, c (MAP-2) : mouse monoclonal antibody (NeoMakers), アストロサイトは Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) : rabbit polyclonal antibody (Sanbio) を用いて fluorescein (FITC) で識別, 抗 BDNF (santa cruz), 抗 NT-3 は rhodamine で標識し, double stain で評価した。

【結果】

a) 経時的形態変化と細胞障害の程度

neuron soma の縮小, 細胞膜の肥厚, 細胞間質の拡大が 6 時間以上のストレスで観察された (figure 2)。LDH, NO 値もその形態変化とほぼ一致して 6 時間以降で高値を示した。

b) 免疫染色

MAP2 陽性細胞数は, 時間と共に減少するのに対

し, GFAP 陽性細胞は比較的ストレスに対してその数は比較的保たれていた。MAP2 細胞同様に BDNF 陽性細胞も減少し, double stain の結果では, 抗 MAP2/BDNF 抗体陽性細胞はストレス時間に伴い数は減少していた。astrocyte については, 抗 GFAP/BDNF 抗体陽性細胞はストレス時間に伴い比較的その数は保たれていたが, 経時的な観察により, 残存する抗 GFAP 陽性細胞の immunoreactivity は高かった。抗 GFAP/NT-3 抗体陽性細胞の変化も同様であり, 6 時間で immunoreactivity がピークに達していた (figure 3)。一方ニューロンの標識では, BDNF 同様, 抗 MAP2/NT-3 抗体陽性細胞数は減少していったが残存する MAP2 は高率で NT-3 陽性であった (figure 4)。

【考察】

Flexercell strain unit は培養細胞に周期的牽引負荷を与えることができる細胞の伸縮装置であり, 筋

6 hr

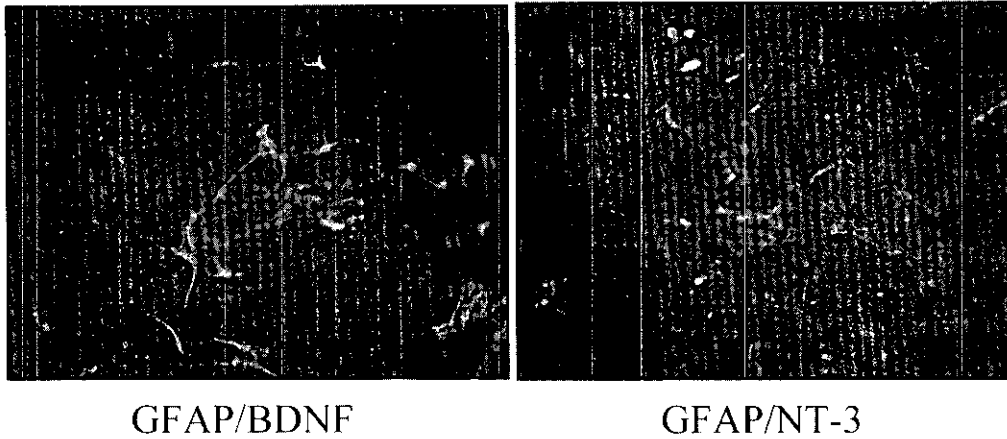


Figure 3 RESULT 1 : reactive astrocyte

6 hr

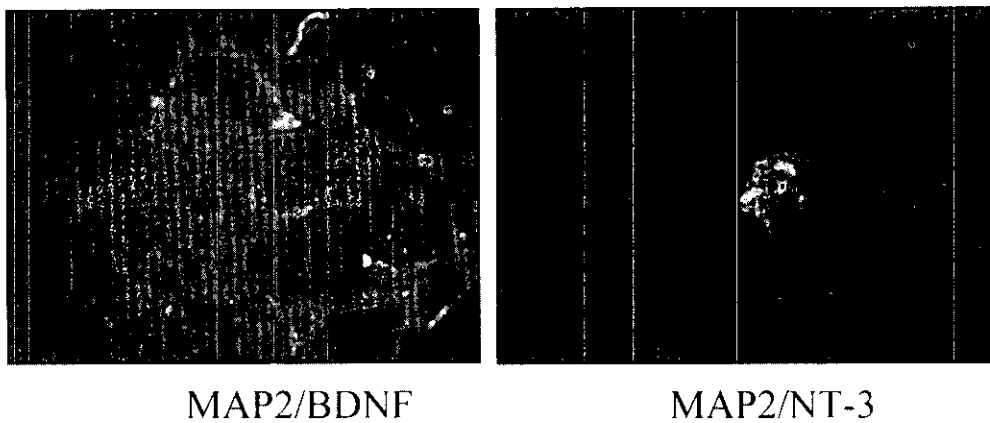


Figure 4 RESULT 2 : motoneurons

肉細胞，血管内皮細胞，造骨細胞の mechanical signal のメカニズム解明に応用されてきた。神経細胞についての報告については ELLIS らの報告にはじまる⁴⁷⁾。彼等の伸縮条件は伸縮率を30—70%にし、50m秒のパルスで行っているが、これは生体内では存在し得ない条件であった。今回我々は予備実験の結果より伸縮率15%、伸縮回数が毎秒1回程度の比較的軽度なストレス条件を設定した。その結果ストレス開始後6時間で形態変化、神経細胞より放出されるLDH活性の増加、NO活性の増加が観察された。中枢神経系におけるNOの機能的役割についてはシナプス可塑性、細胞の増殖と活性化、細胞死などが考えられているが^{8,9)}、アストロサイトの活性の増加を考えれば、今回のNO値の変化はニューロン死の結果と推測される。

神経成長因子 (nerve growth factor) を代表とす

る神経栄養因子は、特異的レセプターを介してニューロンに作用し、神経突起の伸展促進、生存維持、分化誘導などの活性を示す蛋白性分子群で、BDNF、NT-3はその代表蛋白とされている³⁾。今回の免疫染色の結果では、ニューロンでは、抗MAP2/BDNF/、抗MAP2/NT-3抗体陽性細胞数は減少していったが残存するMAP2陽性細胞は高率で両抗体と共に陽性であった。一方アストロサイトは抗GFAP/BDNF抗体陽性細胞、抗GFAP/NT-3抗体陽性細胞共に細胞障害が生じる前の6時間の時点でのimmuno-reactivityが増加していた。この変化は機械的ストレスに対して、反応性アストロサイトがNeurotrophin発現を増加させていることを意味する。これは以前in vivoで報告した我々の結果³⁾と一致している。今回の結果より培養細胞下での機械的ストレスに対するアストロサイトが生存維持、機

能修復に関与している可能性が示唆された。

[参考文献]

- 1) Baba H, Maezawa Y, Imura S, et al. Quantitative analysis of the spinal cord motoneuron under chronic compression : an experimental observation in the mouse. *J Neurol* 1996 ; 243 : 109-16.
- 2) Baba H, Maezawa Y, Uchida K, et al. Three-dimensional topographic analysis of spinal accessory motoneurons under chronic mechanical compression : an experimental study in the mouse. *J Neurol* 1997 ; 244 : 222-9.
- 3) Uchida K, Baba H, Maezawa Y, et al. Histological investigation of spinal cord lesions in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy) : morphological changes in anterior horn cells and immunoreactivity to neurotrophic factors. *J Neurol* 1998 ; 245 : 781-793.
- 4) Ellis EF, Mckinney JS, Willoughby KA et al. A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture : characterization of the model using astrocytes. *J Neurotrauma* 1995 ; 12 : 325-39.
- 5) Albert JB, Mari T, Juro Y, et al. Mechanoreception at the cellular level : the detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals. *Biochem Cell Biol* 1995 ; 73 : 349-65.
- 6) Colasanti M, Persichini T, Meneqgazzi M, et al. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression. Suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem* 1995 ; 10 : 26731-3.
- 7) Rzigalinski BA, Weber JT, Willoughby KA, et al. Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes. *J Neurochem* 1995 ; 70 : 2377-85.
- 8) Nomura, Y and Kitamura Y. Inducible nitric oxide synthase in glial cells. *Neurosci Res* 1993 ; 18 : 103-107.
- 9) Goureau O, Hicks D, Courtois Y, et al. Induction and regulation of nitric oxide synthase in retinal muller glial cells. *J Neurochem* 1994 ; 63 : 310-317.

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

国府田正雄 (千葉大学医学部整形外科), 山崎 正志 (千葉大学医学部整形外科),
橋本 将行 (千葉大学医学部整形外科), 村上 正純 (千葉大学医学部整形外科),
白澤 浩 (千葉大学分子ウイルス), 守屋 秀繁 (千葉大学医学部整形外科)

KEYWORDS=BDNF, adenovirus, in vivo gene transfer, axonal regeneration

【研究要旨】

〔目的〕 成ラット脊髄切断モデルに対しアデノウィルスベクターを用いて BDNF を遺伝子導入しその効果につき検討すること。〔方法〕 成ラット脊髄切断部に BDNF および β -galactosidase を組み込んだアデノウィルスベクターを注入した。Western blotting, X-gal 染色・免疫染色にて遺伝子発現を, BBB locomotor scale にて行動評価および神経トレーサーを用い軸索再生を評価した。〔結果〕 BDNF 遺伝子導入したラットでは行動の改善が得られ, 逆行性神経トレーサーにて赤核のニューロンが標識された。〔結論〕 アデノウィルスベクターを用いた BDNF 遺伝子導入により, 成ラット脊髄切断モデルにおいて下降性軸索の一部再生と後肢機能の回復が得られた。

A. 研究目的

神経栄養因子とは神経細胞の分化・生存・突起伸展などを促進する物質のことであり, 脊髄損傷に対してもその効果が期待され, 様々な報告がなされている。神経成長因子 (Nerve growth factor) ファミリーは神経栄養因子の代表として広く知られている。我々はこの中でも特に脳由来神経栄養因子 (Brain derived neurotrophic factor) に注目し検討を重ねてきた。現在までに, 脊髄損傷後急性期に BDNF mRNA の発現上昇がみられること⁷⁾, BDNF 髄腔内投与にて superoxide dismutase の発現低下が抑えられ, myelin basic protein の発現が上昇して, 行動学的にも改善すること⁸⁾, さらに BDNF 髄腔内投与にて脊髄損傷後遅発性におこるオリゴデンドロサイトのアポトーシスが抑制されること¹¹⁾を報告してきた。

今回さらに, BDNF の軸索再生に対する効果につき検討するため, アデノウィルスベクターを用いた BDNF 遺伝子導入を試みた。本研究の目的は, ラット脊髄切断モデルに対しアデノウィルスベクターを用いて BDNF を遺伝子導入しその効果につき検討することである。

B. 方法

非増殖性アデノウィルスベクターの作製 COS-TPC 法¹⁶⁾を用いて E. coli β -galactosidase (AdLacZ) およびマウス BDNF (AdBDNF) を CAG

プロモーター下流に組み込んだ非増殖性アデノウィルスベクターを作製した。力価はともに 3.0×10^9 plaque forming units (pfu)/ml に調製した。

ウェスタンブロット解析 BDNF 発現の確認のためウェスタンブロット解析をおこなった。COS 細胞に AdLacZ および AdBDNF を感染させてその上清をサンプルとした。ウイルス量は AdLacZ では multiplicity of infection (moi) 100, AdBDNF では moi 10, 50, 100 とした。

脊髄切断モデル・ベクター注入 雄ウィスター系ラット 8 週齢を用いた。ハロセン麻酔下に T8 椎弓切除し, マイクロ尖刀にて脊髄を完全に切断した。椎体後縁をマイクロ尖刀の先端で何往復か探り, 切断が完全であることを確認した。頭側・尾側両断端より約 1 mm の部位にガラスマイクロピペットを用いベクターを $10 \mu\text{l}$ ずつ注入した (計 3×10^7 pfu のウイルスを注入したこととなる)。

X-gal 染色・免疫染色 AdLacZ 群は, 注入後 24 時間, 3 日, 1 週, 2 週および 4 週の時点で 4% パラフォルムアルデヒドにて経心的灌流固定し, 脊髄および脳の凍結切片を作製した。X-gal 染色にて LacZ の発現を確認した。また, LacZ と各種細胞マーカーの免疫二重染色を行い, 遺伝子導入細胞の細胞種を同定した。細胞マーカーとして, ニューロンは Neu-N, アストロサイトは GFAP, オリゴデンドロサイトは RIP, ミクログリアは OX-42 をそれぞれ用いた。

行動学的検討 後肢行動の改善を BBB

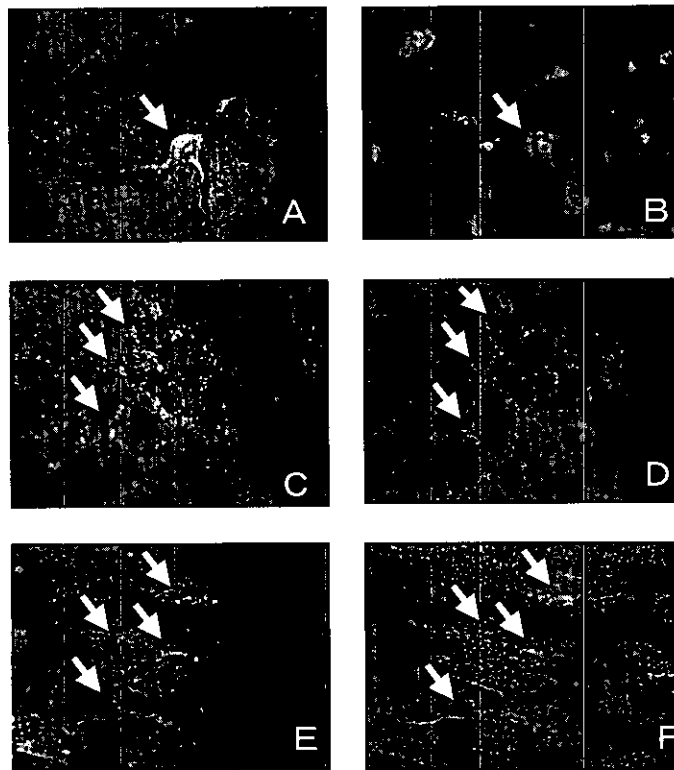


図3 抗 β -galactosidase抗体と細胞マーカーによる二重染色の結果を示す。A・C・Eは抗 β -galactosidase抗体による免疫染色、BはニューロンのマーカーNeu-N、DはオリゴデンドロサイトのマーカーRIP、FはアストロサイトのマーカーGFAPそれぞれの抗体による免疫染色である。矢印は二重陽性細胞を示す。

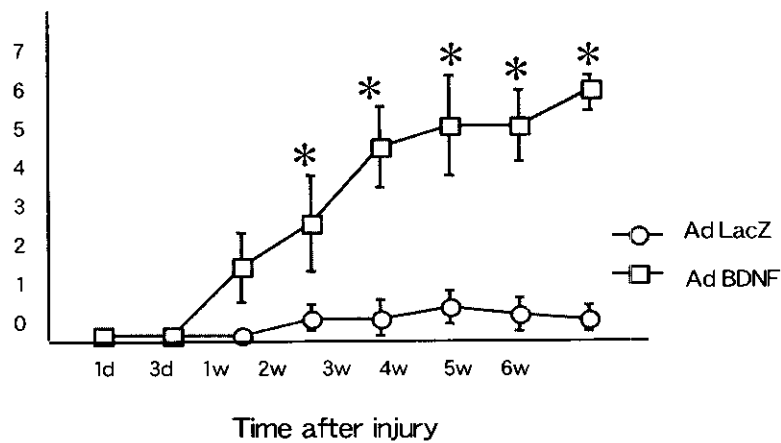
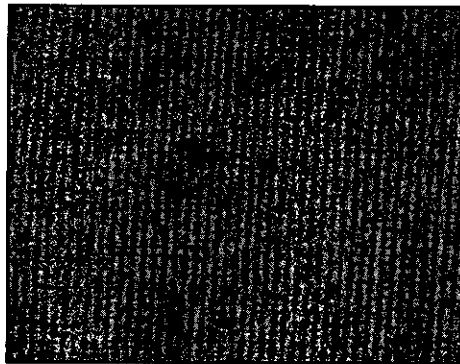


図4 BBB locomotor scaleによる後肢運動機能評価である。丸印の線はAdLacZ群ラットを、四角の線はAdBDNF群ラットのスコーを示す。AdBDNF群では損傷後2週より有意な回復が始まっていた。損傷後6週の時点における平均スコアはAdLacZ群0.4点に対しAdBDNF群6.0点であった。

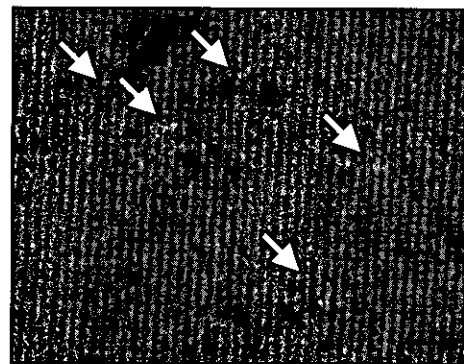
ベクターを感染させていないCOS細胞およびmoi 100にてAdLacZを感染させたCOS細胞の培養上清ではBDNFは検出されなかった。これに対してAdBDNF感染COS細胞では培養上清中にBDNFが

検出され、その濃度はウイルス感染量の増大に伴って上昇していた。

X-gal染色の結果(図2)、ベクター注入部付近の脊髄では注入後24時間よりLacZ発現が認められた。



AdLacZ



AdBDNF

図5 逆行性神経トレーサーFluorogoldを用いたretrograde tracingの結果である。AdBDNF群では赤核にラベルされる細胞を認めた(矢印)。一方AdLacZ群では脳幹部にラベルされる細胞は認めなかった。

注入後3日になるとその発現は増し、注入後1週でピークとなった後、2週でも弱いながらも発現が認められた。注入部付近のほとんどすべての細胞にX-gal染色陽性シグナルが認められた。一方、脳では、注入後1週をピークとして、赤核、前庭核、網様体、小脳プルキンエ細胞などにX-gal染色陽性シグナルがみられたが、皮質運動野には全経過を通じてX-gal染色陽性シグナルを認めなかった。

抗LacZ抗体と細胞マーカーの二重染色では(図3)、脊髄においてLacZとNeu-N二重陽性のニューロン、LacZとGFAP二重陽性のアストロサイト、LacZとRIP二重陽性のオリゴデンドロサイトが認められたが、LacZとOX-42二重陽性のミクログリアは認められなかった。また、脳ではLacZとNeu-N二重陽性のニューロンのみで、二重陽性のグリア細胞はみられなかった。

BBB locomotor scaleを用いて後肢運動機能を評価すると(図4)、AdBDNF群では損傷後2週よりAdLacZ群と比べ有意に改善が認められた。この改善は損傷後6週まで続き、損傷後6週の時点でのAdBDNF群の平均スコアは6.0点に対し、AdLacZ群の平均スコアは0.4点だった。AdBDNF群のうち回復がみられた2匹の脊髄を損傷後6週で再切断したところ、それまでに得られた回復がすべて失われた。

FGを用いたretrograde tracingの結果(図5)、AdBDNF群では赤核にラベルされるニューロンを認めたが、AdLacZ群では全くラベルされる細胞を認めなかった。

D. 考察

Ramon y Cajal¹⁸⁾以来、成熟哺乳動物の中枢神経系はひとたび損傷されると再生しないと信じられてきた。そのおもな原因として、中枢神経系ミエリン中の軸索伸展阻害因子などによる非許容的環境、神経栄養因子の不足などが現在広く認められている。これらに対して脊髄の再生を促す実験的アプローチとして、非許容的環境を許容的環境に変える方法やニューロンの軸索伸展する力を増す方法などが試されている。前者に属するものとしては、胎児脊髄組織の移植⁸⁾、Schwann細胞・嗅上皮細胞などの移植^{17,20,21)}、ミエリン中の阻害因子に対する抗体の投与¹⁹⁾などがある。一方後者に属するものとしては神経栄養因子の投与^{5,7,9,11)}、遺伝子導入などが行われてきた。

脊髄損傷に対する神経栄養因子の遺伝子導入としてex vivo法^{4,10,13)}とin vivo法^{2,12,14,15)}の報告がある。なかでもアデノウィルスベクターを用いたin vivo法は、その導入効率の高さが最大のメリットといえる。本研究においても、注入部付近の脊髄のみならず、脳幹部の下降性軸索起始核にも遺伝子が導入されたことが確認された。

今回、BDNFを遺伝子導入したラットにおいて、BBB locomotor scaleにて後肢行動の改善が認められ、逆行性神経トレーサーfluorogoldにて赤核のニューロンがラベルされたこと、また再切断により回復した機能がすべて失われたことをあわせると、BDNF遺伝子導入によって下降性軸索の再生がおこり後肢機能の回復が得られたといえる。

BDNF 遺伝子導入により軸索再生がおこるメカニズムについてはまだ詳細は不明である。注入部位で局所的に BDNF の濃度が一過性に高まることによる chemotropic な効果,あるいは逆行性に脳幹部の神経核にまでベクターが到達し BDNF を強発現することによりニューロンの軸索伸展を直接刺激している可能性もある。また最近,神経栄養因子がニューロン内の cAMP 濃度を上昇させることで,中枢神経系ミエリン中の軸索伸展阻害因子の一つ myelin associated glycoprotein (MAG) に対するニューロンの反応を逆に変えることが報告されており³⁾, BDNF による軸索再生のひとつの機序かもしれない。Miuraらは,神経栄養因子レセプターの下流に位置するシグナル分子 MEK の恒常活性型をアデノウィルスベクターを用いて遺伝子導入し,(ベクターの力価,発現の効率などが異なるため単純な比較は不可能だが)われわれとほぼ同等の機能回復と軸索再生を報告している¹⁵⁾。先に述べたごとく現時点では軸索再生のメカニズムが明らかになっていないので,下流のシグナル分子一つだけよりは栄養因子自体の遺伝子導入の方が現実的といえるかもしれない。

今回得られた軸索再生および後肢機能の回復はいずれもごく一部でしかない。切断部に形成される大きな空洞や瘢痕など局所の悪条件が主な障害になっていると思われる。今後さらに良好な軸索再生と機能回復を得るためには,細胞移植などを併用して局所の環境を整えることが必要であろう。

E. 結語

アデノウィルスベクターを用いた BDNF 遺伝子導入により,成ラット脊髄切断モデルにおいて下降性軸索の一部再生と後肢機能の回復が得られた。

[参考文献]

- 1) Basso D M et al. (1995) A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **J Neurotrauma** **12** : 1-21.
- 2) Boulis NM, Bhatia V, Brindle TI, et al. (1999) Adenoviral nerve growth factor and β -galactosidase transfer to spinal cord: a behavioral and histological analysis. **J Neurosurg** **90** : 99-108
- 3) Cai D, Shen Y, De Bellard M, et al. (1999) Prior exposure to neurotrophins blocks inhibition by MAG and myelin via a cAMP-dependent mechanism. **Neuron** **22** : 89-101.
- 4) Grill R, Murai K, Blesch A, et al. (1997) Cellular delivery of Neurotrophin-3 promotes corticospinal axonal growth and partial functional recovery after spinal cord injury. **J Neurosci** **17** : 5560-5572.
- 5) Houweling DA, Van Asseldonk JT, Lankhorst AJ, et al. (1998) Local application of collagen containing brain-derived neurotrophic factor decreases the loss of function after spinal cord injury in the adult rat. **Neurosci. Lett.** **251** : 193-196.
- 6) Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. (2001) Acute up-regulation of BDNF expression resulting from experimentally-induced injury in the rat spinal cord. **Acta Neuropathol** **102** : 239-245.
- 7) Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. (2002) Effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on compression-induced spinal cord injury : BDNF attenuates down-regulation of superoxide dismutase expression and promotes up-regulation of myelin basic protein expression. **J Neuropathol Exp Neurol** **61** : 142-153.
- 8) Iwashita Y, Kawaguchi S, Murata M (1994) Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. **Nature** **367** : 167-170.
- 9) Jakeman LB, Wei P, Guan Z, et al. (1998) Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. **Exp Neurol** **154** : 170-184.
- 10) Kim DH, Gutin PH, Noble LJ, et al. (1996) Treatment with genetically engineered fibroblasts producing NGF or BDNF can accelerate recovery from traumatic spinal cord injury in the adult rat. **Neuroreport** **7** : 2221-2225.
- 11) Koda M, Murakami M, Ino H, et al. (2002) Brain derived neurotrophic factor suppresses delayed apoptosis of oligodendrocytes after spinal cord injury in rats. **J Neurotrauma** (in press)