

会 (2002.10.11-12 青森) 骨・関節再生
への分子生物学的アプローチ

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

持続的なMAPKシグナル抑制によるBMPの応答制御

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

[研究要旨]

脊柱靱帯骨化症の成因の一つと考えられている骨形成因子 (Bone Morphogenetic Protein; BMP) は多分化能を有する間葉系細胞を骨芽細胞へ分化誘導する作用を有する。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。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た。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。今回の結果より、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靱帯骨化症の成因の一つである可能性が示唆された。

A. 研究目的

骨形成因子 (Bone morphogenetic protein; BMP) は、in vivo では異所性骨形成を誘導し、in vitro では間葉系細胞の骨芽細胞分化を促進する生物活性を有している。脊柱靱帯骨化症においては、異所性骨化部位やその周辺部位において、BMP2/4 や BMP レセプターの発現が認められ、その骨化の発生や進展に強い関与が考えられている。我々は、BMP に対する応答性の制御機構が異所性骨化に関係する可能性を考え、その制御機構を解析することにより脊柱靱帯骨化症の成因解明の1つのアプローチとしてきた。

これまでに細胞骨格関連遺伝子が BMP による骨形成を修飾していることを報告したが、今回、間葉系細胞において、mitogen-activated protein kinase (MAPK) シグナル伝達系の変化が BMP の応答性に及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

1) BMP2 による骨芽細胞分化が誘導される C2C12 筋芽細胞株と前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いて、MAPK/extracellular signal-regulated (ERK) kinase (MEK) の特異

的阻害剤である PD98059 および U0126 の骨芽細胞分化に対する影響を調べた。それぞれの阻害剤とリコンビナントヒト BMP2 は細胞培養期間中、常時培地に加えた。分化マーカーとしてはアルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン分泌、細胞外基質の石灰化結節のカルシウム含有量を測定した。

2)C2C12 筋芽細胞に MEK-1 の活性型 cDNA およびドミナントネガティブ型 cDNA を導入し、安定発現株を得た。この安定発現株を用いて、BMP2 によるアルカリフォスファターゼ活性の変化を調べた。

3)リコンビナントヒト BMP2(3 μ g)を含有するアテロコラーゲンを ICR マウス背部筋膜下に移植し、異所性骨形成を観察する系を用いて、MEK 特異的阻害剤 U0126 の腹腔内投与による異所性骨形成に対する影響を軟 X 線像にて観察した。

C. 研究結果

MEK 特異的阻害剤の PD98059 はともに C2C12 細胞において、リコンビナントヒト BMP2 によって誘導されるアルカリフォスファターゼ活性を濃度依存的に上昇させた。また、MC3T3-E1 細胞ではリコンビナントヒト BMP2 の有無にかかわらず、アルカリフォスファターゼ活性の濃度依存的上昇を認めた。活性型 MEK-1 を安定発現した C2C12 細胞では BMP2 によって誘導されるアルカリフォスファターゼ活性の上昇を認めず、ドミナントネガティブ型 MEK-1 を安定発現する細胞株では、BMP2 で誘導されるアルカリフォスファターゼ活性が mock 細胞株に比べて上昇していた。一方、BMP2 によって誘導されるオステオカルシン分泌は、C2C12 細胞では PD98059 濃度依存的に抑制され、逆に

MC3T3-E1 細胞では増加した。細胞外基質の石灰化結節内カルシウム含有量は、両細胞株において MEK 特異的阻害剤により優位に上昇していた。

In vivo の異所性骨形成に対する U0126 特異的 MEK 阻害剤投与の影響に関しては、阻害剤がリコンビナントヒト BMP2 によって形成される異所性骨を増大する傾向が認められた。

D. 考察

BMP2 による異所性骨形成が各種の細胞内シグナル伝達系の影響を受けていることが、明らかになりつつある。我々は、持続的に MAPK シグナル伝達系を抑制することで BMP2 による骨形成が促進されることを示した。今回、骨芽細胞分化マーカーの1つであるオステオカルシンの分泌が細胞株の種類によって変化を認めたが、オステオカルシン自身は骨形成を抑制したり、骨代謝のターンオーバーに関与しているとも報告もあり、直接的に骨形成に影響をおよぼしていないと考えられる。むしろ、アルカリフォスファターゼ活性が石灰化に重要な影響をもっているとの報告があり、この活性の上昇が in vitro における細胞外基質石灰化亢進や in vivo における異所性骨形成の亢進に関与していると考えられる。今回の我々の結果より、MAPK シグナル伝達系は BMP の応答性を修飾していることが示唆された。

E. 結論

BMP 応答性制御機構の1つとして MAPK シグナル伝達系があげられ、この系の抑制は BMP の骨形成に対する応答性を促進すると考えられた。

脊椎後縦靭帯骨化症の感受性遺伝子解析

田中 利弘(弘前大学整形外科)、古島 弘三(弘前大学整形外科)

猪狩 勝則(弘前大学整形外科)、藤 哲(弘前大学整形外科)

原田 征行(青森県立中央病院)

小宮 節郎(鹿児島大学整形外科)

岩崎 弘英(弘前大学薬理学)、古川 賢一(弘前大学薬理学)

田中 浩(山口大学整形外科)、河合 伸也(山口大学整形外科)

中島 敏晶(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)

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ゲノム全域での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、なお膨大かつ詳細なスクリーニングが必要となる。よって次に、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用な手段となりうる。

A.研究目的

近年、ヒトの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て発症する

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、公式ウェブサイトで公開されデータベースに登録されている SNPs の中でも、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。タイピングは、ケース及びコントロールサンプルそれぞれ 96 例で行い、関連解析により P-value<0.05 もしくはアレル頻度差 5% 以上の SNP に対し、さらにケースで 246 例、コントロールで 202 例のサンプルを追加して解析を行った。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 600 SNPs のスクリーニングにて、現在まで表 1 に示す 7 遺伝子、14 SNPs で P value<0.01 の有意差を認めている。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 は進化上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、今後は連鎖不平衡解析を含めたさらに詳細な解析により、より原因変異に近い領域へとアプローチしていくつもりである。

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。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関しても遺伝解析をすすめていく必要がある。

F.健康危惧情報

なし

G.研究発表

1.論文発表

Furushima K., Shimo-onoda K., Maeda S., Nobukuni T., Ikari K., Koga H., Komiya S., Nakajima T., Harata S., Inoue I. Large-Scale Screening for Candidate Genes of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Spine. J. Bone Miner. Res. 17, 128 - 137, 2002.

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. 47, 649 - 655, 2002.

2.学会発表

第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

脊柱靱帯骨化症に関する遺伝子解析

分担研究者 池川 志郎

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 チームリーダー

研究要旨 脊柱靱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が、有意な相関を認めなかった。

A. 研究目的

遺伝子多型を用いたケースコントロール相関解析を行うことで、脊柱靱帯骨化症（OPLL）の遺伝的背景の本態を明らかにすること。

B. 研究方法

1. 軟部組織の石灰化の抑制作用のある *MSX2*（川島ら、2002）はその機能より OPLL の発症に関わっている可能性がある。このため *MSX2* が OPLL の疾患感受性遺伝子であるか検討するためのスクリーニングを行った。骨化椎体数 8 以上の OPLL 典型例 24 例（男女各 12 例）とこれに性別・年齢のマッチした非 OPLL 例 12 例について、PCR ダイレクトシーケンス法により *MSX2* 遺伝子内とその上流 1 kb について遺伝子多型の検索とタイピングを行った。結果はカイ 2 乗検定、またはフィッシャーの検定にて評価した。

2. 罹患同胞法による連鎖解析で、21 番染色体長腕に OPLL の疾患感受性遺伝子が存在する可能性が示唆されている。さらに同領域内の 1 塩基置換多型（SNP）を用いた相関解析により *COL18A1* と *COL6A1* が OPLL の疾患感受性遺伝子の候補としてあげら

れた（田中・井上ら、2002）。そこでこれら 2 遺伝子、異なった OPLL・コントロールサンプルを用いて SNP を用いた相関解析を行った。ケース約 350 例、コントロール約 750 例について、2 遺伝子内の 9 SNP を対象に、PCR ダイレクトシーケンス法、またはマルチプレックス PCR インベーター法にてタイピングを行った。結果はカイ 2 乗検定にて評価した。

なお、本研究は理化学研究所、その他参加各施設において倫理委員会の承認を得た上、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・経済産業省告示第 1 号）を遵守して行った。

C. 研究結果

1. *MSX2* 遺伝子領域に 4 箇所の SNP、1 箇所の欠失・挿入多型を認めた。第 2 エクソンにアミノ酸の置換を伴う SNP（T129M）が存在したが、この多型はコントロール群に 1 アレルに存在するのみであった。アレル頻度 10%以上の多型は転写開始点上流に 2 箇所認めたが、いずれも OPLL とコントロール間で頻度に差を認めなかった。

2. タイピングした *COL18A1*・5 箇

所、*COL6A1*・4箇所 の SNP のうち OPLL 群とコントロール群でカイ 2 乗検定の P 値が有意水準 0.05 を下回ったのは、Bonferroni の補正を行わない条件でも *COL18A1* の 3'非翻訳領域の多型 1 箇所のみであった (P=0.04, オッズ比 1.19)。

D. 考察

1. *MSX2* 遺伝子について 5 箇所 の多型を同定したが、OPLL と明らかに相関のある多型は同定されなかった。アミノ酸の変化を伴う T129M 多型も M アレルは OPLL 典型例 24 例の中には同定されず、OPLL の一部の集団の疾患感受性を決定しているという仮説もなりたちにくい。今回の研究では 24 例ずつと比較的少数の検討ではあるが、典型例を用いていることもあり、*MSX2* 遺伝子内の多型が OPLL の疾患感受性に寄与している可能性は少ないと考えられた。

2. 独立した OPLL およびコントロール集団での相関解析の結果、先行研究にて認めた相関を裏付ける結果は得られなかった。唯一 p 値が 0.05 を下回ったのは *COL18A1* の 3'非翻訳領域の

多型であったが、先行研究とは逆に OPLL 群でアレル頻度が高くなっており、連鎖不平衡やハーディ・ワインベルグ平衡、さらにタイピングの生データの検討からはインベータープローブの特異性の問題による少数のタイピングエラーによる影響がでたものと考えられた。

先行研究と同一の結果が得られなかったことについては、SNP 頻度の地域差による影響、OPLL の遺伝的背景が集団間で異なっている可能性、連鎖解析で同定された領域内に他に真の感受性遺伝子が存在する可能性、などが考えられる。

E. 結論

MSX2、*COL18A1*、*COL6A1* が OPLL の疾患感受性遺伝子であるという証拠は得られなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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

研究要旨

アデノウイルスベクターにより脊髄圧迫損傷部位に神経栄養因子(glial cell line-derived neuro-trophic factor: GDNF) 発現ベクターを導入、遺伝子脊髄内発現を免疫組織学的に調べた。human GDNF遺伝子を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクター (AxCAhGDNF)をCOS-TPC法で作製した。14-16週齢 Wister Rat を用い、脊髄圧迫損傷モデルを作製、圧迫部位への髄内投与を行い、免疫染色、RT-PCRで評価した。注入後1週ではコントロールに比べ細胞数、抗GDNF抗体陽性細胞数、免疫活性の増加がみられた。アデノウイルスを用いた神経栄養因子遺伝子の導入は損傷された脊髄内における残存ニューロンの生存維持、再生能力の賦活化に役立つと考えられる。

A. 研究目的

末梢神経の軸索再生に必須とされている神経栄養因子が脊髄においても神経再生の促進因子として作用することが明らかとなってきた。これまで我々は後縦靭帯骨化症モデル(tw y/tw y)の圧迫損傷を受けた脊髄組織を観察し、圧迫部およびその近傍部における神経細胞およびグリア細胞がその機能維持、修復、再生のために神経栄養因子を強く発現していることを報告した。圧迫脊髄損傷の治療においてはこれらの神経再生、および栄養因子を損傷部位に効率的、選択的に神経回路再生に作用させることが不可欠であると考えられる。これまで我々は残存ニューロンの生存維持という観点より、神経栄養因子の損傷脊髄内導入実験を行ってきた。今回強力なベクターと考えられるアデノウイルス1)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学的に調べた。

B. 研究方法

1) GDNF発現アデノウイルスベクターの作製 human GDNF遺伝子、 β -galactosidase 遺伝子 (LacZ virus)を組み込んだ非増殖型アデノウイルスベクター (AxCAhGDNF, AxCALacZ)をCOS-TPC法で作製した2)。ウイルス力価は 3.5×10^9 plaque forming units/mlに調製した。2) 脊髄損傷モデルの作製 脊髄損傷モデルは、14-16週齢、雄のWistar Rat (体重400-450g)を用い、ペントバルビタール麻酔下に拡大鏡下にケリソン鉗子を使用しTh8、

Th9椎弓切除を行なった。硬膜外よりTh9高位の脊髄を2X3mm圧迫面を有する120gの重錘で2分間圧迫し、脊髄完全損傷モデルを作製した。損傷直後、ベクターを損傷部位にマイクロシリンジポンプを用いて、1分間1 μ lの速度でtotal 10 μ lの髄内投与を行った。

3) 免疫組織化学的検討

作製したvectorの生物学的活性はIn Vitroでは、Western Blot解析にてCOS1細胞感染後の上清を調べた。In Vivoでの検討は、まずAxCALacZにおいてベクター発現の局在を観察後、PBS、AxCAhGDNF注入群の両群間で、免疫組織化学的検討を行った。組織の評価は、損傷部位から頭尾側10mmの横断切片(20 μ m)で評価し、X-gal染色、細胞マーカーによるdouble staining、GDNF、choline acetyl transferase; ChATの免疫染色を行った。残存ニューロン数の評価はニッスル染色による前角部のcell countを行った。組織の観察はベクター注入後より経時的に行った。これらの動物実験、ベクター実験は福井医科大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認に基づくものである。

C. 研究結果

1) In Vitroでの生物学的活性の検討 COS1細胞感染後のGDNFの発現は2日以降で認められた。COS細胞内ではGDNFはグリコシド結合するため、グリケネース添加2)により、NativeGDNFと同分子量のバンドが検出できた。2) X-gal染色 矢状断では損傷部を中心に広範囲に染色されてお

り(図1)、前角部、後索部にも、X-gal陽性細胞が観察された。これらの変化はベクター注入直後から認められた。X-gal染色と細胞マーカーによる二重染色では、micro tubuleMAP2、Anti-Oligo.Ab、GFAP陽性細胞が観察され、それぞれの細胞への遺伝子導入、蛋白発現が確認された(図2)。

3) GDNF, ChAT免疫染色の観察

損傷後約2週、4週のGDNF免疫染色では、コントロール(PBS群)に比べニューロンに特に強いimmuno reactivityが観察された(図3)。経時的な蛋白発現の半定量化として行ったWBではPBC群では損傷初期に強い発現を認めたのに対し、AxCAhGDNFでは2週にベクターによる蛋白発現が確認された。損傷後4週のChAT免疫染色では、コリン作動性ニューロンである前角ニューロンにも特に強いimmuno reactivityが観察された。

4) ニッスル染色による前角部のcell count

細胞保護作用の確認はニッスル染色による前角部のcell countを行った。AxCAhGDNF群では特に2から4週においてPBS群に比べ有意に細胞数の減少が抑制されていた(図4)。

D. 考察

Neurotrophic familyは、特異的レセプターを介して種々の活性を示す蛋白群であり神経突起の伸展、生存維持、分化誘導に関与する。その中でGDNFは、脊髄前角ニューロンの生存維持に作用するproteinである3),4)。GDNFはTGF- β familyに属し、他のニューロトロフィンとは異なるシグナル伝達機構を持つと考えられている5)。この栄養因子はドーパミン作動性ニューロンに対する効果がBDNF6)を上回るのみならず、運動ニューロンに対しても強力な保護作用を持つと考えられている。今回の検討では損傷脊髄内にアデノウイルスベクターにより導入されたGDNF遺伝子は神経細胞を含む各細胞に高率に導入されていた。残存ニューロン機能維持という観点から、外来遺伝子によるGDNF蛋白発現は神経細胞の生存維持と可塑性に寄与する可能性が実験的に示唆された。

E. 結論

アデノウイルスを用いた神経栄養因子遺伝子の導入は損傷された脊髄内における残存ニューロンの生存維持、再生能力の賦活化に役立つと考えられる。

(文献)

1) Miyake, S., et al: Efficient generation of

recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 1320-1324, 1996.

2) Watebe, K., et al: Rescue of Lesioned Adult Rat Spinal Motoneurons by Adenoviral Gene Transfer of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor. JNR 60: 511-519, 2000.

3) Yan, Q., et al.: In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. Nature 373: 341-344. 1995.

4) Oppenheim, R.W., et al.: Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. Nature 373: 344-346, 1995.

5) Lin, L.F., et al: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science 260: 1130-1132, 1993.

6) Novikov, L., et al: Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. Neuroscience 79: 765-774, 1997.

G. 研究発表

学会発表

内田研造,馬場久敏,前澤靖久,小久保安朗,久保田力,中嶋秀明: 神経栄養因子発現ベクター導入後の損傷脊髄内遺伝子発現の検討.第17回日本整形外科学会基礎学術集会,2002,10,青森.日整会誌. 76(8),S1115,2002,8.

内田研造,馬場久敏,小久保安朗,久保田力,中嶋秀明: 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.第21回日本運動器移植・再生医学研究会,2002,10,東京.

内田研造,馬場久敏,小久保安朗,久保田力,中嶋秀明,*米和徳,*山浦一郎: アデノウイルスベクターを用いた損傷脊髄に対する神経栄養因子遺伝子の導入.第37回日本脊髄障害医学会,2002,11,和歌山.第37回日本脊髄障害医学会プログラム・抄録集.39,2002,11.

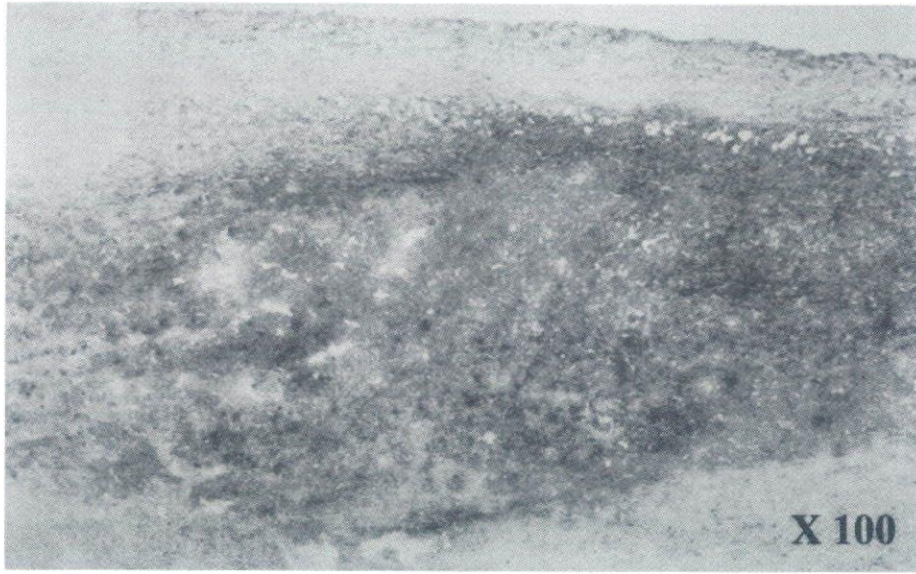


图 1

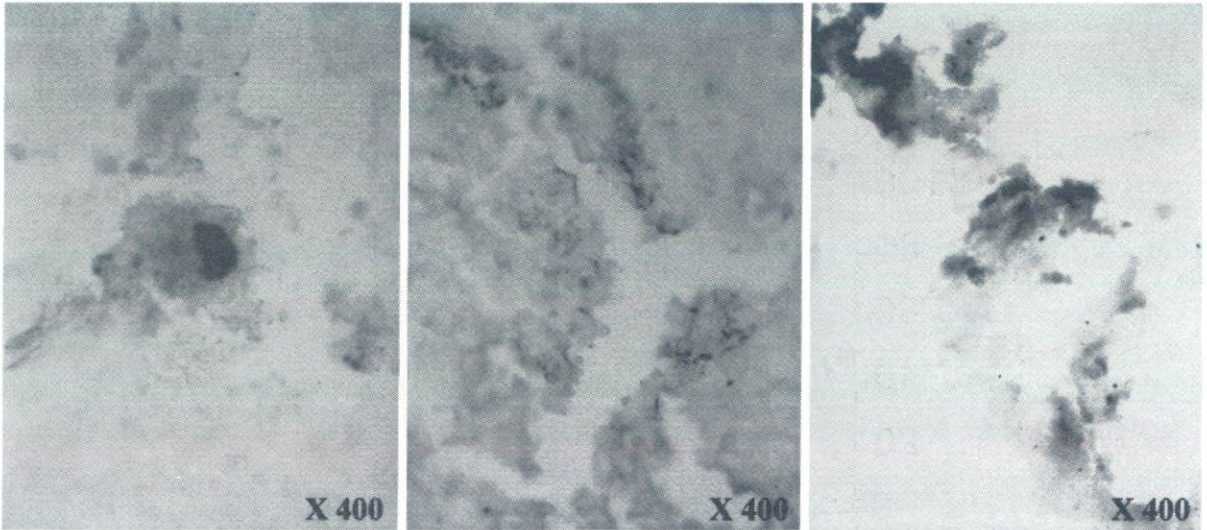


图 2

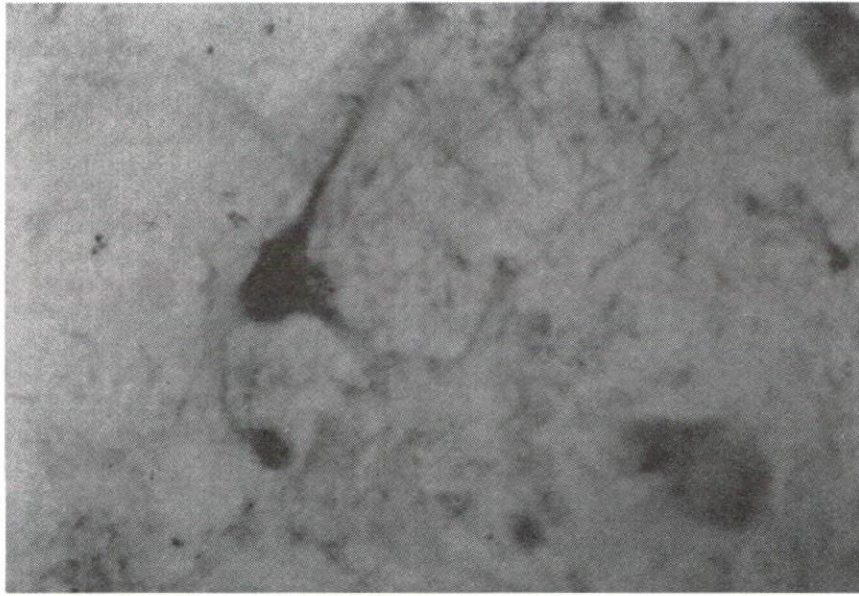


図 3

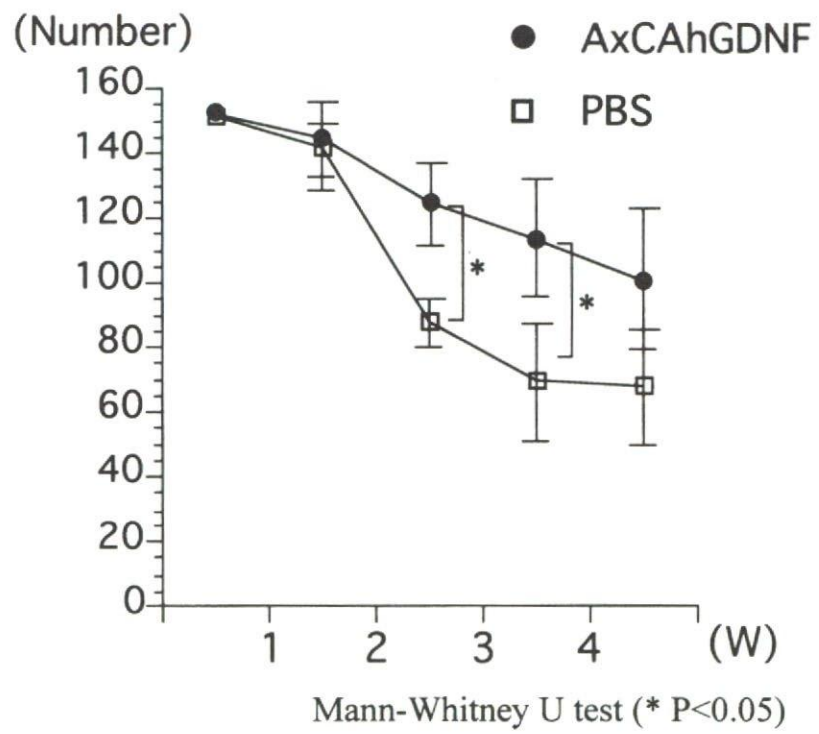


図 4

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

長嶺智徳（鹿児島大学医学部整形外科）、有島善也（鹿児島大学医学部整形外科）、
瀬戸口啓夫（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）、
泉 俊彦（鹿児島大学医学部整形外科）、早田正和（鹿児島大学医学部第一病理
学）、山浦一郎（鹿児島大学医学部整形外科）、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）、松永俊二（鹿児島大学医学部整形外
科）、米 和徳（鹿児島大学医学部整形外科）、小宮節郎（鹿児島大学医学部整
形外科）

〈現在、他雑誌に投稿中〉

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

岩崎弘英（弘前大学・薬理学、整形外科）、古川賢一（弘前大学・薬理学）、丹野雅彦（青森市民病院・整形外科）、楠美智巳（弘前大学・第2病理）、植山和正（弘前記念病院・整形外科）、岡田晶博（弘前大学・整形外科）、元村成（弘前大学・薬理学）、原田征行（青森県立中央病院）、藤哲（弘前大学・整形外科）

研究要旨

後縦靭帯骨化症(OPLL)における靭帯骨化の発生の機序は明らかではなく、靭帯局所にかかるメカニカルストレスがその一因と指摘されている。今回我々は、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。

メカニカルストレスとして繰り返し伸展刺激を加えたところ、OPLL 細胞では Cbfa1、ALP、type I collagen、integrin β 1 の発現が増加した。また免疫染色では OPLL 由来の棘間靭帯の靭帯実質部において線維芽細胞様細胞での Cbfa1 発現の増加傾向が認められた。さらに MAPK kinase (MEK) 阻害薬の添加実験により靭帯骨化における MAPK の関与、さらにその上流の integrin β 1 の mechanotransducer としての関与が推測された。しかし、上記の応答は non-OPLL では認められなかった。以上から 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ことが示唆された。

A. 研究目的

OPLL をはじめとする脊柱靭帯骨化症はその成因がまだ明らかで無く、遺伝的変異、代謝異常、環境因子、局所因子等々が協奏的に働いて起こる多因子疾患であることが予測されている。OPLL 患者由来脊柱靭帯細胞

(OPLL 細胞) は、非 OPLL 患者由来脊柱靭帯細胞(非 OPLL 細胞)に比べ、ALP (Alkaline Phosphatase) 活性が高いこと (1)、や BMP(Bone Morphogenetic Protein)、IGF(insulin-like growth factor)、CTGF(connective tissue growth factor)などの成長因子に対する

反応が異なる(2,3,4,5)ことから、骨形成系細胞に形質転換していることが考えられる。また局所へのメカニカルストレスがOPLLの伸展を促進するという報告(6,7)や、メカニカルストレスによりOPLL細胞でBMP2、osteopontinの発現およびALP活性が増加したという我々の報告(8)があり、メカニカルストレスがOPLL発生もしくは進展の一因である可能性も示唆されている。

また近年骨芽細胞の分化においてRunx2/Cbfa1/PEBP2 α (以下Cbfa1; core binding factor alpha1)が重要な働きを有することが報告されている。

そこで我々はOPLL細胞におけるメカニカルストレスによる遺伝子発現の変化に注目し、Cbfa1を中心として検討した。

B. 研究方法

1. 脊柱靭帯細胞

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10例、非OPLL患者10例の脊柱靭帯組織から骨成分を除き、outgrowth法にて靭帯細胞を単離し、10%FBS添加DMEM培地中で、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ 気相下にて培養した。

2. 伸展刺激(メカニカルストレス)

5代目の線維芽細胞様細胞を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、コンフルエント後1%FBS添加DMEM培地にて24時間インキュベートした後、伸展刺激装

置(スカラテック社)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。

3. RT-PCR

伸展刺激後、total RNAを回収し、うち1 μ gをcDNAに逆転写し、Cbfa1、ALP、type I collagen、integrin β 1の発現量をRT-PCRにて定量した。PCR産物は2.5%アガロース変性ゲルで泳動後、SYBR Green Iにて染色し、泳動ゲル画像をTIFFファイル形式で保存後、解析した。

4. 免疫染色

OPLLおよびnon-OPLL患者由来の頸椎棘間靭帯を術中採取し、1%FBS添加DMEM培地にて同装置、同条件で4時間伸展刺激を加えた。靭帯は脱灰後パラフィン包埋ブロックにて固定し、ABC法により抗ヒトCbfa1抗体を用いて免疫染色を行った。

5. MAPK kinase (MEK) 阻害薬の添加

MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK)の特異的な阻害薬であるU0126を1%FBS添加DMEM培地に40 μ M添加し、9時間伸展刺激に対するCbfa1、ALP、type I collagenの発現へのU0126の作用を解析した。

C. 研究結果

1. 伸展刺激によるCbfa1発現変化

RT-PCRにてCbfa1 mRNAの発現を解析したところ、OPLL細胞では伸展刺激開始6時間、9時間では、伸展刺激なし(0h)に比べて発現が200%($P<0.05$)、192%($P<0.05$)と有意に

増加した。一方 non-OPLL 細胞では経時的に減少する傾向が認められた。

(図 1)

2、免疫染色

OPLL および non-OPLL 患者由来の棘間靭帯では、共に靭帯骨付着部の軟骨細胞に Cbfa1 の発現が認められた。しかし OPLL 患者由来の棘間靭帯では伸展刺激により靭帯実質部の線維芽細胞様細胞において Cbfa1 の発現が増加する傾向が認められた。一方 non-OPLL 例では変化は認められなかった。(図 2。non-OPLL 例は省略。)

3、伸展刺激による骨の分化マーカーの発現の変化

RT-PCR にて骨芽細胞の早期の分化マーカーである ALP、type I collagen mRNA の発現の変化を解析したところ、OPLL 細胞では 9 時間伸展刺激により ALP、type I collagen の発現が伸展刺激無しに比べて、それぞれ 230% (P<0.05)、246% (P<0.05) と有意に増加した。一方 non-OPLL 細胞では伸展刺激による分化マーカーの発現の変化は認められなかった。(図 3, 4)

4、伸展刺激による integrin $\beta 1$ の発現の変化

integrin $\beta 1$ subunit は mechanotransducer としての働きを有することが知られており、骨芽細胞では integrin $\beta 1$ に対する機械的刺激により MAPK pathway が活性化し、骨芽細胞の分化が誘導されることが報告されている (9,10)。

OPLL 細胞では integrin $\beta 1$ の発現は 9 時間の伸展刺激により、伸展刺激無

しに比して 210% (P<0.05) 増加した。一方 non-OPLL 細胞では伸展刺激による発現の変化は認められなかった。

(図 5)

5、伸展刺激による発現変化への MAPK kinase (MEK) 阻害薬の効果

前述の通り、MAPK pathway は機械的刺激が integrin $\beta 1$ subunit を介して細胞内へ情報伝達される際に重要な経路である。U0126 は MEK1, 2 に特異的に結合し、ERK1/2 のリン酸化を阻害する。

OPLL 細胞では 9 時間の伸展刺激により Cbfa1、ALP、type I collagen の mRNA 発現は伸展刺激なしに比べてそれぞれ 173% (P<0.05)、274% (P<0.001)、295% (P<0.05) に増加したが、U0126 の添加によりそれらの発現は 116%、140%、116% と増加は抑制された。non-OPLL 細胞ではそのような変化は認められなかった。

integrin $\beta 1$ は OPLL 細胞では伸展刺激により 155% 発現が増加したが (P<0.05)、U0126 による発現増加の抑制効果は認められなかった。(図 6)

D、考察

メカニカルストレスは骨の metabolism において非常に重要な役割を有することは知られており、骨芽細胞ではメカニカルストレスにより、ALP、type I collagen、osteopontin、osteocalcin といった骨の分化マーカーの発現が増加するという報告が多くなされている。(11, 12)

骨芽細胞に特異的な転写因子である *Cbfa1* はノックアウトマウスでは内軟骨性及び膜性骨化の両者が阻害され、骨芽細胞の分化において key role を有する (13)。今回の研究により OPLL 細胞では伸展刺激により *Cbfa1* および ALP、type I collagen の発現が増加した。また OPLL 患者由来棘間靭帯では靭帯実質部の線維芽細胞様細胞で伸展刺激により *Cbfa1* 発現の増加傾向が見られた。これらの事から OPLL 細胞の骨形成系細胞への形質転換の可能性、そしてメカニカルストレスによる OPLL 細胞の骨形成系細胞への分化誘導の可能性が示唆された。以前 OPLL 細胞の ALP 活性 (1) の増加が報告されたが、今回の研究では伸展刺激が無い状態での OPLL 細胞および non-OPLL 細胞の ALP 発現には有意差は認められず、伸展刺激による ALP 発現への感受性の相違が認められた。

骨芽細胞において ERK の活性化を介した *Cbfa1* mRNA 発現の増加・DNA 結合能の増加が報告されており (14)、さらに U0126 の添加により *Cbfa1* の転写産物である osteocalcin や bone sialoprotein の発現の抑制が報告されている (15)。このように骨芽細胞において MAPK pathway は重要な経路であり、本研究でも OPLL 細胞での U0126 の抑制効果を鑑みるに、靭帯骨化の過程において MAPK が関与するものと考えられる。

細胞外部からの刺激であるメカニカルストレスを細胞内情報へと変換する mechanotransducer として、骨芽細胞

においては Ca channel や integrin $\beta 1$ subunit などが挙げられる。当教室の研究で、OPLL 細胞において電位依存性 Ca channel 阻害薬の添加により ALP 活性が抑制されることや伸展刺激によって Ca channel 自体が増加することから Ca channel の関与が示唆されている。本研究では integrin $\beta 1$ subunit の発現が伸展刺激により増加した。MAPK pathway は integrin によるシグナルが核内に伝達する際の重要な経路であるが、今回 OPLL 細胞における integrin $\beta 1$ から MAPK 活性化への関連が明らかとはなっておらず、今後のさらなる研究が必要と考える。

E. 結論

本研究においてメカニカルストレスにより OPLL 細胞では *Cbfa1*、ALP、type I collagen、integrin $\beta 1$ の発現が増加した。OPLL 細胞が骨形成系細胞へと形質転換し靭帯骨化が生じる過程として integrin $\beta 1$ subunit を介した MAPK pathway の関与が示唆される。

G. 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

参考文献

- (1) Ishida Y, Kawai S. Characterization of cultured cells derived from ossification of

- the posterior longitudinal ligament of the spine. *Bone*. 14, 85-91, 1993
- (2) Kon T, Yamazaki M, Taawa M, Goto S, Terakado A, Moriya H, Fujimura S. Bone morphogenetic protein-2 stimulates differentiation of cultured spinal ligament cells from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Calcif.Tissue Int.* 60, 291-296, 1997
- (3) Goto K, Yamazaki M, Tagawa M, Goto S, Kon T, Moriya H, Fujimura S. Involvement of insuline-like growth factor I in development of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Calcif.Tissue Int.* 62, 158-165, 1998
- (4) 赤石孝一、古川賢一、植山和正、丹野雅彦、山本祐司、原田征行. 後縦靱帯骨化症患者由来の靱帯細胞において CTGF/Hcs24 により発現調整される遺伝子の解析. 厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成 12 年度報告書. 80-85, 2001
- (5) Yamamoto Y, Furukawa K, Ueyama K, Nakanishi T, Takigawa M, Harata S. Possible roles of CTGF/Hcs24 in the initiation and development of ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine*. 27, 1852-1857, 2002
- (6) Matsunaga S, Sakou T, Taketomi E, Yamaguchi M, Okano T. The natural course of myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine. *Clin.Orthop.* 305, 168-177, 1994
- (7) 富田卓、原田征行、植山和正、伊藤淳二、新戸部泰輔. 頸椎後縦靱帯骨化症の骨化進展についての X 線学的考察. *臨整外*, 34 巻 2 号, 167-172, 1999
- (8) 丹野雅彦、古川賢一、植山和正、元村成、原田征行. 厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成 12 年度報告書. 64-68, 2001
- (9) Schmidt C, Pommerenke H, Durr F, Nebe B, Rychly J Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J Biol Chem* 273, 5081-5085, 1998
- (10) Pommerenke H, Schmidt C, Durr F, Nebe B, Luthen F, Muller P, Rychly J The mode of mechanical integrin stressing controls intracellular signaling in osteoblasts. *J Bone Miner* 17, 603-611, 2002
- (11) Harter LV, Hruska KA, Duncan RL Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology* 136, 528-535, 1995
- (12) Pavlin D, Dove SB, Zadro R, Gluhak-Heinrich J Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model: effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int* 67, 163-172, 2000
- (13) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K,

Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764, 1997

(14) Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG The bone-specific transcriptional regulator *Cbfa1* is a target of mechanical signals in osteoblastic

cells. *J Biol Chem* 277, 23934-23941, 2002

(15) Xiao G, Gopalakrishnan R, Jiang D, Reith E, Benson MD, Franceschi RT Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res* 17,101-110, 2002