

20020723A

厚生労働科学研究費補助金
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

平成14年度総括研究報告書

平成15(2003)年3月

主任研究者 中村耕三

厚生労働科学研究費補助金
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

平成14年度総括研究報告書

主任研究者 中村耕三

目 次

I. 班員構成	
脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班	1
II. 総括研究報告書	
主任研究者 中村 耕三 東京大学大学院医学系研究科整形外科	3
III. 分担研究報告書	
1. 異所性骨化に関する新規遺伝子cystatin 10 (chondrocyte specific cysteine protease inhibitor) のクローニングと機能解析	9
東京大学大学院医学系研究科整形外科	
山田 高嗣、腰塚 裕、河野 博隆、川口 浩、中村 耕三	
2. 持続的なMAPKシグナル抑制によるBMPの応答制御	13
大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学整形外科	
吉川 秀樹	
3. 脊椎後縦靱帯骨化症の感受性遺伝子解析	15
弘前大学整形外科	
田中 利弘、古島 弘三、猪狩 勝則、藤 哲	
青森県立中央病院	
原田 征行	
鹿児島大学整形外科	
小宮 節郎	
弘前大学薬理学	
岩崎 弘英、古川 賢一	
山口大学整形外科	
田中 浩、河合 伸也	
東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断部門	
中島 敏晶、井ノ上逸朗	
4. 脊柱靱帯骨化症に関する遺伝子解析	19
理化学研究所・遺伝子多型研究センター 変形性関節症関連遺伝子研究チーム	
池川 志郎	
5. 圧迫脊髄損傷に対するアデノウイルスベクターを用いた神経栄養因子遺伝子の導入	21
福井医科大学整形外科	
内田 研造、馬場 久敏、小久保安朗、久保田 力、中嶋 秀明	
6. 脊髄損傷後に生じる神経細胞のapoptosisをエリスロポエチンは抑制する	25
鹿児島大学医学部整形外科	
長嶺 智徳、有島 善也	
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	
瀬戸口啓夫	
鹿児島大学医学部整形外科	
泉 俊彦	
鹿児島大学医学部第一病理学	
早田 正和	

鹿児島大学医学部整形外科 山浦 一郎	
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 田賀 哲也	
鹿児島大学医学部整形外科 松永 俊二、米 和徳、小宮 節郎	
7. 後縦靭帯骨化症発生におけるメカニカルストレスの作用およびcore binding factor alpha1 発現の影響の解析.....	26
弘前大学薬理学整形外科 岩崎 弘英	
弘前大学薬理学 古川 賢一	
青森市民病院整形外科 丹野 雅彦	
弘前大学第2病理 楠 美智巳	
弘前記念病院整形外科 植山 和正	
弘前大学整形外科 岡田 晶博	
弘前大学薬理学 元村 成	
青森県立中央病院 原田 征行	
弘前大学整形外科 藤 哲	
8. 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.....	34
弘前大学・医・整形外科 大石 裕誉	
弘前大学・医・薬理学 古川 賢一	
弘前記念病院 植山 和正	
弘前大学・医・整形外科 岡田 昌博	
弘前大学・医・薬理学 元村 成	
青森中央病院 原田 征行	
弘前大学・医・整形外科 藤 哲	
9. 臨床検体を用いた後縦靭帯骨化に関する遺伝子の検索.....	42
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	

10. 脊柱靱帯骨化症に対するMDCTの有用性に関する研究	47
山口大学整形外科	
豊田耕一郎 田口 敏彦	
11. Mouse Genetics の手法を用いた脊椎骨形成の発生生物学的解析	49
京都大学大学院医学研究科感覚運動系外科学講座	
<i>Department of Molecular Genetics, The University of Texas M. D. Anderson Cancer</i>	
秋山 治彦	
<i>Department of Molecular Genetics, The University of Texas M. D. Anderson Cancer</i>	
Benoit de Crombrughe	
<i>Cardiovascular Division, University of Pennsylvania</i>	
Jonathan A. Epstein	
<i>Institute of Human Genetics, University of Newcastle</i>	
Andreas Schedl	
京都大学大学院医学研究科感覚運動系外科学講座	
中村 孝志	
12. 損傷脊髄の修復過程におけるオステオポンチンの発現と役割	52
千葉大学医学部整形外科	
橋本 将行、国府田正雄、村上 正純、山崎 正志、守屋 秀繁	
13. 損傷脊髄の修復促進を目的とした造血幹細胞分画移植	61
千葉大学医学部整形外科	
腰塚 周平、国府田正雄、橋本 将行、村上 正純、大河 昭彦	
熊本大学エイズ学研究センター	
岡田 誠治	
千葉大学医学部整形外科	
山崎 正志、守屋 秀繁	
14. ヒストン蛋白脱アセチル化酵素阻害剤によるosteopontin発現の検討	68
和歌山県立医科大学整形外科教室	
坂田 亮介、南 晋司、玉置 哲也	
15. SNPを用いたOPLL散発症例におけるコラーゲン11 α 2遺伝子の疾患感受性に関する 解析	71
徳島大学医学部感覚運動系病態医学講座運動機能外科学	
酒井 紀典、安井 夏生、加藤 真介、西良 浩一、浜田 大輔	
徳島大学医学部分子栄養学講座	
田中 知里	
徳島大学医学部分子栄養学講座	
片島 るみ	
徳島大学医学部分子栄養学講座	
吉本 勝彦	
徳島大学ゲノム機能研究センター遺伝情報分野	
板倉 光夫	
16. Zucker Fatty RatおよびMonosodium Glutamate投与肥満RatにおけるBMP-2筋層 内投与による異所性骨化発現の病理組織学的検討（経過報告）	74
東京医科大学整形外科教室	
渡辺 淳、山本 謙吾、木村 大、朝日 盛也、布田 大介、今給黎篤弘	

東京医科大学第二病理学教室	
海老原善郎	
17. Zucker Fatty Rat およびMonosodium Glutamate投与肥満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	76
東京医科大学整形外科	
木村 大、山本 謙吾、町田 英明、中谷 知薫、反町 武史、今給黎篤弘	
東京医科大学第2病理学教室	
海老原善郎	
18. 脊椎後縦靭帯骨化症の感受性遺伝子同定に関する研究	80
滋賀医科大学整形外科	
森 幹士、松末 吉隆	
19. 脊柱靭帯骨化症におけるプロテオーム解析	81
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	
久留米大学クリニカルバイオスタティスティックス	
角間 辰之	
20. 靭帯・腱および脊柱靭帯骨化症におけるMsx2遺伝子の発現とその意義に関する研究	83
新潟大学大学院医師学総合研究科	
川島 博行	
21. 頸椎後縦靭帯骨化症に対する椎弓形成術後のX線学的検討 — 一割断レベルと術式の相違について —	84
九州大学整形外科	
岩本 幸英、前田 健、志田 純一、細川 哲、播広谷勝三	
総合せき損センター整形外科	
芝 啓一郎	
22. 後縦靭帯骨化症患者に対する頸椎en bloc laminoplasty術後10年以上の長期成績	88
富山医科薬科大学医学部整形外科	
川口 善治、金森 昌彦、石原 裕和、杉森 一仁、木村 友厚	
23. 頸椎後縦靭帯骨化症患者における予後不良因子の検討	90
鹿児島大学医学部整形外科	
松永 俊二、林 協司、久木田 信、小宮 節郎	
24. 頸椎椎弓形成術における周術期合併症について — 一片開き式と棘突起縦割式の比較 —	94
鹿児島大学医学部整形外科	
林 協司、松永 俊二、米 和徳、泉 俊彦、小宮 節郎	
25. 胸椎後縦靭帯骨化症に対する後方進入前方除圧術の効果： 骨化靭帯摘出の是非に関する検討	97
北海道大学保健管理センター	
鏡 邦芳	
北海道大学整形外科	
伊東 学、小谷 善久、角家 健、白土 修、三浪 明男	
26. 頸椎後縦靭帯骨化症に対する片開き式脊柱管拡大術の手術成績—C2拡大の影響—	100
慶應義塾大学整形外科	
佐々木政幸、千葉 一裕、丸岩 博文、松本 守雄、中村 雅也、西澤 隆、戸山 芳昭	

27. 東北大学脊椎外科手術登録からみた脊柱靭帯骨化症の手術数の推移と臨牀疫学像に関する研究	107
東北大学大学院医学系研究科医科学専攻外科病態学講座体性外科学分野	
相澤 俊峰、田中 靖久、小澤 浩司、松本不二夫、星川 健、国分 正一	
28. 頰椎後縦靭帯骨化症の診療ガイドライン策定に関する研究	113
国立大阪南病院	
米延 策雄	
29. 胸椎後縦靭帯骨化症に対する術式別の手術成績と適応	115
千葉大学医学部整形外科	
山崎 正志、大河 昭彦、新羽 正明、橋本 光宏、政木 豊、守屋 秀繁	
30. 高度の頰椎後縦靭帯骨化症に対する手術療法の安全性に関する臨床的研究	124
高知医大整形外科	
谷 俊一、牛田 享宏、石田 健司、居相 浩之、野口 政隆、山本 博司	
31. 胸腰椎移行部圧迫骨折を伴う脊椎黄色靭帯骨化症に関する研究	129
国立病院岡山医療センター整形外科	
中原進之介	
32. 胸椎後縦靭帯骨化症の手術的治療に関する研究	
— 広範囲後方除圧矯正固定術の治療成績 —	132
名古屋大学大学院医学研究科機能構築医学専攻運動・形態外科学講座整形外科	
石黒 直樹	
33. 後縦靭帯骨化症に対する前方・後方アプローチによる脊髄全周除圧術	
Circumspinal decompression for thoracic myelopathy due to ossification of the posterior	
longitudinal ligament.	134
金沢大学整形外科	
川原 範夫、富田 勝郎、村上 英樹、赤丸 智之、上田 康博、	
羽藤 泰三、粟森世里奈	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	141

I 班員構成

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

区分	氏名	所属等	職名
主任研究者	中村耕三	東京大学大学院医学系研究科整形外科	教授
分担研究者	吉川秀樹	大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）	教授
	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	客員助教授
	池川志郎	理化学研究所・遺伝子多型研究センター	チームリーダー
	岩本幸英	九州大学医学部整形外科	教授
	馬場久敏	福井医科大学整形外科	教授
	木村友厚	富山医科薬科大学医学部整形外科	教授
	小宮節郎	鹿児島大学医学部整形外科	教授
	藤 哲	弘前大学医学部整形外科	教授
	鐙邦芳	北海道大学保健管理センター	教授
	四宮謙一	東京医科歯科大学医学部整形外科	教授
	戸山芳昭	慶應義塾大学医学部整形外科・脊椎脊髄外科	教授
	国分正一	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻外科病態学講座体性外科学分野整形外科学	教授
	田口敏彦	山口大学医学部生体機能統御学・整形外科	助教授
	米延策雄	国立大阪南病院整形外科	副院長
中村孝志	京都大学大学院医学研究科	教授	
守屋秀繁	千葉大学医学部整形外科	教授	
研究協力者	山本博司	高知医科大学整形外科	教授
	玉置哲也	和歌山県立医科大学整形外科	教授
	安井夏生	徳島大学医学部整形外科	教授
	中原進之介	国立病院岡山医療センター整形外科	医長
	今給黎篤弘	東京医科大学整形外科	教授
	石黒直樹	名古屋大学医学部整形外科	教授
	富田勝郎	金沢大学医学部整形外科	教授
	松末吉隆	滋賀医科大学整形外科	教授
	永田見生	久留米大学医学部整形外科	教授
	川島博行	新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能制御学分野	教授
事務局		東京大学医学部整形外科 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 TEL: 03-5800-8656 FAX: 03-3818-4082	
経理事務 担当者	関 辰男	東京大学医学部附属病院事務部管理課 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 TEL: 03-5800-9753 FAX: 03-5800-8727 E-mail: sekit@adm.h.u-tokyo.ac.jp	

Ⅱ 総括研究報告書

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究

主任研究者 中村 耕三 東京大学大学院医学系研究科整形外科教授

研究要旨 脊柱靱帯骨化症に対して、これまでの特定疾患研究班の研究成果を踏まえつつ、基礎研究として原因遺伝子のさらなる絞り込みと原因候補のタンパク質等の検討、臨床研究としてはガイドラインの作成という3つを主眼として、疾患の病態解明と診療体系の確立を意図するものである。分子遺伝学・分子生物学的方法により各施設より収集したサンプルを解析し、OPLLの疾患遺伝子を同定する。共同研究機関より提供された匿名化されたゲノムDNAを用いて、一塩基多型(SNP: single nucleotide polymorphism)を含むDNA多型を利用した連鎖解析、相関解析などを中心とする遺伝学的解析を行い、疾患関連遺伝子を探索し、その機能解析を行う。現在、各施設での倫理委員会への申請ならびに血液サンプルの収集が始まったところである。ガイドライン策定は文献査読までの前段階であり、査読・策定の後には学会での検証ならびに今後の多施設研究の設定と診断基準の見直しを図っていく。

分担研究者	所属機関名	職名
吉川 秀樹	大阪大学大学院医学系研究科器官制御外科学（整形外科）	教授
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	客員 助教授
池川 志郎	理化学研究所・遺伝子多型研究センター	チーム リーダー
岩本 幸英	九州大学整形外科	教授
馬場 久敏	福井医科大学整形外科	教授
木村 友厚	富山医科薬科大学医学部整形外科	教授
小宮 節郎	鹿児島大学医学部整形外科	教授
藤 哲	弘前大学医学部整形外科	教授
鏡 邦芳	北海道大学保健管理センター	教授
四宮 謙一	東京医科歯科大学医学部整形外科	教授
戸山 芳昭	慶應義塾大学医学部整形外科・脊椎脊髄外科	教授
国分 正一	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻外科病態学講座体性外科学分野整形外科	教授

田口 敏彦	山口大学医学部生体機能統御学・整形外科	助教授
米延 策雄	国立大阪南病院整形外科	副院長
中村 孝志	京都大学大学院医学研究科	教授
守屋 秀繁	千葉大学医学部整形外科	教授
研究協力者	所属機関名	職名
山本 博司	高知医科大学整形外科	教授
玉置 哲也	和歌山県立医科大学整形外科	教授
安井 夏生	徳島大学医学部整形外科	教授
中原進之介	国立病院岡山医療センター整形外科	医長
今給黎篤弘	東京医科大学整形外科	教授
石黒 直樹	名古屋大学医学部整形外科	教授
富田 勝郎	金沢大学医学部整形外科	教授
松末 吉隆	滋賀医科大学整形外科	教授
永田 見生	久留米大学医学部整形外科	教授
川島 博行	新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能制御学分野	教授

A. 研究目的

脊髄麻痺を引き起こす疾患は患者および家族への身体および精神的障害が甚大である。それらの麻痺性疾患のうち慢性発症ではとくに脊柱靭帯骨化症は多発する骨化巣、時間経過にともなう麻痺の進行という特異な病態を有する。さらに一部の患者では麻痺が重篤化し介護・福祉面での社会への負担も大きい。

原因については過去の特定疾患研究班において数々の画期的な解明がなされてきたが、原因遺伝子の同定には至っておらず、原因タンパク質の特定もされていない。さらに治療の必要性・有用性を検定する際に必要となる自然経過の研究は未だ散発的であり、また疾患の進行を予測する指標の選定も充分には行われていない。また診断基準は作成されているが、診断確定に至るまでに必要な診察・検査のアルゴリズムは含まれていない。すなわち診断の手順や個々の症例に則したテイラーメイド的治療法を目指した包括的なガイドラインはこれまで策定されていない。

本研究は、脊柱靭帯骨化症に対して、これまでの特定疾患研究班の研究成果を踏まえつつ、基礎研究として原因遺伝子のさらなる絞り込みと原因候補のタンパク質等の検討、臨床研究としてはガイドラインの作成という3つを主眼として、疾患の病態解明と診療体系の確立を意図するものである。

B. 研究方法

原因遺伝子の解明は言うまでもなく遺伝子治療などの脊柱靭帯骨化症の根本治療への第一歩であるが、平成12年度厚生省特定疾患研究事業・脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班報告書に明らかなように脊柱靭帯骨化

症を集中的に診療している大学病院ですら各施設あたりの診療患者数は限られている。したがって各参加施設の協力によりサンプル数を増やすこととする。分子遺伝学・分子生物学的方法により集まったサンプルを解析し、OPLLの疾患遺伝子を同定する。共同研究機関より提供された匿名化されたゲノム DNA を用いて、一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) を含む DNA 多型を利用した連鎖解析、相関解析などを中心とする遺伝学的解析を行い、疾患関連遺伝子を探索し、その機能解析を行う。

ガイドライン作成はガイドライン委員会を設け、委員会主導で行っていく。また関連した脊椎疾患のガイドライン作成を行っている日本整形外科学会ガイドライン委員会、日本脊椎脊髄病学会ガイドライン委員会と連携をとりながら行う。文献検索・取得には国際医学情報センターに一部委託しつつ、リサーチクエスションの設定後、文献を査読しガイドラインを策定する。ガイドラインは仮策定後、日本脊椎脊髄病学会・日本整形外科学会での評価あるいは検証を行う。また現時点での診断・治療における問題提起を行い、単施設の研究では困難であった研究課題に対する多施設研究の設定を検討する。同時に将来的には診断基準の見直しも検討する。

また各施設の基礎的研究として吉川は BMP-2 のシグナル伝達経路の1つとして mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル経路に注目し、骨芽細胞分化への影響を調べた。井ノ上・小宮らは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った。池川・池田は脊柱靭帯骨化症の疾患感受性遺伝子の候補として、*MSX2*、*COL18A1*、

COL6A1の3遺伝子についてケースコントロール相関解析を行った。内田はアデノウイルスを用いて損傷部位に直接神経栄養因子(glial cell line-derived neuro-trophic factor: GDNF) 発現ベクターを導入、その遺伝子の脊髄内発現動態を免疫組織化学的に調べた。藤・岩崎はメカニカルストレスによるOPLL患者由来靭帯細胞(OPLL細胞)並びにその対照としての非OPLL細胞の遺伝子発現の変化をRT-PCRにて解析した。また抗ヒトCbfa1抗体を用いたヒト脊柱靭帯組織の免疫染色によるメカニカルストレスの影響の解析も行った。四ノ宮・加藤はDNAアレイを用いて、OPLL臨床検体で強く発現を認める遺伝子の検索、および非骨化靭帯との比較で著明な発現差が認められる遺伝子の検索を行った。中村(孝)・秋山はCre/loxP recombination systemを用いてSox9遺伝子を組織特異的および時間特異的に欠かさず脊椎骨の形態的变化を観察した。守屋・橋本はラット脊髄損傷モデルでのosteopontin発現と、その修復過程における役割を解析した。守屋・腰塚は成マウス脊髄損傷モデルに対し骨髄由来の造血幹細胞分画を移植し、行動学的・組織学的評価をおこない、その効果について検討した。今給黎・渡辺は異所性骨化誘導因子であるrecombinant human bone morphogenetic protein-2をRat筋層内投与し、異所性骨化発現を経時的に解析し、糖代謝異常下における骨化関連因子の経時的变化を検討した。今給黎・木村は脊柱靭帯骨化モデル動物であり、高インスリン血症を発症させたラットを用い、インスリン、IGF-Iが脊柱靭帯局所に与える影響を免疫組織学的に検討した。永田は靭帯骨化組織、靭帯未骨化組織の細胞質、細胞膜のプロテオーム解析を行った。川島は腱や靭帯細胞の分化・機

能の制御メカニズムを明らかにする目的で、マウス歯根膜(歯周靭帯)細胞株PDL-L2を樹立し、その性質を調べた。

臨床研究では岩本は頸椎後縦靭帯骨化症に対し頸椎椎弓形成術が施行された症例において、C2まで椎弓割断を要した症例の術後頸椎前弯及び可動域の変化、あるいは椎弓割断後の後方連続性の再建による術後頸椎アライメントに対する影響について調べた。木村・川口は頸椎en bloc laminoplastyを施行し、10年以上を経過した頸椎後縦靭帯骨化症(OPLL)患者における、JOAスコアを用いた臨床成績およびX線学的所見について調べた。小宮・松永は頸椎後縦靭帯骨化症患者において脊髄症状を呈した患者と呈さなかった患者について種々の因子を解析して脊髄症状発症の危険因子を検討した。小宮・林は頸椎後方除圧術として、平林法に準じた片開き式椎弓形成術とハイドロキシアパタイト棘突起スパーサーを用いた棘突起縦割式を行っているので両椎弓形成術における周術期合併症の発生頻度を比較検討した。鑑は胸椎後縦靭帯骨化症に対する後方進入前方除圧術の効果すなわち骨化靭帯摘出の是非に関する検討を行った。戸山・佐々木はC2椎弓を拡大することが頸椎アライメントや術後成績に及ぼす影響を検討した。国分・田中は東北大学整形外科及びその関連病院で行っている東北大学脊椎外科懇話会の手術登録から、宮城県内で1988年から2000年までに手術が行われた全13112例を対象に、脊柱靭帯骨化症の疫学調査を行った。田口・豊田はMDCTを撮像した靭帯骨化症の画像所見について検討した。守屋・山崎は胸椎後縦靭帯骨化症の手術例について、術式別の成績を比較検討し、今後の術式選択の基準を解析した。山本・谷は高度の頸椎後縦靭帯骨化症(OPLL)に対する手術療法として顕微鏡視下の椎体亜全摘前方除圧固定術(前方法)と椎弓形成術(後方法)のどちらがより安全かを検討した。中原は脊椎

黄色靭帯骨化症を合併した胸腰椎移行部圧迫骨折で両下肢麻痺を呈して手術例を評価した。石黒は胸椎後縦靭帯骨化症の手術的治療に関する研究として広範囲後方除圧矯正固定術治療成績を検討した。富田・川原は後縦靭帯骨化症に対する前方・後方アプローチによる脊髄全周除圧術の手術について検討した。

(倫理面での配慮)

血液サンプルに関しては、血液採取に当たって研究の目的などを説明後、書面による同意を得る。またプライバシーの漏洩に注意し、各サンプルをコード化して収集、管理・保存を行い、氏名など個人情報が血液サンプルと関連付けが不可能なように扱うこととしている。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日 文部科学省 厚生労働省 経済産業省)」に従う。検体の提供者からは、書面によるインフォームドコンセントを取得し、特に、個人情報の保護に留意する。

C. 研究結果ならびに考察

平成14年8月に開催された班会議においてゲノム研究の概要ならびに血液サンプルの収集に関する事務的申し送りが行われ、その後各施設において倫理委員会への研究申請が行われた。現在6施設にて認可後血液収集が計600例行われた。また現在倫理委員会認可待ちが8施設、申請準備中が5施設ある。

また同班会議においてガイドライン委員長に米延策雄副院長が選ばれた。委員長は4施設(鹿児島大学、山口大学、国立岡山医療センター、大阪労災病院)にガイドライン委員1名ずつ選定し、ガイドライン策定のタイムスケジュールを他のガイドライン委員会と調整しつつ設定した。現在文献の査読への採否の基準を含むリサーチクエスションの設定を行い、エ

ビデンステーブルを作成後に文献の査読に取り掛かる予定となっている。

吉川は MAPK/extracellular signal-regulated kinase (MEK)の特異的阻害剤により、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性の上昇と細胞外基質の石灰化の促進を認め、また、間葉系細胞 C2C12 細胞に MEK の活性型 cDNA を導入すると BMP-2 による骨芽細胞分化が抑制され、逆にドミナントネガティブ型 cDNA を導入するとアルカリフォスファターゼ活性の上昇がみられたことから、MAPK シグナル伝達経路の抑制により BMP 応答性が亢進し、異所性骨化を導くことが推測され、このシグナル伝達系が脊柱靭帯骨化症の成因の一つである可能性を示した。井ノ上・小宮らは SNPs を用いた関連解析を行い、7 遺伝子、14 SNPs で OPLL への関与が示唆する結果を得た。池川・池田は脊柱靭帯骨化症の疾患感受性遺伝子の候補として、*MSX2*、*COL18A1*、*COL6A1* の 3 遺伝子についてケースコントロール関連解析を行ったが、有意な相関を認めなかった。内田は非増殖型アデノウイルスベクターにより損傷脊髄内の細胞への神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor: GDNF) 発現ベクターを導入、蛋白発現を確認した。藤・岩崎は OPLL 患者の脊柱靭帯細胞は骨形成系細胞へある程度分化していること、メカニカルストレスによってさらにそれが助長される可能性を示した。四ノ宮・加藤の DNA アレイを用いた研究では骨形成関連因子の顕著な発現は認めず、著明な発現差が見られた遺伝子の中にも骨形成関連因子は認めなかった。中村(孝)・秋山は *Pax3-Cre* トランスジェニックマウスと *Sox9* floxed allele を交配し *Sox9* 遺伝子を欠失させたところ、これらのコンディショナルノックアウト

マウスでは下位胸椎および腰椎が完全に欠損した。その他、肋骨の低形成も認められた。Sox9 は脊椎骨形成においても必須であることを示した。守屋・橋本は mRNA とタンパクが脊髄損傷後 3 日において増加することならびに osteopontin の発現が炎症反応の進展と関連を示した。守屋・腰塚は造血幹細胞を移植した群では行動の改善が得られ、生着細胞の神経系細胞への分化が認められたことから、骨髄由来の造血幹細胞分画の移植により、マウス脊髄損傷モデルにおいて後肢機能の改善が得られたことを示した。今給黎・木村はインスリン抵抗性存在下に、Zucker Fatty Rat の椎間板において、インスリン、IGF-I に対する感受性が増強し、MAP キナーゼを介した細胞増殖作用が、椎間板の変性、膨隆に促進的に作用した可能性を示した。今給黎・渡辺は BMP-2 投与にて異所性骨化を確認することを報告した。永田は後縦靭帯骨化症、黄色靭帯骨化症の靭帯骨化組織の細胞膜、細胞可溶部分の両方に糖鎖が付いたタンパク質と、糖尿病に重要であると言われる糖タンパク質を見ることができたと報告した。川島は歯根膜細胞は骨芽細胞への分化能を保持しながらも、通常の状態ではその分化が抑制されていること、また、ホメオボックスを持つ転写因子 Msx2 が分化抑制にかかわっていることから、Msx2 の発現低下を来すメカニズムが OPLL 発症機序と深くかかわる可能性を明らかにした。

岩本は C2 まで椎弓割断を要した症例は、術後頸椎前弯及び、可動域の減少が有意に大きく、また椎弓割断後の後方連続性の再建については、術後頸椎アライメントに有意な影響を与えなかったことを示した。木村・川口は頸椎 en bloc laminoplasty 施行後 10 年以上を経過した頸椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者では

最終調査時の JOA スコア改善率は 50% と保たれており、良好な臨床成績が得られ、X 線学的所見では術後頸椎後弯変形、頸部可動域制限が問題としてあげられることを示した。小宮・松永は靭帯骨化による残余脊柱管径が 6mm 未満の症例は全例脊髄症状を呈して、6mm 以上の症例で脊髄症状の有る症例は無い症例に比べ頸椎の可動域が有意に大きかったことから、脊髄症状発現には静的因子に加えて動的因子の関与が重要であることを明らかにした。小宮・林は神経合併症として、片開き式椎弓形成術では血腫による麻痺が、棘突起縦割式椎弓形成術では C5 麻痺が特徴的であったことを示した。鏡は急峻な後方突出形態を呈した後弯部にある胸椎後縦靭帯骨化症では一次的に骨化靭帯を摘出したほうが、むしろ確実な除圧効果が得られる可能性を示す手術成績を示した。戸山・佐々木は C2 以下の拡大例においては、他群と比し後弯傾向にあるものの有意差はなく、術後の JOA score、改善率、頸肩部痛も有意差なく、良好な結果が得られたことから必要なら C2 椎弓の除圧もためらうべきではないと報告した。国分・田中の疫学調査では脊柱靭帯骨化症は 598 例で、全脊椎手術の 4.5% を占めており、1 年間あたりの手術数はおよそ 50-60 人/年で増加傾向にあったこと、男女比は 2.6:1 で、手術時平均年齢は男性が 60 歳、女性が 62 歳であったことを示し、さらに頸部脊髄症を呈した手術例のうち、後縦靭帯骨化 (OPLL) が主因と考えられた症例は 18.6% で、一方胸部脊髄症の手術が行われた中の 47.2% が OPLL や黄色靭帯骨化症 (OLF) が原因と考えられる結果を示した。田口・豊田は造影矢状断像では骨性要素に加えて椎間板造影矢状断像は骨性要素に加えて椎間板隙に描出し、術後の除圧状態の確

認め良好であったことから MDCT 矢状断像は断層像に匹敵し、断層撮影は省略可能であると報告した。守屋・山崎は後方除圧術では、術直後の麻痺例および術後短期間での麻痺進行例が存在し、術後中長期的な再悪化の可能性も高いため。椎弓切除単独での適応はなく、原則的に Instrumentation 固定を併用すべきと考えられること、骨化摘出術は、成功例の改善率が極めて良好であり、第一選択とすべき術式であるが、術前脊髄高度障害例では骨化の摘出にこだわるべきではなく、Instrumentation 固定による制動効果に期待してもよいと考えられること、後方除圧固定術では、改善率は比較的良好であり、術直後の麻痺例がなく、中長期的な再悪化もないことから術前脊髄高度障害例、骨化摘出が困難な例には有力な選択肢となり得ることを報告した。山本・谷は機能障害の改善は前方群が有意にすぐれ、神経合併症は後方法では 33%に認められ、前方法ではなかったことから、高度の頸椎 OPLL に後方法を適用する場合、脊髄モニターにより神経合併症の予防に努めると同時にその原因を究明する必要があることを示した。中原は胸腰椎移行部圧迫骨折の患者で両下肢麻痺を呈した場合は、黄色靭帯骨化症の合併に留意しその対応を考慮すべきである、とした。石黒は骨化形態に関係なく広範囲後方除圧矯正固定術は良好な結果であったことを報告した。富田・川原は後縦靭帯骨化症に対する前方・後方アプローチによる脊髄全周除圧術の良好な手術成績を報告した。

D. 結論

ゲノム研究は現在、各施設での倫理委員会への申請ならびに血液サンプルの収集が始まったところであり今後解析を行っていく。

ガイドライン策定は文献査読までの前段階であり、査読・策定の後には学会での検証ならびに今後の他施設研究の設定と診断基準の見直しを図っていく。

井ノ上・小宮は 7 遺伝子、14SNPs で OPLL への関与が示唆された。今後はこれらの変異を中心に、さらにまだスクリーニングを行っていない遺伝子についても遺伝解析をすすめていく。

E. 健康危険情報

現在、介入をおこなう研究は行われておらず、またゲノム研究においては「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省 厚生労働省 経済産業省)」に従っており、検体の提供者からは、書面によるインフォームドコンセントを取得し、特に、個人情報の保護に留意している。

Ⅲ 分担研究報告書

異所性骨化に関与する新規遺伝子cystatin 10 (chondrocyte specific cysteine protease inhibitor) のクローニングと機能解析

分担研究者 山田 高嗣、腰塚 裕、河野 博隆、川口 浩、中村 耕三
東京大学大学院医学系研究科整形外科

研究要旨: 異所性骨化のモデルマウス、*ttw* (tip toe walking) mouse を用いて異所性骨化の発症機序を解明する中で、食事中的リン負荷により異所性骨化が増強することを見いだした。本研究では、リン負荷の有無によって *ttw* の耳介軟骨での発現が異なる遺伝子を differential display 法 (DD 法) により解析し、異所性骨化に関与する新規遺伝子 cystatin 10 (*cst10*) を単離、*in vitro* の解析より、*cst10* が軟骨細胞の後期分化促進能・アポトーシス誘導能を有していることが明らかになった。更に *cst10* 遺伝子欠損マウスの解析より、生体内では成長板における石灰化に関与している可能性が示された。

A. 研究目的

OPLL 等の異所性骨化のモデルマウスとして、nucleotide pyrophosphatase をコードする *Npps* の点変異をもつ *ttw* (tip toe walking) mouse が知られている。このマウスは、成長期より、耳介軟骨・脊椎傍靭帯・関節包などにさまざまな異所性骨化を呈する。このマウスを用いて異所性骨化の発症機序を解明する中で、我々は、食事中的リン負荷により異所性骨化が増強することを見いだした。本研究では、リン負荷の有無によって *ttw* の耳介軟骨での発現が異なる遺伝子を differential display 法 (DD 法) により解析し、異所性骨化に関与する新規遺伝子 cystatin 10 (*cst10*) を単離、その *in vitro* の機能について解析した。更に、*Cst10* の生体内における高次機能を解明する目的で、

Cst10 遺伝子欠損マウスを作製し、骨軟骨組織の解析を行った。

B. 研究方法

DD 法により osteopontin と6種類の新規遺伝子を単離し、更に全身の組織の中で軟骨でのみ特異的に発現している1種類の遺伝子を特定した。そして、その遺伝子の細胞内の局在や成長板での発現を解析し、さらにマウス軟骨細胞様細胞株 ATDC5 の分化段階における発現の変化や ATDC5 に遺伝子導入・高発現させた細胞株を樹立し、分化および内軟骨性骨化に与える影響を解析した。

次に、*Cst10* の3つのエクソンの内、転写開始点を含む第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換する構造のターゲティング

ベクターを作製し、ES 細胞を用いた標的遺伝子組み換え法によって、キメラマウス、ヘテロマウスを経て、ホモ欠損マウス (Cst10^{-/-}) の作出に成功した。骨軟骨組織の検討のために、同胞の雄性 WT および Cst10^{-/-} の長管骨の成長軟骨板および骨組織に関して、単純 X 線、3D-CT、DEXA (Lunar PIXImus) および pQCT による骨密度測定、骨代謝マーカー測定、および組織学的解析を行った。

(倫理面への配慮)

全ての実験動物の取り扱いには東京大学実験動物取り扱い規約に則って行った。

C. 研究結果

軟骨特異的な遺伝子 *cystatin 10* (*cst10*) は、cysteine protease inhibitor のひとつである *cystatin C* とアミノ酸レベルで 39% のホモロジーを持ち、*ttw* の耳介軟骨での発現はリン負荷により著明に亢進した。ATDC5 の培養系においては、インスリン非存在下では *cst10* の発現は見られず、インスリンによる分化誘導 3 日後に X 型コラーゲンの発現に先立って現れ、その後分化の進行に伴って発現量は増加した。マウスの成長板の免疫組織染色では、分化の進んだ肥大細胞層に強い染色性が認められた。*cst10* の cDNA を COS7 細胞に強制発現させ、lysosome との 2 重免疫染色を行ったところ、Cst10 は lysosome と同一部位に局在することが明らかとなった。また、ATDC5 の *cst10* 導入細胞では II 型コラーゲンの発現と Alcian blue の染色性はベクターのみ導入した対照細胞と同程度であったが、細胞の肥大化、X 型コラーゲンの発現がより早い時期から見られ、Alizarin red および von Kossa の染色性は著

明に亢進していた。より発現の強い導入細胞クローンでは、分化誘導後 1 週間から trypan blue 陽性の浮遊細胞が多数出現した。PI ラベル後のフローサイトメトリーにおいて導入細胞では sub-G1 population が増加しており (35.9% vs. 8.1%)、核の断片化、Annexin V 染色による細胞膜リン脂質の非対称性の喪失が認められ、更に caspase 3、8、9 の活性が著明に亢進していた。

Cst10^{-/-} は、外見上正常で、発生・成長とも野生型マウス (WT) と差がなかった。X 線上、Cst10^{-/-} (8 週齢) の全身骨格の形態的な異常はなかったが、大腿骨・脛骨の骨密度が、全体として約 10% 低下し、長軸方向に 20 分画に分けると骨量減少は骨幹端部の成長板近傍に強く認められた。組織学的に検討すると、脛骨近位部のトルイジンブルー染色では、成長板軟骨の厚さや軟骨細胞の柱状配列は正常に保たれていたが、ビラヌーバー・ゴールドナー染色では、成長軟骨板直下の一次海面骨量の減少が認められた。同マウスの脛骨非脱灰切片をフォンコッサで染色すると、成長板下端の肥大軟骨細胞層での石灰化が、Cst10^{-/-} で低下していた。脛骨近位の成長板軟骨の厚さ・石灰化軟骨層の厚さとその割合を計測すると、成長板軟骨全体の厚さは野生型マウスと Cst10^{-/-} の間に差は見られなかったが、石灰化軟骨層の厚さが Cst10^{-/-} で減少し、成長板軟骨全体に対する割合が有意に低下していた。また、石灰化した基質に覆われた、1 コラム当たりの肥大軟骨細胞の数も、Cst10^{-/-} で有意に減少していた。

D. 考察

我々は、内軟骨性骨化に関与している新

規遺伝子 cystatin 10 (Cst10)をマウス軟骨細胞からクローニングした。本遺伝子産物は、cysteine protease inhibitor である cystatin family に属する分子で、軟骨細胞の分化の後期に発現し、培養軟骨細胞に高発現させると軟骨細胞の後期分化・アポトーシスの誘導に働くことを示した。従って、新規遺伝子 *cst10* は軟骨細胞の後期分化促進能・アポトーシス誘導能を有し、内軟骨性骨化に重要な因子である可能性が示された。更に、Cst10 遺伝子欠損マウスの解析により、この軟骨分化の後期に発現する cystatin 10 は、生体内では、成長板における石灰化に参与している可能性が示された。今後、骨折治癒過程における機能や変形性関節症の病態における機能の解析を検討している他、この *Cst10*^{-/-}を異所性骨化のモデルマウスである *ttw* マウスと掛け合わせ、*ttw* マウスで見られる異所性骨化がレスキューされるかどうか等について検討していく予定である。

E. 結論

1. 内軟骨性骨化に参与している新規遺伝子 cystatin 10 をマウス軟骨細胞からクローニングした。
2. in vitro の解析では、新規遺伝子 cystatin10 は軟骨細胞の後期分化促進能・アポトーシス誘導能を有していた。
3. 遺伝子欠損マウスの解析により、cystatin 10 は、生体内では成長板における石灰化に参与している可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yu Koshizuka, Hiroshi Kawaguchi, Naoshi Ogata, Toshiyuki Ikeda, Akihiko Mabuchi, Atsushi Seichi, Yusuke Nakamura, Kozo Nakamura, and Shiro Ikegawa: Nucleotide pyrophosphatase gene polymorphism associated with ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res* 17: 138-144, 2002.
- 2) Naoshi Ogata, Yu Koshizuka, Toshiki Miura, Motoshige Iwasaki, Takayuki Hosoi, Masataka Shiraki, Atsushi Seichi, Kozo Nakamura, and Hiroshi Kawaguchi: Association of bone metabolism regulatory factor gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity. *Spine* 27: 1765-1771, 2002.

2. 学会発表

- 1) 第 20 回日本骨代謝学会 (2002.7.25-27 岡山) Cystatin 10 遺伝子欠損マウスは成長板近傍の海綿骨形成の抑制を示す
- 2) 第 20 回日本骨代謝学会 (2002.7.25-27 岡山) ランチョンセミナー 骨代謝疾患への関与と骨軟骨再生医療への応用
- 3) 第 17 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2002.10.11-12 青森) Cystatin 10 遺伝子欠損マウスの作出と骨軟骨組織の解析
- 4) 第 17 回日本整形外科学会基礎学術集