

ンの細胞体、樹状突起は増大し、その変化は BDNF mRNA 発現量に相関があったと述べた。また、Merlio ら 2) は、brain insult (虚血、外傷後てんかん) の際に BDNF, NT-3 のレセプターである trkB mRNA が増加し、Arendt ら 3) は慢性に進行する神経変性が、NGF 産生の機転となると報告している。

BDNF, NT-3 の前角ニューロンに関する作用を示唆する文献としては、Sendtner ら 4) は新生ラットの軸索断端に BDNF を投与し、コントロールに対し cell death を防ぐことができたとし、Yan ら 5) は成熟ラットの軸索損傷に伴う前角ニューロンの機能低下 (コリンアセチル転移酵素の活性低下) をこれらの蛋白が抑制できると報告している。Schnell ら 6) の脊髄損傷の実験では、NT-3 を損傷部に投与することによって皮質脊髄路の伸長に効果がみられたと報告している。Henderson ら 7) はラット胎生期において BDNF, NT-3 が運動ニューロンの生存を維持し、ニューロン内の mRNA の局在を証明した。本研究では圧迫部位 (siteC) に残存する前角ニューロンの抗 BDNF, NT-3 抗体の染色性は、ともに減弱していたのに対し、脊髄残余面積 (TRAS) が、その吻側部 (siteB) では、コントロールに比べ、強く染色され、特に抗 NT-3 抗体で強かった。また、圧迫が高度になるほど両者は著明に染色される傾向にあった。高度圧迫例において、特に吻側、尾側の特に白質部に抗 BDNF 抗体陽性のアストロサイト様細胞が出現していた。このことは、高度の脊髄圧迫において、BDNF はアストロサイトからも合成され、神経修復、再生に関与することを示唆するものである。

Flexercell strain unit は培養細胞に周期的牽引負荷を与えることができる細胞伸縮装置であり、筋肉細胞、血管内皮細胞、造骨細胞の mechanical signal のメカニズム解明に応用されてきた。神経細胞についての報告については ELLIS らの報告にはじまる 8, 9)。彼等の伸縮条件は伸縮率を 30-70% にし、50m秒のパルスで行っているが、これは生体内では存在し得ない条件であった。今回我々は予備実験の結果より伸縮率 15%、伸縮回数が毎秒 1 回程度の比較的軽度なストレス条件を設定した。今回の免疫染色の結果では、ニューロンでは、抗 MAP2/BDNF/、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 陽性細胞は高率で両抗体と共に陽性であった。一方アストロサイトは抗 GFAP/BDNF 抗体陽性細胞、抗 GFAP/NT-3 抗体陽性細胞共に細胞障害が生じる前の 6 時間の時点での immuno-reactivity が増加していた。この変化は機械的ストレスに対して、反応性アストロサイトが Neurotrophin 発現を増加させていることを意味する。今回の結果より培養細胞下での機械的ストレスに対するアストロサイトが

生存維持、機能修復に関与している可能性が示唆された。

#### E. 結論

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あるいはアストロサイトによる神経栄養因子産生が誘因になり、各遺伝子発現パターンが変化し、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。

#### 参考文献

- 1) Suzuki F, Junier M-P, Guilheim D, Sørensen J-C, Onteniente B (1995) Morphogenetic effect of kainate on adult hippocampal neurons associated with a prolonged expression of brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience* 64: 665-674
- 2) Merlio JP, Ernfors P, Kokaia Z, Middlemas DS, Bengzon J, Kokaia M, Smith MJ, Siesjö BK, Hunter T, Lindvall O, Persson H (1993) Increased production of trkB protein tyrosine kinase receptor after brain insults. *Neuron* 10: 151-164
- 3) Arendt T, Brukner MK, Pagliusi S, Krell T (1995) Degeneration of rat cholinergic basal forebrain neurons and reactive changes in nerve growth factor expression after chronic neurotoxic injury: I. Degeneration and plastic response of basal forebrain neurons. *Neuroscience* 65: 633-645
- 4) Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde Y-A (1992) Brain-derived neurotrophic factor prevents death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature* 360: 170-173
- 5) Yan Q, Elliot JL, Matheson C, Sun J, Zhang L, Mu X, Rex KL, Snider WD (1993) Influences of neurotrophins on mammalian motoneurons in vivo. *J Neurobiol* 24: 1555-1577
- 6) Schnell L, Schneider R, Kolbeck R, Barde Y-A, Schwab ME (1992) Neurotrophin-3 enhances sprouting of corticospinal tract during development and after adult spinal cord lesion. *Nature* 367: 170-173
- 7) Henderson CE, Camu W, Mettling C, Gouin A, Poulsen K, Karihaloo M, Rullamas J, Evans T, McMahon SB, Armanini MP, Berkemeier L, Phillips HS, Rosenthal A (1993) Neurotrophins promote motor neuron survival and are

present in embryonic limb bud. *Nature* 363: 266-270

8) Ellis EF, McKinney JS, Willoughby KA et al. A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes. *J. Neurotrauma* 1995; 12: 325-39

9) Rzigalinski BA, Weber JT, Willoughby KA, et al. Intracellular free calcium dynamics in stretch-injured astrocytes. *J Neurochem* 1995; 70: 2377-85

#### G. 研究発表

Kenzo Uchida, Hisatoshi Baba, Yasuhisa Maezawa, Shoei Furukawa, Nobuaki Furusawa, Shinich Imura. Histological investigation of spinal cord lesions in the spinal hyperostotic mouse (twy/twy): Morphologic changes in anterior horn cells and immunoreactivity to neurotrophic factors. *J Neurol* 245(12): 781-793, 1998.

Kenzo Uchida, Hisatoshi Baba, Yasuhisa Maezawa, Chikara Kubota, Progressive changes in neurofilament proteins and growth-associated protein-43 immunoreactivities at the site of cervical spinal cord compression in spinal hyperostotic mice. *Spine* 27(5): 480-486, 2002.

Kenzo Uchida, Hisatoshi Baba, Yasuhisa Maezawa, Shoei Furukawa, Makoto Omiya, Yasuo Kokubo, Hideaki Nakajima. Increased expression of neurotrophins and their receptors in the mechanically compressed spinal cord the spinal hyperostotic mouse (twy/twy). *Acta Neuropathol* 106: 29-36, 2003.

## 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)、塚原 聡(弘前大学整形外科)  
古島 弘三(弘前大学整形外科)、岡田 晶博(弘前大学整形外科)  
原田 征行(青森県立中央病院)、  
猪狩 勝則(東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター整形外科)  
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)  
藤 哲(弘前大学整形外科)

### 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、感受性領域への絞りこみに限界があるため、さらに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、ゲノムサイエンスが進歩し、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、近年著しく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/](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  $P < 0.05$  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

3700autosequencer (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。このように正當に収集、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 7 遺伝子、14 SNPs で  $P < 0.01$  の有意差を認めた。さらに詳細な関連解析とハプロタイプ解析の結果、表 1、2 に示すように collagen 6A1 (COL6A1) 遺伝子の変異とハプロタイプでより大きな統計学的有意差を認め、OPLL への関与が示唆された。

表 1

COL6A1 内変異のアレル頻度と関連解析結果

No.	Location	Nucleotide substitution	Allele Frequency		P
			OPLL	Non-OPLL	
1	5'UTR (-5)	G/C	.323 (n=314)	.262 (n=284)	.020
2	Intron2 (+651)	G/A	.217 (n=92)	.215 (n=86)	.958
3	Intron 2 (+758)	T/C	.352 (n=91)	.238 (n=86)	.019
4	Intron 3 (+1326)	C/T	.049 (n=92)	.068 (n=88)	.435
5	Intron 4 (+13)	A/C	.320 (n=86)	.227 (n=77)	.062
6	Intron 4 (+20)	G/C	.176 (n=85)	.132 (n=76)	.267
7	Intron 4 (+37)	A/G	.203 (n=64)	.089 (n=62)	.010
8	Intron 8 (-208)	G/C	.123 (n=312)	.087 (n=281)	.043
9	Intron 9 (+62)	T/C	.423 (n=300)	.346 (n=272)	.007
10	Intron 9 (+188)	C/G	.174 (n=290)	.133 (n=267)	.057

11	Intron 9 (-19)	G/A	.051 (n=89)	.084 (n=89)	.205
12	Exon 15 (+39)	T/C	.402 (n=331)	.310 (n=287)	.0008
13	Intron 15 (+39)	C/T	.264 (n=331)	.200 (n=285)	.008
14	Intron 18 (-138)	G/A	.031 (n=81)	.085 (n=59)	.048
15	Intron 19 (+27)	C/A	.137 (n=84)	.072 (n=83)	.053
16	Intron 19 (+116)	T/C	.455 (n=77)	.327 (n=78)	.021
17	Intron 19 (+361)	T/C	.043 (n=92)	.074 (n=88)	.219
18	Intron 19 (-152)	T/G	.132 (n=87)	.091 (n=77)	.238
19	Intron 20 (+745)	A/C	.133 (n=338)	.077 (n=297)	.001
20	Intron 20 (-32)	C/T	.417 (n=333)	.340 (n=296)	.005
21	Intron 21 (+18)	A/C	.340 (n=316)	.236 (n=277)	.00009
22	Intron 21 (-36)	A/G	.076 (n=79)	.026 (n=76)	.048
23	Intron 22 (+19)	G/C	.234 (n=92)	.264 (n=89)	.504
24	Intron 32 (-29)	T/C	.335 (n=336)	.216 (n=298)	.000003
25	Intron 33 (+15)	G/A	.124 (n=342)	.063 (n=292)	.0002
26	Intron 33 (+20)	A/G	.440 (n=342)	.329 (n=293)	.00005
27	Intron 33 (+55)	A/G	.439 (n=330)	.327 (n=278)	.00006
28	Intron 33 (+88)	C/T	.311 (n=323)	.252 (n=270)	.02
29	Exon 35 (+85)	G/A	.248 (n=322)	.199 (n=271)	.044
30	Exon 35 (+203)	G/A	.249 (n=321)	.199 (n=269)	.040
31	Exon 35 (+205)	C/T	.059 (n=321)	.065 (n=269)	.677
32	Exon 35 (+332)	C/T	.235 (n=321)	.180 (n=269)	.021

表 2

COL6A1 内 3 座位にて構築したハプロタイプ頻度検定

Haplotype <sup>a</sup>	Frequency		P
	OPLL (n=306)	Non-OPLL (n=270)	
H1(M/M/M)	0.548	0.647	0.0006
H2(m/m/m)	0.297	0.172	0.0000007
H3(M/M/m)	0.067	0.070	0.82
H4(M/m/m)	0.046	0.045	0.92
Others <sup>b</sup>	0.042	0.066	0.101

<sup>a</sup>M: major allele, m: minor allele; 3 座位は左から intron21(+18), intron32(-29), and intron33(+20)

<sup>b</sup>ハプロタイプ頻度が 3%未満

#### 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關する。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、連鎖解析の結果に基づいて SNP をマーカーとした関連解析を行い、最終的に *COL6A1* で最大有意差を認めた。*COL6A1* はその連鎖不平衡解析より遺伝子全体の連鎖不平衡は保たれているため、ここで確認し得た変異、もしくはそれと連鎖不平衡にある変異の OPLL への関与の可能性が強く示唆された。

#### E. 結論

ゲノム全域の連鎖解析と 21 番染色体テロメア領域の高密度マッピング、そして SNPs を用いた関連解析を行い *COL6A1* で OPLL への関与が示唆された。今後はこの遺伝子内の詳細な多型解析とそれに基づく機能解析により、さらに詳細な原因と治療の解明が必要である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Toshihiro Tanaka, Katsunori Ikari, Kozo Furushima, Akihiro Okada, Hiroshi Tanaka, Ken-Ichi Furukawa, Kenichi Yoshida, Toshiyuki Ikeda, Shiro Ikegawa, Steve Hunt, Jun Takeda, Satoshi Toh, Seiko Harata, Toshiaki Nakajima, and Ituro Inoue. Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses pinpoint the ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine to *COL6A1* locus on chromosome 21. *Am. J. Hum. Genet.* 73, 812-822, 2003.

#### 2. 学会発表

##### 第 87 回弘前医学会総会

##### 脊椎後縦靭帯骨化症の感受性遺伝子解析

田中利弘<sup>1</sup>、猪狩勝則<sup>2</sup>、古島弘三<sup>1</sup>、岡田晶博<sup>1</sup>、古川賢一<sup>3</sup>、小宮節郎<sup>4</sup>、中島敏晶<sup>5</sup>、井ノ上逸朗<sup>5</sup>、原田征行<sup>6</sup>、藤哲<sup>1</sup>

1弘前大学整形外科、2東京女子医科大学附属膠原病リウマチ痛風センター整形外科

3弘前大学薬理学、4鹿児島大学整形外科、5東京大学医科学研究所ゲノム情報応用診断

6青森県立中央病院

平成 15 年 6 月 14 日 三沢市公会堂 (三沢市)

#### 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

## 後縦靭帯骨化症患者由来脊柱靭帯細胞に対する メカニカルストレスの影響のトランスクリプトーム解析

岩澤智宏（弘前大学・整形外科）、岩崎弘英（弘前大学・整形外科）

澤田利匡（弘前大学・整形外科）、岡田晶博（弘前大学・整形外科）、藤哲（弘前大学・整形外科）

古川賢一（弘前大学・薬理学）、元村成（弘前大学・薬理学）

植山和正（弘前記念病院・整形外科）

原田征行（青森県立中央病院）

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）は多因子疾患であり、その骨化発症・伸展に関して局所因子であるメカニカルストレスが一因であるとされている。本研究では OPLL 患者由来および非 OPLL 脊椎疾患患者由来の培養脊柱靭帯細胞にメカニカルストレスを加え、それによる遺伝子発現の差異を cDNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を施行し網羅的に解析した。OPLL 患者由来細胞を用いた cDNA マイクロアレイでは、当教室でこれまでにメカニカルストレスとの関連を報告してきた Bone Morphogenetic protein(BMP)-2 や Prostaglandin I<sub>2</sub>(PGI<sub>2</sub>) synthase、OPLL の原因遺伝子として報告された type 11 Collagen alpha 2 を含む多数の骨関連遺伝子の発現増加を認めた。

その中で今回我々は、強力な血管収縮物質として知られている endothelin-1(ET-1)が alkaline phosphatase(ALP)等の骨関連遺伝子と同程度の発現増加を認めたため、RT-PCR 法や ELISA 法を用いて詳細な機能解析を施行した。RT-PCR 法ではメカニカルストレスの経時的負荷により ET-1 の発現増加が認められた。また、ET-1 と選択的に結合することが報告されている受容体サブタイプ A の発現増加も認められた。一方、受容体サブタイプ B は発現を殆ど認めなかった。OPLL、非 OPLL 患者由来細胞に直接 ET-1 を添加し、骨化マーカーである ALP の発現を調べた実験では、OPLL 患者由来細胞で ET-1 添加濃度依存性に ALP の発現量が増加し、100 nM 添加で有意差を認めた。非 OPLL 患者由来細胞では発現量の変化を認めなかった。また、OPLL 患者由来細胞に受容体 A,B それぞれの選択的拮抗薬を添加した実験では、受容体 A 選択的拮抗薬添加によって ALP の発現量が有意に抑制された。ELISA 法では OPLL 患者由来細胞でのみ、メカニカルストレス負荷により ET-1 の分泌量が増加した。

ET-1 は文献報告では血管内皮細胞にて PGI<sub>2</sub> の放出を誘発することが報告されているが、OPLL 細胞では、ET-1 負荷により濃度依存性に PGI<sub>2</sub> の発現量が増加し、ET-1 の 30 および 100 nM 添加で有意差を認めた。我々は以前に OPLL 患者由来細胞における、メカニカルストレス負荷による PGI<sub>2</sub> を介した骨化機構を報告しており、その関連性が示唆された。

以上の結果より、cDNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析により、メカニカルストレス負荷にて OPLL の発症・伸展に関与することが報告された遺伝子について改めて確認されたとともに、OPLL 患者由来細胞ではメカニカルストレスにより ET-1 の発現が mRNA レベル・タンパクレベルとともに増加し、ET 受容体 A や PGI<sub>2</sub> の介在するパラクライン機構を介して、靭帯の骨化機構が促されることが示唆された。



## A. 研究目的；

脊柱後縦靭帯骨化症は、遺伝的要因や環境因子が関与する多因子疾患であり(1-5)、脊柱靭帯にかかるメカニカルストレスもその一因であると推定されている(6-10)。本研究では OPLL 患者および非 OPLL 患者由来のヒト脊柱靭帯培養細胞にメカニカルストレスを負荷し、cDNA マイクロアレイを用いて発現を変化させる遺伝子のトランスクリプトーム解析を施行することによりその遺伝子の 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

### 1. ヒト脊柱靭帯細胞の単離と培養

弘前大学医学部倫理委員会の承認ならびに術前に患者、その家族に十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得た上で術中に摘出した OPLL 患者、非 OPLL 患者の脊柱靭帯組織から骨化部分を除き outgrowth 法にて靭帯細胞を単離し、10%FBS 添加 DMEM 培地中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下にて培養した。

### 2. 伸展刺激（メカニカルストレス）負荷

継代5代目の脊柱靭帯細胞を 0.1%ゼラチンコーティングした伸縮性シリコンチャンバーに播種した。コンフルエント到達後 1%FBS 添加 DMEM 培地にて 24 時間インキュベートした後、伸展刺激負荷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。

### 3. cDNA マイクロアレイ

OPLL 細胞に伸展刺激を加えたものと刺激を加えなかったもの、それぞれから総 RNA を回収し、ヒト cDNA マイクロアレイ(Agilent 社製)を用いて、約 1 万 8 千クロンの遺伝子を対象に、伸展刺激負荷の有無により発現に差が認められる遺伝子についてスクリーニング(トランスクリプトーム解析)を施行した。

### 4. RT-PCR 法

ET-1、ET-2、ET 受容体サブタイプ A ならびに B の mRNA 量を RT-PCR 法にて定量した。

### 5. 添加実験

OPLL 細胞、非 OPLL 細胞に ET-1 をそれぞれ 10、30、100nM、9 時間添加し、ALP ならびに PGI<sub>2</sub> の mRNA 量を RT-PCR 法にて定量した。また、受容体 A ならびに B に対する拮抗薬による ALP の発現量についても検討した。

## 6. ELISA 法

ELISA 法を用いて蛋白レベルにおけるメカニカルストレスによる ET-1 発現量について検討した。

## C. 研究結果

### 1. cDNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析

異なる OPLL 患者の脊柱靭帯組織から調製した 4 つの細胞サンプルを用いて検討したが、いずれも同様に伸展刺激によって様々な遺伝子の発現増加ならびに減少を認めた。OPLL の原因遺伝子として報告されている type I1 collagen alpha 2 や type 6 collagen alpha 1、骨化マーカーである ALP や BMP-2、BMP-4 等で発現増加を認めた(Table. 1)。そこで伸展刺激によって著明な発現増加を示した遺伝子の一つである ET-1 並びにその関連遺伝子(Table.2)の発現変化を RT-PCR で詳細に解析した。

### 2. RT-PCR 法による解析

OPLL 細胞ではメカニカルストレスによって ET-1 の mRNA 量が経時的に有意に増加したが(Figure 1)、ET-2 はその発現を認めなかった。受容体サブタイプ A は未刺激の細胞で十分な発現を認めたが、伸展刺激でもそのレベルは変化しなかった(Figure 2)。一方、サブタイプ B ではごくわずかの発現を認めたにとどまり、伸展刺激で減少する傾向が認められた(Table 3)。しかし、非 OPLL 細胞では ET-1 および 2, ET 受容体サブタイプ A および B のいずれの遺伝子も OPLL と発現のレベルに違いはないものの、メカニカルストレスによる発現の変化はまったく認められなかった。

### 3. 添加実験

OPLL 細胞では ET-1 100 nM、9 時間添加で、ALP ならびに PGI<sub>2</sub> の mRNA 量の有意な増加を

認めましたが、非 OPLL 細胞ではどちらの発現量の変化も認めなかった(Figure 4, 6)。また、受容体 A 拮抗薬によりその ALP の mRNA 量が有意に減少したが、受容体 B 拮抗薬では減少を認めたが有意差は認めなかった(Figure 5)。

#### 4. ELISA 法

OPLL 細胞では、伸展刺激により ET-1 の発現量が約 5 倍に増加していたが、非 OPLL 細胞では変化を認めなかった(Figure 7)。

#### D. 考察

OPLL 細胞に対するメカニカルストレス負荷により発現量の変化する遺伝子についてトランスクリプトーム解析を施行したという報告はまだない。メカニカルストレス負荷で骨形成関連遺伝子を含め、多数の遺伝子が発現を変化させており、メカニカルストレスが靭帯細胞の機能発現に強く影響することが示唆された。発現を増加させた遺伝子の中で、今回は ET-1 に注目した。ET-1 は脳、腎臓および血管内皮や平滑筋組織に見られ、血管収縮作用および血管平滑筋細胞増殖作用を有することが知られているが(11)、骨形成原細胞の増殖と遊走を調節しているとの報告もある(12)。また ET-1 は主に ET 受容体 A を介してその作用を発現すること、PGI<sub>2</sub> の放出を誘発することが報告されている。以前に我々はメカニカルストレス負荷による PGI<sub>2</sub> を介した骨化機構を報告している(13)。今回の実験結果から、OPLL 細胞ではメカニカルストレスにより ET-1 の発現が mRNA レベル・蛋白レベルとともに増加し、ET 受容体 A や PGI<sub>2</sub> の介在するパラクライン機構を介して、靭帯の骨化進展が促されることが示唆された。

#### E. 結論

OPLL 患者ではメカニカルストレス負荷によって産生された ET-1 が関与しており、その細胞内伝達には ET 受容体 A や PGI<sub>2</sub> が関与していることが示唆された。

#### G. 学会発表

- ・第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会
- ・第 77 回日本薬理学会年会
- ・50th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society

#### 参考文献；

- 1) Yamamoto Y, Furukawa K-I, Ueyama K, Nakanishi T, Takigawa M, Harata S (2002) Possible roles of CTGF/Hcs24 in the initiation and development of ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine* 27:1852-1857.
- 2) Numasawa T, Koga H, Ueyama K, Maeda S, Sakou T, Harata S, Leppert M, Inoue I (1999) Human retinoic X receptor beta: complete genomic sequence and mutation search for ossification of posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res* 14:500-508.
- 3) Furushima K, Shimo-Onoda K, Maeda S, Nobukuni T, Ikari K, Koga H, Komiya S, Nakajima T, Harata S, 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.
- 4) 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.
- 5) Tanaka T, Ikari K, Furushima K, Okada A, Tanaka H, Furukawa K-I, Yoshida K, Ikeda T, Ikegawa S, Hunt SC, Takeda J, Toh S, Harata S, Nakajima T, 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 Genet* 73:812-822.

- 6) Matsunaga S, Sakou T, Taketomi E, Yamaguchi M, 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.
- 7) 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.
- 8) 古川賢一ら(2002) 脊柱後縦靱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.
- 9) Tanno M, Furukawa K-I, Ueyama K, Harata S, Motomura S (2003) Uniaxial cyclic stretch induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. *Bone* 33:475-484.
- 10) Iwasaki K, Furukawa K-I, Tanno M, Kusumi T, Ueyama K, Tanaka M, Kudo H, Toh S, Harata S, Motomura S (2003) Uni-axial Cyclic Stretch Induces Cbfa1 Expression in Spinal Ligament Cells Derived from Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. *Calcif Tissue Int* *in press*.
- 11) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988) A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial Nature 332:411-415.
- 12) Sasaki T, Hong MH (1993) Endothelin-1 localization in bone cells and vascular endothelial cells in rat bone marrow. *Anat Rec* 237:332-337.
- 13) Ohishi H, Furukawa K-I, Iwasaki K, Ueyama K, Okada A, Motomura S, Harata S, Toh S 2003 Role of Prostaglandin I<sub>2</sub> in the gene expression induced by mechanical stress in spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Pharmacol Exp Ther* 305:818-824.

TABLE 1. cDNA マイクロアレイにおける骨関連遺伝子の発現状況

<i>Primary Name</i>	<i>AccessionNum</i>	<i>Mean Ratio</i>
collagen, type I, alpha 1	AW577407	3.117
collagen, type I, alpha 2	AF004877	0.908
collagen, type II, alpha 1	AW410427	1.104
collagen, type V, alpha 2	Y14690	2.137
collagen, type VI, alpha 1	X99135	1.038
collagen, type VIII, alpha 1	NM_001850	3.348
collagen, type IX, alpha 2	M95610	1.821
collagen, type X, alpha 1	AL121963	1.708
collagen, type IX, alpha 3	L41162	3.220
collagen, type XI, alpha 1	J04177	2.304
Human alpha-2 type XI collagen mRNA (COL11A2).	J04974	3.029
collagen, type XVIII, alpha 1	AF018082	3.266
secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)	D14813	1.899
bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (osteocalcin)	X04143	1.986
osteoclast stimulating factor 1	AW902059	1.104
cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	NM_001797	2.889
bone morphogenetic protein 1	NM_006129	3.282
bone morphogenetic protein 2	M22489	2.412
bone morphogenetic protein 4	U43842	1.939
bone morphogenetic protein 5	M60314	4.389
bone morphogenetic protein 6	M60315	2.116
bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1)	X51801	1.878
bone morphogenetic protein receptor, type IA	Z22535	2.202
bone morphogenetic protein receptor, type IB	U89326	2.563
bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	NM_001204	2.367
connective tissue growth factor	U14750	3.200
insulin-like growth factor 1 (somatomedia C)	X57025	2.612
insulin-like growth factor 1 receptor	X04434	3.389
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	S77035	1.022
insulin-like growth factor 2 receptor	Y00285	3.424

(continued)

parathyroid hormone	W39202	3.094
parathyroid hormone receptor 1	U17418	1.723
vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	AI874346	2.941
estrogen receptor 1	M12674	3.017
estrogen-related receptor alpha	L38487	1.188
estrogen-related receptor gamma	AB020639	3.981
calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	M26095	1.956
vascular endothelial growth factor	AW173461	3.330
transforming growth factor, beta 1	X02812	2.966
transforming growth factor, beta 2	Y00083	2.762
transforming growth factor, beta 3	X14885	1.511
transforming growth factor, beta receptor I	L11695	2.727
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	AL050393	1.096
alkaline phosphatase, liver/bone/kidney	AB011406	2.143
Homo sapiens mRNA for alkaline phosphatase, partial cds	AB012642	1.780
prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	D83402	2.384
prostaglandin I2 (prostacyclin) receptor (IP)	D25418	2.377

---

AccessionNum, Accession Number of GenBank Database (NCBI); Mean Ratio, ratio of the signal of stretched sample to that of un-stretched sample in four OPLL cells.

TABLE 2. cDNA マイクロアレイにおけるエンドセリンの発現状況

<i>Primary Name</i>	<i>AccessionNum</i>	<i>Mean Ratio</i>
endothelin converting enzyme 1	AL031005	4.390
endothelin 2	M65199	3.248
endothelin receptor type B	D13168	3.115
endothelin receptor type A	D90348	2.940
endothelin receptor type B	D90402	2.659
endothelin 1	NM_001955	2.550
endothelin receptor type A	D90348	2.220
endothelin 1	S56805	2.146
endothelin converting enzyme 1	Z35307	1.639

AccessionNum, Accession Number of GenBank Database (NCBI); Mean Ratio, ratio of the signal of stretched sample to that of un-stretched sample in four OPLL cells.

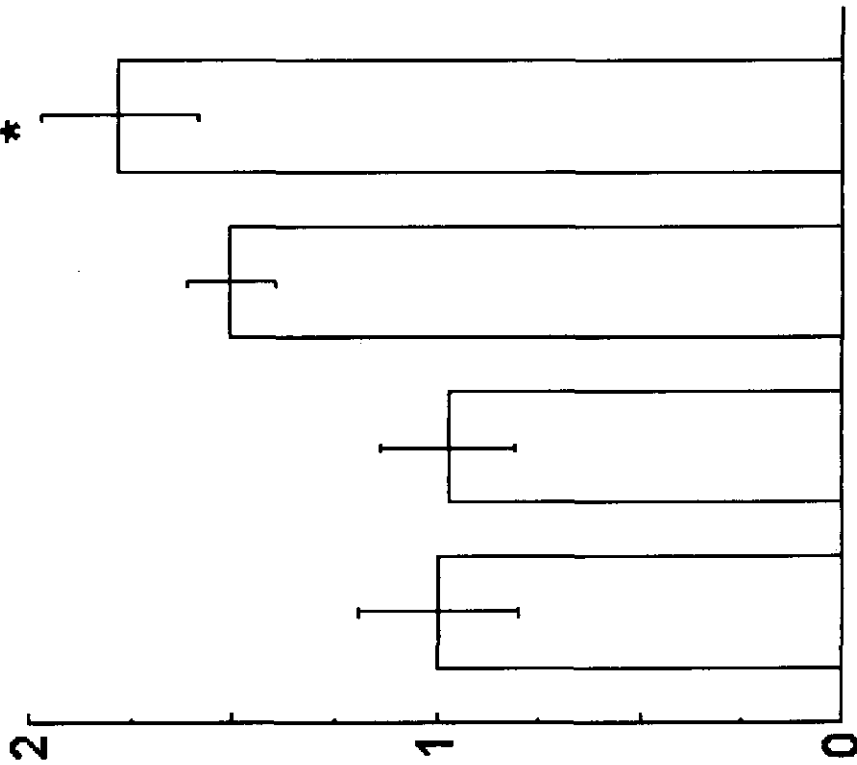
OPLL



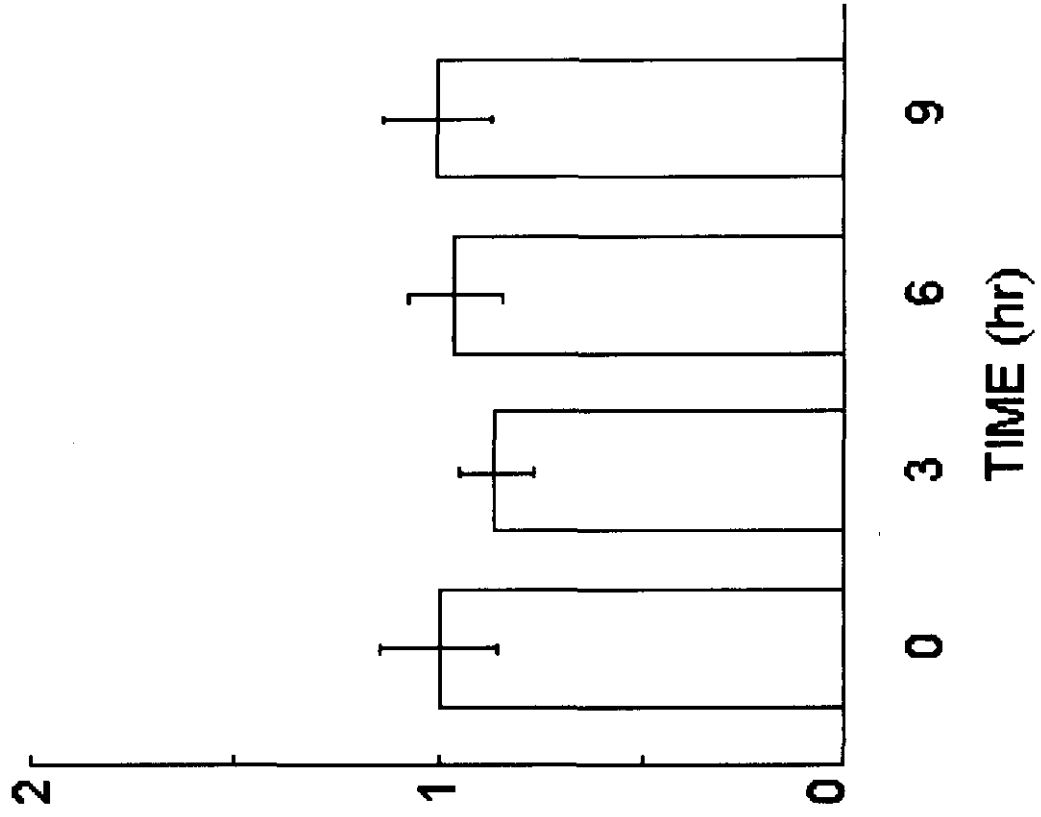
NON-OPLL



FOLD INCREASE IN  
ET-1/G3PDH



FOLD INCREASE IN  
ET-1/G3PDH



TIME (hr)

TIME (hr)

図1. メカニカルストレス負荷によるET-1 mRNAの発現

OPLL

NON-OPLL

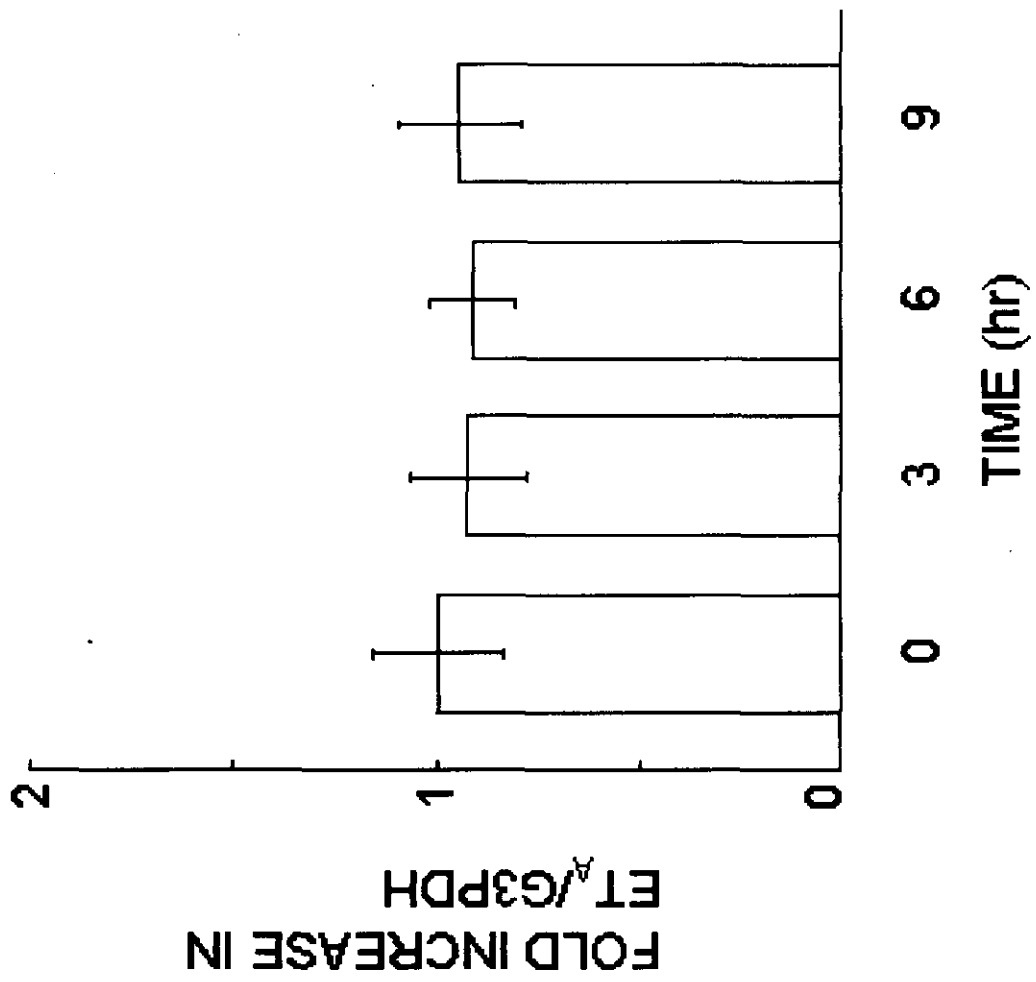
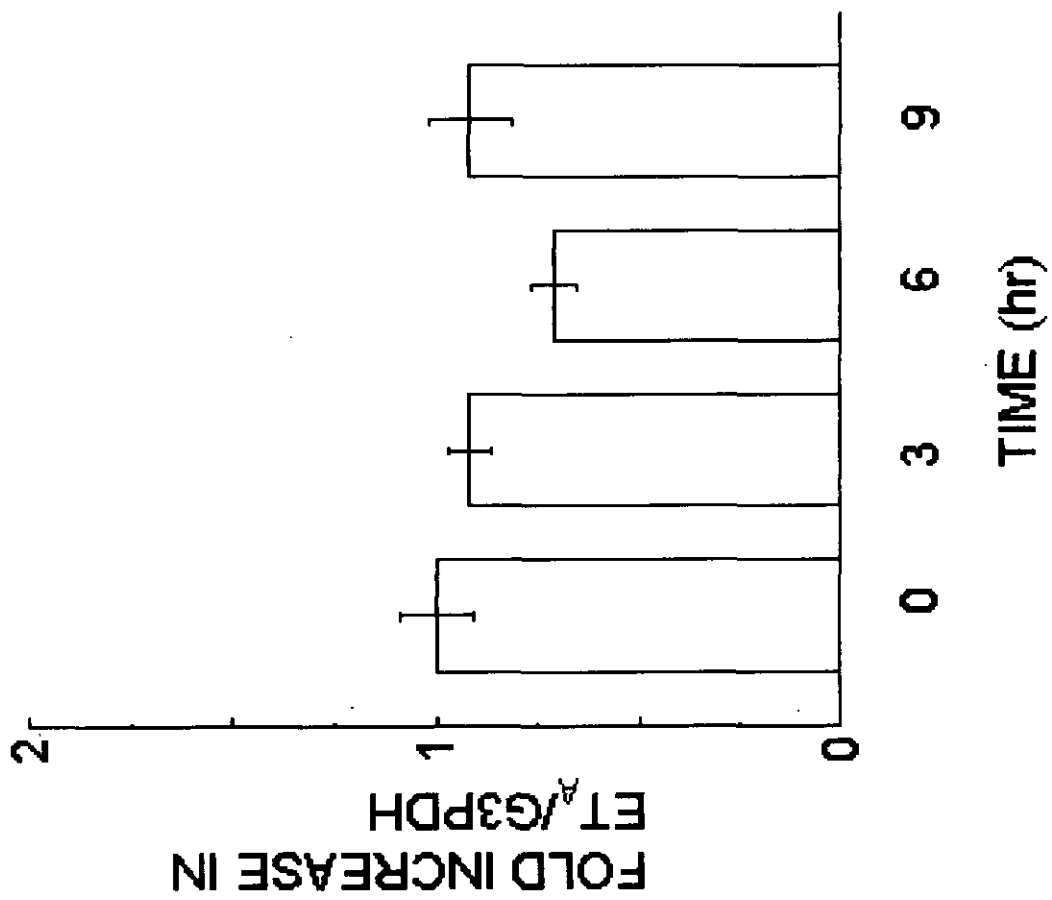


図2. メカニカルストレス負荷によるET受容体A mRNAの発現



OPLL



NON-OPLL

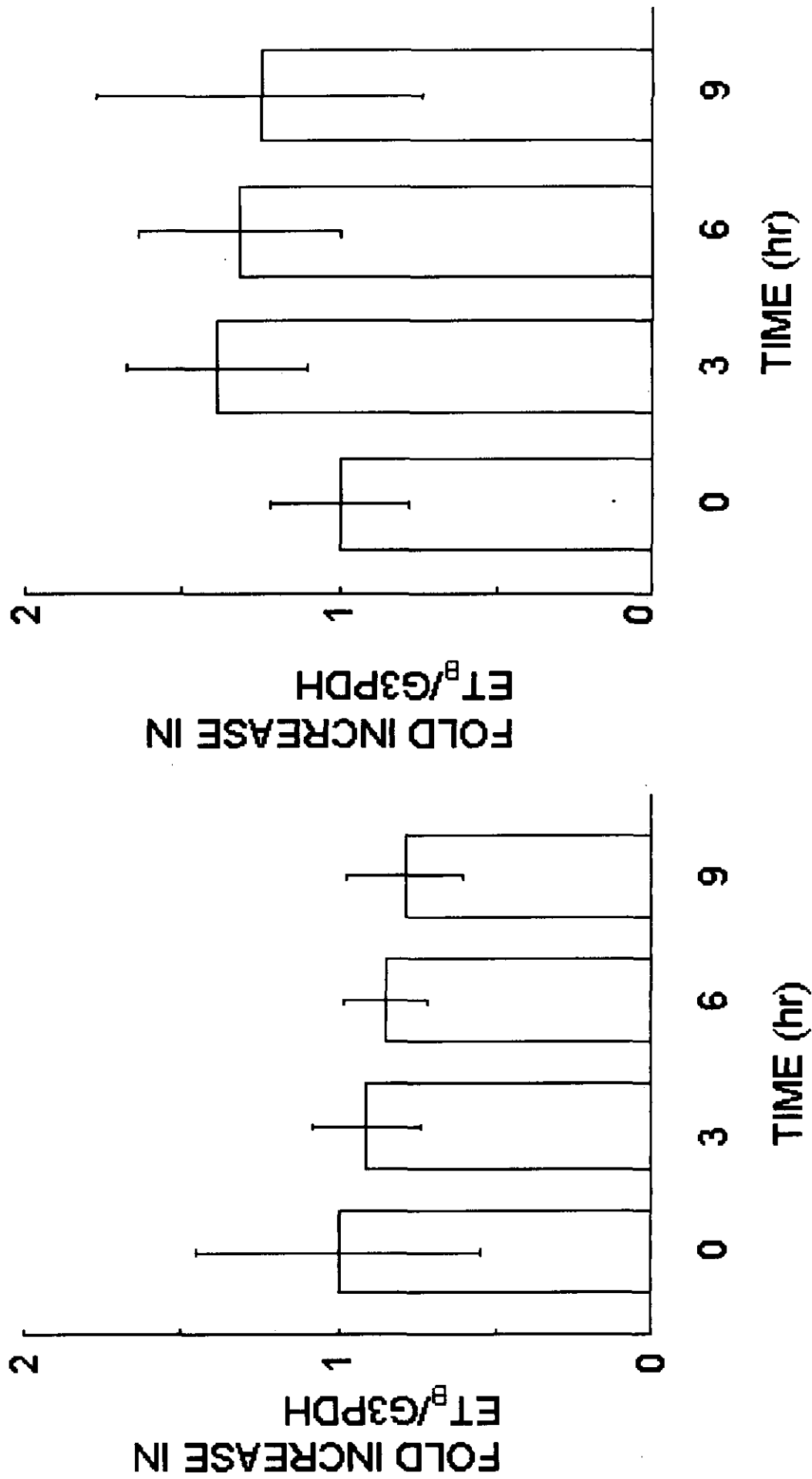


図3. メカニカルストレス負荷によるET受容体B mRNAの発現

OPLL



NON-OPLL

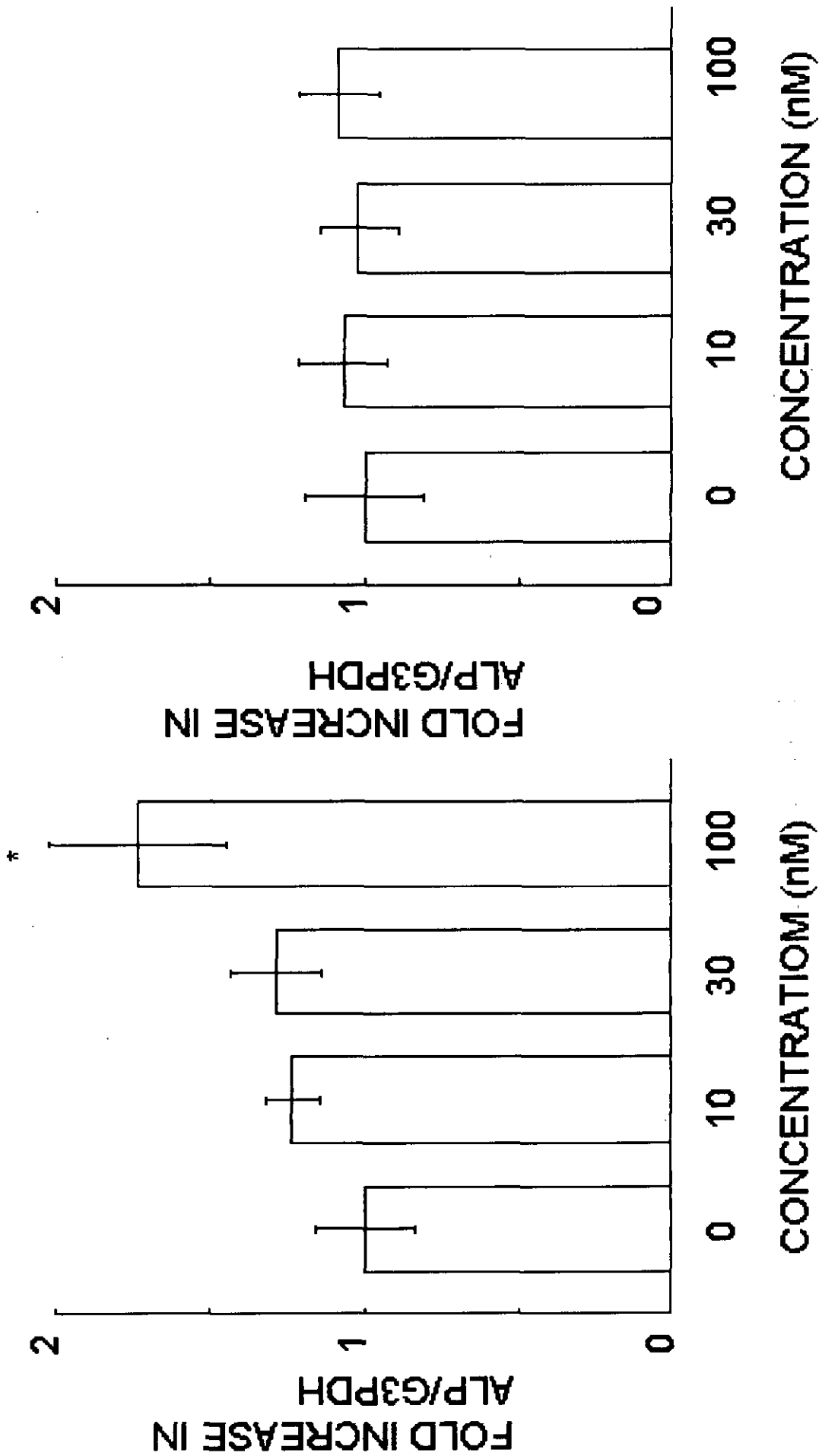


図4. ET-1添加によるALP mRNAの発現

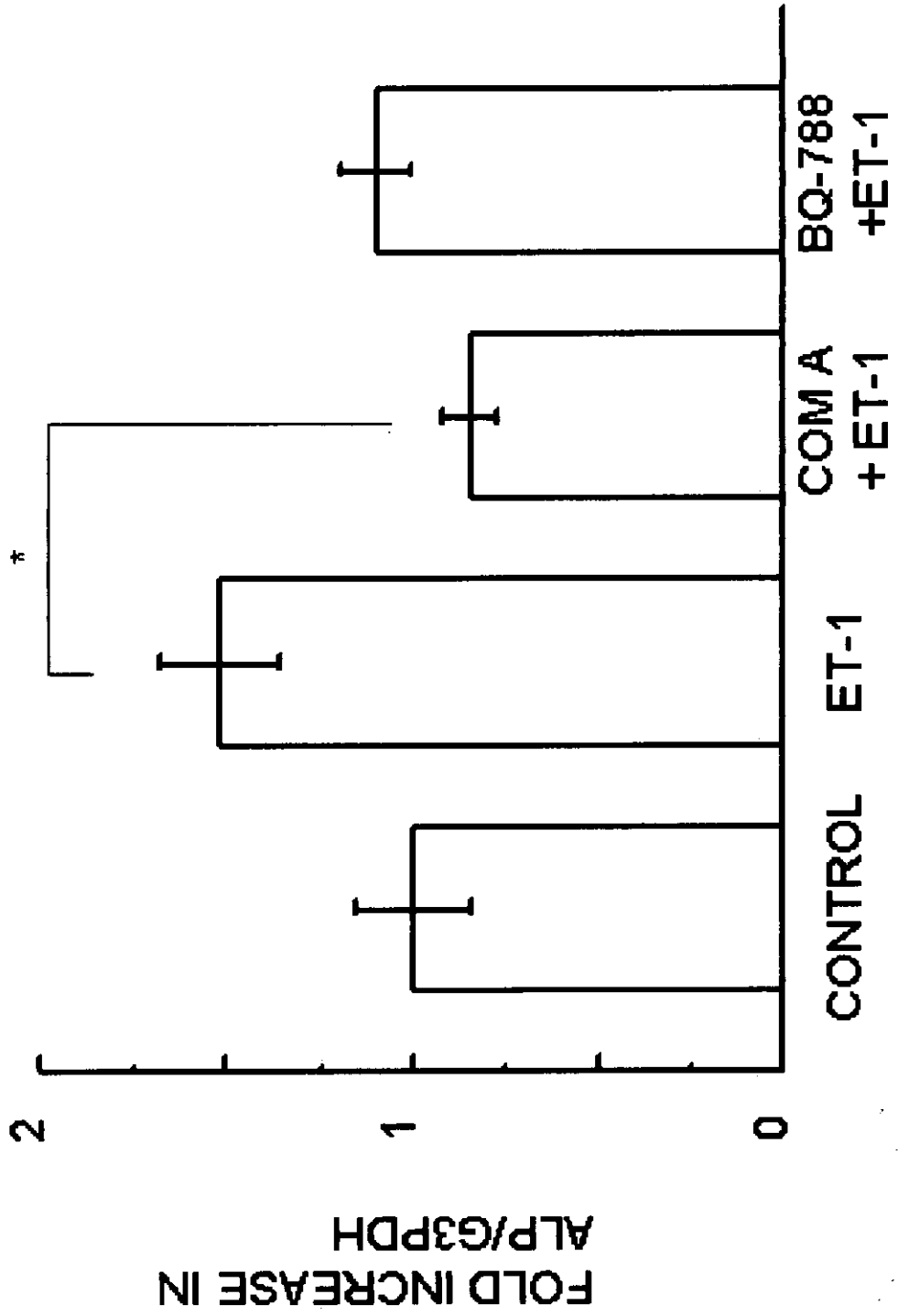


図5. ET受容体拮抗薬存在下でのALP mRNAの発現

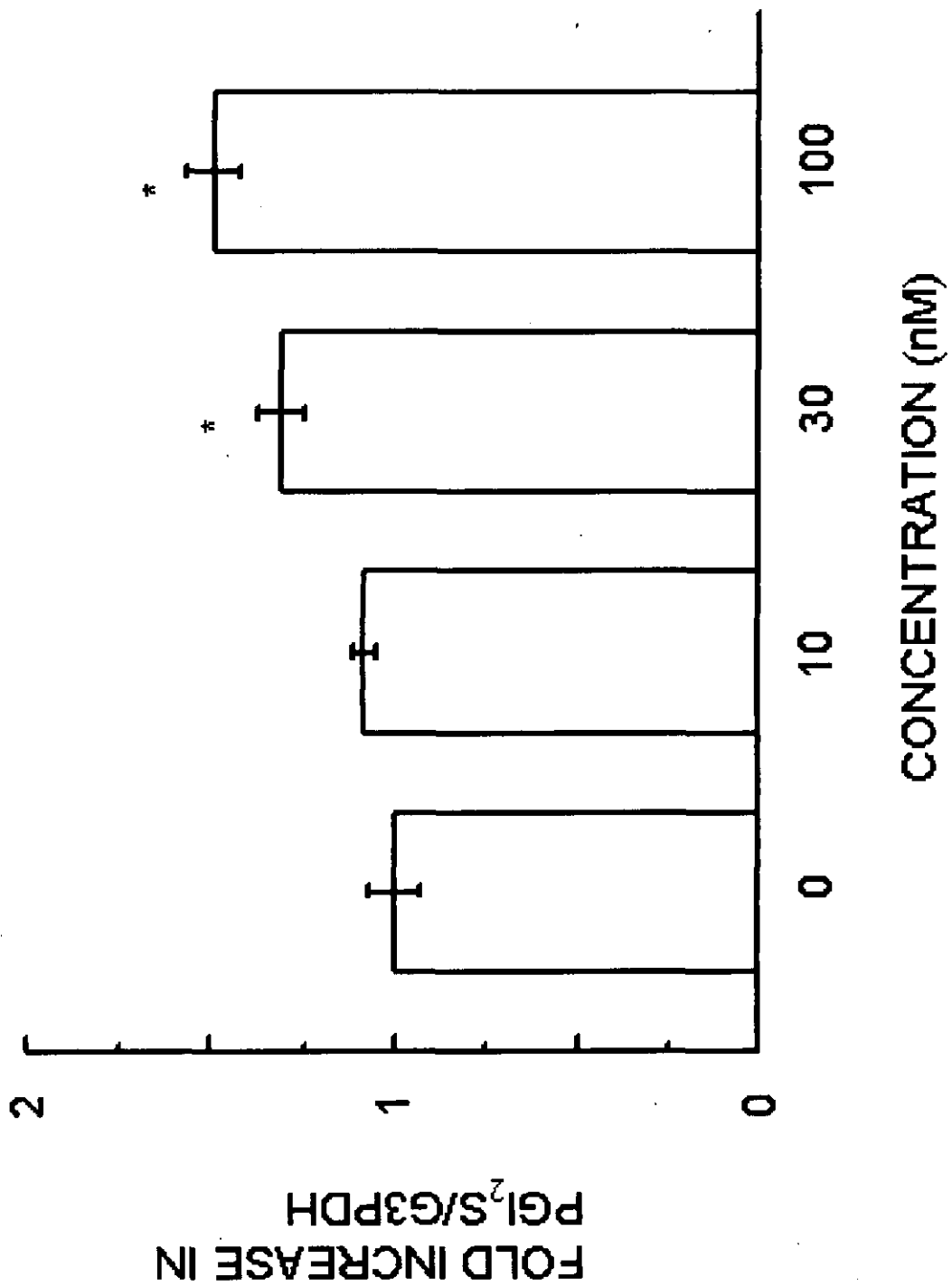


図6. ET-1添加によるPGI<sub>2</sub> synthase mRNAの発現