

20020276

別添2

厚生労働科学研究費補助金

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14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井ノ上 逸朗

平成15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. 分担研究報告及び共同研究者報告

1. 後縦靭帯骨化症患者由来の培養脊柱靭帯細胞においてメカニカルストレスに よって誘導されるプロスタグランジン I ₂ の役割	6
---	---

藤 哲

2. OPLL 靭帯細胞の骨芽細胞への分化制御機構の解明	14
--	----

池田龍二

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	25
-------------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	29
---------------------------	----

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

後縦靭帯骨化症(以下、OPLL)はこれまでの遺伝子解析により、コラーゲン 11A2 遺伝子の関与が報告されている。またマイクロサテライトマーカーを用いた候補遺伝子スクリーニングにより、BMP4 を含めたいくつかの骨代謝に関連する候補遺伝子の関与も示唆されている。しかしながら、OPLL のような多因子疾患(common disease)では、当然、他にも関与する遺伝子が存在する可能性が十分予想される。そこで我々は、感受性遺伝子の網羅的同定を目指し、ゲノム全域連鎖解析を行い、21 番染色体テロメアの領域に最も強い連鎖を認めた。しかしノンパラメトリック連鎖解析においては、約 10cM(センチモルガン)領域への絞りこみが限界であるため、そこから膨大かつ詳細なスクリーニングが必要となる。次のステップとして、その領域に存在する既知の遺伝子について一塩基置換(single nucleotide polymorphisms; 以下 SNPs)をデータベースもしくはダイレクトシーケンスによるスクリーニングから、遺伝子あたり数個もしくは十数個獲得し、患者・対照関連解析を行った。さらに SNPs を組み合わせてハプロタイプを構築し、連鎖不平衡を利用し、疾患と関連する遺伝子多型の同定を目指している。これにより、疾患に直接関与する変異だけでなく、これと連鎖不平衡にある多型の検出により、感受性遺伝子同定の戦略として有効な手段となりうる。大規模な連鎖不平衡マッピングにより、コラーゲン 6A1 の OPLL への関与を示すことができ、疾患メカニズム解明の手がかりができた。

OPLL の責任遺伝子同定が本研究の重要な柱ではあるが、同時に骨化に関連する遺伝子探索から、治療法の開発を検討している。OPLL 患者から得た靭帯細胞が骨芽細胞へと分化する過程で発現増幅される遺伝子を同定し、骨芽細胞分化に重要な役割をはたすことを示すことができた。骨芽細胞分化を制御する遺伝子の同定、かつこの遺伝子発現を二本鎖 RNAi で抑制すると骨化抑制がおこるので、OPLL の治療標的が定まったといえる(分担研究報告書で詳細について報告)。

分担研究者

藤 哲 弘前大学・医学部 教授

研究協力者

池田龍二 東京大学・医科学研究所

リサーチアソシエート

A.研究目的

近年、ヒトゲノムドラフト配列の解明や数百万個から数千万個ともいわれるヒト遺伝子多型(SNPs)の報告など、一気にゲノムサイエンスが加速し、ポストシーケンスへ向かっている。医学領域においては疾患

感受性遺伝子解析、特に多因子疾患解析に注目が集まりつつある。Common Diseaseは、高血圧や気管支喘息などに代表されるように、比較的強い遺伝的背景にさまざまな環境要因が複雑に絡み合っただ発症する多因子疾患である。OPLLは整形外科領域におけるCommon Diseaseのひとつであり、原因究明においてこれまで数多くの報告がなされているものの未解決な問題が多い。これまでに行ったゲノム全域での罹患同胞対連鎖解析では、21番染色体テロメア領域に最も強い連鎖を認め、この領域の疾患への関与は示唆されているが、原因遺伝子の同定にはさらに詳細な解析を要する。そこで、近年著しい進歩を遂げ、データベース化が進むゲノム情報を有効に活用し、OPLLの疾患感受性遺伝子の同定を目指している。

B.研究方法

解析に用いたSNPsは、NCBI dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>)及びIMS-JST JSNP DATABASE (<http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/>)から選出した。選出の際に考慮する点として、SNP間距離は可能な限り遺伝子全域にわたって3-10kbで均等に保つようにし、またコーディング領域、機能的関与の可能性の高い領域のSNPを優先した。8人のOPLL患者を用いたスクリーニングによりアレル頻度1/16以上のSNPを選定し、そこからさらに、アレル頻度やSNP間の連鎖不平衡を考慮しタイピングすべきSNPを決定した。1次スクリーニングのタイピングは、600SNPsについてケース及びコン

トロールサンプルそれぞれ96例で行った。有意差を認めたSNPおよび該当遺伝子に関して、SNPを増やし、患者(246例)および対照(202例)で関連解析を行った(2次スクリーニング)。この段階で強い有意差を得たSNPについては全症例で検討した。タイピングにはPSQ96(Pyrosequencing AB)及びABI 3700 autosequencer(PE Biosystems)を使用した。ハプロタイプ解析はArlequinプログラム及び、SNPalyzeプログラム(Dynacom)を用いた。解析に用いたサンプルは、罹患同胞対は鹿児島大学、弘前大学の協力のもと140対収集された。同様に、関連解析で必要となるOPLL患者サンプル342例、コントロールサンプル298例も収集された。いずれも十分な研究への説明を行った上で、本人の同意が得られた症例である。なお年齢、症状、臨床分類等の個人情報に関しては、個人情報管理者により匿名化されたうえで、エクセルファイルにて厳密に管理されている。このように正当に収集、管理されたサンプルは、倫理委員会の承認のもと適切に使用されている。

C.結果

連鎖領域を中心にした140遺伝子、約600SNPsのスクリーニングにて、現在まで7遺伝子、14SNPsでP value<0.01の有意差を認めている(表1)。なかでも、collagen 6A1(COL6A1)遺伝子のJST016808変異は、関連解析にて約11%のアレル頻度差があり、 χ^2 検定では最も強い有意差を認め、OPLLへの関与が示唆された

表 1

Associated genes(P value < 0.01) with OPLL				
GENE	db-SNP ID	Allelic Frequency		P value
		OPLL (n=342)	Non-OPLL (n=298)	
PRKCBP2	rs762178	0.184	0.123	0.0095
DSCR1	JST022042	0.041	0.095	0.0046
CBR1	rs20572	0.232	0.121	0.0052
COL18A1	JST016803	0.345	0.454	0.0007
	JST016805	0.329	0.441	0.0005
	JST016806	0.336	0.442	0.0011
PCBP3	rs2839036	0.411	0.312	0.0004
	rs2839037	0.106	0.043	0.0001
	rs395418	0.239	0.167	0.002
COL6A1	JST003751	0.402	0.310	0.0008
	JST016807	0.124	0.063	0.0002
	JST016808	0.440	0.329	0.00005
	JST106809	0.439	0.327	0.00006
COL6A2	rs914246	0.341	0.261	0.004

D.考察

SNP はゲノム上に 300~1000bp に 1 つと高頻度に存在する遺伝子多型であり、情報度の高いマーカーとなりうる。よって、連鎖解析により疾患感受性候補領域を絞り込んだ後に、さらに感受性遺伝子へとアプローチする際のマーカーとして非常に有用であり、SNP を用いた関連解析による疾患感受性遺伝子同定の報告も次々となされている。しかし SNP による疾患感受性遺伝子同定は、数多くの変異の中から、直接原因に関与する変異を検出することは非常に困難で、多くの場合、疾患と関連する遺伝子変異またはハプロタイプと連鎖不平衡にあることが多い。SNP は進化的に安定であるので数十世代以上にわたって

受け継がれてきた多型であり、それゆえ組換えの影響を受けやすく、物理的に近い SNP でないと連鎖不平衡が成立しない。一般的には、その強さは距離、そして発生した時期に相関する。すなわちアレル間の距離が短いほど、また新しいアレルであるほど連鎖不平衡が強いといえる。概して連鎖不平衡の強さは距離に反比例するので、未知の原因変異と連鎖不平衡にある SNP を検出することにより遺伝子座の絞り込みが可能となる。我々はこれまでに、OPLL に関与する可能性を示唆する 7 遺伝子 14 変異を見出しており、どの遺伝子が OPLL の責任遺伝子かについては連鎖不平衡マッピングを利用して検討した。領域での連鎖不平衡を詳細に検討したところ、連鎖不平

衡は遺伝子ごとに保たれていた。言い方を変えると、もっとも強い有意差を得た SP が存在する遺伝子が原因と考えられる。結果、コラーゲン 6A1 遺伝子が OPLL と最も強く関連しており、原因遺伝子の強力な候補と考えられる。

E. 結論

連鎖解析にて最も強い有意差を認めた 21 番染色体テロメア領域を中心に、SNPs を用いた関連解析を行い、7 遺伝子、14SNPs で OPLL への関与が示唆された。なかでもコラーゲン 6A1 遺伝子がもっとも強い有意差を示し、強力な候補遺伝子と考えられた。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Ikeda R, Furukawa T, Mitsuo R, Noguchi T, Kitazono M, Okumura H, Sumizawa T, Haraguchi M, Che XF, Uchimiya H, Nakajima Y, Ren XQ, Oiso S, Inoue I, Yamada K, Akiyama S. 2003. Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 358-363.
- Onda H, Kasuya H, Yoneyama T, Hori T, Nakajima T, Inoue I. 2003. Endoglin is not a major susceptibility gene for intracranial aneurysm among

Japanese. *Stroke* in press

- Shimo-onoda K, Tanaka T, Furushima K, Nakajima T, Toh S, Harata S, Yone K, Komiya S, Adachi H, Nakamura E, Fujimiya H, Inoue I. 2002. Akaike's information criterion for an alternative measure of linkage disequilibrium. *J Hum Genet* 47, 649-655.
- Maeda S, Nobukuni T, Shimo-onoda K, Hayashi K, Yone K, Komiya S, Inoue I. 2002. Sortilin is up-regulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *J Cell Physiol* 193, 73-79.
- Kobayashi Y, Nakajima T, Inoue I. 2002. Molecular modeling of the dimeric structure of human lipoprotein lipase and functional studies of the carboxyl-terminal domain. *Eur J Biochem* 269, 4701-4710.
- Ohmori H, Makita Y, Funamizu M, Hirooka K, Hosoi T, Orimo H, Suzuki T, Ikari K, Nakajima T, Inoue I, Hata A. 2002. Linkage and association analyses of the osteoprotegerin gene locus with human osteoporosis. *J Hum Genet* 47, 400-406.
- Rohrwasser A, Zhang S, Dillon HF, Inoue I, Callaway CW, Hillas E, Lalouel JM. 2002. Contribution of Sp1 to initiation of transcription of angiotensinogen. *J Hum Genet* 47,

249-56.

8. Nakajima T, Jorde LB, 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.
9. Furushima K, Shimo-onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiya S, Nakajima T, Harata S, Inoue I. 2002. Large scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J. Bone Miner. Res.* 17, 128-137.

2. 学会発表

17回日本整形外科学会基礎学術集会

脊椎後縦靭帯骨化症の感受性遺伝子解析

田中利弘¹、古島弘三¹、藤哲¹、下小野田一騎²、小宮節郎²、原田征行³、井ノ上逸朗⁴

¹弘前大学医学部整形外科 ²鹿児島大学医学部整形外科 ³青森県立中央病院

⁴東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断
平成14年10月11日・12日 青森市文化会館・ホテル青森（青森市）

52nd Annual Meeting of the American Society of Human Genetics

Identification of susceptible gene for the ossification of the posterior longitudinal

ligament of the spine from the linkage region on chromosome 21.

T. Tanaka¹, K. Ikari², K. Furushima¹, S. Toh¹, S. Harata¹, T. Nakajima², I. Inoue².

¹ Department of Orthopaedic Surgery, School of Medicine, Hirosaki University, Hirosaki, Japan.

² Division of Genetic Diagnosis, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

October 15-19, 2002 · Baltimore, Maryland, USA.

H.知的財産権の出願、登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

後縦靭帯骨化症患者由来の培養脊柱靭帯細胞において メカニカルストレスによって誘導されるプロスタグランジン₂の役割

分担研究者 藤 哲 弘前大学・医学部 教授

研究要旨

後縦靭帯骨化症 (OPLL) の発症にはメカニカルストレスが局所因子として重要な働きをしていると推定されている。本研究では OPLL 患者由来および OPLL 以外の脊椎疾患患者由来の培養脊柱靭帯細胞間の遺伝子発現の差異を differential display RT-PCR 法によって捉えて、その遺伝子と OPLL 発症機序との関連性ならびにメカニカルストレスが与える影響を検討した。OPLL 細胞に強い発現がみられた PGI₂ 合成酵素（プロスタグランジン₂ 合成酵素）は骨代謝の重要なメディエーター PGI₂ の合成酵素であるが、PGI₂ は骨吸収の阻害因子として働くことが知られている。また骨細胞、骨芽細胞はその受容体を有し、さらにこれらの細胞でメカニカルストレスにて PGI₂ 産生が促進されることが報告されている。今回 OPLL 細胞にのみメカニカルストレスにより骨化マーカーのアルカリフォスファターゼ (ALP) の mRNA 量が増加するとともに、PGI₂ 合成酵素の mRNA 量の増加が認められ、また PGI₂ 受容体の存在が確認された。またメカニカルストレスによって PGI₂ 産生そのものも増大した。一方、骨芽細胞において、メカニカルストレスによって誘導される PGI₂ 産生によってアデニル酸シクラーゼを介した細胞内 cAMP 濃度上昇が報告されている。OPLL 細胞においても細胞膜透過性 cAMP 添加および安定化 PGI₂ アナログであるベラプロストナトリウム添加により ALP mRNA 量の増加がみられた。上記の結果から、メカニカルストレスにより産生された PGI₂ は OPLL 細胞表面の受容体にオートクライン、パラクライン機構を介して作用し、アデニル酸シクラーゼによる細胞内 cAMP 濃度上昇を介することで骨芽細胞様細胞の骨への分化を誘導して OPLL の発生、進展を促すことが示唆された。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症(以下 OPLL)の発症には遺伝的要因を背景に様々な因子が関与しており、なかでもメカニカルストレスが局所因子として重要な働きをしていると推定されているが、その詳細は不明である。本研究では OPLL 患者由来および OPLL 以外の脊椎疾患患者由来の培養脊柱靭帯細胞間の遺伝子発現の差異を捉えて、その遺伝子の

OPLL 発生機序との関連性ならびにメカニカルストレスが与える影響を検討した。

B. 研究方法

・細胞

弘前大学医学部倫理委員会の承認を得て、患者への十分なインフォームドコンセントを行った。術中に摘出した OPLL 患者、非 OPLL 患者の脊柱靭帯組織から outgrowth 法

にて靱帯細胞を単離し、10%FBS 添加 DMEM 培地中で 37°C、5%CO₂ 気相下にて培養した。

・ Differential Display RT-PCR

OPLL 細胞と非 OPLL 細胞より全 RNA をそれぞれ回収し、differential display RT-PCR 法を用いて、両細胞間で発現に差が認められる遺伝子をスクリーニングし、データベースによるホモロジー検索によって同定した。

・ 伸展刺激（メカニカルストレス）負荷

5 代目の脊柱靱帯細胞を 0.1%ゼラチンコーティングしたシリコンチャンバーに播種し、コンフルエント到達後に 1% FBS 添加 DMEM 培地にて 24 時間インキュベートし、その後伸展刺激装置にて一軸方向に周期的伸展刺激（0.5Hz、20%伸長）を 0、3、6、9 時間加えた。

・ RT-PCR

伸展刺激を負荷した後に全 RNA を回収し、プロスタグランジン I₂（以下 PGI₂）合成酵素、PGI₂ 受容体、骨分化マーカーとしてアルカリフォスファターゼ（ALP）の mRNA 量を RT-PCR 法にて定量した。内部標準として glycerol 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)を用いた。

・ベラプロストナトリウムと dibutyl cyclic AMP の添加

OPLL 細胞と非 OPLL 細胞に、PGI₂ 誘導体であるベラプロストナトリウム、また細胞膜透過性 cyclic AMP アナログの dibutyl cyclic AMP を添加し、それぞれ 0、3、6、9 時間経過した時点で全 RNA を回収して RT-PCR 法を行い、ALP の mRNA 量を定量した。

・ アデニル酸シクラーゼ阻害薬添加

アデニル酸シクラーゼ阻害薬である SQ22536(7)を OPLL 細胞に添加した後、ベラプロストナトリウムを添加し、それぞれ 0、3、6、9 時間経過した時点で全 RNA を回収して RT-PCR 法を行い、ALP の mRNA 量を定量した。また OPLL 細胞に SQ22536 を添加した後、伸展刺激を負荷し 9 時間経過した時点で全 RNA を回収して RT-PCR 法を行い、ALP の mRNA 量を定量した。

・ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

OPLL 細胞に伸展刺激を 9 時間負荷した後、1% FBS 添加 DMEM 培地を回収し、PGI₂ 代謝産物である 6-keto-PGF_{1 α} を Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kit (Assay Designs, Inc. Ann Arbor, USA) を用いて測定した。

C. 研究結果

1. Differential Display RT-PCR

OPLL と非 OPLL 細胞間で再現性のある 5 つの遺伝子発現の相違が認められ、その一つが PGI₂ 合成酵素（プロスタグランジン I₂ 合成酵素）の遺伝子と 95%の相同性を示した（図 1）。

2. RT-PCR

OPLL 細胞では、伸展刺激後 9 時間後に PGI₂ 合成酵素の mRNA 量が伸展刺激無し（0 時間）に比べて発現が 170%（P<0.05）と有意に増加したが、非 OPLL 細胞では変化は認められなかった（図 2）。また OPLL 細胞、非 OPLL 細胞に PGI₂ 受容体の存在が確認された（図 3）。

图1

Fig.1.

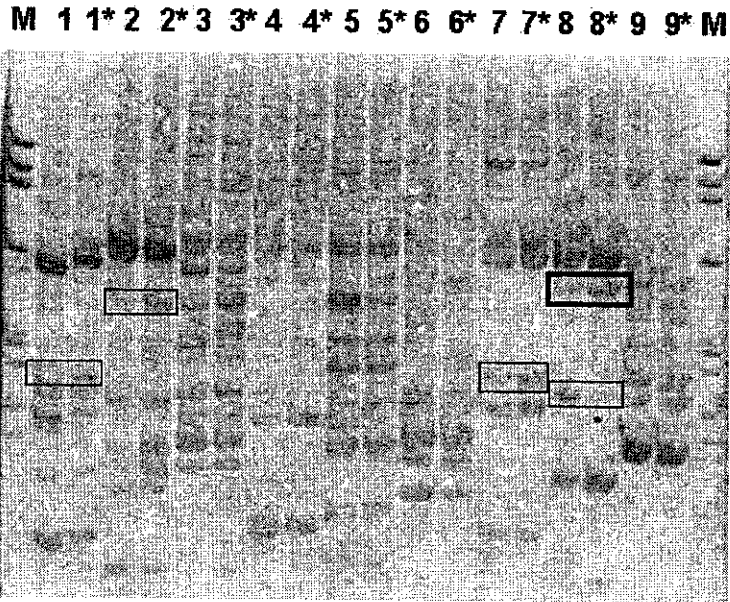


Fig. 2

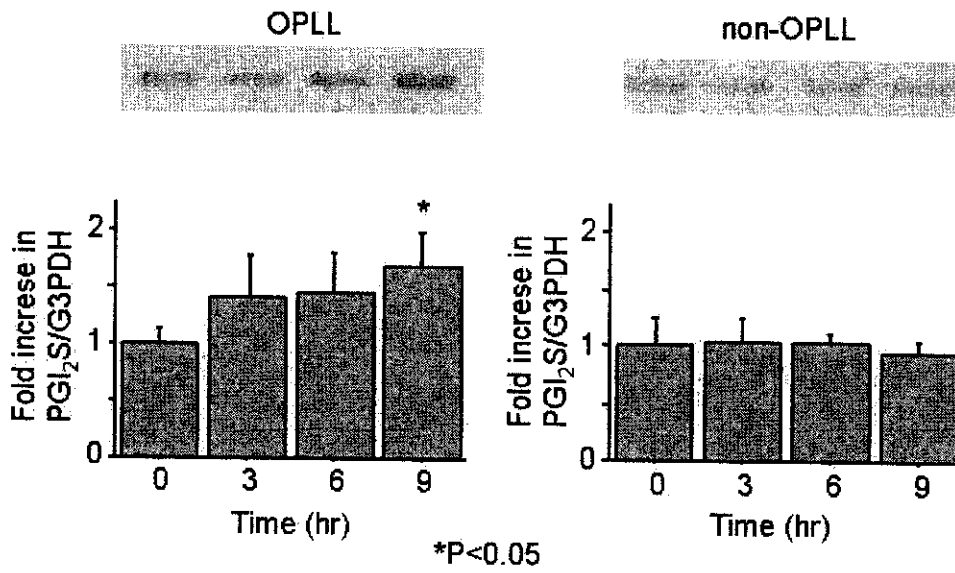


图2

图3

Fig. 3

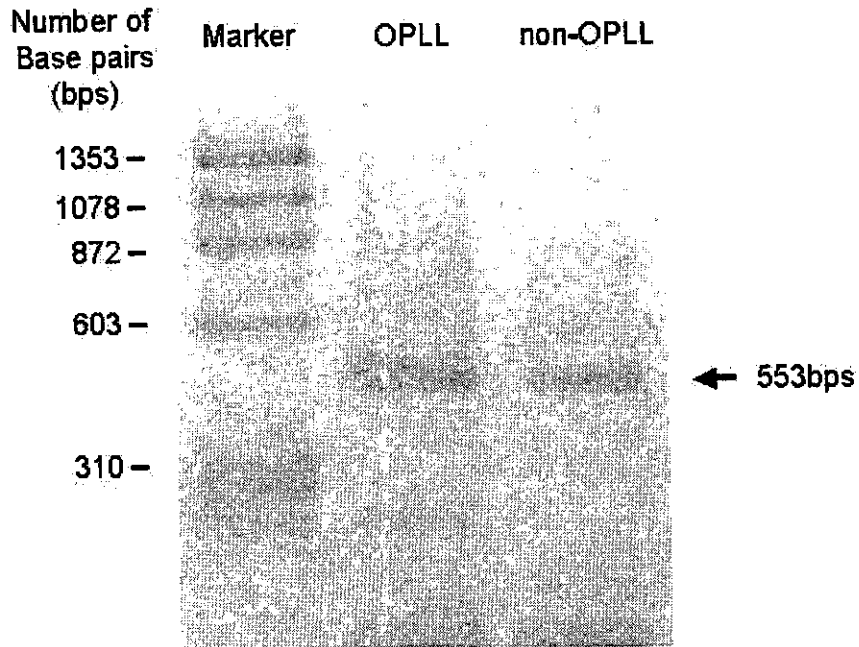


Fig. 4

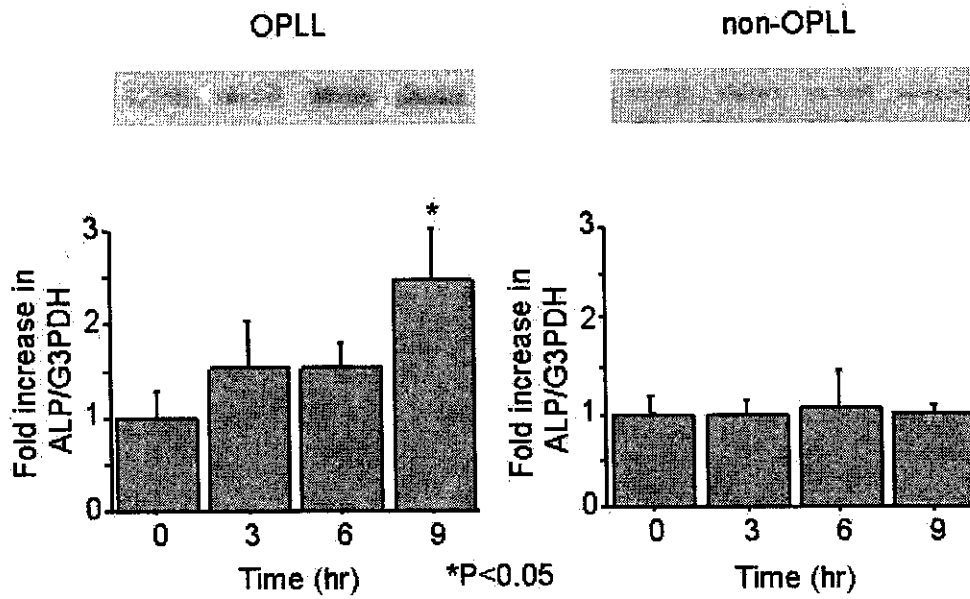


图4

Fig. 5

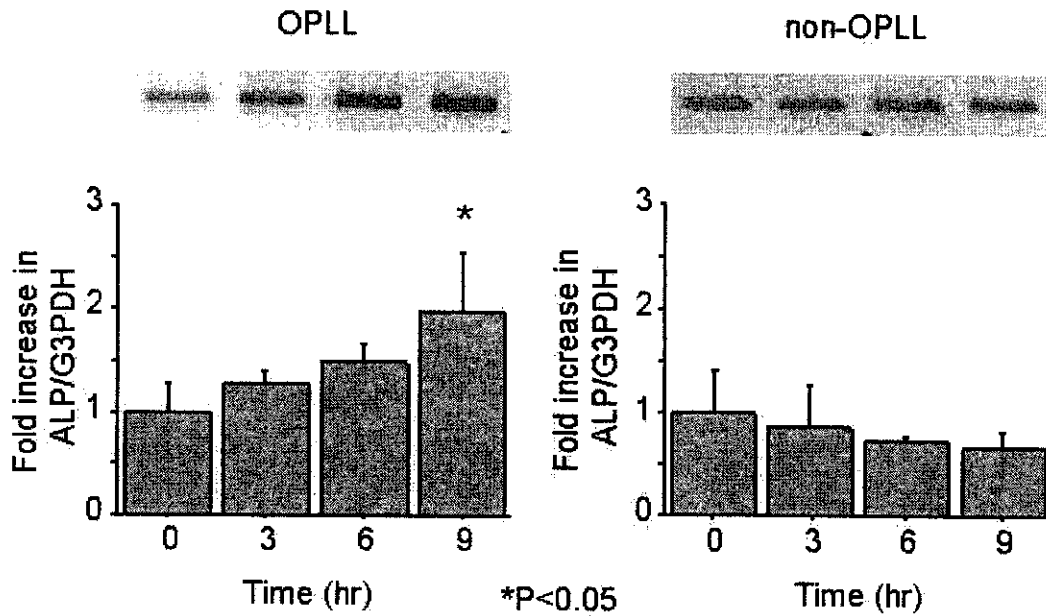


図5

3. ベラプロストナトリウム、dibutyryl cyclic AMP 添加

OPLL 細胞では、ベラプロストナトリウム、dibutyryl cyclic AMP 添加により ALP の mRNA 量が添加後 9 時間でそれぞれ 240% ($P<0.05$)、200% ($P<0.05$) と有意に増加したが、非 OPLL 細胞では変化を認めなかった (図 4,5)。

4. アデニル酸シクラーゼ阻害薬添加

OPLL 細胞では SQ22536 を加えることで、

阻害薬を加えないコントロールに比して ALP の mRNA の発現増加は抑制された (図 6)。

5. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

9 時間の伸展刺激によって培地中に放出された PGL_2 は 9 時間静置した培地中のそれよりも有意に増加していた (伸展刺激: 3128 ± 132 pg/ml, 静置: 1091 ± 54 pg/ml)。

図表およびその説明は末尾に提示してある。

Fig. 6

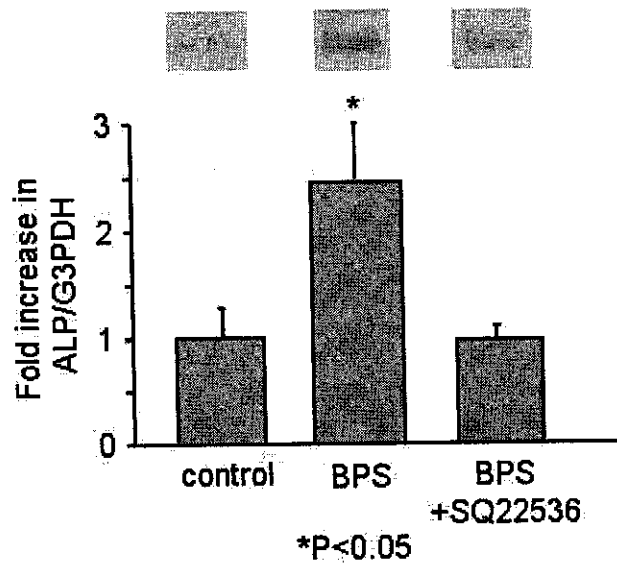


図6

D. 考察

これまでに OPLL 細胞と非 OPLL 細胞との間には形態学的、組織学的に差が認められるという報告が数多くなされてきたが、遺伝子発現レベルで2つの細胞を比較した報告は少ない。今回 differential display RT-PCR 法にて OPLL 細胞に高い発現が認められた PGI₂ 合成酵素は、骨代謝の重要なメディエーター PGI₂ の合成酵素であるが、PGI₂ は骨吸収の阻害因子として働くことが知られている。また骨細胞、骨芽細胞はその受容体を有し、さらにこれらの細胞でメカニカルストレスにて PGI₂ 産生が促進されることが報告されている。今回 OPLL 細胞において

メカニカルストレスにより PGI₂ 合成酵素の mRNA 量の増加が認められ、また PGI₂ 受容体の存在が確認された。骨芽細胞において、メカニカルストレスによって誘導される PGI₂ 産生にはアデニル酸シクラーゼを介した細胞内 cAMP の関与が報告されている。OPLL 細胞では細胞膜透過性 cAMP 添加および安定化 PGI₂ であるベラプロストナトリウム添加により ALP mRNA 量の増加がみられた。上記の結果から、メカニカルストレスにより産生された PGI₂ は OPLL 細胞表面の受容体にオートクライン、パラクライン機構を介して作用し、アデニル酸シクラーゼによる細胞内 cAMP 濃度上昇を介する

ことで骨芽細胞様細胞の骨への分化を誘導して OPLL の発症、進展を促すことが示唆された。

E. 結論

OPLL の発症、進展にはメカニカルストレスによって産生された PGI₂ が関与しており、その細胞内伝達には PGI₂ /cAMP system が関与していることが示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tsuda E, Ishibashi Y, Okamura Y, Toh S. Restoration of anterior cruciate ligament-hamstring reflex arc after anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2003 (2):63-7

Otsuka H, Ishibashi Y, Tsuda E, Sasaki K, Toh S. Comparison of three techniques of anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone graft: differences in anterior tibial translation and tunnel enlargement with each technique.

Am J Sports Med 2003 Mar-Apr; 31(2):282-8

Ohishi H, Furukawa KI, Iwasaki K, Ueyama K, Okada A, Motomura S, Harata S, Toh S. Role of prostaglandin I₂ in the gene expression induced by mechanical stress in spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 in press

Furushima K, Shimo-Onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiya S, Nakajima T, Harata S, and Inoue I. Large-scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 128-137

Toh S, Miura H, Arai K, Yasumura M, Wada M, Tsubo K. Scaphoid fractures in children: problems and treatment. *J Pediatr Orthop* 2003 Mar-Apr; 23 (2): 216-21

Shimo-Onoda K, Tanaka T, Furushima K, Nakajima T, Toh S, Harata S, Yone K, Komiya S, Adachi H, Nakamura E, Fujimiya H, Inoue I. Akaike's information criterion for a measure of linkage disequilibrium. *J Hum Genet* 2002; 47(12):649-55

Toh S, Tsubo K, Nishikawa S, Inoue S, Nakamura R, Narita S. Osteosynthesis for nonunion of the lateral humeral condyle. *Clin Orthop* 2002 Dec;(405): 230-41

Nishikawa S, Toh S. Anatomical study of the carpal attachment of the triangular fibrocartilage complex. *J Bone Joint Surg Br* 2002 Sep;84 (7):1062-5

Vallejo GI, Toh S, Arai H, Arai K, Harata S. Results of the latissimus dorsi and teres major tendon transfer on to the rotator cuff for brachial plexus palsy at birth. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 2002;36(4):207-11

Furushima K, Shimo-Onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiya S, Nakajima T, Harata S, and Inoue I (2002) Large-scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. J Bone Miner Res 17:128-137.

2. 学会発表

- ・ 第17回日本整形外科学会基礎学術集会
- ・ The ASBMR 24th Annual Meeting
- ・ 49th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society

(図1) Differential Display の電気泳動像
(1*-8*:OPLL、1-8:非 OPLL)

(図2) 伸展刺激による PGI₂S(PGI₂ 合成酵素) の mRNA 発現

(図3) PGI₂ receptor の発現

(図4) ベラプロスト添加による ALP mRNA の発現

(図5) dibutyl cyclic AMP 添加による mRNA の発現

(図6) SQ22536 存在下でのベラプロスト添加による ALP mRNA の発現

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）

研究協力者研究報告書

OPLL 靱帯細胞の骨芽細胞への分化制御機構の解明

共同研究者 池田 龍二 東京大学・医科学研究所

研究要旨

後縦靱帯骨化症（OPLL）は進行性靱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。OPLL は後縦靱帯が骨化することが知られているが、どのようなメカニズムで骨化するのかは現在のところ不明である。したがって本研究では骨芽細胞への分化機構を解明することにより OPLL の骨化制御機構の解明を目的とする。

我々は、骨芽細胞への分化能を有するヒト間葉系幹細胞（human Mesenchymal Stem Cell; hMSC）、OPLL 患者および対照として頸椎症性脊髄症患者から得られた靱帯細胞において骨芽細胞系への分化に伴う遺伝子発現の変化を網羅的にマイクロアレイ解析で検討した。マイクロアレイ解析の結果複数の遺伝子発現変化が観察された。すべての系において共通して発現上昇が見られ、OPLL 患者により発現上昇が確認された ZFP に注目した。さらに、その発現レベルの経時的パターンを調べた。分化誘導前は発現まったく確認されず、分化誘導後に発現が速やかに上昇した。この転写因子である ZFP が骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが期待されたので、この遺伝子発現を抑える目的で 21 塩基の二本鎖 RNAi（RNAi）を 2ヶ所で設計しリポフェクトアミンで hMSC へ取り込ませた。その結果効率よく遺伝子発現抑制が、RT-PCR で確認でき同時に alkaline phosphatase の上昇をマーカーとした骨芽細胞への分化は抑制された。次に C2C12 細胞で強制発現させたところ、骨芽細胞への分化促進が確認された。これらの結果から、ZFP が骨芽細胞分化に重要な因子であるのみでなく、OPLL の治療につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

OPLL は脊柱管内の後縦靱帯が異所性骨化し、脊髄を圧迫することで神経障害をきたす疾患である。OPLL は後縦靱帯細胞が骨化することが知られているが現在のところその詳細は不明である。本研究では

OPLL 由来靱帯細胞、骨芽細胞の前駆細胞であるヒト間葉系幹細胞（hMSC）を用いて、骨芽細胞への分化に関わる遺伝子、OPLL の骨化に関わる遺伝子を同定し、その遺伝子を制御することで OPLL の治療へ結びつけることを目指す。

B. 研究方法

OPLL 由来靭帯細胞の骨芽細胞系への分化に伴う遺伝子発現を網羅的にマイクロアレイにより解析した。また、対照として頸椎症性脊髄症患者から得られた靭帯細胞を用いた。解析した遺伝子は、約 12,000 遺伝子であった。また分化に伴う経時的遺伝子発現変化を RT-PCR で確認した。骨芽細胞系への分化誘導には 0.1 μ M dexamethasone, 0.05 mM ascorbic acid-2-phosphate, 10 mM β -glycerophosphate を添加した。ZFP の発現を抑制する目的で 21 塩基の二本鎖 RNAi (RNAi) を 2ヶ所作成し、リポフェクトアミンで hMSC に取り込ませ、骨芽細胞分化への影響を観察した。マウス未分化細胞株である C2C12 細胞に ZFP を強制発現させて、骨芽細胞分化への影響を検討した。

C. 研究結果

OPLL は骨化傾向があるので靭帯培養細胞は骨芽細胞へ効率よく分化した。一方、骨化傾向のない頸椎症性脊髄症患者からの靭帯細胞は骨芽細胞への分化能は低かった (Figure 1)。

OPLL 由来靭帯細胞の骨芽細胞系への分化に伴う遺伝子発現を網羅的にマイクロアレイにより解析したところ、ZFP がすべての系において共通して発現上昇が認められた (Table 1~3)。さらに対照として頸椎症性脊髄症患者由来の靭帯細胞より、OPLL 由来靭帯細胞が ZFP の高い発現上昇がマイクロアレイおよび RT-PCR で確認された (Table 1 および Figure 2)。hMSC においては、ZFP の発現は 2 日目より増加

し 6 日間持続した (Figure 2)。この転写因子である ZFP が骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが期待されたので、この遺伝子発現を抑える目的で 21 塩基の二本鎖 RNAi (RNAi) を 2ヶ所で設計しリポフェクトアミンで hSMC へ取り込ませた。その結果効率よく遺伝子発現抑制が、RT-PCR で確認でき同時に alkaline phosphatase の発現上昇をマーカーとした骨芽細胞への分化は抑制された (Figure 3)。次に C2C12 細胞で強制発現させたところ、骨芽細胞への分化促進が確認された (Figure 4)。これらのデータは末尾に示す。

D. 考察

OPLL は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引き起こす疾患である。発症には遺伝的要因及び環境因子等が複雑に関与していると考えられるが、その詳細は不明である。OPLL は後縦靭帯細胞が骨化することがその病態であることから、OPLL 由来靭帯細胞の骨芽細胞系への分化に伴う遺伝発現を網羅的にマイクロアレイにより調べたところ ZFP の発現上昇が認められた。

ZFP は 9 つの zinc finger ドメインを有する転写因子であり、骨分化誘導と共に発現が上昇した。最近の研究で ZFP のノックアウトマウスの解析より、この遺伝子が四肢や軸性骨格のパターン形成に関与していることが判明している。今回、後縦靭帯細胞や hMSC が骨分化する過程においても、ZFP の発現上昇が重要な因子であることが示唆され、このような遺伝子を靭帯細胞から骨分化の過程で制御できれば OPLL の新たな予防、治療への戦略となりうる。

E. 結論

ZFP は骨芽細胞への分化に重要な遺伝子の1つである。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

【論文発表】

Maeda S, Nobukuni T, Shimo-Onoda K, Hayashi K, Yone K, Komiya S, Inoue I. Sortilin is upregulated during osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and promotes extracellular matrix mineralization. *J. Cell Physiol.* 193, 73-9, 2002

Ikeda R, Furukawa T, Mitsuo R, Noguchi T, Kitazono M, Okumura H, Sumizawa T, Haraguchi M, Che XF, Uchimiya H, Nakajima Y, Ren XQ, Oiso S, Inoue I, Yamada K, Akiyama S. Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 358-63, 2003

【学会発表】

なし

H. 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

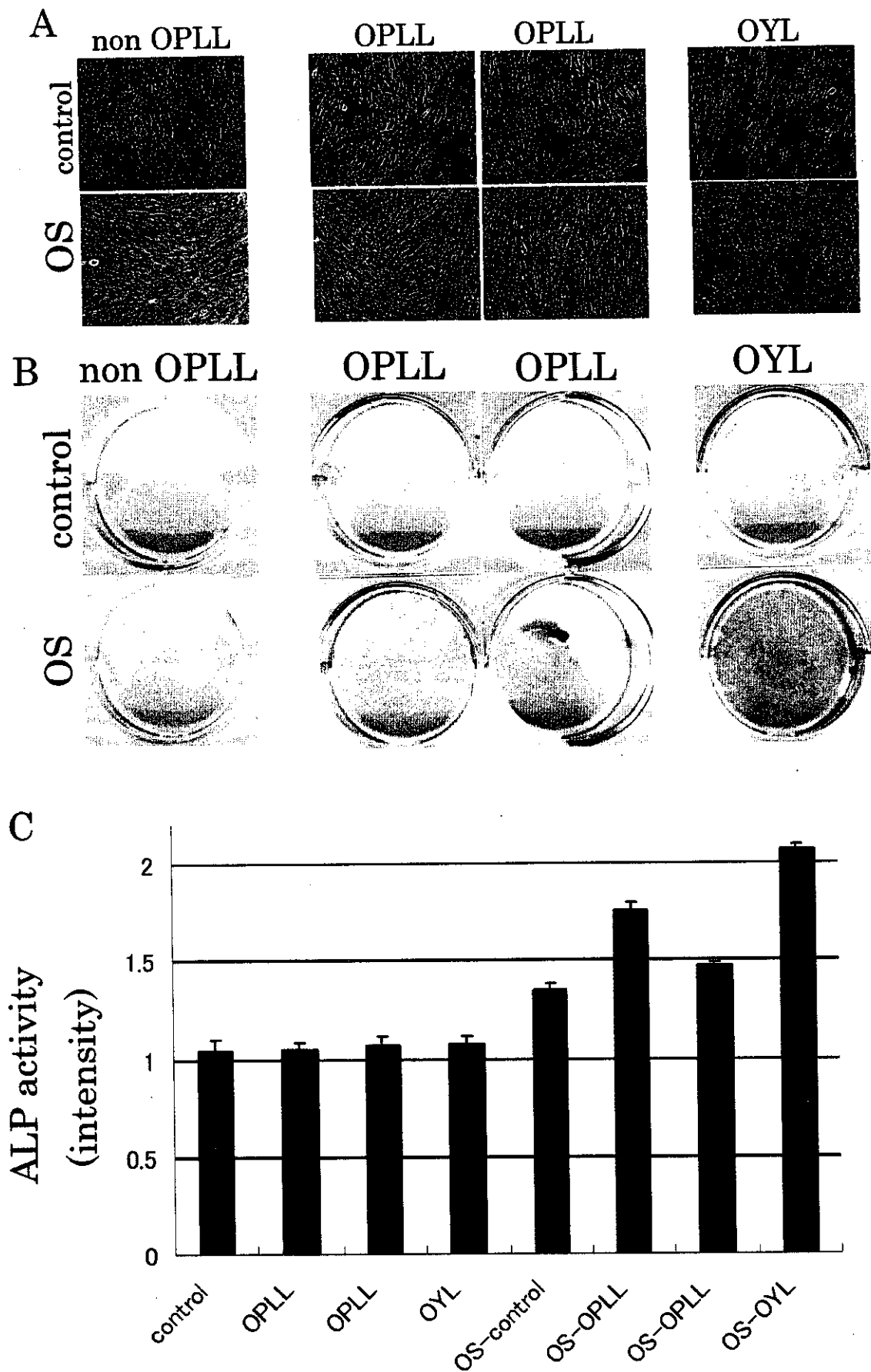


図 1 OPLL 靭帯細胞にみられる骨分化誘導後の ALP の活性
 OPLL, OYL, control 靭帯細胞に分化誘導剤を加え 10 日間培養後、形態変化と ALP 活性を調べた。OPLL, OYL 靭帯細胞では、control 靭帯細胞に比べて分化誘導剤によって ALP 活性が上昇していた。

Table 1. Genes regulated during osteoblastic differentiation of OPLL primary cells by DNA microarray analysis			
OPLL Cells	OPLL Cells	OPLL Cells	
GeneName	Accession Number	fold change	
ZFP		11.5	
RAN binding protein 2	D42063	6.2	
fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)	A1075338	4.8	
Sequence 39 from Patent WO9947655.	AX017495	4.5	
Human metallothionein-II pseudogene (mt-IIps).	J00272	4.2	
crystallin, alpha B	S45630	3.9	
metallothionein 1L	F26137	3.5	
metallothionein 1G	J03910	3.5	
collagen, type VIII, alpha 1	NM_001850	3.3	
matrix Gla protein	AW997681	3.1	
ESTs, Highly similar to	R99207	3.1	
metallothionein 1L	X97261	3.0	
RNA helicase-related protein	A1814448	2.9	
matrix Gla protein	X53331	2.9	
cardiac ankyrin repeat protein	X83703	2.8	
dual specificity phosphatase 1	X68277	2.5	
Sequence 12 from Patent WO9954460.	AX013690	2.4	
growth arrest-specific 1	L13698	2.4	
metallothionein 1E (functional)	HT2532	2.3	
KIAA0851 protein	AB020658	2.2	
MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide D (myocyte enhancer factor 2.L116794		2.1	
adrenomedullin	S73906	2.1	
collagen, type XI, alpha 1	J04177	2.1	
cardiac ankyrin repeat protein	X83703	2.0	
integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	NM_002205	2.0	
<u>Human desrin-2 pseudogene mRNA, complete cds</u>	<u>U72518</u>	<u>2.0</u>	

Fold change, up regulated gene after 48 h OS induction.