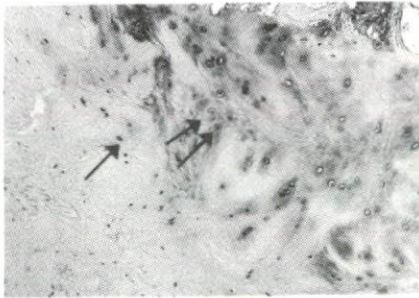


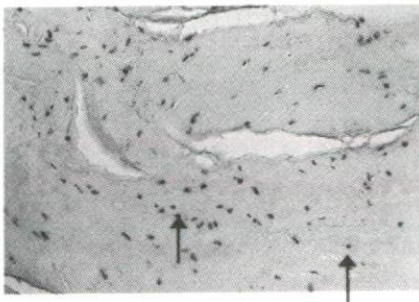
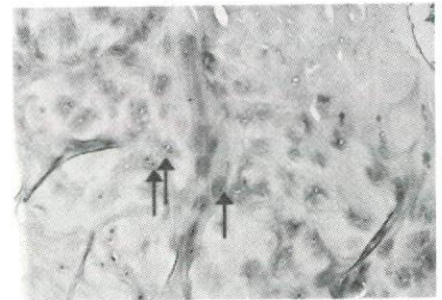
Fig. 1

伸展刺激なし



靭帯骨付着部
(×25)

4時間伸展刺激



靭帯実質部
(×50)

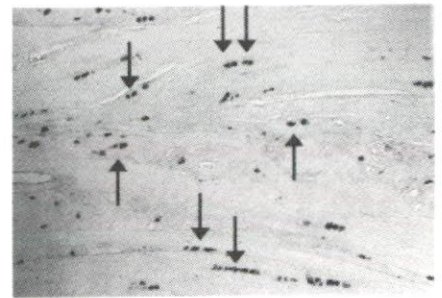


Fig. 2

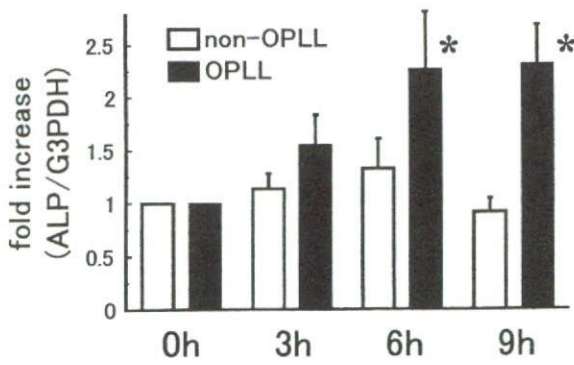


Fig. 3

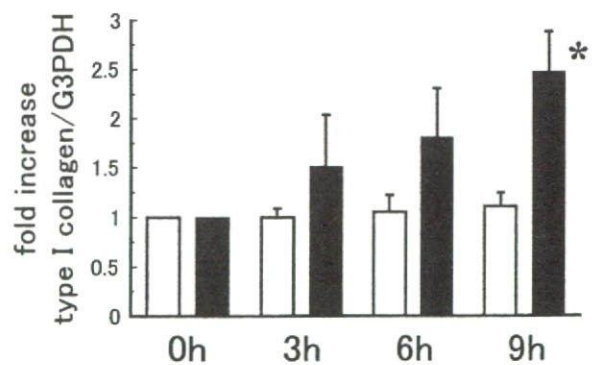


Fig. 4

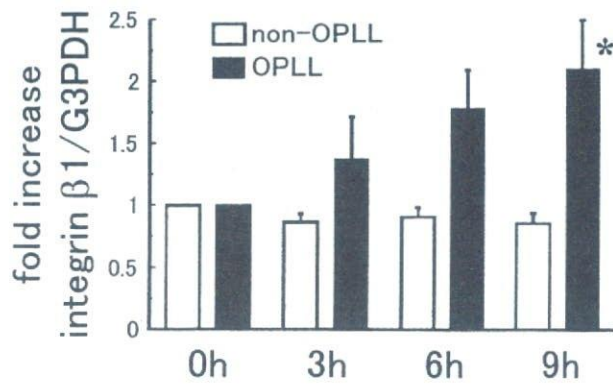


Fig. 5

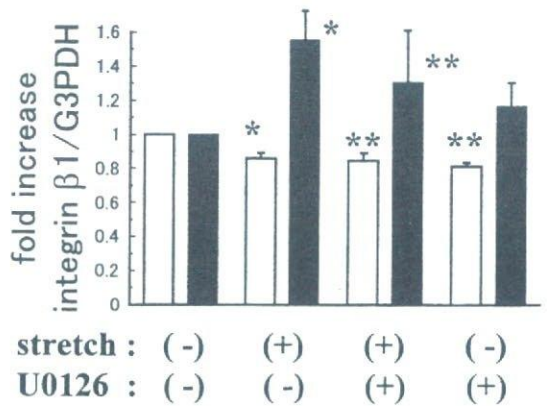
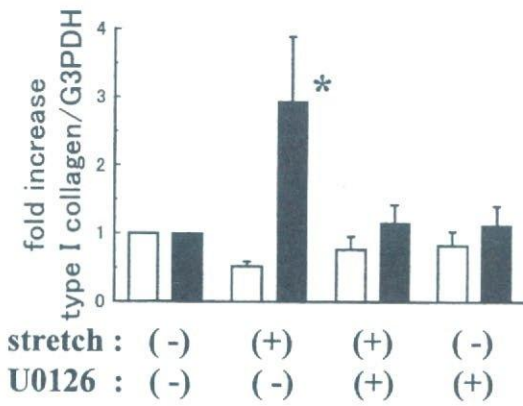
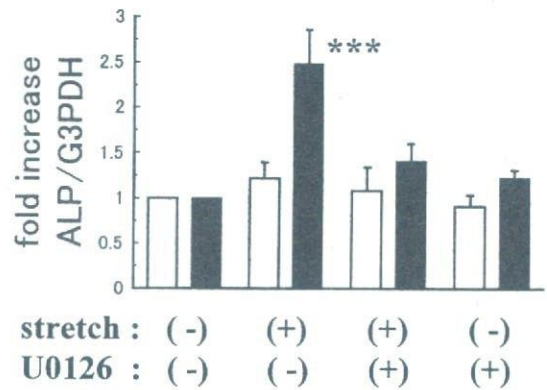
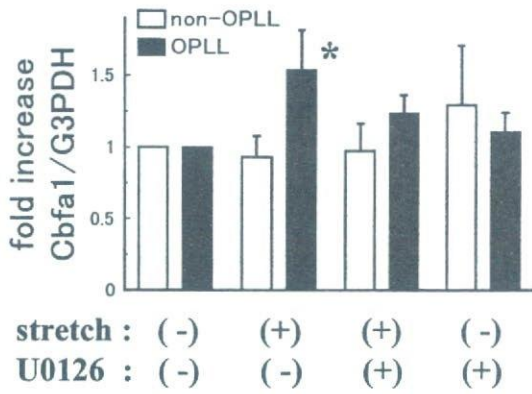


Fig. 6

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_{I₂}の役割

大石裕誉 (弘前大学・医・整形外科)、古川賢一 (弘前大学・医・薬理学)、植山和正 (弘前記念病院)、岡田晶博 (弘前大学・医・整形外科)、元村成 (弘前大学・医・薬理学)、原田征行 (青森県立中央病院)、藤 哲 (弘前大学・医・整形外科)

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 I₂ 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(1-3)、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(4-6)、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椎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 患者の脊椎靭帯組織から outgrowth 法にて靭帯細胞を単離し、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 代目の脊椎靭帯細胞を 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 dibutyryl 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 dibutyryl 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）。

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 PGI₂ 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）。

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(8,9)、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(10)。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(11,12)。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(13-15)。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。

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) 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) Yamamoto Y, Furukawa KI, Ueyama K, Nakanishi T, Takigawa M, and Harata S (2002) Possible roles of CTGF/Hcs24 in the initiation and development of ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine* 27:1852-1857.
- (3) 赤石孝一ら (2001) 後縦靭帯骨化症患者由来の靭帯細胞において CTGF/Hcs24 により発現調節される遺伝子の解析 弘前医学 52:66-71.
- (4) Matsunaga S, Sakou T, Taketomi E, Yamaguchi M, and Okano T (1994) The natural course of myelopathy caused by ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine. *Clin Orthop* 305: 168-177.
- (5) Nakamura, H (1994) A radiographic study of the progression of ossification of the cervical posterior longitudinal ligament: the correlation between the ossification of the posterior longitudinal ligament and that of the anterior longitudinal ligament. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 68: 725-730.
- (6) 古川賢一ら(2002) 脊柱後縦靭帯の骨化進展におけるメカニカルストレスの役割 *THE BONE* 16: 77-80.
- (7) Schilling L, Kanzler C, Schmiedek P, and Ehrenreich H (1998) Characterization of the relaxant action of urocortin, a new peptide related to corticotropin-releasing factor in the rat isolated basilar artery. *Br J Pharmacol* 125: 1164-1171.
- (8) Ishida Y (1998) Studies on induction mechanism of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine--especially on the cultured cells from the human spinal ligament. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 62: 1019-1027.
- (9) Goto K, Yamazaki M, Tagawa M,

- Goto S, Kon T, Moriya H, and Fujimura S (1998) Involvement of insulin-like growth factor I in development of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Calcif Tissue Int* 62: 158-165.
- (10) Fortier I, Patry C, Lora M, Samadfan R, and de Brum-Fernandes AJ (2001) Immunohistochemical localization of the prostacyclin receptor (IP) human bone. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 65:79-83.
- (11) Rawlinson SC, Mohan S, Baylink DJ, and Lanyon LE (1993) Exogenous prostacyclin, but not prostaglandin E₂, produces similar responses in both G6PD activity and RNA production as mechanical loading, and increases IGF-II release, in adult cancellous bone in culture. *Calcif Tissue Int* 53:324-329.
- (12) Zaman G, Suswillo RF, Cheng MZ, Tavares IA, and Lanyon LE (1997) Early responses to dynamic strain change and prostaglandins in bone-derived cells in culture. *J Bone Miner Res* 12: 769-777.
- (13) Khanin M, Liel Y, and Rimon G (1999) Differential effect of TPA on PGE₂ and cicaprost-induced cAMP synthesis in UMR-106 cells. *Cell Signal* 11: 165-169.
- (14) Partridge NC, Kemp BE, Livesey SA, and Martin TJ (1982) Activity ratio measurements reflect intracellular activation of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase in osteoblasts. *Endocrinology* 111:178-183.
- (15) Rawlinson SC, el-Haj AJ, Minter SL, Tavares IA, Bennett A, and Lanyon LE (1991) Loading-related increases in prostaglandin production in cores of adult canine cancellous bone in vitro: a role for prostacyclin in adaptive bone remodeling? *J Bone Miner Res* 6: 1345-1351.

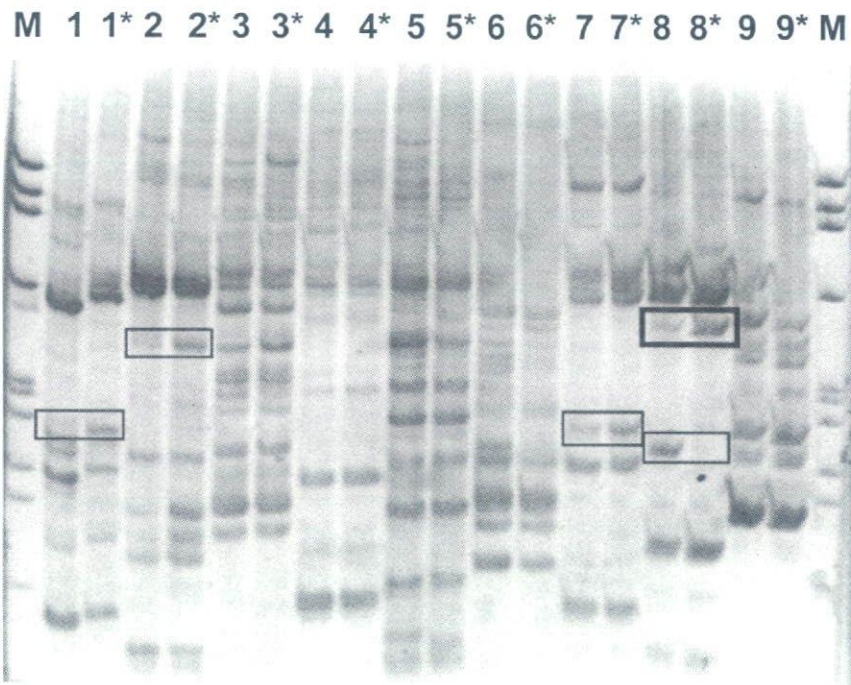


図1 Differential Displayの電気泳動像(1*-8*:OPLL,1-8:非OPLL)

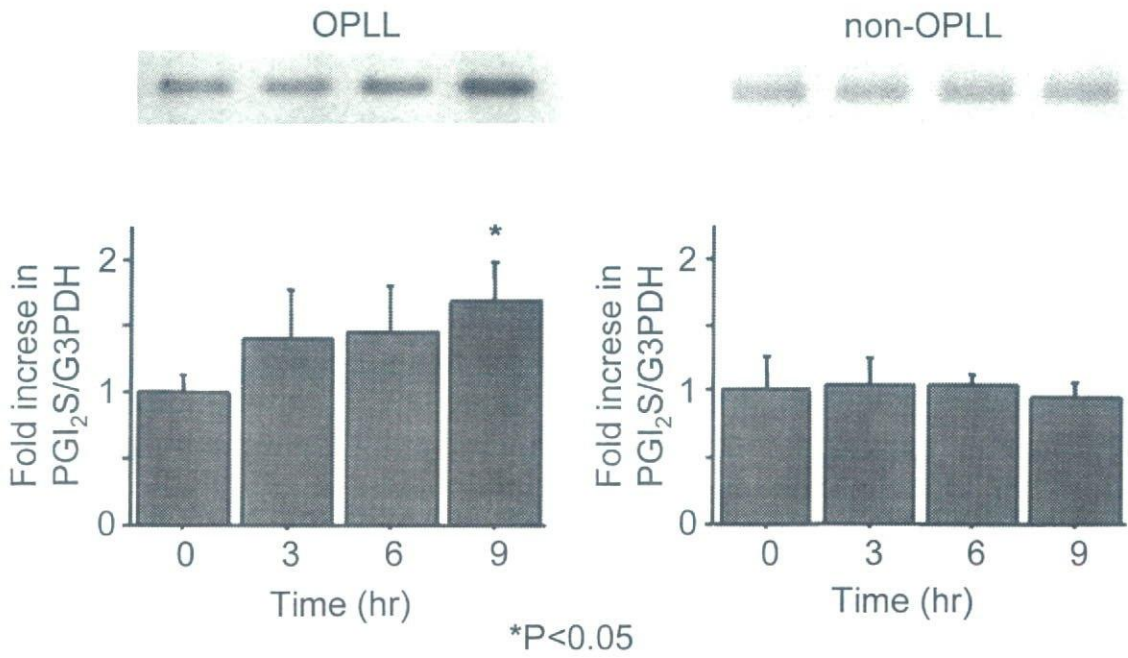


図2 伸展刺激によるPGI₂S(PGI₂合成酵素)のmRNA発現

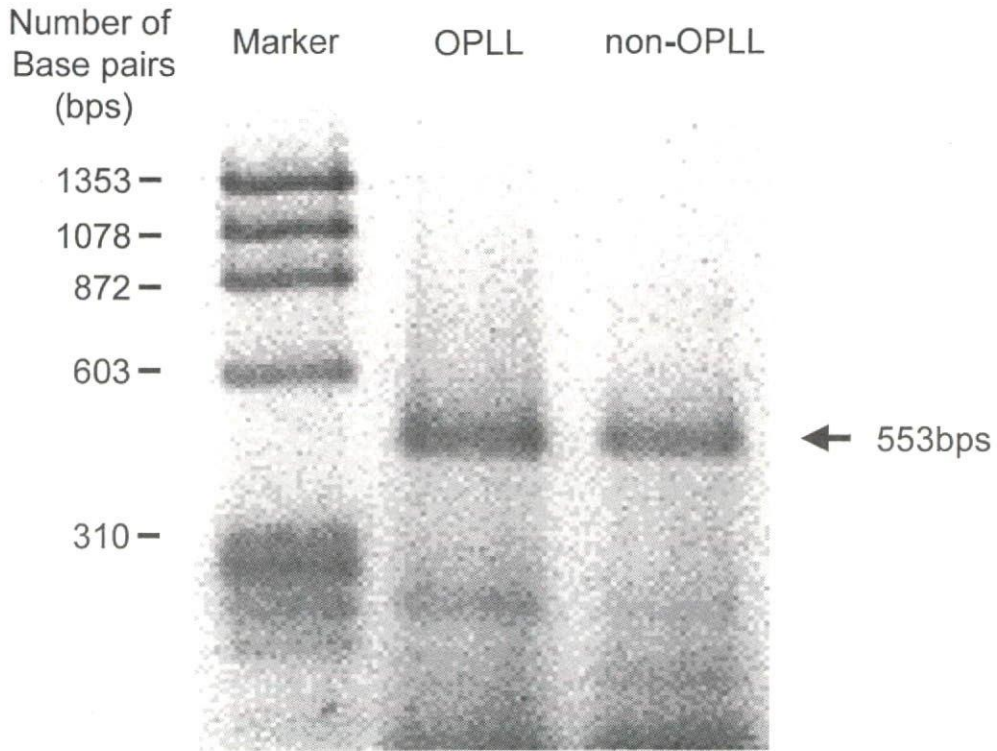


図3 PGI₂ receptorの発現

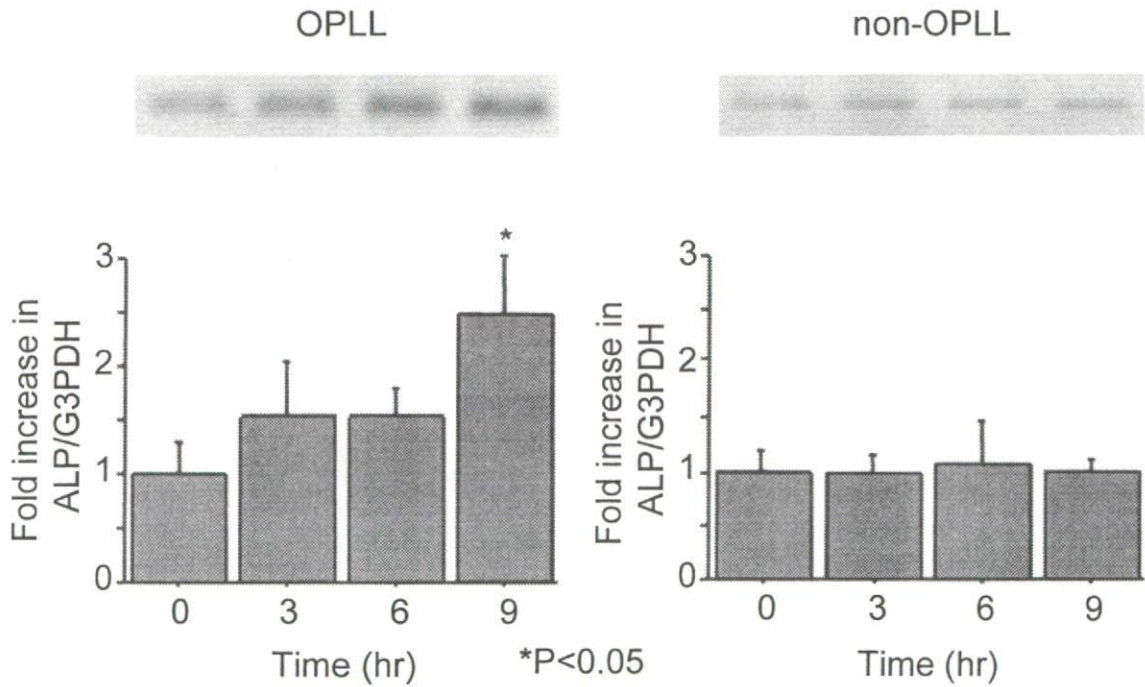


図4 ベラプロスト添加によるALP mRNAの発現

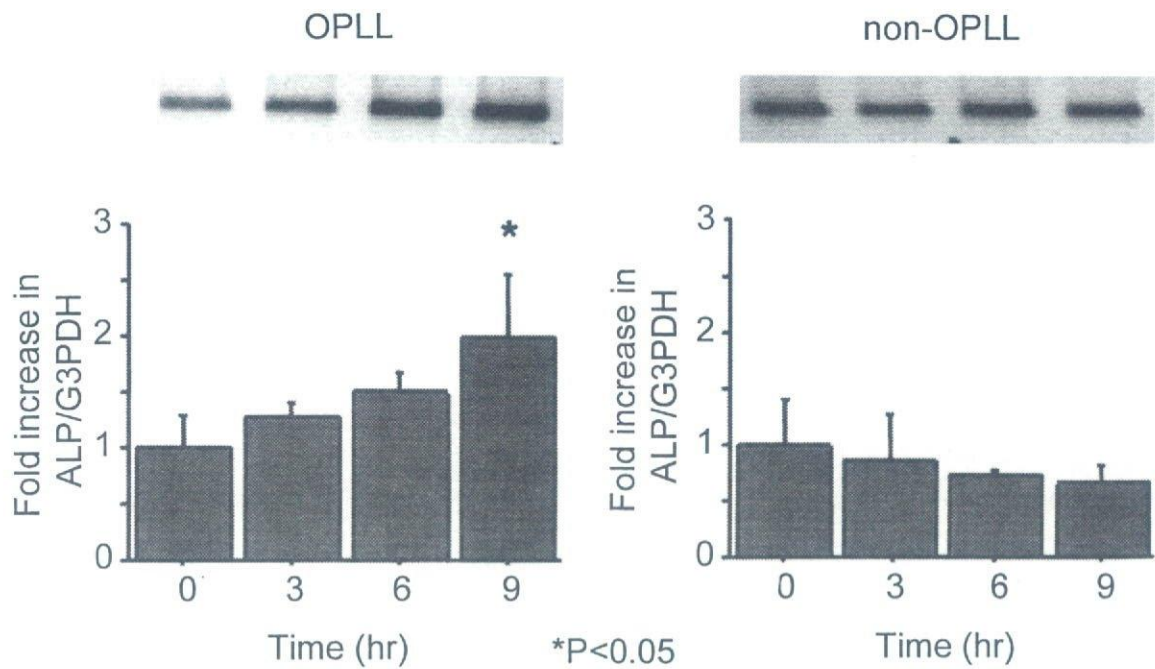


図5 dibutyl cyclic AMP添加によるmRNAの発現

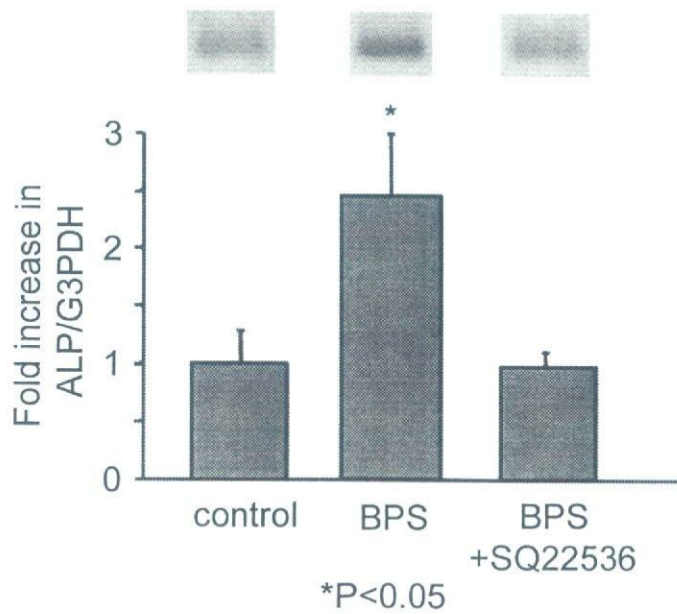


図6 SQ22536存在下でのベラプロスト添加によるALP mRNAの発現

臨床検体を用いた後縦靭帯骨化に関する遺伝子の検索

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
脊椎脊髄神経外科学	波呂 浩孝
脊椎脊髄神経外科学	四宮 謙一

要旨

近年のゲノム解析の進歩に伴い、後縦靭帯骨化の成因の遺伝子解析が進められてきている。今回、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。しかし、いわゆる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。ただし、発現差が大きく見られた遺伝子の中には、癌関連遺伝子や細胞接着因子などが多く含まれており、今後の検討において注目されるべき因子であろうと考えられた。

A. 研究目的

近年のゲノム解析の進歩に伴いヒトゲノムも解明され、様々な疾患の遺伝子解析が進められてきている。後縦靭帯骨化症（以下、OPLL）の遺伝子解析結果も報告されてきており、6番染色体短腕に存在するコラーゲン11A2(COL11A2)が OPLL の原因遺伝子の一つであるとわかってきている。また骨化靭帯の局所では、BMP-2、TGF-beta、IGF-1、CDMP-1、CTGF、PTHrP などの内軟骨性骨化に関わる因子の発現が確認されている。今回我々は OPLL 手術時に採取した臨床検体を用いて、DNA アレイでの検索を行い、OPLL 形成にどのような因子が関与しているかを調査した。

B. 研究方法

当大学にて頸椎 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により同意していただいた方の OPLL 病変を臨床検体として採取し、また黄色靭帯などで骨化していない部分をコントロールとして採取した。採取後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。OPLL 検体と非骨化靭帯検

体の両者から十分量で、かつ良い quality の RNA が採取できた症例の検体を用いて、DNA アレイによる検討を行った。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、1081 個のヒト既知遺伝子による Array Gauge を用いた解析を行った。

C. 研究結果

OPLL 検体において、BMP などの骨形成関連遺伝子の発現に顕著なものは見られなかった。

OPLL 検体と非骨化検体の発現シグナル強度が共に有意に強く、発現変動比を正確に計測できた遺伝子のうち、OPLL 検体で非骨化検体より 1.5 倍以上の強い発現を見せた遺伝子が 31 種類、逆に 1.5 倍以上減弱したものが 20 種類見つかった(Table 1)。これらの中には我々の注目していた COL11A2 や、BMP、TGF-beta などの骨形成関連遺伝子は含まれていなかった。

次いで、発現の変動が大きく見られた遺伝子には、どのような分類に含まれるものが多く認められるかを検討してみた。OPLL 検体と非骨化検体のいずれかの発現シグナル強度が高く、1.5

倍以上の発現比を持つと計測された 99 遺伝子のうち、oncogenes and tumor suppressors 分類に入るものが 12 種類あり、そのうち 11 種類は OPLL 検体で発現比が高いものであった(Table 2)。Growth factors, cytokines, and chemokines という分類、cell adhesion proteins という分類に当てはまる遺伝子がそれぞれ 11、7 種類ずつあり、これらは OPLL 検体で発現比が減少しているものがほとんどであった(Table 3, 4)。

D. 考察

後縦靭帯骨化の原因遺伝子の検索として、臨床検体での DNA アレイを用いた検討を行った。しかし、これまで原因遺伝子とされてきた、あるいは骨形成因子として注目されてきた遺伝子については、大きな発現を認めなかった。ただ、collagen VI alpha 2 subunit(COL6A2)遺伝子の発現増加が OPLL 検体で見られており、COL11A2 と同じく OPLL 形成に関与しているものかどうか今後の検討項目に挙げられるかもしれない。

また BMP、TGF-beta などいわゆる骨形成因子の顕著な発現は認めなかったものの、それらと同じく growth factors, cytokines, and chemokines に分類されている因子が、OPLL 検体で発現が減少しているものに多く含まれていた。同様に、細胞接着関連タンパクは発現が減少したものに多く、逆に、腫瘍形成因子/癌抑制遺伝子は、OPLL 検体で発現の増加したものに多く含まれていたことは興味深い点である。腫瘍形成因子と癌抑制遺伝子の発現が共に増加していることなど不明な点もあるが、今後 OPLL 形成のメカニズムを検討する上で、骨形成因子以外で注目すべき因子になりうるかもしれない。

本研究は、手術検体を用いたものであり、サンプルの品質の問題があったのかもしれないが、これまでの報告を裏付けるようなデータは得られなかった。しかし今回の結果をふまえ、先述の遺伝子の特徴をさらに調べていきたい。また、できるだけ多くの検体を集め、既存の骨形成関連遺伝子や、今回注目した遺伝子について引き続き DNA アレイによる研究を進めていきたいと考えている。

E. 結論

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が、これまで報告されている因子に注目すべき結果は認めなかった。しかし、大きな発現差を認めた遺伝子に多く認めた腫瘍関連因子などに今後注目してもよいかもしれない。

F. 健康危険情報

とくに無し

G. 研究発表

とくに無し

H. 知的財産権の出願、登録状況

とくに無し

Table 1

up比	down比	発現遺伝子
	2.4	small inducible cytokine subfamily A member 5 (SCYA5); regulated on activation normal T-cell-expressed & secreted protein (RANTES); T-cell specific protein p288 (TCP288)
	1.9	integrin alpha 6 (ITGA6); CD49F antigen; VLA6
	1.9	transferrin receptor (TFRC); CD71 antigen
	1.9	90-kDa heat-shock protein A (HSP90A); HSP86; HSPCA
	1.8	contactin (CNTN1); glycoprotein gp135
	1.8	opioid receptor mu 1 (OPRM1)
	1.7	keratin 9 (KRT9; KT9)
	1.7	platelet-derived growth factor receptor beta subunit (PDGFR-beta; PDGFRB); CD140B antigen
	1.6	VRK2
	1.6	CD9 antigen; leukocyte antigen MIC3
	1.6	casper, a FADD- and caspase-related inducer of apoptosis (CASH-alpha + CASH-beta); FLAME-1; FLICE-like inhibitory protein
	1.6	HIV-1 TATA element modulatory factor
	1.6	transcription factor ZFM1
	1.6	alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein (alpha-2-MRAP; A2MRAP); low-density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1 (LRPAP1)
	1.6	polycystin; autosomal dominant polycystic kidney disease protein 1 (PKD1)
	1.6	seven in absentia homolog
	1.6	oncostatin M (OSM)
	1.6	TRK-C; NT-3 growth factor receptor (TRKC tyrosine kinase) (GP145-TRKC)
	1.5	thymosin beta 10 (TMSB10; THYB10); PTMB10
	1.5	DNA damage repair & recombination protein 50 homolog (RAD50)
2.6		prostaglandin E2 receptor EP3 subtype (PTGER3); prostanoid EP3 receptor
2.6		T cell receptor variable region
2.3		Tel Ets-like protein
2.2		ras-related protein RAB5A
2.0		phospholipase C delta-1 (PLC-delta 1; PLCD1); PLC-III; 1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase delta 1
2.0		high mobility group protein isoforms I & Y (HMG1Y)
2.0		prothymosin alpha (PROT-alpha; PTMA)
2.0		ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (RAC2)
1.9		metastasis-associated protein 1 (MTA1)
1.9		transcription factor ETR101
1.9		diphtheria toxin receptor (DTR); heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HBEGF; HEGFL)
1.9		collagen VI alpha 2 subunit (COL6A2)
1.9		phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMTase); noradrenaline N-methyltransferase
1.8		Insulin receptor-related protein (IR-related receptor; IRR)
1.8		glutamate receptor subunit epsilon 2 (GRIN2); N-methyl D-aspartate receptor subtype 2B (NMDAR2B; NR2B)
1.7		nucleobindin 1 (NUCB1)
1.7		raf-responsive zinc finger protein
1.7		C-mos proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
1.6		phosphorylase B kinase gamma catalytic subunit testis isoform (PHK-gamma-T; PHKGT); PSK-C3
1.6		MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3)
1.6		tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP2); CSC-21K
1.6		adenylate cyclase VII; ATP pyrophosphate-lyase; adenylyl cyclase; KIAA0037
1.6		sodium- & chloride-dependent glycine transporter 1 (GLYT-1)
1.6		wingless-related MMTV integration site 13 protein (WNT13)
1.6		ADP-ribosylation factor 1 (ARF1)
1.5		neural retina-specific leucine zipper protein (NRL); D14S46E
1.5		CDC2-related protein kinase CHED
1.5		protein-tyrosine phosphatase zeta (R-PTP-zeta)
1.5		rhoHP1
1.5		neurogenic locus notch protein homolog 4 (NOTCH4)
1.5		protein tyrosine phosphatase receptor type F (PTPRF); leukocyte antigen-related protein (LAR); CD47 antigen; Rh-related antigen; integrin-associated protein (IAP); MER6

Table 2

発現比	up比	down比	Gene	Gene bank	分類
1.92	1.9		diphtheria toxin receptor (DTR); heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HBEGF; HEGFL)	M60278	FS02 SF00
1.64	UP		colony stimulating factor 3 (CSF3); granulocyte colony-stimulating factor (GCSF)	X03438	FS02 SF00
0.66		DOWN	small inducible cytokine subfamily B member 10 (SCYB10); interferon gamma-induced protein 10 (INP10; IP10)	X02530	FS02 SF00
0.65		1.5	thymosin beta 10 (TMSB10; THYB10); PTMB10	M92381	FS02 SF00
0.64		1.6	oncostatin M (OSM)	M27288	FS02 SF00
0.62		DOWN	interleukin 1 receptor antagonist protein (IL1RA; IRAP)	M63099	FS02 SF00 SC00
0.62		DOWN	hepatocyte growth factor-like protein; macrophage-stimulating protein (MSP)	M74178	FS02 SF00
0.57		DOWN	endothelial-monocyte activating polypeptide II (EMAP II)	U10117	FS02 SF00
0.55		DOWN	thrombopoietin (THPO); megakaryocyte colony stimulating factor; c-mpl ligand; megakaryocyte growth & development factor (MGDF)	L36052; L36051; U11025	FS02 SF00
0.42		2.4	small inducible cytokine subfamily A member 5 (SCYAS5); regulated on activation normal T-cell-expressed & secreted protein (RANTES); T-cell specific protein p288 (TCP288)	M21121	FS02 SF00
0.36		DOWN	semaphorin III/F (SEMA3F); semaphorin IV	U33920	FS01 FS02 SX00

FS02: growth factors, cytokines, chemokines

Table 3

発現比	down比	Gene	Gene bank	分類
0.63	1.6	polycystin; autosomal dominant polycystic kidney disease protein 1 (PKD1)	U24497	FD01 SB00
0.62	DOWN	beta 3-endonexin	U37139	FD01 SB00
0.61	DOWN	platelet glycoprotein IV (GPIV; PAS IV; PAS4); GPIIb; CD36 antigen	M24795	FA00 FR05 FV07 FD01 SB00
0.55	1.8	contactin (CNTN1); glycoprotein gp135	U07819	FD02 SB00
0.54	DOWN	integrin beta 1 (ITGB1); fibronectin receptor beta subunit (FNRB); very late antigen 4 beta subunit (VLA4); CD29 antigen	X07979	FD02 SB00
0.53	1.9	integrin alpha 6 (ITGA6); CD49F antigen; VLA6	X53586; X59512	FD02 SB00
0.52	DOWN	corneodesmosin (CDSN); S protein	L20815	FD03 SC00

FD: cell adhesion proteins

Table 4

発現比	up比	down比	Gene	Gene bank	分類
4.86	UP		IMP dehydrogenase 1	J05272	FL06 FC00 FG00 SC00
2.80	UP		putative oral tumor suppressor protein; DOC-1	AF006484	FG00 SC00 SN00
2.30	2.3		Tel Ets-like protein	U11732	FG00 FB03 SN00
1.97	2.0		ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (RAC2)	M64595; M29871	FG00 FT04 FL03 SC00 SB00
1.93	1.9		metastasis-associated protein 1 (MTA1)	U35113	FG00 FC00 SN00
1.92	UP		ras-related protein RAP-1A; C21KG; KREV-1 protein; GTP-binding protein SMG-p21A; G-22K	M22995	FT04 FG00 SC00
1.66	1.7		C-mos proto-oncogene serine/threonine-protein kinase	J00119	FG00 FT02 SC00
1.62	1.6		MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3)	M80359	FG00 FC02 FT02 SN00
1.60	UP		relA proto-oncogene; nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (NFKB3)	L19067	FB03 FT00 FG00 SN00 SC00
1.57	UP		gamma-interferon-inducible protein; IP-30	J03909	FG00 FU01 SL00
1.52	1.5		rhoHP1	D85815	FG00 FT04 FK04 SB00, SK00
1.52	1.5		neurogenic locus notch protein homolog 4 (NOTCH4)	U95299	FG00 FR01 FV07 SB00
0.64		DOWN	leukemia inhibitory factor (LIF); cholinergic differentiation factor (CDF)	X13967; M63420	FT10 FG00 SC00 SN00

FG00:oncogenes,tumor suppressors

脊柱靱帯骨化症に対するMDCTの有用性に関する研究

豊田耕一郎 田口敏彦 山口大学整形外科

研究要旨 MDCT を撮像した靱帯骨化症の画像所見について検討した。MDCT 矢状断像は断層像に匹敵し、今後は断層撮影は省略可能である。造影矢状断像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も良好であった。MDCT は靱帯骨化の画像診断に有用である。

A. 研究目的 従来のヘリカル CT は、X 線管球からでた X 線ビームが被写体を 1 回転して検出器で検出され画像化されるが、体軸方向である Z 軸方向には検出器が 1 チャンネルしかないため、2 次元再構成画像に関しては Z 軸方向の分解能が低下し、アーチファクトが多い欠点があった。その欠点を改良したのがヘリカル CT の第 2 世代ともいえる、Z 軸方向に複数の検出チャンネルを有するマルチスライス CT である。マルチスライス CT (以下 MDCT) の特徴として時間分解能、空間分解能が高く、短時間で広範囲撮像が可能で、薄い slice でも解像度は良好である。また従来のヘリカル CT では処理速度、解像度に難があった矢状断、冠状断といった任意の 2 次元の断面像も容易に描出が可能となった。スライス厚の変更もでき、3 次元画像も高画質である。今回私達は当院に今年の 7 月から導入された MDCT 矢状断像を用いて脊柱靱帯骨化症の有用性について検討した。

B. 研究方法

対象は 19 例 (男性 14 例、女性 5 例) で、平均年齢は 61 才である。内訳は頸椎 OPLL9 例、胸椎 OPLL、OLF6 例、腰椎 OPLL4 例である。

撮像機種は Siemens 社製 ZOMATOM Plus 4 / VOLUME ZOOM を用いた。撮像パラメータは コリメーション 1mm、テーブル移動速度 3mm / 1 回転/秒、スライス厚 1.25mm、管電圧 140kV、管電流 330mA であり、撮像時間は約 30-40 秒である。検討項目として MDCT 矢状断像での靱帯骨化描出能として、骨化範囲を断層像と比較し、最大脊柱管狭窄率 ((脊柱管前後径-骨化最大幅) × 100) / 脊柱管前後径) を断層像、MRIT2 強調矢状断像、ミエロ側面像との比較検討を行った。画像解析ソフトは Scion Image (Scion Corp., Maryland, USA) を用いて、3 回計測を行い平均値を用いた。統計解析ソフトは Stat View5. 0J を用い、相関分析を行った。また、機能写や手術前後での比較を行った。本研究は画像情報のみの検討であるため、倫理面は問題ないと判断した。

C. 研究結果 骨化範囲は MDCT 矢状断像と断層像とは全例一致した。この 2 者での最大脊柱管狭窄率の相関分析では $r=0.973$ と有意の非常に高い相関を認めた。最大脊柱管狭窄率は MDCT 矢状断像は平均 61.5% であり、断層像は平均 59.9% であった。またミエロ側面像では平均

58%、MRI 矢状断像は 60.3%とほぼ同様であったが MDCT 矢状断像と有意の相関はなかった。

D. 考察 MDCT は MRI に比べコントラスト分解能は落ちるが、従来のヘリカル CT より短時間で高い空間分解能の画像情報を取得することが可能である。それにもまして 2 次元矢状断、冠状断像が容易に得られることが術前情報としても有用と考える。被曝はあるものの撮像時間も短縮され、1mm スライスでも解像度は良好である。靭帯骨化描出能としては骨化の範囲、幅、脊柱管狭窄率は断層像に匹敵するが、造影剤併用にて硬膜の圧迫、硬膜骨化の状態も描出可能であった。今後 MDCT による矢状断、冠状断の併用により断層像は省略可能であり、靭帯骨化症の術前、術後の検査としては MRI と並んで有用であると考えられる。

E. 結論 1. MDCT を撮像した靭帯骨化症 19 例について検討した。2. MDCT 矢状断像は断層像に匹敵し、今後は断層撮影は省略可能である。3. 造影矢状断像は骨性要素に加えて椎間板や黄色靭帯による硬膜間、脊髄圧迫を明瞭に描出した。4. 術後の除圧状態の確認も良好であった。5. MDCT は靭帯骨化の画像診断に有用である。

F. 健康危険情報
特になし

G. 1. 論文発表

豊田耕一郎、田口敏彦、金子和生、他：マルチスライス CT の脊椎疾患における使用

経験. 整形外科と災害外科 50 巻 3 号
Page740-742、2001

豊田耕一郎、田口敏彦、金子和生、他：マルチスライス CT の脊椎靭帯骨化症に対する MDCT の有用性について、西日本脊椎研究会誌 28 巻 2 号 Page171-173、2002

2. 学会発表

豊田耕一郎、田口敏彦、金子和生、他：マルチスライス CT の脊椎疾患における使用経験. 西日本整災、2001

豊田耕一郎、田口敏彦、金子和生、他：マルチスライス CT の脊椎疾患における有用性について 日本整形外科学会、2002

豊田耕一郎、田口敏彦、金子和生、他：マルチスライス CT の脊椎靭帯骨化症に対する MDCT の有用性について、西日本脊椎研究会、2002

Mouse Genetics の手法を用いた脊椎骨形成の 発生生物学的解析

秋山 治彦 (京都大学大学院医学研究科 感覚運動系外科学講座,

Department of Molecular Genetics, The University of Texas M. D. Anderson Cancer)

Benoit de Crombrughe (*Department of Molecular Genetics, The University of Texas M. D. Anderson Cancer*)

Jonathan A. Epstein (*Cardiovascular Division, University of Pennsylvania*)

Andreas Schedl (*Institute of Human Genetics, University of Newcastle*)

中村 孝志 (京都大学大学院医学研究科 感覚運動系外科学講座)

【研究要旨】

近年、脊椎骨発生の機序に関する研究が数多くなされ、細胞系譜の解析、様々な分泌タンパク質の関与とそれらのシグナル伝達系の解析、および遺伝子群の転写調節機構が徐々に解明されてきている。我々は以前より内軟骨性骨化の機序解明を主研究として続けてきており、転写因子 Sox9 が内軟骨性骨化に不可欠であることを見出した。今回、我々は 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失させ脊椎骨の形態的变化を観察した。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。

A. 研究目的

我々の骨格を構成している骨の 95%以上は軟骨を介して形成される内軟骨性骨化の過程を経る。内軟骨性骨化は未分化間充織細胞の凝集から始まる。凝集した細胞は増殖を一時的に停止し軟骨細胞へ分化する。分化した軟骨細胞は増殖を続けつつ細胞外基質を分泌し成長軟骨帯を形成する。増殖軟骨細胞は肥大化軟骨へと成熟、分化し、基質の石灰化の後、骨組織に置換される。脊椎骨では、体節から分化した硬節の未分化間充織細胞が脊椎骨形成部に移動した後、凝集し軟骨に分化する。Sox9 は HMGDNA 結合部位をもつ転写因子である。Sox9 は軟骨形成過程において、全ての軟骨前駆細胞と全ての分化した軟骨細胞に発現しており、その発現は軟骨細胞の肥大化に伴い消失する。ヒトの Sox9 遺伝子の異常は軟骨低形成と性分化異常を特徴に持つ campomelic dysplasia の原因となる。近年の我々は mouse genetics の手法を用いて作成した Sox9 遺伝子変異キメラマウスおよび、Cre/loxP recombination system を用いて Sox9 遺伝子を胚芽未分化間充織細胞凝集前および後に欠失させたコンディショナルノックアウトマウスの解析より、Sox9 は一連の軟骨分化の全ての過程に必須であることを見出した。本研究では Sox9 が脊椎骨形成においても必須であるかどうかを検討した。

B. 研究方法

はじめに Sox9 遺伝子の第 1 イントロンと 3'-

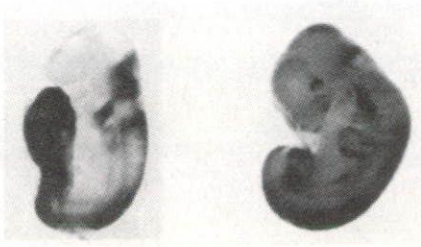
flanking region に loxP site を導入した target vector を作成し、ES 細胞内で相同組み換えを引き起こした。この ES 細胞を blastocyst に注入しキメラマウスを作成後、交配により Sox9 floxed allele を有するマウスを得た。次に 1.6KbPax3 プロモーターに Cre recombinase cDNA をつないだ transgene を pronuclear injection しトランスジェニックマウスを作成した。このトランスジェニックマウスと Sox9 floxed allele を有するマウスを交配させ、コンディショナルヘテロマウスを作成した後、さらに Sox9 floxed allele を有するマウスを交配させコンディショナルノックアウトマウスを作成した。マウス胎児を skeletal preparation および組織学的手法によって検索した。

C. 研究結果

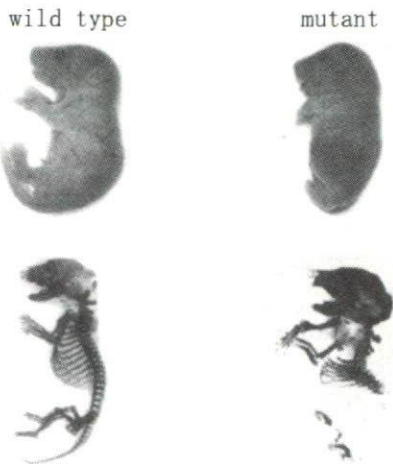
1) 作成した Pax3-Cre トランスジェニックマウスの Cre recombinase の発現を ROSA26 リポーターマウスを用いて解析した。それぞれのマウスを交配した後、胎生 9.5、11.5、13.5 日で胎児を摘出し whole mount X-gal 染色にて発現パターンを調べたところ、神経堤細胞が主として染色されており、さらに肋骨形成部の一部、および下位体節が染色されていた。

E9.5

E11.5



2) Pax3-Cre トランスジェニックマウスとの交配によって作成した Sox9 コンディショナルノックアウトマウスは体幹が非常に短く、死産であった。Skeletal preparation では下位胸椎および腰椎が完全に欠損しており、肋骨の著しい低形成も認められた。組織学的検索では、腰椎部では Alcian blue 陽性の軟骨組織はほぼ欠失していた。



D. 考察

近年我々は、Sox9 がマウス胎児の肢芽骨格形成において軟骨発生および分化の全ての段階で必須の機能を果たしていることを報告した。Sox9 を未分化間充織細胞凝集前に欠失させた場合、未分化間充織細胞は軟骨前駆細胞に specify されるにも関わらず、間充織細胞凝集が起こらず、軟骨細胞に分化することができなかった。本研究では Pax3-Cre transgene は主に神経堤に発現しているものの、中位、下位体節にも発現しているため、Sox9 遺伝子がそれら体節で欠失したと考えられる。体節から形成される硬節には Cre recombinase の発現がみられないことから、Sox9 遺伝子は体節で欠失したのではないかと推察される。

本研究からも体軸骨格形成においても Sox9 は必須の転写因子であり、内軟骨性骨形成を制御していることがあきらかとなった。すなわちパターン形成になう転写因子群の下流、または並列で、分化制御

因子である Sox9 が未分化細胞から軟骨前駆細胞への細胞の specification を担っているものと思われる。

今後、このコンディショナルノックアウトマウスの詳細な解析で体軸骨格形成におけるシグナル系と転写制御機構の詳細が解明されると思われる。

E. 結論

Pax3-Cre transgene を用いて作成した Sox9 コンディショナルノックアウトマウスの解析により、体軸骨格形成に Sox9 が必須であることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Akiyama H., M.C. Chaboissier, J.F. Martin, A. Schedl, and B. de Crombrughe. 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev* 2002 Nov1;16(21):2813-28

2. 学会発表

1) H. Akiyama, M.C. Chaboissier, J.F. Martin, R.R. Behringer, D.H. Rowitch, J.A. Epstein, A. Schedl, and B. de Crombrughe. THE TRANSCRIPTION FACTOR SOX9 HAS ESSENTIAL ROLES IN SUCCESSIVE STEPS OF THE CHONDROCYTE DIFFERENTIATION PATHWAY AND IN ENDOCARDIAL CUSHION, NEURAL CREST, AND NOTOCHORDAL DEVELOPMENT. Cold Spring Harbor Laboratory, Mouse Molecular Genetics, Cold Spring Harbor, New York, USA, August, 2002

2) H. Akiyama, M.C. Chaboissier, J.F. Martin, A. Schedl, and B. de Crombrughe. The Transcription Factor Sox9 Has Essential Roles in Successive Steps of the Chondrocyte Differentiation Pathway and Is Required for Expression of Sox5 and Sox6. The American Society for Bone and Mineral Research 24th Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA, September, 2002

3) H. Akiyama, M.C. Chaboissier, J.F. Martin, R.R. Behringer, A. Schedl, and B. de Crombrughe. Multiple roles of Sox9 During Chondrogenesis. 1st Wittgenstein Conference: Genetics and Molecular Biology of Skeletal Development. Palazzo Ducale, Lucca, Italy, October, 2002

4) H. Akiyama, M.C. Chaboissier, J.F. Martin, R.R. Behringer, D.H. Rowitch, J.A. Epstein, A. Schedl, and B. de Crombrughe. THE TRANSCRIPTION FACTOR SOX9 HAS ESSENTIAL ROLES

IN SUCCESSIVE STEPS OF THE CHONDROCYTE
DIFFERENTIATION PATHWAY AND IN ENDOCARDIAL
CUSHION, NEURAL CREST, AND NOTOCHORDAL
DEVELOPMENT. The first meeting: The American
Society for Matrix Biology. Houston, Texas,
USA, November, 2002