

## 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

橋本将行 (千葉大学医学部整形外科) 国府田正雄 (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) 山崎正志 (千葉大学医学部整形外科)  
守屋秀繁 (千葉大学医学部整形外科)

KEYWORDS=astrocyte, microglia, osteopontin, spinal cord injury

### 【研究要旨】

[ 目的 ] Osteopontin は非コラーゲン性細胞外基質タンパクの一つであり、様々な組織においてその発現が報告されている一方脊髄における osteopontin の発現の報告はない。本研究の目的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することである。[ 結果 ] Northern blot にて osteopontin mRNA は脊髄損傷後 3 日において正常脊髄の 7 倍であり、In situ hybridization における osteopontin の発現のピークと同様であった。Osteopontin タンパクは細胞質に 12 時間から発現がみられ 3 日にピークを迎えており、発現形態、ピーク時間を考慮すると osteopontin 発現細胞は microglia であった。また 7 日になると細胞外基質においても発現がみられ、蛍光免疫三重染色の結果より osteopontin が astrocyte の集ぞくに関して影響を及ぼしていることが推察できた。[ 結論 ] ラット脊髄損傷における osteopontin の発現を調べ、mRNA とタンパクが脊髄損傷後 3 日において増加することがわかった。また osteopontin の発現が炎症反応の進展と関連があることがわかった。

### A. 研究目的

Osteopontin は細胞外マトリックスを構成するリン酸タンパクとして

1986 年にラットの骨肉腫組織より単離された<sup>17)</sup>。

その後に骨基質、腎臓、胎盤、血管などさまざまな組織において osteopontin の発現が報告されている<sup>13,25,16,8)</sup>。中枢神経系における発現の報告は中大脳動脈梗塞モデルにおいてされており、正常脳組織における発現はごくわずかであるが、梗塞部大脳皮質の microglia または macrophages において数倍程度の発現の増加がみられる<sup>6,23)</sup>。

梗塞部 microglia/ macrophages に発現した

osteopontin は梗塞部へ macrophages や astrocytes を遊走させ<sup>23)</sup>、osteopontin の Arg-Gly-Asp-Ser (RGD)-containing binding site を介して、macrophages や astrocytes 細胞膜上にある integrin  $\alpha\beta3$  と反応する<sup>6)</sup>。In vivo の系において osteopontin の新生と osteopontin と astrocyte の integrin  $\alpha\beta3$  を介した反応は脳組織における損傷の治癒を促進する<sup>6)</sup>といわれている。

正常脳において microglia は静止状態にあり、短い process をもっている状態 (Ramified microglia) であり、損傷をうけると損傷近接部 microglia は円形細胞となり



(ameboid phagocytic cells) 損傷部の組織の貪食を行う<sup>12)</sup>。脊髄損傷においても同様であり、脊髄損傷後 24 時間で microglia または macrophages が円形の貪食細胞様の形態に変化する<sup>2)</sup>。

脳梗塞モデルと脊髄損傷には類似点が多くみられるが、いくらかの違いが存在する。脳梗塞モデルが局所の虚血が主な原因であるのに対して、脊髄損傷モデルにおけるもっとも顕著な組織変化は血管の破断による出血であり、血流に乗った macrophage が損傷部に集ぞくし、microglia が辺縁部より集族する<sup>7)</sup>。Schnell らは炎症反応そのものは脳においてより、脊髄においてのほうが激しいという報告をしており<sup>20)</sup>、これらの病理学的違いが osteopontin 発現に対してどのような違いを生じ得るものか、今回我々はラット脊髄損傷モデルを用いて検討したので報告する。

## B. 方法

### 脊髄損傷モデル

Wister ラット、8 週齢オスを 1.2% halothane にて深麻酔し、T8-9 を椎弓切除、30g rod を用いて 5 分間圧迫した<sup>9,11)</sup>。用手排尿を 1 日 2 回施行、動物の取り扱いには千葉大学実験動物取り扱い規約に従った。ラットは 12 時間、24 時間、3 日、7 日、14 日にて屠殺し、total RNA の抽出<sup>10)</sup>とパラフィン切片の作製を行った<sup>9,11)</sup>。

### Northern blot analysis

Total RNA samples (10 µg/lane) をフォルムアミド含有アガロースゲルに電気泳動

し Hybond XL membranes (Amersham Biosciences) に転写 osteopontin cDNA (大阪大学、野村慎太郎先生より提供) は Readiprime random-priming DNA labeling kit (Amersham) を用いて [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3000 Ci/mmol) をラベルして使用した。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションは ExpressHyb solution (Clontech) にて 68 度 1 時間行った。メンブレン上のシグナルは Hyperfilms (Amersham) に転写した。各バンドの量比は NIH Image analysis software を使用して解析した。

### In situ hybridization

osteopontin cDNA (nt 259 to 1025) を含む pCR II plasmids (Invitrogen) を制限酵素 BamHI と XbaI にて直線状にし、Antisense と sense RNA probes を DIG RNA labeling mixture (Roche Diagnostics) と SP6 または T7 RNA polymerase (Takara) を用いて in vitro transcription にて作製した。In situ hybridization は<sup>9,10)</sup>に準じて行った。

### 免疫染色及び Tomato-lectin 組織染色

Osteopontin 免疫染色は抗原性を高めるため 0.4% pepsin in 0.01 N HCl にて 37 °C、20 分間、tomato-lectin 組織染色は 50 mM citrate buffer (7.2 mM citric acid and 42.8 mM sodium citrate) を 90 °C、10 分間浸水した後施行した。全ての染色の前に内因性ペルオキシダーゼのブロッキングに 3% 過酸化水素を使用した。抗体は anti-mouse osteopontin rabbit antibody (1:100; LSL)、anti-APC (Ab7/CC-1; 1:400; Oncogene Research Products)、anti-neuronal nuclei (NeuN; 1:100; Chemicon International) と anti-mouse glial fibrillary acidic protein (GFAP;

1:400; Sigma) を使用した。

Tomato-lectin 組織染色には 0.02 mg/ml biotinylated tomato-lectin (Sigma) を使用した。

### 蛍光免疫二重染色、蛍光免疫三重染色

Osteopontin と microglia の二重染色において、抗 osteopontin 抗体、tomato-lectin 組織染色の後 Alexa Fluor 350-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Molecular Probes) と Texas Red-conjugated avidin D (Vector Laboratories) にて蛍光二重染色を行った。

Osteopontin と microglia と astrocyte の三重染色においては上記に Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Molecular Probes) を追加した。

### Tomato-lectin positive activated microglia 数カウント

活性型 microglia は非活性型 microglia と小型円形状をとっていることから区別でき、Tomato-lectin 陽性活性型 microglia を損傷中心部の前、後、側索の 3 エリアについてカウントした( $n=3$ )。

### 統計学的検討

Northern blot analysis と tomato-lectin positive microglia についてグループ間の差違は Fisher's PLSD test により検定し、有意水準は Northern blot analysis で  $p<0.05$ 、細胞カウントでは  $p<0.01$  を有意差ありとした。

## C. 結果

### Northern blot analysis

Fig. 1A のごとく低レベルの osteopontin 発現は正常脊髄にて観察され、24 時間か

ら発現が上昇し 3 日に最大となり、Fig. 1B のごとく正常脊髄の 7 倍であった( $p<0.05$ )。

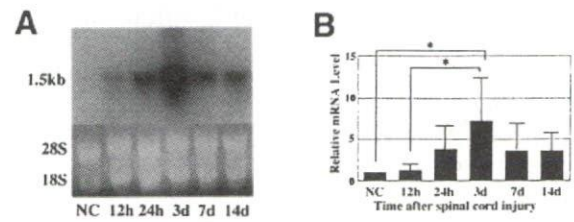


FIG. 1. A, Osteopontin mRNA の Northern blot B, A のバンドの定量的解析 ( $n=5$ )、Y 軸は NC との比をあらわす  $*p<0.05$ 。

### In situ hybridization of osteopontin

正常脊髄において発現はごくわずかであり(Fig. 3A)、24 時間より後索、後角に発現がみられ、3 日でピークをむかえた。osteopontin 陽性細胞は小型円形細胞であり、主に脊髄背側損傷部と脊髄周囲に発現がみられた(Figs. 2A, B, 3C)。3 日後シグナルは減少した。

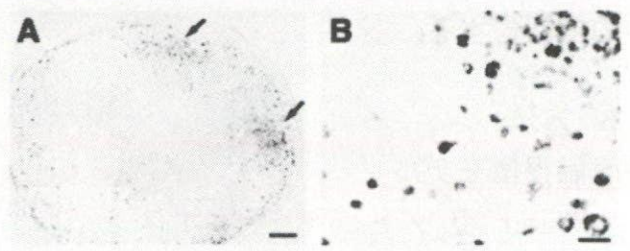
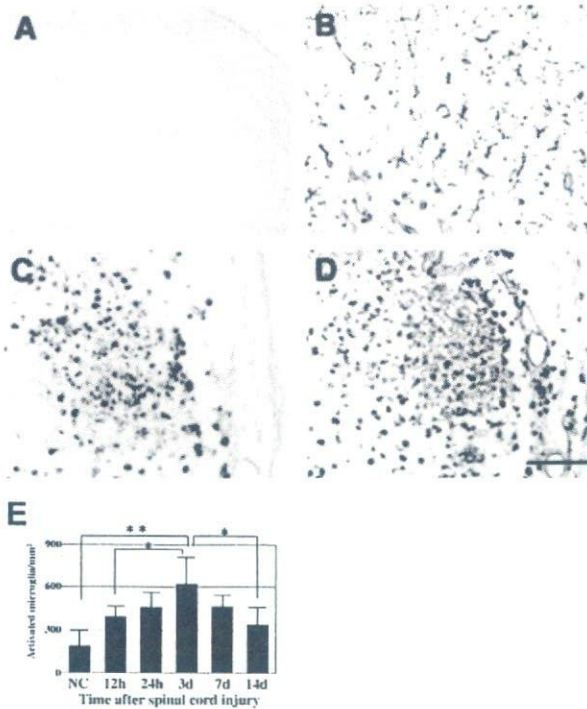


FIG. 2. A, 脊髄損傷後 3 日における In situ hybridization 像。Osteopontin mRNA は後索、側索、脊髄周囲に発現がみられた (arrows)。B, A の強拡大像。Osteopontin は小型円形細胞に発現していた。Scale bars = 200  $\mu\text{m}$  for A; 20  $\mu\text{m}$  for B.

Osteopontin 発現細胞を同定するために microglia のマーカーである tomato-lectin 組織染色を試みた。正常脊髄において



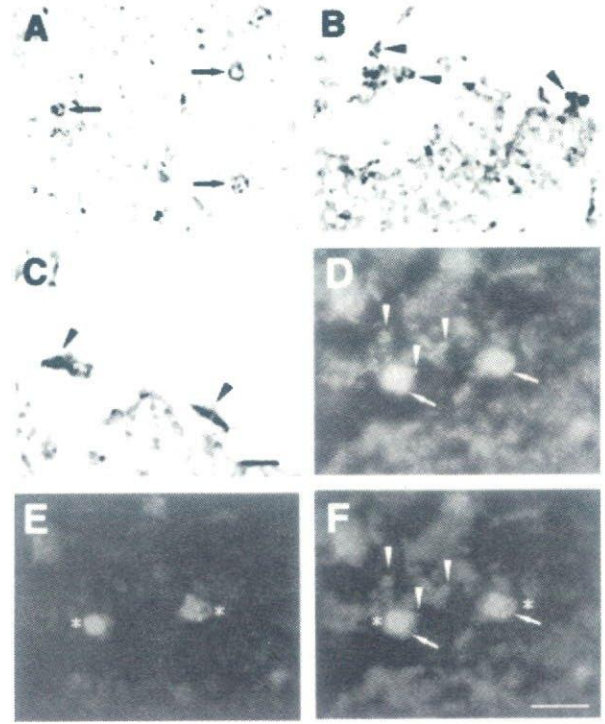
microglia は静止型である ramified form をとっており、側索中心にびまん性



**FIG. 3.** NC において osteopontin mRNA はごくわずかであり(A)、osteopontin mRNA は脊髄損傷後 3 日に急増していた(C)。NC における Tomato-lectin 陽性 microglia は ramified form をとり(B)、脊髄損傷後 3 日の ameboid form (D)と区別できた。脊髄損傷後 3 日における osteopontin mRNA 発現細胞(C)は ameboid form をした Tomato-lectin 陽性 microglia(D)に類似していた。Scale bar = 100  $\mu$ m. 各タイムコースにおける tomato lectin 陽性、ameboid microglia 数 (E) \* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ .

に分布していた(Fig. 3B)。損傷後は microglia は小型円形状の活性型である ameboid form をとっており、数も増大し 3 日でピークを

迎えていた(Fig. 3D, E)。Osteopontin mRNA の分布は連続切片において部分的に tomato-lectin 組織染色と類似しており(Fig. 3C, D)、活性型 microglia 数のピーク時間が osteopontin mRNA 発現のピークと一致していた (Figs. 1A, B, 3E)。これらのデータより osteopontin 発現細胞は活性型 microglia であったが全ての tomato-lectin 陽性 microglia が osteopontin mRNA を発現しているわけではなかった。また Osteopontin mRNA 発現はアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ニューロンのマーカーである GFAP、APC、NeuN とは一致しなかった。



**FIG. 4.** 脊髄損傷後 3 日(A)、7 日(B)、14 日(C)における osteopontin 免疫染色。D-F は蛍光免疫二重染色。D は osteopontin、E は tomato-lectin 陽性 microglia、F は D と E の融合像。Scale bar = 20  $\mu$ m.

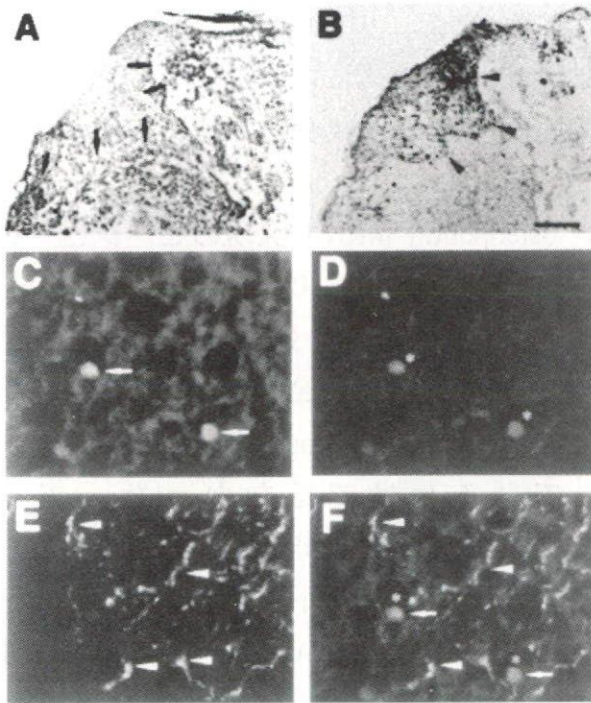


FIG. 5. A は osteopontin、B は GFAP による脊髄損傷後 3 日の免疫染色、Osteopontin (A, arrows) は GFAP 陽性 astrocytes (B, arrowheads) に囲まれている。C-F は osteopontin (C) と tomato lectin binding (D) と GFAP (E) による蛍光免疫三重三色。F は CDE の融合像を示す。Scale bars = 200  $\mu$ m for A and B; 20  $\mu$ m for C, D, E and F.

#### Osteopontin 免疫染色

正常脊髄においてごくわずかに osteopontin の局在がみられるのみだったが、12 時間後より発現が増大し、3 日後には損傷部周囲の小型円形細胞周囲に発現がみられ、発現量も最大であった (Fig. 4A)。7 日後には細胞外基質にも発現がみられ、14 日後には空洞周囲を縁取るように局在していた (Fig. 4C)。

蛍光二重染色、3 日において osteopontin は tomato-lectin 陽性活性型 microglia と (Fig. 4D, E, F; arrows and asterisks)、細胞外基質にも局在しており (Fig. 4D, F; arrowheads)、in situ hybridization のデータと一致した。一方 GFAP 陽性 astrocytes は 7 日においては osteopontin 発現 microglia を取り囲むように局在していた (Fig. 5A, B)。GFAP と tomato-lectin、osteopontin による三重染色において Osteopontin は 3 日において tomato-lectin 陽性 microglia に局在しており (Fig. 5C, D, F; arrows and asterisks)。GFAP 陽性 astrocyte は osteopontin 陽性 microglia を取り囲むように局在していた。Osteopontin と GFAP は一致しなかった (Fig. 5C, E, F; arrows and arrowheads)。また APC や NeuN と一致像は得られなかった。

#### D. 考察

##### 脊髄損傷モデルにおける osteopontin の発現と脳梗塞モデルとの比較

Ellison, Wang らによるとラット正常脳組織において osteopontin の発現はごくわずかであり、脳梗塞モデルにおいては発現が増大し 5 日でピークを迎える<sup>6,23)</sup>。今回のモデルにおいては osteopontin mRNA は 24 時間から増加し、protein とともに 3 日でピークをむかえた。osteopontin mRNA 発現細胞は活性型 microglia であり主に脊髄白質に分布していた。

Osteopontin mRNA 発現のピーク時間が、脳梗塞モデルより脊髄損傷モデルが先んじ



ていた理由を次のように考察した。Schnellらは大脳皮質と比べて脊髄における炎症反応の進展は早くて強いと報告している<sup>20)</sup>。急性期脊髄損傷における炎症反応の進展の一つとして6時間後にNeutrophilの組織浸潤がおき、24時間後まで炎症部位に停滞する<sup>2)</sup>。本研究においても炎症細胞の浸潤は脊髄背側に6時間においてみられ、白質の空胞化をともなっていた。組織は激しく損傷を受け、edemaを伴う組織に血管は拡張し、一部破綻し血球の浸潤がみられるが、この時期におけるosteopontin発現はまだみられなかった。一方脳梗塞モデルにおいて炎症反応の進展は緩徐でありNeutrophilの組織浸潤は梗塞部に1日以降みられ、組織の空胞化も1日以降にみられる<sup>3)</sup>。

炎症細胞の第2波としてmicrogliaとmacrophageが組織に浸潤する。脊髄損傷モデルにおいては損傷後1日よりmicrogliaとmacrophageの浸潤がはじまり<sup>2)</sup>、われわれの結果ではosteopontinの発現とともに3日でピークをむかえる。一方の脳梗塞モデルにおいては3日においてはまだNeutrophilの発現が残り、macrophageはまばらにみられるのみであり、5日になってはじめてその数がNeutrophilより多くなる<sup>3,4)</sup>。

総括するとosteopontin発現の増加は活性型microgliaまたはmacrophageの増加と一致しており、これは本研究及び、脳梗塞モデルに共通である<sup>23)</sup>。Osteopontin発現は炎症反応の範囲、強さと関係しており、脳梗塞モデルと脊髄損傷モデルのosteopontin発

現のピーク時間の違いは炎症反応の進展過程の違いにあると思われた。

#### 脊髄損傷におけるOsteopontin発現細胞

Osteopontin mRNAを発現している活性型microgliaは白質、後角背側部、脊髄周囲に多くみられ、灰白質、脊髄中心部にはごくわずかの発現しかみられなかった。これらの2種類のmicrogliaは小型円形、ameboid formをとっており活性型であった。Osteopontin発現microgliaが主に白質に存在する訳ははっきりしないが、脱髄との関係があると思われた。遅発性脱髄は多くは脊髄損傷後2から7日の間におこり、これらはmacrophageの過密な浸出と同期する<sup>1)</sup>。ミエリンの残骸がosteopontin発現を刺激する可能性が示唆された。

脳梗塞モデルにおいて、全てのmicrogliaやmacrophageがosteopontinを発現しているわけではなく<sup>6,23)</sup>、本研究においても同様の結果が得られた。活性型microgliaにosteopontin mRNAが発現するには何かしらのトリガーが必要とされると推察された。

#### 脊髄損傷におけるOsteopontinの役割

Osteopontinノックアウトマウスは一般的には通常の発育をして、寿命を全うするといわれている一方、その詳細な研究により細胞傷害、感染に際しosteopontinは抗炎症作用に重要な役割を示すことがわかっている<sup>5,19)</sup>。すなわちOsteopontinは創傷治癒を促進し、感染の封じ込めを行う<sup>5)</sup>。

本研究においてosteopontinタンパクは3日において細胞質に7日において細胞外基質に局在がみられた。脳梗塞モデルにおい



て osteopontin は、はじめに核周囲のゴルジ体に局在し<sup>23)</sup>、5 日程度たってから後細胞外基質に局在する<sup>6)</sup>。McKee and Nanci らは分泌された osteopontin が opsonin として macrophage が歯や関連する軟部組織に接着するのを<sup>14)</sup>、Reinholt らは osteoclast が骨に接着する際にアンカーとして<sup>18)</sup>、Weintraub らは血管平滑筋細胞がコラーゲンゲルに接着するのを補助すると報告している<sup>24)</sup>。細胞外基質に分泌された Osteopontin は接着物質として microglia の phagocytosis に関与するのではないかと思われた。

Osteopontin は炎症反応の過程において、細胞走化性をもつといわれる。Osteopontin と反応している macrophage はその生理的活性を変え血管外にでてくる<sup>22)</sup>。トロンビン接着性の osteopontin は *in vitro* において内皮細胞走化の刺激に対してより大きな反応を示す<sup>21)</sup>。Osteopontin は平滑筋細胞の走化性を基準値の 29 倍にまで高める<sup>26)</sup>。中枢神経系においては *in vitro* の系で osteopontin が astrocytes に対して細胞走化性をもつという結果がでている<sup>23)</sup>。本研究の蛍光免疫三重染色においても osteopontin 陽性領域が astrocyte に取り囲まれるような像が得られ、osteopontin の astrocyte に対する影響が示唆された。グリア瘢痕のなかの活性型 astrocyte は軸索再生を阻害するような物質を分泌するといわれており<sup>15)</sup>、もし osteopontin がその細胞走化性によりグリア瘢痕形成に関与しているとすると osteopontin の制御により、瘢痕形

成を抑制し、軸索再生を促進する可能性が示唆された。

## E. 結論

ラット脊髄損傷モデルにおける osteopontin 発現について調べた。Osteopontin は mRNA、タンパクとも 3 日における発現が最大であり、それらは活性型 microglia に発現し一部は細胞外基質に局在していた。

活性型 microglia から分泌された osteopontin は astrocyte の走化に関係しているものと思われた。

## [参考文献]

- 1) Blight A R (1985) Delayed demyelination and macrophage invasion: a candidate for secondary cell damage in spinal cord injury. **Cent Nerv Syst Trauma** 2: 299-315.
- 2) Carlson S L, Parish M E, Springer J E, et al. (1998) Acute inflammatory response in spinal cord following impact injury. **Exp Neurol** 151: 77-88.
- 3) Clark R K, Lee E V, Fish C J, et al. (1994a) Development of tissue damage, inflammation and resolution following stroke: an immunohistochemical and quantitative planimetric study. **Brain Res Bull** 31: 565-572.
- 4) Clark R K, Lee E V, White R F, et al. (1994b) Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue. **Brain Res Bull** 35: 387-392.
- 5) Denhardt D T, Noda M, O'Regan A W, et al. (2001) Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. **J Clin Invest** 107: 1055-1061.
- 6) Ellison J A, Velier J J, Spera P (1998) Osteopontin and its integrin receptor  $\alpha\beta 3$  are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. **Stroke** 29: 1698-1707.



- 7) Fawcett J W and Asher R A (1999) The glial scar and central nervous system repair. **Brain Res Bull 49**: 377-391.
- 8) Giachelli C, Bae N, Lombardi D, et al. (1991) Molecular cloning and characterization of 2B7, a rat mRNA which distinguishes smooth muscle cell phenotypes in vitro and is identical to osteopontin (secreted phosphoprotein 1, 2aR). **Biochem Biophys Res Commun 177**: 867-873.
- 9) Ikeda O, Murakami M, Ino H, et al. (2001) Acute up-regulation of brain-derived neurotrophic factor expression resulting from experimentally induced injury in the rat spinal cord. **Acta Neuropathol 100**: 69-74.
- 10) Ikada 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.
- 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 19**: 777-785.
- 12) Lehrmann E, Christensen T, Zimmer J, et al. (1997) Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. **J Comp Neurol 386**: 461-476.
- 13) Mark M P, Prince C W, Gay S, et al. (1987) A comparative immunocytochemical study on the subcellular distributions of 44KDa bone phosphoprotein and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein in osteoblasts. **J Bone Miner Res 2**: 337-346.
- 14) McKee M D and Nanci A (1996) Secretion of osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues : a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. **Anat Rec 245**: 394-409.
- 15) McKeon R J, Schreiber R C, Rudge J S, et al. (1991) Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. **J Neurosci 11**: 3398-3411.
- 16) Nomura S, Willis A J, Edwards D R, et al. (1988) Developmental expression of 2ar (osteopontin) and SPARK (osteonectin) RNA as revealed by in situ hybridization. **J Cell Biol 106**: 441-450.
- 17) Oldberg A, Franzen A and Heinegard D (1986) Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. **Proc Natl Acad Sci USA 83**: 8819-8823.
- 18) Reinholt F P, Hultenby K, Oldberg A, et al. (1990) Osteopontin-a possible anchor of osteoclasts to bone. **Proc Natl Acad Sci USA 87**: 4473-4475.
- 19) Rittling S R, and Denhardt D T (1997) Osteopontin function in pathology: lessons from osteopontin-deficient mice. **Exp Nephrol 7**: 103- 113.
- 20) Schnell L, Fearn S, Klassen H, et al. (1999) Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS : differences between brain and spinal cord. **Eur J Neurosci 11**: 3684-3658.
- 21) Senger D R, Ledbetter S R and Claffey K P (1996) Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the  $\alpha v \beta 3$  integrin osteopontin, and thrombin. **Am J Pathol 149**: 293-305.
- 22) Singh R P, Patarca R, Schwartz J, et al. (1990) Definition of a specific interaction between the early T lymphocyte activation 1 (*Eta-1*) protein and murine macrophages in vitro and its effect upon macrophages in vivo. **J Exp Med 171**: 1931-1942.
- 23) Wang X K, Loudon C, Yue T L, et al. (1998) Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. **J Neurosci 18**: 2075-2083.
- 24) Weintraub A S, Giachelli C M, Krauss R S,



et al. (1996) Autocrine secretion of osteopontin by vascular smooth muscle cells regulates their adhesion to collagen gels. **Am J Pathol** **149**: 259-272.

25) Yoon K, Buenaga R and Rodan G A (1987) Tissue specificity and developmental expression of rat osteopontin. **Biochem Biophys Res Commun** **148**: 1129-1136.

26) Yue T L, McKenna P J, Ohlstein E H, et al. (1994) Osteopontin-stimulated vascular smooth muscle cell migration is mediated by  $\beta$ 3 integrin. **Exp Cell Res** **214**: 459-464.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### **Upregulation of Osteopontin Expression in Rat Spinal Cord Microglia After Traumatic Injury**

MASAYUKI HASHIMOTO, MASAO KODA, HIDETOSHI INO, MASAZUMI MURAKAMI, MASASHI YAMAZAKI, and HIDESHIGE MORIYA

J Neurotrauma (2003)

Volume20, issue3, p287- 296

### 2. 学会発表

ラット脊髄損傷モデルにおける Osteopontin の発現

橋本将行、国府田正雄、村上正純、山崎正志、守屋秀繁（千葉大学医学部整形外科）

日本整形外科学会基礎学術集会(2001)



# 損傷脊髄の修復促進を目的とした造血幹細胞分画移植

腰塚周平(千葉大学医学部整形外科)、国府田正雄(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)、  
大河昭彦(千葉大学医学部整形外科)、岡田誠治(熊本大学エイズ学研究センター)、  
山崎正志(千葉大学医学部整形外科)、守屋秀繁(千葉大学医学部整形外科)、

KEY WORDS= bone marrow, hematopoietic stem cell, spinal cord injury

## 【研究要旨】

[目的]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すること。[方法]受傷後1週の成マウス脊髄損傷部に造血幹細胞分画を移植した。移植後5週までの行動評価をおこない、Y in situ hybridizationにて移植細胞の生着を、二重免疫染色にて移植細胞の分化を評価した。[結果]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。[結論]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。

### A. 研究目的

幹細胞とは、自己複製能と多分可能を併せもつた細胞であり、様々な臓器に存在している。近年、幹細胞を用いた再生医療が注目されており、脊髄損傷治療の研究においては、胚性幹細胞<sup>(13)</sup>、神経前駆細胞<sup>(15)</sup>を用いた研究が報告されている。我々は脊髄損傷治療の移植材料として、骨髄由来の組織幹細胞である造血幹細胞に注目した。造血幹細胞は骨髄移植として白血病など血液疾患の治療に広く用いられているが、近年、放射線照射後に移植した造血幹細胞が、骨格筋、肝細胞、血管内皮細胞、心筋細胞に分化したという報告<sup>(6, 12, 18)</sup>が相次いでなされた。さらに、骨髄移植後に骨髄由来の細胞が胚葉をこえてアストロサイト、ニューロンなどの外胚葉由来神経組織に分化したという報告もされている<sup>(2, 4, 14)</sup>。

今回我々は造血幹細胞の中樞神経再生のための移植細胞としての可能性に注目し、造血幹細胞移植を試みた。本研究の目的は、マウス脊髄損傷モデルに対し純化した造血幹細胞分画を移植し、その効果について検討することである。

### B. 方法

マウス脊髄不全損傷モデル 対象には雌性 C57Bl/6J マウス8週齢を用いた。ハロセン麻酔下に第7, 8胸椎椎弓切除し、Farooqueらの方法に準じて硬膜外より脊髄に20g、5分間の重錘圧迫を加えて不全脊髄損傷モデルを作成した<sup>(5)</sup>。

造血幹細胞移植 LacZ トランスジェニックマウスである雄性 ROSA26 マウスの大腿骨から採取した LacZ 陽性の骨髄細胞に対して、FACS (fluorescence-activated cell sorter)を用いてソー



ティングをおこない(図 1)、c-Kit 陽性、Sca-1 陽性、Lin 陰性の造血幹細胞分画を純化した<sup>(16, 17)</sup>。損傷後1週の脊髄損傷部に $10^4$ 細胞/ $\mu$ lに調整した造血幹細胞分画 $3\mu$ l( $3 \times 10^4$ 細胞)を損傷部に直接注入した群を移植群とし、PBSのみを $3\mu$ l注入した群を対照群とした。

行動学的検討 後肢運動機能の改善を hindlimb motor function scoring system of mouse<sup>(5)</sup>を用いて評価した。受傷後3日、1週、移植後3日、1-5週(1週ごと)にビデオ撮影をおこない盲目的に採点した。移植群及び対照群の間で、Mann-Whitney U 検定にて統計学的検討を行った。

組織学的評価 移植群、対照群ともに移植後5週の時点で4%パラフォルムアルデヒドを用いて経心的灌流固定をおこない、損傷部脊髄組織の連続切片を作成した。Y 染色体 FISH (fluorescent in situ hybridization)にて Y 染色体陽性の移植幹細胞の生着を確認した。また、抗 LacZ 抗体と各種神経系マーカーとの免疫二重染色を行い、移植した造血幹細胞の分化の有無を評価した。神経系マーカーとして、ニューロンは NeuN、オリゴデンドロサイトは O4、アストロサイトは GFAP、神経前駆細胞は nestin をそれぞれ用いた。

### C. 結果

hindlimb motor function scoring system を用いて後肢運動機能評価を行った結果(図 2)、移植群では対照群に比して損傷後 3 週より有意な改善を認めた。この改善は移植後 5 週まで続き、移植後 5 週時点での移植群の平均スコアは 4.2 点であったのに対し、対照群の平均スコアは 2.9 点

であった。この結果は移植群では後肢での加重が可能になったことを示している。

Y 染色体 FISH の結果、移植後 5 週の脊髄において、Y 染色体陽性の移植細胞が生着していることが確認された(図 3)。移植細胞の大半は脊髄白質に存在していた。

抗 LacZ 抗体と神経系マーカーとの免疫二重染色では(図 4)、LacZ と O4、LacZ と GFAP、LacZ と nestin の二重陽性細胞が認められたが、LacZ と NeuN の二重細胞は認められなかった。LacZ 陽性の造血幹細胞由来の細胞は一切片あたり平均 24.8 細胞あり、LacZ と O4、LacZ と GFAP、LacZ と nestin の二重陽性細胞の割合はそれぞれ  $38.3 \pm 3.0\%$ 、 $29.7 \pm 2.0\%$ 、 $22.9 \pm 1.6\%$ であった。

### D. 考察

Ramon j Kajal<sup>(20)</sup>の報告以来、長い間成熟哺乳動物の中枢神経はひとたび損傷されると再生することはないと信じられてきた。しかしながら近年の研究により、損傷部の環境が軸索再生を妨げていることが明らかになってきた。その原因として、炎症性のサイトカインや軸索進展阻害因子の存在、軸索進展の足場となるグリア環境の破綻、神経栄養因子の不足など様々な要因が考えられる<sup>(21)</sup>。これらに対して中枢神経再生を促すアプローチとして、神経栄養因子の投与<sup>(7, 8, 10, 11)</sup>、軸索進展阻害因子に対する中和抗体の投与<sup>(21)</sup>、胎児脊髄組織の移植<sup>(9)</sup>、Schwann 細胞・嗅上皮細胞の移植<sup>(19, 23, 24)</sup>などがおこなわれてきた。

本研究では、骨髄由来の造血幹細胞分画をマウスの脊髄損傷部に移植することで後肢運動機能に有意な回復が認められ、移植細胞の一部が



神経前駆細胞、オリゴデンドロサイト、アストロサイトのマーカー陽性細胞に分化していた。

骨髄由来の細胞が神経系の細胞に分化した報告は、骨髄移植後に中枢神経系に未熟なニューロンやアストロサイトをみとめた報告<sup>(2, 4, 5)</sup>の他に、脊髄損傷部へ移植した骨髄間質細胞がニューロンやグリアに分化した報告がある<sup>(3)</sup>。骨髄組織には、造血幹細胞、間葉系幹細胞、骨髄間質細胞、血管内皮前駆細胞などが含まれている。骨髄移植の報告ではこの細胞がどの前駆細胞由来であるか不明であったが、本研究では FACS を用いて純化した造血幹細胞を用いており、分化した細胞は造血幹細胞由来であるといえる。骨髄移植、骨髄間質細胞移植でニューロンへの分化が認められたのに対して、本実験でニューロンへの分化を認められなかったのは、造血幹細胞の分化の特性によるものかもしれない。また、培養神経幹細胞から成熟血球細胞への分化の報告<sup>(1)</sup>もされており、造血系と神経系の相互関係が推察される。

冠動脈結紮モデルの心臓に造血幹細胞を直接注入して心筋への分化を認めた報告<sup>(18)</sup>があるように、本研究を含めて造血幹細胞の非造血細胞への分化は *in vivo* で損傷組織を修復する形で認められる。組織損傷の際に起こる局所の環境変化が造血幹細胞の局所依存性の多能性分化と深い関連があることが示唆される

造血幹細胞移植によって後肢運動機能が回復したメカニズムについての詳細は不明である。移植細胞由来のグリア細胞が機能的に働いて軸索進展の足場となり回復に貢献した可能性、移植した造血幹細胞由来の何らかの因子が作用した可能性などが考えられるが、定かではない。しか

しながら、麻痺の回復が移植後3週と比較的早期から認められたこと、生着した移植細胞数が多いことなどから後者の可能性が高いと考えられる。造血幹細胞は *angiopoietin* 等の増殖因子を出すとの報告もあり<sup>(22)</sup>、これらの栄養因子が作用した可能性もある。

ES 細胞や胎児由来の神経幹細胞は拒絶反応の問題や倫理的な問題があり、実際に臨床応用するには解決しなければならない問題が多いのに対して、造血幹細胞は採取が比較的容易であり、自己移植が可能であるなどの点で有用である。

本研究において、有意な後肢運動機能の回復が認められたものの、限られた回復でしかない。しかしながら神経栄養因子、軸索進展阻害因子の阻害剤等と併用によって、損傷脊髄局所の環境を整えてから移植することでさらなる良好な回復が得られる可能性があり、また自己移植が可能である点から遺伝子治療の担体としても有用であり、脊髄損傷治療への有用な手段として応用されることが期待される。

## E. 結論

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運動機能の有意な改善が得られた。また移植後5週で移植した造血幹細胞の一部は神経系マーカー陽性の細胞へ分化していた。

## [参考文献]

(1) Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult



- neural stem cells in vivo. **Science** **283**: 534-7.
- (2) Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, et al. (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. **Science** **290**: 1775-9
- (3) Chopp M, Zhang XH, Li Y, et al. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport*. 2000; 11: 3001-05
- (4) Eglitis MA, Mezey E. (1997) Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. **Proc Natl Acad Sci USA** **94**: 4080-85
- (5) Farooque M. Spinal cord compression injury in the mouse: presentation of a model including assessment of motor dysfunction. (2000) **Acta Neuropathol** **100**: 13-22
- (6) Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, et al. (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. **Nature** **401**: 390-94
- (7) Houweling DA, van Asseldonk JT, Lankhorst AJ, Hamers FP, Martin D, Bar PR, Joosten EA. (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**: 193-6.
- (8) Ikeda O, Murakami M, Ino H, Yamazaki M, Koda M, Nakayama C, Moriya H. (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**: 142-53.
- (9) Iwashita Y, Kawaguchi S, Murata M. (1994) Restoration of function by replacement of spinal cord segments in the rat. **Nature** **367**: 167-70.
- (10) Jakeman LB, Wei P, Guan Z, Stokes BT. (1998) Brain-derived neurotrophic factor stimulates hindlimb stepping and sprouting of cholinergic fibers after spinal cord injury. **Exp Neurol** **154**: 170-84.
- (11) Koda M, Murakami M, Ino H, Yoshinaga K, Ikeda O, Hashimoto M, Yamazaki M, Nakayama C, Moriya H. (2002) Brain-derived neurotrophic factor suppresses delayed apoptosis of oligodendrocytes after spinal cord injury in rats. **J Neurotrauma** **19**: 777-85.
- (12) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, et al. (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. **Nat Med** **6**:1229-34
- (13) McDonald JW, Liu XZ, Qu Y, et al. (1999) Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. **Nat Med** **5**: 1410-12
- (14) Mezey E, Chandross KJ, Harta G, et al. (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. **Science** **290**: 1779-82
- (15) Ogawa Y, Sawamoto K, Miyata T, et al. (2002) Transplantation of in vitro-expanded fetal neural progenitor cells results in neurogenesis and functional recovery after spinal cord contusion injury in adult rats. **J Neurosci Res** **69**: 925-33

(16) Okada S, Nakauchi H, Nagayoshi K, et al. (1992) In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. **Blood** **80**: 3044-50

(17) Okada S, Yoshida T, Honq Z, et al. (2000) Impairment of B lymphopoiesis in precocious aging (klotho) mice. **Int Immunol** **12**: 861-71.

(18) Orlic DJ, Kajstura S, Chimenti F, et al. (2001) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. **Proc Natl Acad Sci USA** **98**: 10344-49.

( 19 ) Ramon-Cueto A. (2000) Olfactory ensheathing glia transplantation into the injured spinal cord. **Prog Brain Res** **128**: 265-72.

(20) Ramon Y Cajal (1928) Degeneration and regeneration of the nervous system. translated by May RM, Oxford Univ. press, London

( 21 ) Schwab ME, Bartholdi D. (1996) Degeneration and regeneration of axons in the lesioned spinal cord. **Physiol Rev** **76**: 319-70.

( 22 ) Takakura N, Watanabe T, Suenobu S, Yamada Y, Noda T, Ito Y, Satake M, Suda T. (2000) A role for hematopoietic stem cells in promoting angiogenesis. **Cell** **102**: 199-209.

(23) Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Aebischer P, Bunge MB. (1995) A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. **Exp Neurol** **134**: 261-72.

(24) Xu XM, Guenard V, Kleitman N, Bunge MB. (1995) Axonal regeneration into Schwann cell-seeded guidance channels grafted into transected adult rat spinal cord. **J Comp Neurol**

**351**: 145-60.

## G. 研究発表

[学会発表]

1. 腰塚周平、大河昭彦、国府田正雄、岡田誠治、橋本将行、村上正純、山崎正志、守屋秀繁: マウス脊髄損傷モデルに対する造血幹細胞分画の移植. 第17回日本整形外科基礎学術集会 2002.10.11-12
2. Shuhei Koshizuka, Seiji Okada, Mituhiro Murasawa, Masao Koda, Masayuki Hashimoto, Akihiko Okawa, Masashi Yamazaki, Katsunori Yoshinaga, Masazumi Murakami, and Hideshige Moriya: Transplanted hematopoietic stem cells from bone marrow differentiate into neural lineage cells and promote functional recovery after spinal cord injury in mice. The 20th Annual National Neurotrauma Society Symposium & The Sixth International Neurotrauma Symposium October 27-November 1, 2002



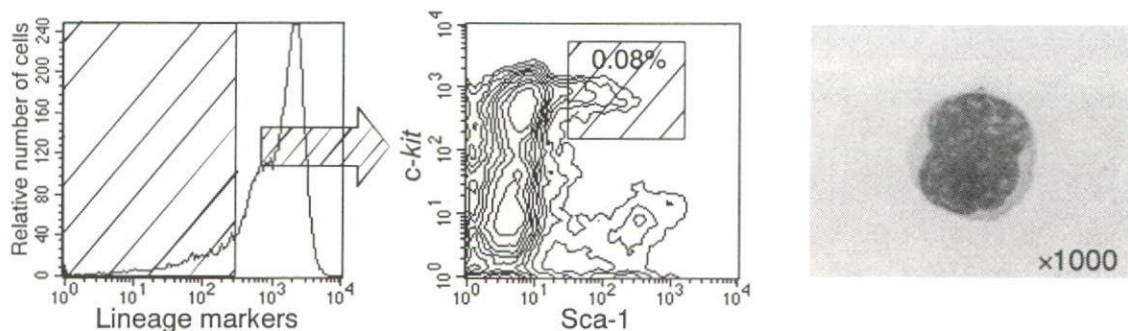


図1 造血幹細胞分画の純化。AはFACSを用いた造血幹細胞分画の純化を示す。Bはc-Kit陽性、Sca-1陽性、Lin陰性の造血幹細胞である。

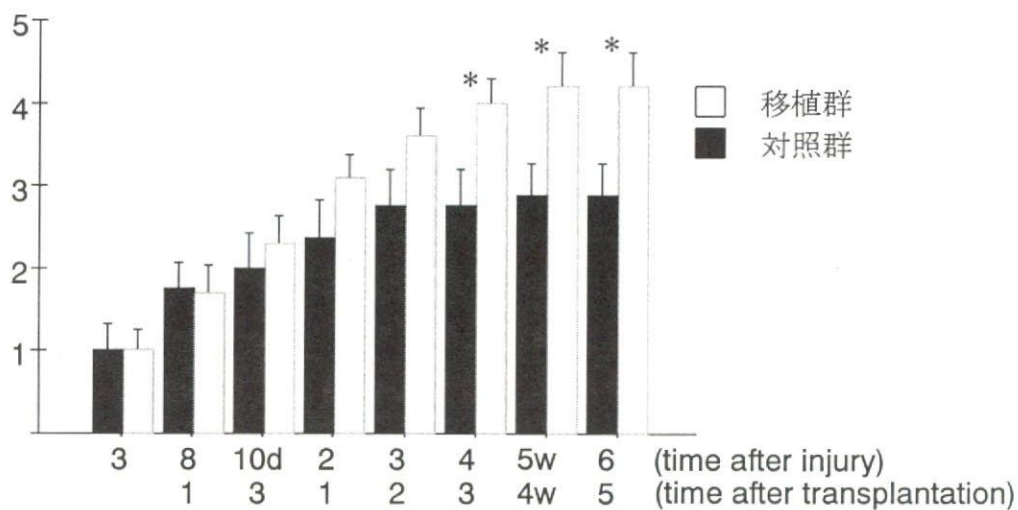


図2 造血幹細胞分画移植による脊髄損傷マウスの後肢運動機能の回復。白棒は移植群を、黒棒は対照群のスコアを示す。移植群では対照群に対して移植後3週より有意な回復を認めた。\*は $P < 0.05$ の有意差を示す。Mann-Whitney U検定。

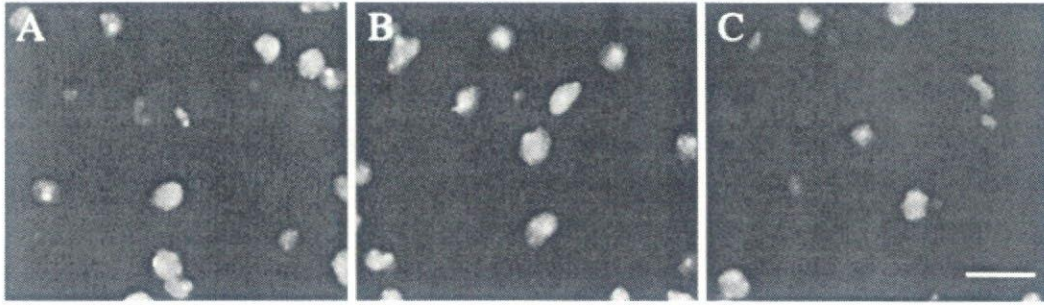


図3 Y染色体 FISH. 正常雄脊髄組織では各細胞に Y 染色体が陽性である(A)。移植群の損傷脊髄組織には移植幹細胞由来の Y 染色体陽性細胞が認められ(B)、造血幹細胞の生着が確認された。これに対して対照群の損傷脊髄組織では Y 染色体陽性の細胞は認められない(C)。Bar=20  $\mu\text{m}$ 。

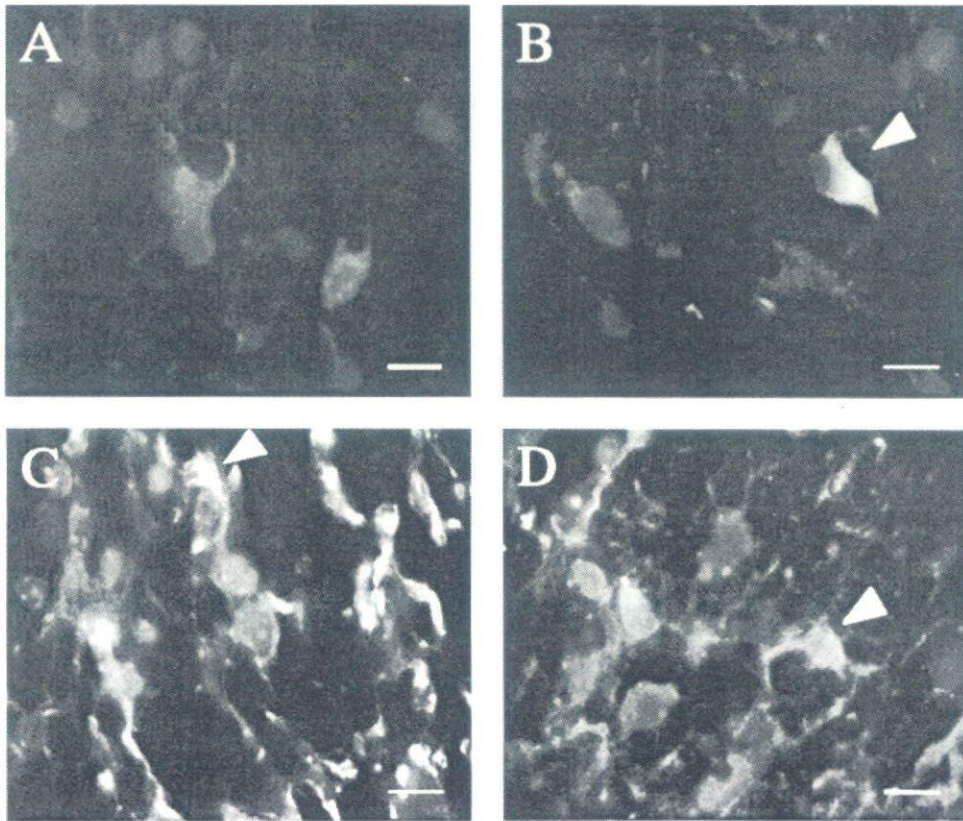


図4 抗 $\beta$ -galactosidase 抗体と神経系マーカーによる免疫二重染色。赤色は LacZ、緑色は神経系マーカー、青色は DAPI による核染色である。矢頭は二重陽性細胞を示す。A はニューロンのマーカー NeuN、B はオリゴデンドロサイトのマーカー O4、C はアストロサイトのマーカー GFAP、D は神経前駆細胞のマーカー nestin それぞれの抗体と抗 $\beta$ -galactosidase 抗体による二重染色である。Bar=10  $\mu\text{m}$ 。



## 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

坂田 亮介、南 晋司、玉置 哲也  
和歌山県立医科大学 整形外科教室

KEYWORD=histone deacetylase inhibitor, trichostatinA, osteopontin, OPLL

(抄録) = [目的] マウス未分化間葉系細胞を用いヒストン蛋白脱アセチル化酵素阻害剤による骨分化への誘導能を検討することを目的とした。[方法] マウス未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 に histone deacetylase inhibitor である trichostatinA (TSA) を 50ng/ml 添加し投与 6 時間後にゲルシフト法により転写因子との結合能を検討した。次いで C3H10T1/2 を  $8 \times 10^4$  個/ 6 cm dish 播種し 24 時間後に TSA を添加した。投与後 0、15、30、60、120、180 分後に total RNA を抽出し、c-fos および c-jun の mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。

[結果] ゲルシフト法では転写因子である c-fos および phosphorylated-c-jun においてスーパーシフトを認めた。RT-PCR 法では、TSA 投与前ではほとんど認められなかった、c-fos および c-jun の mRNA 発現が TSA 投与 15 分後から発現の亢進が見られるようになり、発現の亢進は 180 分後まで持続していた。[結論] ヒストン蛋白のアセチル化による骨分化マーカーである osteopontin の mRNA の亢進を認め、この発現はゲルシフト法の結果から c-fos および c-jun からなる AP1 において発現の調節がおこなわれている可能性が考えられた。また TSA を添加することで c-fos および c-jun の mRNA 発現が亢進することが確認された。

[はじめに]  
我々は、ヒストン蛋白をアセチル化する酵素である histone deacetylase inhibitor である TSA とレチノイン酸の強調作用により osteopontin の発現が上昇することを報告した。また Sato らは osteopontin の発現において転写因子である cbfa1 や ets などの転写因子がその発現に関与していると報告しており<sup>3</sup>、TSA を添加することによりこれら転写因子と osteopontin の発現の関連性を調べることは骨化進

展におけるメカニズムを解析する上で重要なことであると考えられる。今まで我々は骨分化能をもつ未分化間葉系細胞を用いヒストン蛋白脱アセチル化酵素阻害剤により osteopontin の発現につき転写レベルでの解析を行いほうこくした。平成 13 年度本研究班の報告書で述べたように TSA により osteopontin の発現は増加し、この増加は転写レベルで調節されていることがわかった。luciferase assay による調査では

osteopontin promoter 上の AP-1 結合部位が TSA によるプロモーター活性上昇に関与していると考えられた。今回我々は、ゲルシフト法をもちい osteopontin promoter 上に結合する蛋白をあきらかとし、TSA によりこれらの蛋白がどのように推移するか検討を加えた。

#### [方法と対象]

未分化間葉系細胞 C3H10T1/2 を  $2.5 \times 10^5$  個/ 10 cm dish 播種し 24 時間後に histone deacetylase inhibitor である trichostatinA (TSA) を 50 ng/ml 添加した。投与 6 時間後に核タンパク質を抽出し、ゲルシフト法にて osteopontin promoter に結合する転写因子について検討した。この際 c-fos, c-jun, junB, junD, phosphorylated-c-jun に対する抗体を用いた。

次に C3H10T1/2 を  $8 \times 10^4$  個/ 6 cm dish 播種し 24 時間後に TSA を添加した。投与後 0、15、30、60、120、180 分後に total RNA を抽出し、c-fos および c-jun の mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。

#### [結果]

ゲルシフト法では、c-fos および phosphorylated-c-jun においてスーパーシフトが認められたが、c-jun, junB, junD ではスーパーシフトを認めなかった。このことから osteopontin promoter に結合する転写因子は c-fos と phosphorylated-c-jun からなる AP-1 であることがわかった。

c-fos および c-jun が TSA によって発

現量に変化が見られるのか調査するために行った RT-PCR 法では、TSA 投与前ではほとんど認められなかった、c-fos および c-jun の mRNA 発現が TSA 投与 15 分後から発現の亢進が見られるようになり、発現の亢進は 180 分後まで持続していた。

#### [考察・結論]

今回のゲルシフトにおいて、c-jun ではスーパーシフトは見られなかったが、63 番目のセリンがリン酸化を受けた c-jun ではスーパーシフトが確認された。c-jun のリン酸化については、MAP キナーゼファミリーに属する JNK を介して 63,73 番のセリンがリン酸化を受けこのことにより、転写活性を増強すると言われている。<sup>1</sup> 今回の実験系で JNK がどのように関与しているか今後検討を要すると思われる。

HDAC と c-fos 関与について Yang<sup>2</sup> らの報告によると、c-fos プロモーター上には Elk-1 を含む転写因子複合体が結合する SRE サイトが存在し、EGF の添加により Elk-1 のリン酸化が生じ、EGF 添加 15 分後には c-fos の転写が促進する。また Elk-1 のリン酸化が生じることにより Elk-1 と Sin3A と HDAC-1 の複合体の結合が促され、Elk-1 とこの複合体が結合すると、c-fos の転写が反対に抑制される。これにより EGF 添加 120 分後には c-fos の発現は EGF 添加前のレベルまで戻ると報告されている。今回の RT-PCR では TSA 添加により c-fos の発現増強が見られており HDAC1 を阻害す



ることで c-fos 転写の抑制が解除されたと思われる。

一方 Jin<sup>3</sup>らは、ATF2 と JDP2 を含む複合体が c-jun プロモーター上にある DRE サイトに作用し c-jun の転写を抑制すると述べており、この際 HDAC3 がこの抑制作用を増強するとして居る。今回 TSA によりこの転写抑制機構を阻害することで c-jun の発現量を増加したのではないかと考える。

今回の研究より osteopontin の発現には HDAC、AP-1 などが転写レベルで関与していることがわかった。今後は異所性骨化のモデル動物などで osteopontin の発現 c-fos および c-jun の発現の局在、時間的変化について調査検討を行い、生体内でのこれら転写因子の作用を解明する必要があると思われた。

[参考文献]

- 1) Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M.: Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7 , 2135-2148. 1993
- 2) Yang,S.H., Vickers,E., Brehm,A., Kouzarides,T. and Sharrocks,A.D : Temporal recruitment of the mSin3A-histone deacetylase corepressor complex to the ETS domain transcription factor Elk-1. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2802-2814. 2001
- 3) Jin,C., Li,H., Murata,T., Sun,K., Horikoshi,M., Chiu,R. and Yokoyama,K.K : JDP2, a repressor of AP-1, recruits a histone deacetylase 3 complex to inhibit the retinoic acid-induced differentiation of F9 cells. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4815-4826. 2002

# SNPを用いたOPLL散発症例における コラーゲン11 $\alpha$ 2遺伝子の疾患感受性に関する解析

酒井 紀典(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),  
安井 夏生(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),  
加藤 真介(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),  
西良 浩一(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),  
浜田 大輔(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),  
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(徳島大学医学部分子栄養学講座),  
板倉 光夫(徳島大学ゲノム機能研究センター遺伝情報分野)

## A. 研究目的

これまで脊椎後縦靭帯骨化症(OPLL)は、Koga et al.による91対の罹患同胞を用いた candidate gene approach により、ヒト第6染色体p21.3のCOL11A2 遺伝子多型との相関関係が報告されており<sup>1)</sup>、HLA 領域の近傍に原因遺伝子あるいは疾患感受性遺伝子が存在すると推定されている。しかしながら、OPLLは多因子疾患であることや、COL11A2 遺伝子多型の関与は男性患者群でのみ強く、女性患者群では別の遺伝子座が関与している可能性<sup>2)</sup>などが示唆されている。そこで我々はOPLL 散発症例を対象とし、すでに報告されているCOL11A2 遺伝子のSNPs (single nucleotide polymorphisms)に加え、新たにCOL11A2 遺伝子の3'側の領域のSNPsについて解析し、患者対照研究(case-control study)を行なった。

## B. 研究方法

徳島県全域のOPLL患者81名(男性49名、女性32名)、非OPLL患者76名(男性37名、女性39名)よりインフォームドコンセントのもと末梢血10mlを採取し、末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出した。まず罹患同胞で有意差が示されているCOL11A2 遺伝子の5箇所(Promoter, Exon 6, Intron 6, Exon 43, Exon 46)とCOL11A2 遺伝子の3'側の下流領域にPrimerを設定し多蛍光PCR-SSCP(MF-PCR-SSCP)法<sup>3)</sup>

にて多型のscreeningを行い、 $\chi^2$ 検定にて有意差の検討を行った。移動度の異なるバンドの認められた領域については、SNPを塩基配列決定により確認した。なお以前の報告と塩基置換の頻度が逆転していたExon 43(+24)についてはPCR-PIRA (Primer Introduced Restriction Analysis)法<sup>4) 5)</sup>にて塩基置換頻度を再確認した。

## C. 研究結果

COL11A2 遺伝子の5箇所のSNPsについては、Exon 6(+28), Intron 6(-4), Exon(+24)の3箇所でOPLL患者群と非OPLL患者群の間に有意差を認めた。しかしこれらは過去の報告とは異なる有意差の分布を示し、また異なる塩基置換を示す部位も認められた(表1)。COL11A2 遺伝子3'側の約10kb下流領域の数箇所のSNPsを検索したところ、OPLL群・非OPLL群で有意差を示すSNPを見出した。また、このSNPに関して男女別に検討したところ、男性患者群( $p=0.01314$ )、女性患者群( $p=0.00791$ )とそれぞれ有意差を認めた。

## D. 考察

今回の散発症例におけるCOL11A2 遺伝子上の5箇所のSNPsに関する結果はCOL11A2 遺伝子が疾患感受性遺伝子であるという以前の報告を支持するものであった。また男女別に検討した結果においても女性群に関しては有意差が減