

参加施設／大学	OPLL サンプル数
福井医科大学	35
済生会川口病院	33
慶應大学	29
東京医科歯科大学	24
富山医科薬科大学	15
九州大学	14
山口大学	13
国立病院岡山医療センター	12
名古屋大学	10
東京医科大学	5
東北大学	2
滋賀医科大学	2

計 194

罹患同胞対については、下記 6 pair を収集した。

福井医科大学	2
国立病院岡山医療センター	2
東北大学	1
滋賀医大	

患者家系については、2 家系を収集した。

3. 知識を元に決定した候補遺伝子 20 遺伝子について、相関解析を行なった。カイ 2 乗検定、または Fisher 検定での P 値が有意水準 (0.05) を満たしたものはなかった。

D. 考察

OPLL の遺伝子解析における、罹患同胞対法による連鎖解析の有効性については、我々のグループも参加した先行研究 (Tanaka T, et al Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses identify col6a1, on chromosome 21, as the locus for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Am J Hum Genet, 2003.) により証明済みである。解析に十分な数のサンプルの収集が本法の最大の難関で、先行研究もそのため進展しなかったが、今回は左記のように日本全国に渡る多くの OPLL 医療に中心的な役割をになう施設の協力が得られる見通しで、実現可能と思われる。

E. 結論

連鎖解析のためのサンプルの収集を続ける。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

別紙

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

細胞骨格の変化による BMP の応答制御

分担研究者 樋口周久 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)
伊藤和幸 大阪府立成人病センター生物学部門

[研究要旨]

脊柱靭帯骨化症の成因、進展要因の一つに、靭帯組織あるいは骨化組織に対する機械的ストレスが考えられている。また、靭帯組織の骨化には Bone morphogenetic protein(BMP) -2 の関与が考えられている。我々は機械的ストレスによって引き起こされる細胞骨格の変化が骨芽細胞分化に影響するとの仮説をたて、細胞骨格に影響する薬剤を用いて骨芽細胞分化への影響を調べた。アクチン重合阻害剤の一時処理により、骨芽細胞はアクチンストレスファイバーの消失とその再構築がなされた。このとき BMP2 の存在の有無にかかわらず、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オステオカルシン分泌上昇、細胞外基質石灰化亢進を認めた。また、BMP2 存在下ではこの作用は増強された。この骨芽細胞分化促進作用はアクチン細胞骨格への作用機序の異なる3種類の阻害剤に共通に認められた。今回の結果より、細胞骨格の変化により BMP 応答性が亢進し、異所性骨化を導くことが推測され、機械的ストレスによる細胞骨格変化が脊柱靭帯骨化症進展の成因の一つである可能性が示唆された。

A. 研究目的

脊柱靭帯骨化症の成因の一つとして機械的ストレスが考えられており、多くの研究がされている。また、骨形成因子(Bone morphogenetic protein; BMP)やその受容体は、脊柱靭帯骨化症の異所性骨化部位や周囲で発現が認められ、脊柱靭帯骨化症発症に深く関与していると考えられている。我々は、以前より BMP に対する応答性の制御機構が異所性骨化の発症、進展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靭帯骨化症の成因解明の一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や増殖因子の細胞内シグナル伝達経路が BMP による骨形成を修飾していることを報告したが、今回、骨芽細胞において、細胞骨格そのものの変化が

BMP の応答性に及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

通常培養にて骨芽細胞分化し、BMP2 にてその分化が亢進するマウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 を用いた。細胞骨格構成因子の一つであるアクチンの重合阻害剤である cytochalacin D、latrunculin B およびアクチンストレスファイバーを制御している Rho-associated kinase(ROCK) の特異的阻害剤である Y27632 の骨芽細胞分化に対する影響を調べた。MC3T3-E1 をそれぞれの阻害剤にてアクチン細胞骨格が十分変化する1時間処理した後、阻害剤を除去し、リコンビナントヒト BMP2 の存在あるいは非存在下で培養した。分化マーカーとして、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。

C. 研究結果

MC3T3-E1 細胞のアクチン細胞骨格は、アクチン重合阻害剤の cytochalasin D および latrunculin B の1時間処理にて壊され、阻害剤除去後1時間以内に再構築されることをファロイジン染色にて確認した。BMP2 非存在下での培養では、阻害剤の濃度依存性に3日後のアルカリフォスファターゼ活性、mRNA 量および9日後のオステオカルシン分泌量、mRNA 量の増加を認めた。また、21日後の細胞外基質の石灰化結節のカルシウム含有量に有意な上昇を認めた。阻害剤除去後、BMP2 の存在下では、これらの上昇は相乗的に認められた。しかし、阻害剤除去後1時間以上後、すなわちアクチン細胞骨格再構築終了後に BMP2 を培地内に添加しても阻害剤処理によるこれらの分化マーカーの上昇は見られなかった。一方、アクチン細胞骨格を制御するシグナル伝達経路を構成する細胞内タンパクの ROCK の特異的阻害剤を MC3T3-E1 細胞に1時間処理し、アクチン細胞骨格の再構築を起こさせたときでも、アルカリフォスファターゼ活性、オステオカルシン分泌量、細胞外基質の石灰化の亢進を認め、アクチン重合阻害剤と同様に BMP2 はこれらを相乗的に増加させた。この Y27632 と BMP2 の相乗効果は先の2種類のアクチン重合阻害剤と同様に、アクチン細胞骨格再構築後には消失していた。

D. 考察

われわれは、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を示してきた。今回、機械的ストレスが細胞形態を変化させる多数の報告を参考にして、

細胞形態の変化そのものが1つのシグナルとして骨芽細胞分化に影響しているという仮説をたてた。我々の結果は、細胞形態の一時的な変化が BMP2 によるシグナルを修飾し、骨形成の促進を促す可能性を示した。2つのアクチン重合阻害剤はこれまでの報告で、アクチン重合に対する作用機序の違いが報告されており、また ROCK の特異的阻害剤はまったく違った作用機所でアクチンストレスファイバーに影響する。これらのことより、これら3種の阻害剤はアクチン細胞骨格に影響を及ぼし、これが骨芽細胞分化のシグナルを修飾している可能性が高いと考える。また、BMP2 存在下での培養条件において、アクチン細胞骨格の再構築後には3つの阻害剤の骨芽細胞分化マーカー上昇の作用は消失することより、特にアクチン細胞骨格の動的変化が BMP2 のシグナルを修飾している可能性が考えられる。生体内では、細胞外基質等を介して骨芽細胞は機械的ストレスを受けていると考えられ、それによる細胞形態の変化も考えられる。今回の我々の結果は、細胞形態の変化が BMP の応答性を修飾していることを示唆しており、今後、機械的ストレスと細胞骨格変化を解析していく必要があると考えられた。

E. 結論

BMP 応答性制御機構の1つとして細胞骨格変化があげられ、一時的なアクチン細胞骨格の変化は BMP の骨芽細胞分化に対する応答性を促進すると考えられた。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1. Miyaji, T., Nakase, T., Iwasaki, M.,

Kuriyama, K., Tamai, N., Higuchi, C., Myoui, A., Tomita, T., Yoshikawa, H.: Expression and distribution of transcripts for sonic hedgehog in the early phase of fracture repair. *Histochemistry and Cell Biology*, 119:233-237, 2003.

2. Nakase, T., Miyaji, T., Tomita, T., Kaneko, M., Kuriyama, K., Myoui, A., Sugamoto, K., Ochi, T., Yoshikawa, H.: Localization of bone morphogenetic protein-2 in human osteoarthritic cartilage and osteophyte. *Osteoarthritis Cartilage*, 11:278-284, 2003.

3. Kozaki, T., Matsui, Y., Gu, J., Nishiuchi, R., Sugiura, N., Kimata, K., Ozono, K., Yoshikawa, H., Sekiguchi, K.: Recombinant expression and characterization of a novel fibronectin isoform expressed in cartilaginous tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 278:50546-50553, 2003.

4. Matsui, Y., Nakata, K., Adachi, E., Tsumaki, N., Kimura, T., Yasui, N., Kataoka, E., Fujita, Y., Tsuboi, H., Yoshikawa, H.: Cartilage-specific overexpression of C-propeptide of type II collagen affected matrix mineralization in transgenic mice. *Journal of Musculoskeletal Research*, 7:183-189,

2003.

5. 吉川秀樹、名井陽、玉井宣行：骨組織再生の促進、整形外科の最新医療、先端医療技術研究所、pp.45-48, 2003.

H.知的財産権の出願・登録状況
特になし

OPLL 靱帯細胞の骨芽細胞への分化制御機構の解明に関する研究

分担研究者 池田龍二¹、吉田健一¹、塚原聡¹、坂本佳子¹、

古川賢一²、田中浩³、井ノ上逸朗¹

¹ 東京大学・医科学研究所 ゲノム情報応用診断

² 弘前大学医学部薬理学

³ 山口大学医学部整形外科

研究要旨

後縦靱帯骨化症 (OPLL) は進行性靱帯異所性骨化を特徴とする多因子疾患であり、神経圧迫によりさまざまな程度の神経症状をきたす。われわれはゲノム全域連鎖解析から感受性遺伝子同定をおこない、collagen 6A1 の関与を見い出している。感受性遺伝子の同定のみでは異所性骨化の成因解明は困難であったので、骨化傾向を有する OPLL 患者靱帯細胞を骨芽細胞への分化させた際に発現上昇する遺伝子の同定より、OPLL の骨化制御機構の解明を目指した。我々は、骨芽細胞への分化能を有するヒト間葉系幹細胞 (human Mesenchymal Stem Cell; hMSC)、OPLL 患者および対照として頸椎症性脊髄症患者から得られた靱帯細胞において骨芽細胞系への分化に伴う遺伝子発現の変化を網羅的にマイクロアレイ解析で検討した。マイクロアレイ解析の結果多くの遺伝子発現変化が観察された。その中ですべての系において共通して発現上昇が見られ、OPLL 患者により発現上昇が確認された PLZF に注目した。さらに、その発現レベルの経時的パターンを調べた。分化誘導前は発現まったく確認されず、分化誘導後に発現が速やかに上昇した。転写因子である PLZF は骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが期待されたので、この遺伝子発現を抑える目的で 21 塩基の二本鎖 RNA (siRNA) を 2ヶ所で設計しリポフェクトアミンで hMSC へ取り込ませた。その結果効率よく遺伝子発現抑制が、RT-PCR で確認でき同時に alkaline phosphatase の上昇をマーカーとした骨芽細胞への分化は抑制された。次に C2C12 細胞で強制発現させたところ、骨芽細胞への分化促進が確認された。これらの結果から、PLZF が骨芽細胞分化に重要な因子であるのみでなく、OPLL の治療につながる可能性が示唆された。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化症 (OPLL) は後縦靱帯が骨化することによると考えられているが、その骨化制御機構に関しては、ほとんど理解されていない。本研究では OPLL の成因解

明、および治療法の開発を目指す。その目的に OPLL 患者から得られた靱帯細胞から骨芽細胞への分化に重要な遺伝子を同定し、その遺伝子を制御することで OPLL の治療につなげる。

B. 研究方法

OPLL 患者および対照として頸椎症性脊髄

症患者から得られた靭帯細胞において骨芽細胞系への分化への影響および分化に伴う遺伝子発現の変化を網羅的にマイクロアレイ解析で検討した。骨芽細胞分化誘導には ascorbic acid, β -glycerphosphate, dexamethasone (OS)を用いた。また OPLL 患者により分化誘導後 (OS) 発現上昇が確認された PLZF に注目した。さらに、その発現レベルの経時的パターンを調べた。この転写因子である PLZF が骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが期待されたので、この遺伝子発現を抑える目的で 21 塩基の二本鎖 RNA (siRNA) を 2ヶ所で設計しリポフェクトアミンで hMSC へ取り込ませた。次に C2C12 細胞で PLZF を強制発現させた。

C. 研究結果

OPLL 患者および対照として頸椎症性脊髄症患者から得られた靭帯細胞において骨芽細胞系への分化への影響を調べたところ、分化誘導後 (OS) 後 OPLL 患者により高い ALP 活性が認められた (Fig.1A and B)。また骨芽細胞系への分化に伴う遺伝子発現の変化を網羅的にマイクロアレイ解析で検討した (Table)。マイクロアレイ解析の結果複数の遺伝子発現変化が観察された。すべての系において共通して発現上昇が見られ、OPLL 患者により発現上昇が確認された PLZF に注目した (Fig.2A)。さらに、その発現レベルの経時的パターンを hMSC を用いて調べた。分化誘導前は発現がまったく確認されず、分化誘導後発現が速やかに上昇した (Fig.2B)。PLZF が骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが期待されたので、この遺伝子発現を抑える目的で 21 塩基の二本鎖 RNA (siRNA) を 2ヶ所で設計しリ

ポフェクトアミンで hMSC へ取り込ませた。その結果効率よく遺伝子発現抑制が、免疫蛍光染色法で確認でき同時に ALP, COL1A1 の発現上昇をマーカーとした骨芽細胞への分化は抑制された (Fig.3A and B)。次に C2C12 細胞で PLZF を強制発現させたところ、PLZF の核への発現が確認された (Fig.4B)、さらに骨芽細胞への分化促進が確認された (Fig.4C and D)。また、PLZF を強制発現させた結果、CBFA1 の発現上昇が確認された (Fig.4E)。しかしながら、PLZF の BTB domain を欠く mutant では、骨芽細胞分化に影響を与えなかった (Fig.4 C, D and E)。

D. 結論

PLZF は骨芽細胞分化に重要な遺伝子である。また PLZF は CBFA1 の遺伝子発現を調節していた。これらの結果から、PLZF が CBFA1 の上流で働き、骨芽細胞分化に重要な因子であるのみでなく、OPLL の治療につながる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka, T., Ikari, K., Furushima, K., Okada, A., Tanaka, H., Furukawa, K., Yoshida, K., Ikeda, T., Ikegawa, S., Hunt, S. C., Takeda, J., Toh, S., Harata, S., Nakajima, T., and Inoue, I. (2003) Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses identify COL6A1, on chromosome 21, as the locus for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine *Am. J. Hum. Gene.* **73**, 812-822

2. Ikeda, R., Furukawa, T., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Oiso, S., Inoue, I., Yamada, K., and Akiyama, S. (2003) Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by anticancer agents *Nippon Yakurigaku Zasshi* **122**, 84-86

3. Ikeda, R., Furukawa, T., Mitsuo, R., Noguchi, T., Kitazono, M., Okumura, H., Sumizawa, T., Haraguchi, M., Che, X. F., Uchimiya, H., Nakajima, Y., Ren, X. Q., Oiso, S., Inoue, I., Yamada, K., and Akiyama S. (2003) Thymidine phosphorylase inhibits apoptosis induced by cisplatin *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 358-632

2. 学会発表

1. 第31回 薬物活性シンポジウムー薬物感受性の発現制御と創薬ー平成15年11月6日

チミジンホスホリラーゼ (TP) は抗癌剤によって誘導されるアポトーシスに対して抵抗性を賦与する

池田龍二^{1,2}、古川龍彦²、住澤知之²、原口みさ子²、大磯茂¹、山田勝士¹、井ノ上逸朗³、秋山伸一²

¹鹿児島大・大学院医歯学総合・薬物動態制御学分野、²鹿児島大・大学院医歯学総合・分子腫瘍学分野、³東京大学医科学研究所・ゲノム情報応用診断【横浜】

2. 人類遺伝学会 平成15年10月22日
OPLL 靱帯細胞の骨芽細胞への分化制御機構

の解明

池田龍二¹、吉田健一¹、塚原聡¹、坂本佳子¹、古川賢一¹、井ノ上逸朗²

¹東京大学・医科学研究所 ゲノム情報応用診断、²弘前大学医学部薬理学【長崎】

3. 脊柱靱帯骨化症に関する研究報告 (第2回班会議) 平成16年1月31日

OPLL 靱帯細胞の骨芽細胞への分化制御機構の解明

池田龍二¹、吉田健一¹、塚原聡¹、坂本佳子¹、古川賢一²、田中浩³、井ノ上逸朗¹

¹東京大学・医科学研究所 ゲノム情報応用診断、²弘前大学医学部薬理学、³山口大学医学部整形外科【東京】

4. 脊柱靱帯骨化症に関する研究報告 (第2回班会議) 平成16年1月31日

OPLL 靱帯細胞の骨芽細胞への分化制御機構の解明 (2)

塚原聡^{1,2}、池田龍二¹、吉田健一¹、岡田晶博²、古川賢一³、藤哲²、井ノ上逸朗¹

¹東京大学・医科学研究所 ゲノム情報応用診断部門、²弘前大学医学部整形外科教室、³弘前大学医学部薬理学教室【東京】

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

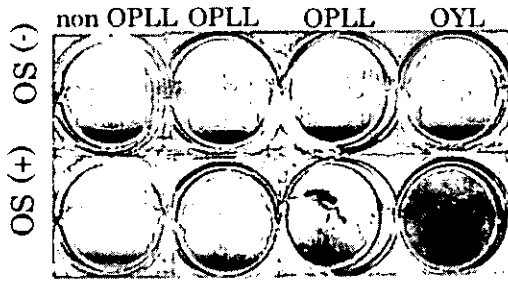
Table. Genes regulated during osteoblastic differentiation of OPLL, OYL and control cells by DNA microarray analysis

GeneName	Accession number	OPLL cells		OYL cells		Control cells
		fold increase	fold increase	fold increase	fold increase	
zinc finger protein 145 (Kruppel-like, expressed in promyelocytic leukemia)	AF060568	11.5	10.1	10.1	4.7	
RAN binding protein 2	D42063	6.2	10.7	10.7	5.0	
fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)	A1075338	4.8	3.4	3.4	2.2	
Human metallothionein-II pseudogene (mt-IIps).	J00272	4.2	5.0	5.0	5.4	
crystallin, alpha B	S45630	3.9	4.0	4.0	4.1	
metallothionein 1G	J03910	3.5	5.8	5.8	5.7	
activated leucocyte cell adhesion molecule	AA777157	3.0	3.5	3.5	2.3	
collagen, type VIII, alpha 1	NM_001850	3.3	2.1	2.1	5.0	
matrix Gla protein	AW997681	3.1	5.3	5.3	4.6	
metallothionein 1B	R99207	3.1	4.5	4.5	4.5	
glutaredoxin (thioltransferase)	X76648	2.1	3.1	3.1	2.2	
Homo sapiens cDNA: FLJ21685 fis, clone COL09372	AK025338	N.D.	3.1	3.1	1.8	
metallothionein 1L	X97261	3.0	4.0	4.0	4.4	
RNA helicase-related protein	A1814448	2.9	N.D.	N.D.	N.D.	
cardiac ankyrin repeat protein	X83703	2.8	3.2	3.2	4.2	
dual specificity phosphatase 1	X68277	2.5	2.6	2.6	3.7	
transgelin	M95787	1.7	2.5	2.5	2.2	
Sequence 12 from Patent WO9954460.	AX013690	2.4	2.7	2.7	2.7	
growth arrest-specific 1	L13698	2.4	2.5	2.5	2.1	
metallothionein 1E (functional)	H72532	2.3	4.8	4.8	N.D.	
KIAA0851 protein	AB020658	2.2	N.D.	N.D.	N.D.	
MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide D	L16794	2.1	1.8	1.8	2.9	
adrenomedullin	S73906	2.1	2.5	2.5	2.9	
collagen, type XI, alpha 1	J04177	2.1	2.1	2.1	3.8	
glucocorticoid-induced leucine zipper	BE295817	1.4	2.1	2.1	2.3	
laminin, alpha 2 (merosin, congenital muscular dystrophy)	M59832	1.9	2.1	2.1	2.4	
integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)	NM_002205	2.0	2.9	2.9	3.9	
Human destrin-2 pseudogene mRNA, complete cds	U72518	2.0	N.D.	N.D.	2.0	

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

Fig. 1

A



B

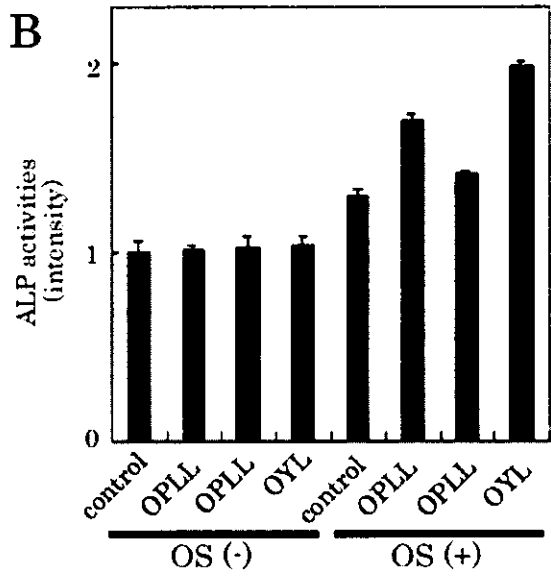
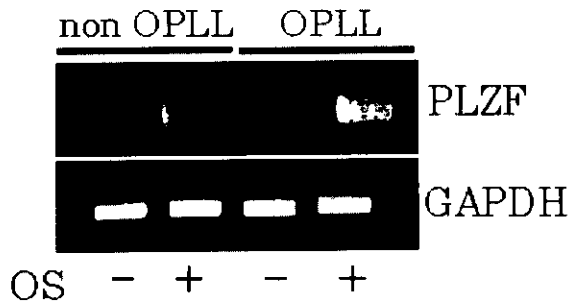


Fig. 2

A



B

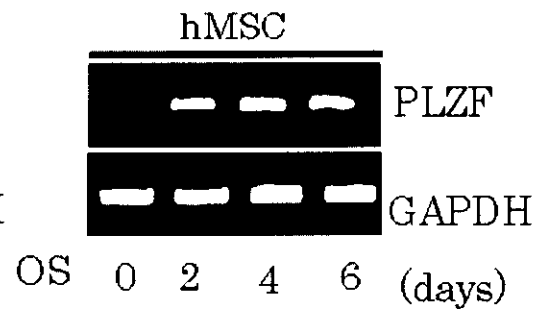
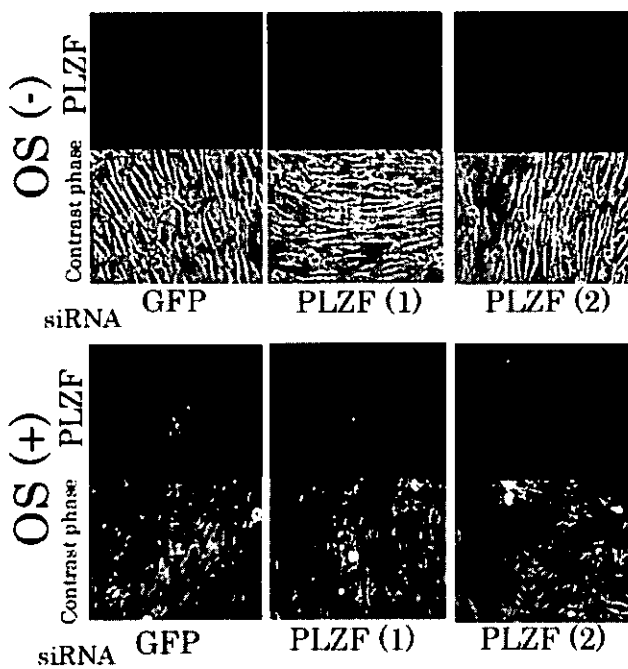


Fig. 3

A



B

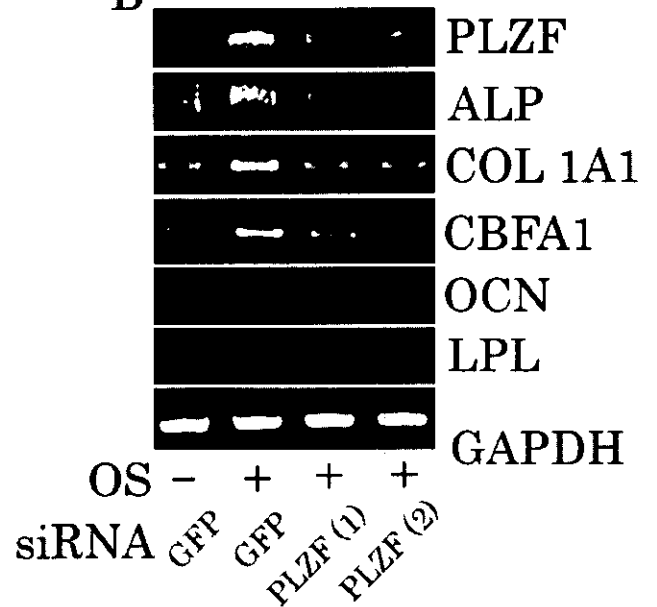
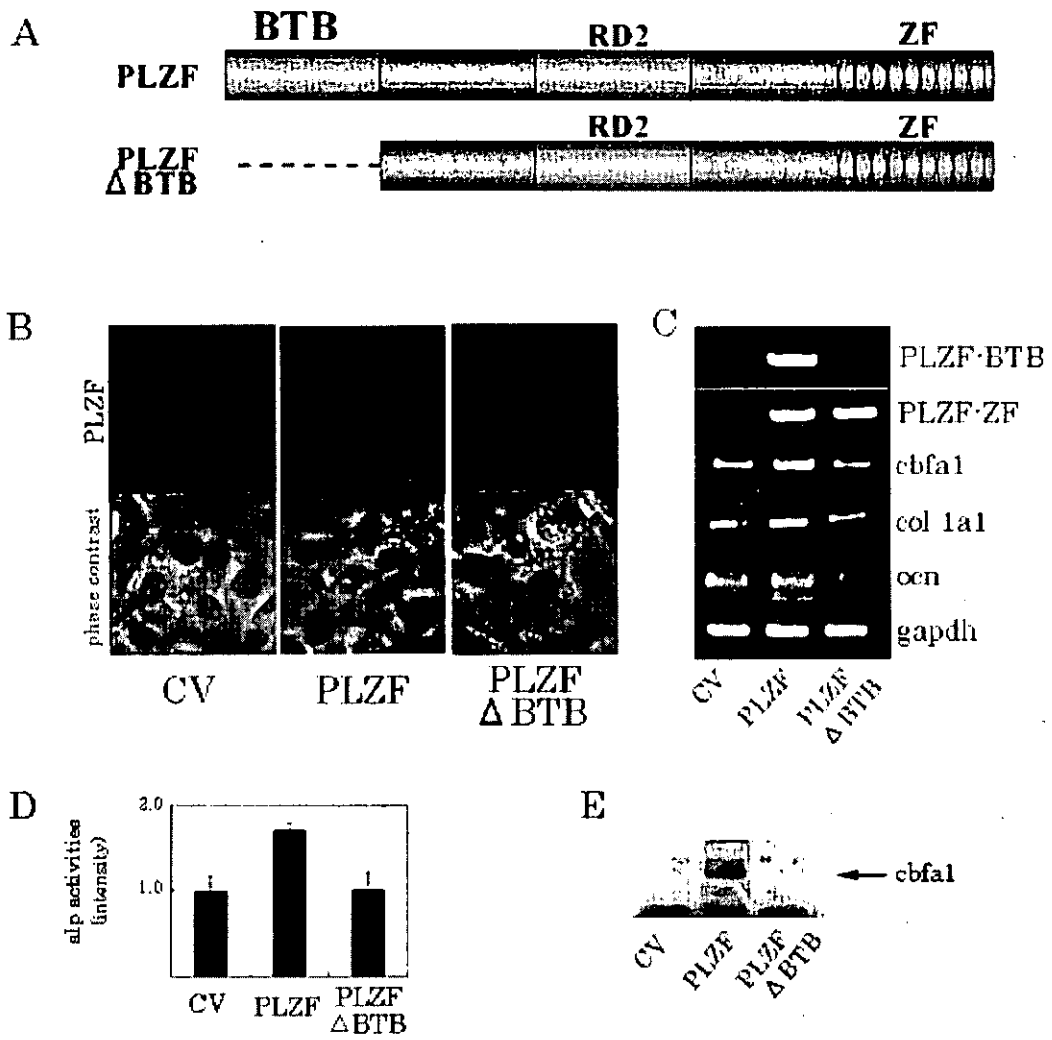


Fig. 4



ラットを用いた脊柱靭帯への反復伸展ストレス負荷モデルの確立

分担研究者 岩本幸英（九州大学整形外科教授）

研究協力者 塚本伸章，前田 健，三浦裕正，志田純一，細川 哲，
播広谷勝三（九州大学整形外科）

日垣秀彦，蔵田耕作（九州産業大学機械工学科）

研究要旨

後縦靭帯骨化症（OPLL）の成因のうち外的因子の一つとして靭帯局所への伸張メカニカルストレスの関与が示唆されている。今回我々は実際に生きた動物の脊柱靭帯に伸張ストレスを負荷した際の形態的变化を観察することを目的として、生体ラットの尾椎を対象とした独自の刺激装置を開発し、反復する伸張ストレスを負荷した。刺激部位および張力さまざま変えて伸張ストレスを与え、屠殺後軟 X 線撮影，マイクロ CT 撮影および組織学的観察を行い評価した。10N～20Nの比較的強い力を負荷した場合，2～4週間の期間にて対象尾椎の骨幹端部，骨端部および一部椎間板周囲に新生軟骨と骨梁を伴った異所性骨組織の出現が観察された。また，近位の尾椎は体幹部の脊椎の構造に近く椎体，椎弓，後縦靭帯および黄色靭帯の構造がはっきりしていた。同部の伸張刺激により組織学的に新生軟骨の出現が，後縦靭帯に沿って認められた。

A. 研究目的

本研究の目的は OPLL の発生進展と局所に負荷されるメカニカルストレスとの関与を明らかにするために、実際に実験動物の脊椎に *in vivo* において伸張刺激を加えることのできる装置を開発し、これを用いて脊椎の形態的变化を観察しえる実験モデルを確立することである。

B. 研究方法

B.1 刺激機器の作成

ラット尾椎に一定の直達的な反復伸張ストレスを負荷するために九州産業大学機械工学科の協力を得、独自の刺激機器を作成した。(Fig.1) この装置はラットを載せる台座，尾椎に刺入したワイヤを装着する治具，反復運動を制御するために一軸リニア

アクチュエータ，ひずみゲージ，ゲージアンプ，モータドライバおよびパーソナルコンピュータから構成されており，各過重負荷サイクルにおいて，尾椎に与えられる最大伸張ストレス，および負荷周期が一定になるようにフィードバック制御が可能である。(Fig.2) ラット尾椎椎体に刺入したワイヤを介して同一平面上で往復運動させ，台形波状の伸張ストレスを負荷できるようにした。

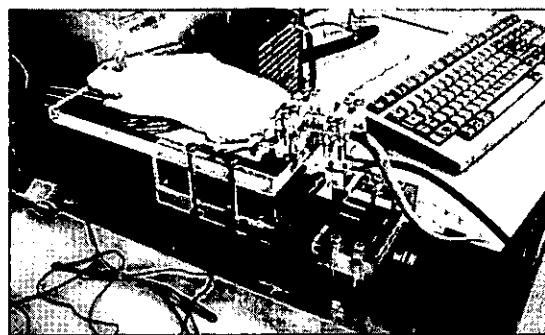


Fig.1 ラット尾椎への反復伸張ストレス刺激機器。

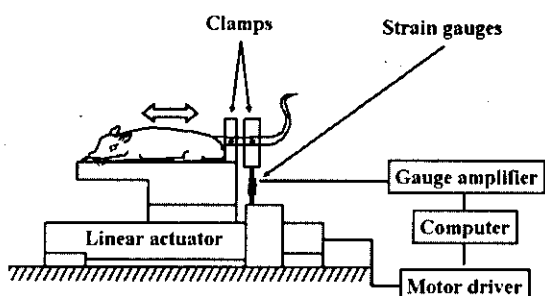


Fig.2 刺激機器のシェーマ。

B.2 対象と刺激方法

対象動物は 14~21 週齢のメス成体 Wistar ラットを用いた。刺激実験に先立ち軟 X 線写真像(Fig.3)と触診所見を参照しながら尾椎椎体中央部に 1.2mm ステンレスワイヤ (Kirschner wire) を冠状面に平行になるように電動ドリルを用いて経皮的に刺入した。(Fig.4) ワイヤはペントバルビタール (40mg/kg) の腹腔内投与による全身麻酔の下で施行した。各回刺激プロトコルの実施においては同様の全身麻酔下で行い、実験終了後は感染、ワイヤの脱落を防ぐため刺入部をポビドンヨード、エタノールにて消毒し、自作の亚克力製固定具にてワイヤ刺入部を保護した。実験時以外は飼育ケージの中で放し飼いにし自由な行動を許容した。



Fig.3 ラット尾椎軟 X 線像。



Fig.4 ワイヤ刺入後尾椎。

刺激プロトコルは以下のように 2 パターン施行した。(Table 1)

[タイプ1]: ラット第 7、10 尾椎にワイヤを刺入し、2ヶ所のワイヤを装置に固定して 20 N の力で 1 Hz, 120 cycle/day, 5 days/week, 期間 3~4 weeks のプロトコルにて刺激を行った。観察対象尾椎は第 8、9 尾椎とした。

[タイプ2]: タイプ1とは異なり、椎体椎弓の構造が整っているより近位の尾椎を対象にした。体幹に近い部分の尾椎にはワイヤを経皮的に刺入することは困難なので、遠位側第 8 尾椎にのみワイヤを刺入した。近位側は機器を改変し骨盤を固定することにより支持した。刺激プロトコルは 5~10 N, 1Hz, 600 cycles/day, 5 days/week, 期間 2 weeks にて施行した。観察対象尾椎は第 3~5 尾椎とした。

Table 1 刺激プロトコール

	タイプ1	タイプ2
負荷荷重(N)	20	5~10
負荷回数	120/day 5 days/week	600/day 5 days/week
期間	3~4 weeks	2 weeks
ワイヤ 刺入部位	CV 7,10	CV 8

CV: caudal vertebrae

B.3 評価

実験期間終了後、尾椎の軟X線撮影を行い刺激負荷による骨組織の変化を観察した。その後ラットをエーテル過麻酔にて屠殺、観察対象尾椎を軟部を含めた一塊として摘出し4%パラホルムアルデヒドにて固定した。後日マイクロCT撮影を行い詳細にわたる形態的变化を観察した。標本は脱灰後パラフィンにて包埋し、正中部矢状断にて5 μ mの厚さで薄切、Hematoxylin-Eosin (HE)染色を施した。なお[タイプ1]のパラフィン薄切切片の一部については抗BMP-2抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)にて酵素抗体法による免疫染色を施した。

(倫理面への配慮)

この実験は、九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査をうけ、規定に基づいて行われた。

C. 研究結果

[タイプ1]: 刺激開始後2週間ほどで軟X線写真上、主に第8, 9尾椎椎体腹側に新生骨様の陰影が出現し4週間後の屠殺時にはより明らかになった。ワイヤを刺入した第

7, 10尾椎ではワイヤ刺入の直接的な影響と思われる椎体周囲の骨化像が見られた。屠殺後のマイクロCT断層像にて詳細に観察すると同部の骨幹端腹側において異所性の骨化が観察された。(Fig.5)ある個体では骨化が椎体間まで突出していた。HE染色所見では第8, 9椎間部において椎椎体皮質骨, 骨梁部分, 椎間板線維輪および髄核においては著明な損傷などの変化は見られなかった。Fig.6に示すように腹側では椎間板外側が著明に肥厚しその中では線維性組織の中に軟骨細胞が多数見られ骨幹部側ではそれに接するように骨梁を伴った新生骨がみられ盛んな内軟骨性骨化像が観察された。抗BMP-2抗体による染色では新生軟骨組織周囲の未分化な細胞の細胞質が淡く染色されておりBMP-2の発現が示唆された。(Fig.6)

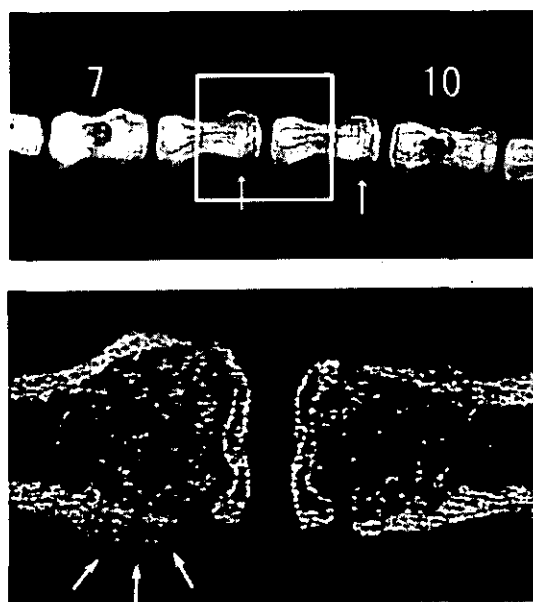


Fig.5 ラット尾椎X線画像(20N, 3週間刺激)。上段: 軟X線画像, 下段: 上段枠内のマイクロCT矢状断画像。矢印: 異所性骨化像。

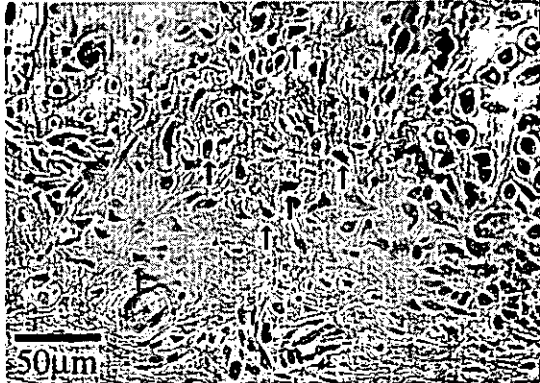
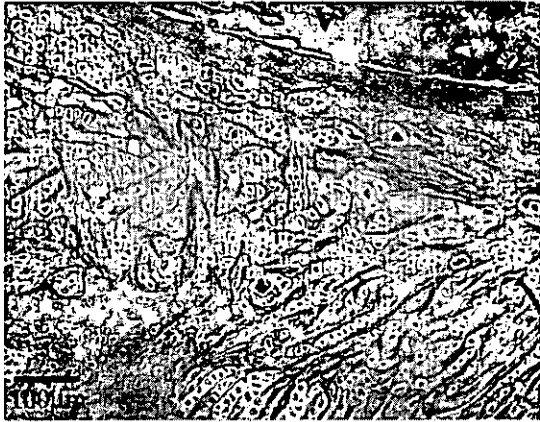


Fig.6 上段：ラット第8, 9尾椎腹側全体像（20N, 3週間刺激, HE染色), 中段：新生軟骨の拡大像（HE染色), 下段：抗BMP-2抗体による免疫染色組織像。

D：椎間板, G：骨端線, V：椎体, *（上段）：新生軟骨部分。

矢印（下段）：典型的な染色陽性細胞。

[タイプ2]:骨格の形態は第8, 9尾椎付近と異なり第3~5尾椎にかけては椎体とと

もにその背側に椎間関節を伴った椎弓をともっており, マイクロCTにより脊柱管の存在も確認された。HE染色による組織標本では後縦靭帯, 黄色靭帯の存在も明瞭であった。(Fig.7, 8)

この群では軟X線上やマイクロCT画像上では著明な変化は現れなかったが, 組織学的には椎体背側の骨幹端部外縁において, 後縦靭帯付着部に沿った線維性組織は肥厚し軟骨細胞が出現していた。椎弓, 椎体, 椎間板部, 黄色靭帯部分には明らかな変化は見られなかった。(Fig.9)

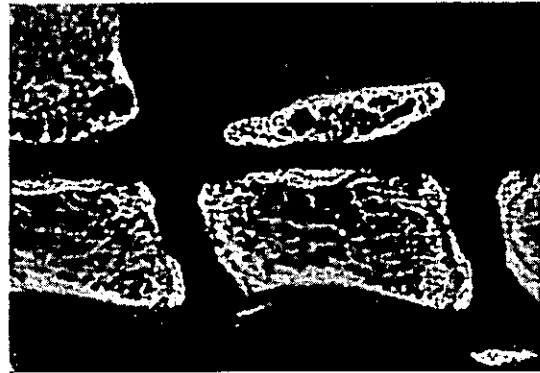


Fig.7 近位尾椎のX線像。

上段：第2~5尾椎軟X線像。下段：第3~5尾椎マイクロCT矢状断像。

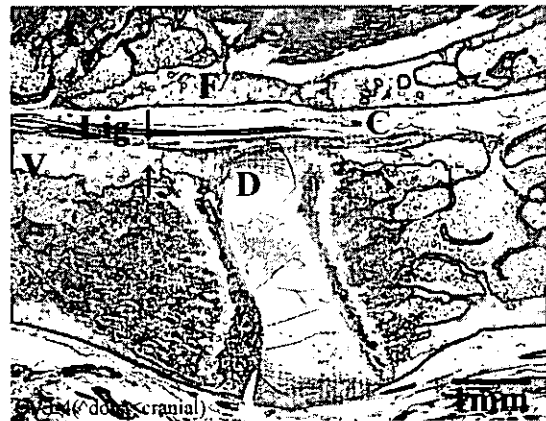


Fig.8 コントロールラット近位尾椎（第3,4尾椎間）HE染色組織像。L：椎弓, F：黄色靭帯, C：脊柱管, V：椎体, D：椎間板, Lig（矢印で囲む）：後縦靭帯。

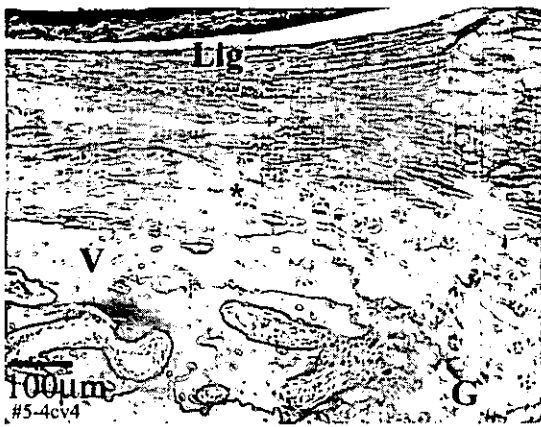


Fig.9 刺激後ラット第4尾椎，椎体背側部写真（10N，2週間刺激）。

Lig：後縦靱帯，V：椎体，G：骨端線，
*：軟骨細胞が出現し肥厚した領域。

D. 考察

OPLL と靱帯へのメカニカルストレスとの関与については過去に数々の報告がある。椎弓形成術などの後方除圧術後に靱帯骨化が進行する例がしばしば見られ，術後後縦靱帯に異常な張力がかかることが骨化進展の一因ではないかと推測されている(1)。また，手術にて摘出した骨化靱帯細胞を培養し *in vitro* にて反復する伸張ストレスを負荷すると，alkaline phosphatase (ALP), BMPs, BMP-receptor などの骨化促進因子の発現が増加したとの報告や(2)，ヒト黄色靱帯細胞に *in vitro* で反復伸張ストレスを負荷すると靱帯肥厚の原因となるような TGF-beta1 や各種コラーゲンの産生が増加したという報告もあり(3)，靱帯への異常なメカニカルストレス，特に伸張ストレスの蓄積が骨化を促進することが強く示唆されている。

我々はさらに本症とメカニカルストレスとの関係をより实际的に検証するために *in vivo* モデルでの実験系の開発を試み，対象

としてラットの尾椎に注目した。ラットの尾椎は体表から浅く，操作を加えやすいことにより，メカニカルストレスを与える研究や，椎間板に関する研究などの対象として多く利用されている(4)(5)(6)。

今回の実験モデルは Chambers らのモデルを参考にして機器の製作，プロトコルの作成を行った。彼らは観察対象尾椎の両隣の尾椎にワイヤを刺入し，これらの尾椎に対して反復する押し込みストレスの負荷を与え，対象尾椎の骨梁構造の変化を観察した。このモデルでは刺入したワイヤを介して直達するメカニカルストレスを定性的に尾椎に与えることができる(4)。我々は引っ張り方向への反復ストレスを尾椎にあたえ特に椎間部における脊椎靱帯の応答を観察した。

タイプ1の実験では20Nの伸張ストレスの反復負荷を3週間加えた個体より尾椎腹側を主とした軟部の肥厚と異所性骨化を確認することができた。組織所見では盛んな内軟骨性骨化の状態を呈していた。また新生軟骨の周囲では BMP-2 の発現も免疫染色により確認された。このことは純粋な伸張ストレスに対して椎間周囲軟部組織が肥厚，異所性骨化という形で応答することを意味している。この骨化形態は骨棘形成や靱帯骨化の際に見られるものと類似しているが，一方微小な骨端線損傷がその治癒機転において関与している可能性は否定できない。現状では伸張ストレスの影響によって生じる骨端線損傷とメカニカルストレスの影響によって生じる靱帯の骨化を分けて評価することが難しい。だが，一部のラットでは出現した骨化が椎体間にまでせり出すように発達したものもあり，伸張スト

レスの蓄積が骨化の形態発達に影響していると考えられた。

タイプ1の実験で対象とした第8, 9尾椎は一部に骨性突起を伴った円柱状の形をしており, 人間の体幹の脊椎とは形態を異にしている。したがってタイプ2では椎体と椎弓を伴った第3, 4, 5尾椎に着目し観察対象尾椎を変更した。同部では後縦靭帯や黄色靭帯の構造がはっきりしており, ヒトの脊椎を模擬する対象としてはより適当であると考えられ, 同部でも後縦靭帯付着部付近に旺盛な軟骨細胞の出現を認めた。

今後は *in vivo* での伸張ストレス負荷による形態的变化のみならず, OPLL の局所骨化促進因子といわれる BMP-2 を始めとした, TGF- β 1, IGF-I, およびそれらのレセプター類など各種サイトカインの動向を免疫染色, RT-PCR, *in situ hybridization* などの手法を導入することによって詳細に検証してゆくことが重要と考えられる。また人為的に BMP-2 を脊柱靭帯に投与して靭帯骨化を発生させたラット動物実験モデル(7)(8)や OPLL の疾患モデル動物である Zucker Fatty Rat (9), あるいは tiptoe-walking-Yoshimura mouse (twy mouse) (10) などを実験対象にすることにより, すでに発生した靭帯骨化がメカニカルストレスの影響によってどのように成長してゆくかを *in vivo* にて実証することも大変興味深いと思われる。

E. 結論

OPLL とメカニカルストレスとの関係を検証するために, ラット尾椎に反復する伸張ストレスを負荷する *in vivo* 実験系を開発した。20N の負荷により椎体周辺部に

異所性の骨化が確認された。また, ヒトの OPLL を模擬するには椎体, 椎弓を有する近位の尾椎を対象とした場合が有効であり, 同部においても組織学的には靭帯付着部周囲に軟骨細胞の出現を認めた。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の登録・出願状況

該当するものなし。

参考文献

1. Matsunaga S, Sakou T, Taketomi E, Nakanishi K. Effects of Strain Distribution in the Intervertebral Discs on the Progression of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligaments. *Spine* 1996;21:184-189
2. Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, Harata S, Motomura S. Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. *Bone* 2003;33:475-484
3. Nakanishi T, Marui T, Hitora T, Doita M, Nishida K, Kurosaka M. Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum via transforming growth factor-beta1
4. TJ Chambers, Mervyn Evans, Trevor N. Gardner, Alan Turner-Smith, Jade W.M. Chow. Induction of bone formation in rat tail vertebrae by mechanical loading. *Bone and Mineral* 1993;20:167-178
5. Ugo E. Pazzaglia, Luca Andrini, Amalia Di Nucci. The effects of mechanical forces on bones and joints. Experimental study on the rat tail. *J Bone Joint Surg [Br]* 1997;79-B:1024-1030
6. Jeffrey C. Lotz, Olivier K. Colliou, Jennie R. Chin, Neil A. Duncan, Ellen Liebenberg. Compression-induced degeneration of the intervertebral disc: An in vivo mouse model and finite-element study. *Spine* 1998;23:2493-2506
7. Miyamoto S, Takaoka K, Yonenobu K, Ono K. Ossification of the ligamentum flavum induced by bone morphogenic protein. *J Bone Joint Surg. [Br]* 1992;74-B:279-283
8. Hoshi K, Amizuka N, Sakou T, Kurokawa T, Ozawa H. Fibroblasts of spinal ligaments pathologically differentiate into chondrocytes induced by recombinant human bone morphogenic protein 2: Morphological examinations for ossification of spinal ligaments. *Bone* 1997;21:155-162
9. Okano T, Ishidou Y, Kato M, Imamura T, Yonemori K, Origuchi N, Matsunaga S, Yoshida H, Peter ten Dijke, Sakou T. Orthotopic ossification of the spinal ligaments of Zucker Fatty Rat: A possible animal model for ossification of the human posterior ligament. *J Orthop Res* 1997;15:820-829
10. Goto S. Pathogenesis of ossification of the spinal ligament. *Seikeigeka Mook* 1987;50:131-145 (in Japanese)

神経栄養因子に関する脊髄神経細胞の圧迫ストレス応答

福井大学医学部整形外科

内田 研造、馬場 久敏、小林 茂、彌山峰史、角山倫子

研究要旨

機械的圧迫ストレス存在下における脊髄神経細胞およびグリア系細胞の神経栄養因子発現を免疫組織化学的に調べた。Twy マウス脊髄では BDNF、NT-3、trkB、C 共に圧迫隣接部位ではコントロールの同部位と比較し、その発現量は高い値を示していた。In vitro 実験では astrocyte において、抗 GFAP/ BDNF 抗体陽性細胞はストレス時間に伴い比較的その数は保たれていた。経時的な観察により、残存する抗 GFAP 陽性細胞の immunoreactivity は高かった。機械的ストレスによって引き起こされるニューロンへの刺激伝達障害、アストロサイトによる神経栄養因子産生が誘因となり、各遺伝子発現パターンが変化し、その結果 autocrine, paracrine mechanism により、ニューロン生存、維持機構が作動していることが示唆された。

A. 研究目的

BDNF、NT-3 に代表される神経栄養因子は、特異的なレセプターを介してニューロンに作用し、神経突起の伸長促進、生存維持、分化誘導などの活性を示す蛋白分子である。近年、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。後縦靭帯骨化症にみられる慢性に圧迫をうける脊髄は高度の圧迫により脊髄断面積が縮小し、明らかな組織変性像を認めるにもかかわらず、その機能が維持されることが稀ではない。圧迫ストレス存在下における脊髄神経細胞およびグリア系細胞の神経栄養因子発現を免疫組織化学的に検討した。

B. 研究方法

1) in vivo 実験

対象には、生後 20 週齢の tw マウス 20 匹、正常対象群には同週齢の ICR マウス

6匹を用いた。ネブタール腹腔内注射後、2%パラホルムアルデヒド緩衝液(0.1MPBS)にて灌流固定後、直ちに延髄から第5頸髄までの脊髄を顕微鏡視下に摘出し、同固定液による1時間の後固定をおこなった。30%ショ糖緩衝液で48時間浸潤し、20 μ mの凍結横断連続切片を作製し、0.3%Triton X-100を含む0.1M Tris-HCL buffer、pH7.6、に24時間浮遊させた。一次抗体には著者らが作製した抗BDNF抗体(V-4:30000倍)、抗NT3抗体(V-4:30000倍)を用い、48時間4 $^{\circ}$ Cで反応させた後、biotinilated anti-rabbit IgG antibodies (Vecter lab .ABC elite kit)を添加、12時間4 $^{\circ}$ Cで反応させ、ABC法に準じて免疫染色をおこなった。発色はNi-DABで行い、可視化した。脊髄高位は便宜的にsiteA:C1前根より吻側部、siteB:C1前根より、C2後根まで(圧迫吻側部)、siteC:C2後根からC3後根まで(圧迫部)の3つに分け、評価した。

2) in vitro 実験

培養脊髄細胞は生後1-2日 Sprague-Dawley ラットより摘出した。Hank液排出後、5mlの0.25%トリプシンと5滴の0.2%DNase液を加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間保温した。培養液はDulbecco's Modified Eagle Medium (MEM)で、これに10%非働化ウマ血清、5mg/mLグルコース、ペニシリン100 U/ml、100ug/mlストレプトマイシンを添加し6日間培養した。細胞の機械的ストレスにはFX-3000TM-Flexercell Strain Unit (Flexorcell International Corporation, Hillsborough, NC)を使用した。細胞は3x10⁴/wellにてFlex I flexible bottomed plate (ストレス処置群)、Flex II flexible control plate (コントロール群)に播種し、5%CO₂ incubator内で機械的刺激を開始した。機械的ストレスは1秒間伸展/弛緩(最大20%牽引)を継続的に加えた。細胞障害の指標としてHank液中のnitric oxide(NO)、Lactate dehydro-genase(LDH)を測定した。NOはGriess法⁶⁾に準じ測定しそれぞれ経時的に観察した。刺激開始後、経時的に(1, 2, 6, 24, 48時間)細胞形態を観察した。細胞特異型マーカーとして、神経細胞は、Microtubule-Associated Protein 2a, b, c(MAP-2): mouse monoclonal antibody (NeoMakers)、アストロサイトはGlial Fibrillary Acid Protein (GFAP): rabbit polyclonal antibody (Sanbio)を用いてfluorescein (FITC)で識別、抗BDNF(santa cruz)、抗NT-3はrhodamineで標識し、double stainで評価した。

C. 研究結果

1) twy マウス脊髄の免疫組織学的検討

BDNF 抗体では ICR マウスでは、前角細胞、後角細胞、また介在ニューロンが染色され、白質では、軸索、グリア様細胞が染色された。TWY マウスでは、siteA では、コントロール群とほぼ同じ染色性であったのに対し、siteB では ICR や、siteA に比べ、神経細胞の染色性は増加していた。圧迫部位の siteC では染色は弱い傾向にあった。高度の圧迫例においてはその吻側部である siteB で強く染色され、白質ではグリア細胞、アストロサイト様細胞の出現がみられた。NT-3 抗体でもほぼ同様で、ICR マウスでは核が抜けた神経細胞が弱く染色され、TWY マウスでは、siteB では、コントロール群に対し、細胞体、樹状突起が強く染色され、圧迫部位の siteC では染色は siteA, siteB, ICR にくらべ染色性は弱かった。

2) 培養脊髄細胞に対するメカニカルストレス実験

neuron soma の縮小、細胞膜の肥厚、細胞間質の拡大が 6 時間以上のストレスで観察された。LDH、NO 値もその形態変化とほぼ一致して 6 時間以降で高値を示した。MAP2 陽性細胞数は、時間と共に減少するのに対し、GFAP 陽性細胞は比較的ストレスに対してその数は比較的保たれていた。MAP2 細胞同様に BDNF 陽性細胞も減少し、double stain の結果では、抗 MAP2/ BDNF 抗体陽性細胞はストレス時間に伴い数は減少していた。astrocyte については、抗 GFAP/ BDNF 抗体陽性細胞はストレス時間に伴い比較的その数は保たれていたが、経時的な観察により、残存する抗 GFAP 陽性細胞の immunoreactivity は高かった。抗 GFAP/NT-3 抗体陽性細胞の変化も同様であり、6 時間で immunoreactivity がピークに達していた。一方ニューロンの標識では、BDNF 同様、抗 MAP2/ NT-3 抗体陽性細胞数は減少していったが残存する MAP2 は高率で NT-3 陽性であった。

D. 考察

神経成長因子 (nerve growth factor) を代表とする神経栄養因子は、特異的レセプターを介してニューロンに作用し、神経突起の伸展促進、生存維持、分化誘導などの活性を示す蛋白性分子群で、BDNF、NT-3 はその代表的な蛋白とされている。中枢神経細胞損傷時の神経栄養因子の作用機序については、種々の報告がある。Suzuki ら 1) は海馬への kainate injection により、歯状回顆粒ニューロ