

図7. ELISA法によるET-1の発現量解析

海綿骨由来の間葉幹細胞に関する研究

分担研究者 四宮謙一 東京医科歯科大学医歯学総合研究科教授

研究要旨 海綿骨からコラゲナーゼ処理して遊離する細胞は、骨髄液由来接着系細胞と同等の増殖能と多分化能を有する。海綿骨は間葉幹細胞源として有用である。

A. 研究目的

海綿骨をコラゲナーゼ処理し得られる骨残渣を組織培養して間葉幹細胞を採取する方法が2002年より2つの施設から報告されている。一方、海綿骨をコラゲナーゼ処理し遊離する細胞はこれまで間葉幹細胞の観点からは関心がもたれていない。我々はこの細胞が血管・細胞・脂肪・骨芽細胞系細胞由来であることに着目し、これが間葉幹細胞源になると仮説を立て、骨髄液由来接着系細胞と比較検討した。

B. 研究方法

術前に承諾を得られた膝前十字靭帯再建術(n=6)及び人工膝置換術(n=6)の際に採取した海綿骨の一部(20-70mg)を洗浄し血球系細胞を十分除いた後、コラゲナーゼ処理をして遊離した細胞及び18G針で脛骨より採取した骨髄液をディッシュ上に播種し、それぞれの収量、増殖・分化能、表面抗原、遺伝子発現を比較した。

C. 研究結果

海綿骨由来細胞、骨髄液由来細胞共に低密度で播種すると、14日後に1細胞由来と考えられる直径5-10mm程度の多数の細胞コロニーを形成した。増殖、軟骨・脂肪分化、石灰化能はいずれも同一ドナー間で同等であった。14種類の表面抗原中、ICAM-1とVCAM-1の割合が海綿骨由来細胞で高かった。海綿

骨由来細胞は培養とともに骨芽細胞及び脂肪細胞関連遺伝子発現が低下し、幹細胞関連のものが増強した。

D. 考察

文献上1g由来の骨残渣から4週間で200万細胞が確保されているが、我々の方法では2週間で平均4000万細胞の採取が可能である。

E. 結論

海綿骨からコラゲナーゼ処理して遊離する細胞は、骨髄液由来接着系細胞と同等の増殖能と多分化能を有する。少量の海綿骨からも十分な細胞数を確保でき、海綿骨は有用な幹細胞源である。

G. 研究発表

1. 論文発表

国際的な学術誌に投稿中

2. 学会発表

2003 Mesenchymal and

Nonhematopoietic Stem Cell Meeting

2003 東日本整形災害外科学会

2003 日本整形基礎学会

2004 Orthopaedic Research Society

2004 再生医療学会

耐糖能異常下における骨化関連因子の検討(経過報告)

渡辺 淳(東京医科大学整形外科学教室) 山本謙吾(東京医科大学整形外科学教室)
木村 大(東京医科大学整形外科学教室) 久保宏介(東京医科大学整形外科学教室)
今給黎篤弘(東京医科大学整形外科学教室)

【研究要旨】

脊柱靱帯骨化の発生機序は未だ不明な点が多いが、耐糖能異常に伴い発生する頻度が高いことが知られている。また新生仔 Rat に Monosodium L-Glutamate を投与すると、視床下部満腹中枢が破壊され、後天的にインスリン非依存性糖尿病が発症することが知られている。

本研究では、Monosodium L-Glutamate 投与 Rat を用い、糖代謝異常と脊柱靱帯骨化との関係を免疫組織学的に検討した。本研究では異所性骨化誘導因子である recombinant human bone morphogenetic protein-2 を Rat 下肢筋層間に挿入し、異所性骨化発現を経時的に解析し、糖代謝異常下における骨化関連因子の経時的変化を検討した。その結果 BMP-2 挿入 2 週にて Zucker Fatty Rat 群及び Monosodium L-Glutamate 投与 Wistar Rat では軟 X 線・骨密度・HE 染色において生理食塩水投与 Wistar Rat に較べ、明らかな有意差を確認することができた。

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化モデル動物である Zucker Fatty Rat は、食欲調節因子であるレプチンのレセプター遺伝子異常により、摂食が抑制されず、過食、高血糖、高インスリン血症をきたし NIDDM を発症する動物であり、脊柱靱帯骨化にインスリンが関与することが示唆されている。我々は昨年、Wistar 系新生仔 Rat に Monosodium L-Glutamate を投与し視床下部食欲中枢を破壊することにより摂食が抑制されず、Zucker Fatty Rat と類似した過食、高血糖、高インスリンを呈する Rat を作製し、免疫組織学的に検討した。その結果、明らかな脊柱靱帯骨化傾向は認められず、インスリンは骨化自体よりも、むしろ遺伝的な素因を含む何らかの骨化素因の存在下で骨化増強因子としての作用があることを報告した。

今回、異所性骨化誘導因子である recombinant human bone morphogenetic protein-2(以下 rhBMP-2)を Rat 筋層間に挿入し、異所性骨化発現を経時的に解析し、糖代謝異常下における骨化関連因子の経時的変

化を検討した。

B. 研究方法

実験動物として Wistar 系 Rat より分娩された新生仔 Rat に出生日より 5 日間 Monosodium L-Glutamate(4mg/g 体重/日)を連日皮下投与した Rat 群(以下 MSG 群)、同量の生理食塩水を注入した Rat 群(以下生食群)、ならびに Zucker Fatty Rat(以下 ZFR 群)を用い、対象は 4 カ月齢以降の各 40 匹とした(図 1)。



(図 1)

ケタラルール(1ml 中に塩酸ケタミンを 57.6mg

含有;三共株式会社)とセクラール(25ml 中にキシラジン塩酸塩を 583mg 含有;パイエル株式会社)を 1:1 の割合で混合し、0.6~0.7ml/kg で腹腔内注入し、全身麻酔を施行。rhBMP-2(山之内製薬より提供) 5 μ g を LF6 緩衝液(5mM グルタミン酸、5mM 塩化ナトリウム、2.5%グリシン、0.5%精製白糖、0.01%ポリソルベート 80)にて希釈の後に polymer-coated gelatin sponge(山之内製薬より提供)4 mm立方に吸収させ、これを Rat 下肢筋層間に挿入。4%パラフォルムアルデヒドを用いて環流固定を行ない、4日、1週、2週、4週にて sponge を取り出し、以下の項目につき比較検討した。

1. 採血による血液検査。
2. 軟 X 線撮影(GE 社 Sonographe DMR)ならびに X-Rite 社 331 を用いての X 線透過性測定。
3. 骨密度撮影(NORAND 社 XR-26)。
4. 4%パラフォルムアルデヒド中で 4 $^{\circ}$ C、24 時間固定を行なう。固定後、10%EDTA にて 96 時間脱灰し、パラフィン包埋後、連続冠状断切片を作成する。作成した切片に対し HE 染色を施行した。

(倫理面への配慮)

東京医科大学動物実験倫理委員会の規定に基づき実験を施行した。

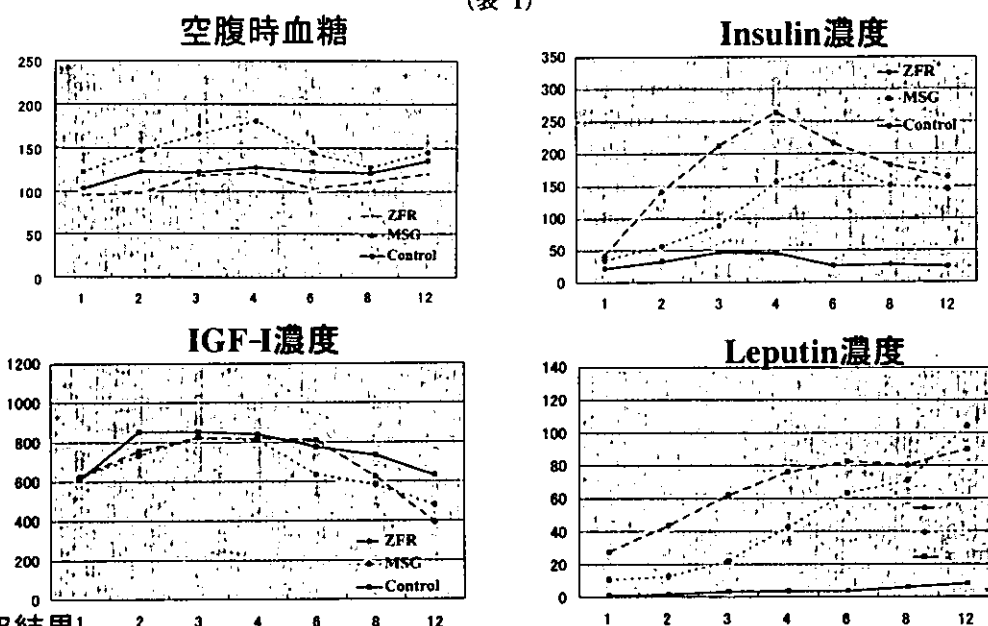
空腹時血糖値は、MSG 投与群が他の 2 群よりも、どの月齢においても、やや高い値を示した。血中インスリン濃度は、ZFR 群は 2ヶ月齢より、MSG 投与群は 4ヶ月齢より高値を示し、8ヶ月齢以降、ZFR 群、MSG 投与群とも生食投与群の約 5 倍の値を示した。血中 IGF-I 濃度は 3 群とも、どの月齢においても、明らかな差は認めなかった。血中レプチン濃度は、ZFR 群は 1ヶ月齢より、MSG 投与群は 2ヶ月齢より高値を示し、加齢とともに増加し、8ヶ月齢以降、ZFR 群、MSG 投与群とも生食投与群の約 10 倍の値を示した(表 1)。

軟 X 線撮影にて各群とも 1 週では明らかな石灰化像は認めないが、ZFR 群ならびに MSG 群では 2 週より明らかな石灰化を認め(図 2)、2 週における X 線透過性の比較では MSG 群と生食群との間で有意差が強く認められた(表 2)。

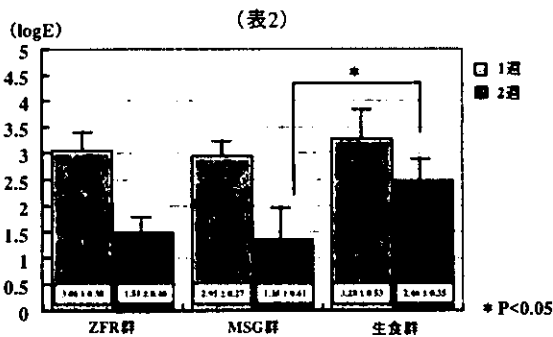
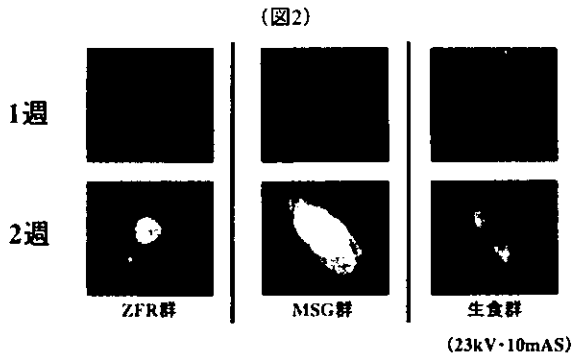
また骨密度撮影でも同様に 2 週で MSG 群では生食群との有意差を確認することができた(表 3)。

H.E.染色でも ZFR 群・MSG 群の 2 群では明らかな骨組織を認め、一部には脂肪髄を認めている(図 3)。

(表 1)

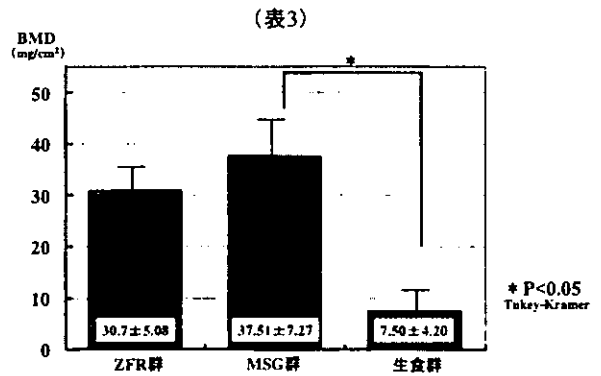


C. 研究結果



D. 考察

脊柱靱帯骨化はインスリン分泌の反応性が高い程発生する頻度が高いことが知られており、我々は脊柱靱帯骨化モデル動物であるZFRを用いて、耐糖能異常と脊柱靱帯骨化における相関性を報告してきた。また成牛より抽出したBMPを筋肉内注入することによってのZFRならびにZucker non-fatty ratにおける異所性骨化に相違がでることも確認している。またL型アミノ酸であるMonosodium L-Glutamateを新生仔動物に投与すると、満腹中枢である視床下部腹内側核が選択的に破壊され、高度の肥満を呈することがこれまで報告され、Olneyによれば、出生直後のマウスにMSGを皮下投与したところ、わずか数時間で視床下部腹内側核が壊死に陥ったと報告している。古川はMSG投与マウスが8週齢頃より肥満傾向および高インスリン血症を呈し、後天的にNIDDMが発症することを報告している。昨年我々は、Wistar系新生仔RatにMonosodium L-Glutamateを皮下投与し、4ヶ月齢より高血糖と、高インスリン血症を認める結果を得られたが、HE染色での椎間板の変性、トリジンブルー染色における軟骨様細胞の増勢等は認められず、また免疫染色でのインスリン、IGF-I、またそれぞれのreceptor



の有意な発現も認めず、組織学的には脊柱靱帯骨化の所見は認められなかった。臨床報告においても高インスリン血症の患者の大部分に脊柱靱帯骨化が認められるわけではない。これらを考慮すると、インスリンは、骨化そのものよりむしろ、遺伝的要素を含めた何らかの骨化素因が存在する時に骨化増強因子として作用する可能性が示唆された。

今回我々は、異所性骨化誘導因子であるrhBMP-2をRat下肢筋層間挿入を行うことにより、MSG群ではZFR群とほぼ等しい早期からの骨化を認め、挿入後2週においては軟X線・骨密度・HE染色で生食群間との明らかな有意差を確認することができた。このことより耐糖能異常下において骨化増強因子投与を行った際、靱帯骨化モデル動物であるZFRと同様に早期からの骨化を確認することができ、インスリン値ならびにIGF-I値の上昇が骨化に対する応答性亢進として関与していることが推測された。しかしながら免疫組織学的検討はできておらず、またZucker rat種でもnon fattyに対してMonosodium L-Glutamate投与糖尿病モデルを作製し、遺伝子に異常を持つものの①耐糖能に対するrhBMP-2の反応性②脊柱靱帯骨化を検討していく必要がある。

E. 結論

BMP-2挿入2週にてZucker Fatty Rat群及びMonosodium L-Glutamate投与Wistar Ratでは軟X線・骨密度・HE染色において生理食塩水投与Wistar Ratに較べ、明らかな有意差を確認することができた。今後免疫組織学的検討も併せて行い、異所性骨化の病態解明をはかりたい。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

参考文献

- 1) 古橋照之: 骨形成因子を用いた異所性骨形成に関する実験的研究. 東医大誌 53(4) 468-479, 1995
- 2) 大沢延行: 脊椎椎体間固定術に関する研究ーラット尾椎椎間板に及ぼす rhBMP-2 の作用ー. 昭和医会誌第 59 巻第 3 号 260-268, 1999
- 3) S. Yokota et al: A new recombinant human bone morphogenetic protein-2 carrier for bone regeneration . International Journal of Pharmaceutics 223 69-79, 2001
- 4) 田中恵: Zucker fatty rat に関する実験的脊柱靱帯骨化に関する研究. 東医大誌 52(1) 19-32, 1994
- 5) 山本謙吾: Zucker fatty rat における脊柱靱帯骨化. THE BONE vol.16 No.3 23-31, 2002
- 6) 渡辺健: Zucker fatty rat アキレス腱における異所性石灰化形成に関する検討. 東医大誌 60(1) 29-39, 2002
- 7) 古川宣明: Monosodium L-glutamate 過剰投与による肥満マウスの糖質代謝に関する研究 II. ピルビン酸脱水素酵素について. 京府医大誌 90(4) 351-361, 1981
- 8) 立花佳代: Monosodium L-glutamate 投与肥満マウス(MSG マウス)の血清レプチン値と摂食行動の解析. 京府医大誌 109(2) 101-110, 2000
- 9) 木村大ら: 満腹中枢破壊ラットの脊柱靱帯骨化関連因子に関する免疫組織学的検討(経過報告). 厚生労働省特定疾患対策研究事業脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班平成 13 年度研究報告書:102-104, 2002

内軟骨性骨化において肥大軟骨細胞に発現する転写因子の解析

関 賢二 (京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座)

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整形外科)

【研究要旨】

近年、骨形成の分子機序が明らかにされてきているなかで、内軟骨性骨化においては肥大軟骨細胞が骨形成を促進する因子を分泌していると考えられ、軟骨細胞分化と骨形成を橋渡しする細胞として注目されている。今回、我々はスネイル・ファミリー転写因子 (Snail, Slug) が肥大軟骨細胞に強く発現していること、また、軟骨細胞の細胞外基質である 2 型コラーゲンとアグリカンの遺伝子発現を制御していることを見いだした。つまり Snail/Slug は骨形成に重要な機序の一つである細胞外マトリクスの転換を調節している分子であると考えられることから、骨化性病変の予防と治療法を開発する上で Snail/Slug が有用な標的分子の一つであると考えられる。

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。スネイル・ファミリー転写因子は C2H2 型の zinc finger DNA 結合部位をもつ転写抑制因子である。これらの転写因子は種を超えて保存されていて、細胞分化・細胞増殖・細胞移動・細胞死といった幅広い生物現象に関わっている重要分子である。本研究ではスネイル・ファミリー転写因子の四肢での発現解析と軟骨細胞分化における機能解析を軟骨細胞分化株 ATDC5 を用いて行った。

B. 研究方法

はじめにマウス胎児四肢の骨・軟骨組織でのスネイル・ファミリー転写因子の発現を in situ hybridization で解析した。次にマウス軟骨細胞分化株 ATDC5 を用いて Snail/Slug の軟骨細胞分化への関与を検討した。軟骨細胞分化実験系には ATDC5 細胞をインシュリン添加培地中でアルジネート中で 3 次元培養する系を用いた。この系でノーザン・プロットにより遺伝子発現の経時的な変化を解析した。最後に Snail/Slug による 2 型コラーゲンの遺伝子発現制御機序をレポーター解析法により解析した。

C. 研究結果

1) 胎生 16 日の胎児の下腿の薄切標本を作製し in situ hybridization を行った。肥大軟骨細胞に Snail/Slug 遺伝子の強い発現を認めた。また、間葉細胞に弱い発現を認めた (図 1, A, B, D, E)。

これらの結果から Snail/Slug が軟骨細胞の分化に関与していることが推測された。

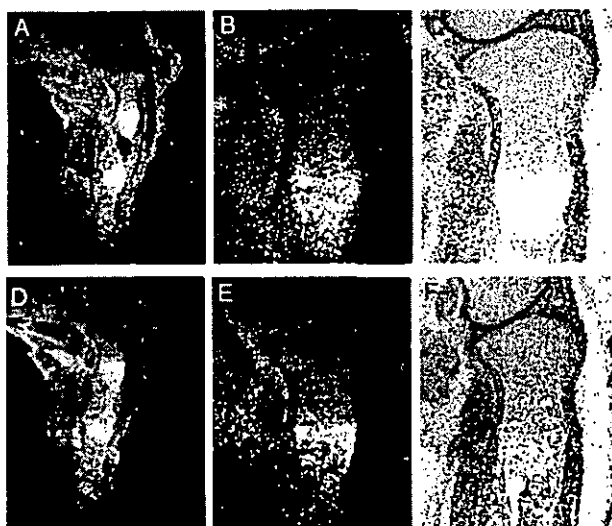


図 1. 胎生 16 日マウス下腿切片を用いた in situ hybridization. A, B, D, E. 暗視野像 (B, E はそれぞれ A, D の拡大像). C, F. それぞれ B, F の明視野像. 肥大軟骨細胞にシグナルを認める。周囲の間葉に弱いシグナルを認める。

2) ATDC5 細胞を 3 次元培養して軟骨細胞分化を誘導すると、軟骨細胞分化マーカーである 2 型コラーゲン、PTH/PTHrP 受容体、Sox9 遺伝子の発現が 2 日後に認められる。このときこれらの遺伝子の発現に逆相関して Snail/Slug の発現が減少することがわかった (図 2A)。次に、Snail または Slug 遺伝子発現ベクターを ATDC5 細胞に一過性に遺伝子導入し、軟骨分化誘導し 2 日後に遺伝子発現を調べると、10 型コラーゲンや PTH/PTHrP 受容体の発現はコントロールと同様に認められるのに比べて、2 型コラーゲンの発現は減弱していた (図 2B)。また、テトラサ

イクリンで発現を誘導する Snail 発現ベクターを用いた同様な実験においても外来性 Snail の発現により 2 型コラーゲン遺伝子の発現の減弱が認められた (図 2C)。次に、外来性の Snail/Slug を安定に発現する ATDC5 細胞株を樹立し、同様に 2 日間の分化誘導後では、Snail/Slug 高発現細胞では 2 型コラーゲ

ンとアグリカン遺伝子の発現が減弱していた (図 2D)。これらの結果から Snail/Slug は軟骨細胞の分化段階に応じて発現量が変化し、Snail/Slug の過剰発現によって軟骨細胞の形質である 2 型コラーゲンとアグリカンの発現が抑制されることがわかった。

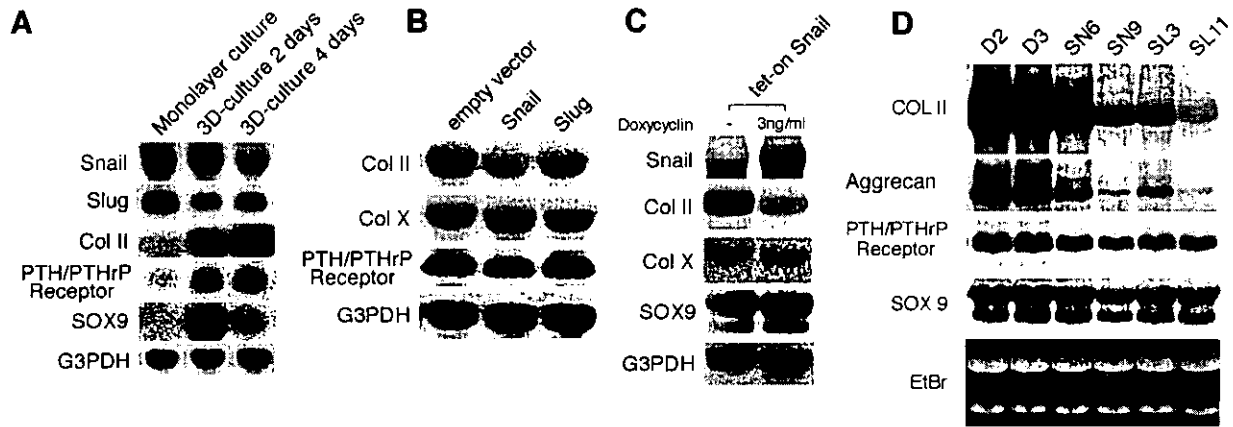
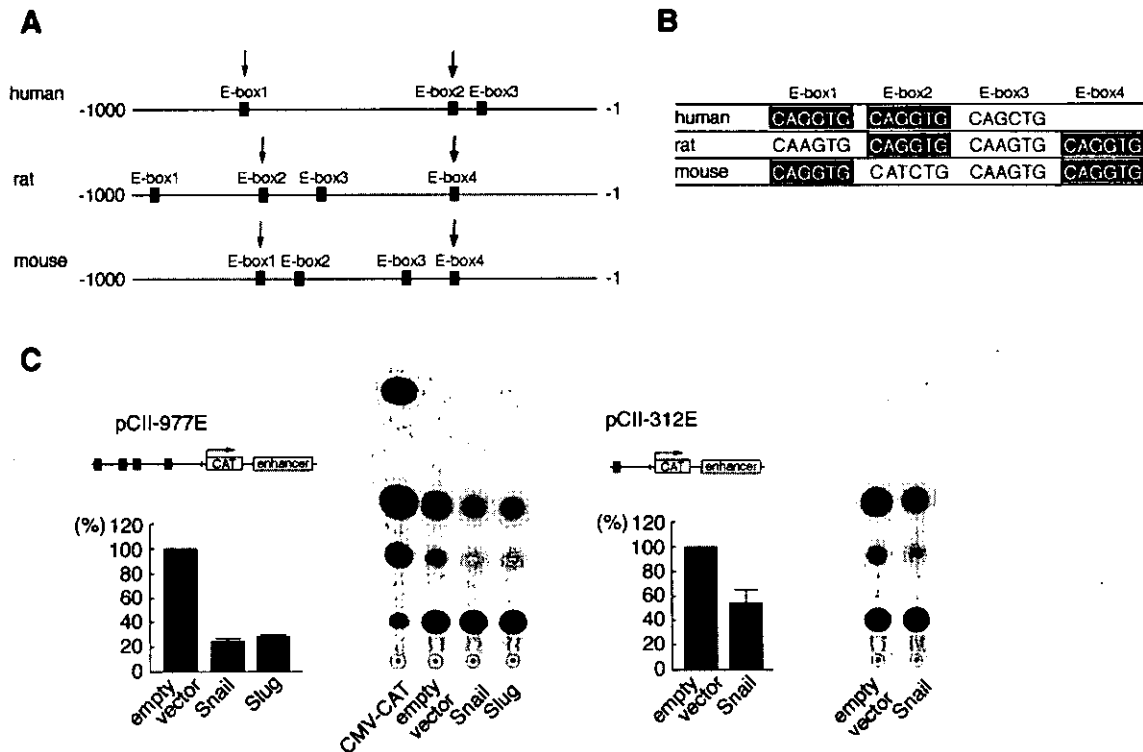


図 2. ノーザン・プロットによる ATDC5 細胞の分化誘導時の遺伝子発現解析。

ATDC5 細胞を 3 次元培養で 2 日間(A, B, C, D)または 4 日間 (A) 分化誘導する。軟骨細胞分化にともない Snail/Slug の発現量は減少する (A)、また、外来性の Snail(B, C) または Slug(B) の過剰発現によって 2 型コラーゲン遺伝子の発現は減少する。発現ベクターを安定に組み込んだ ATDC5 細胞株 (図 D, SN6, SN9, SL3, SL11) では 2 型コラーゲンとアグリカン遺伝子の発現が減弱する (D2, 3 はコントロール・ベクターを組み込んだ細胞株)。



3) Snail/Slug によって 2 型コラーゲンの発現が減弱する機序を解明するために、レポーター遺伝子解析を行った。2 型コラーゲン遺伝子の転写は、第 1 イントロンにあるエンハンサーとプロモーター領域にあるサイレンサーによって制御されていると考えら

れている。Sox9 はこのエンハンサーに結合して転写を活性化することが知られているが、サイレンサーに結合する転写因子は不明であった。そこで、われわれは、Snail/Slug をその候補として解析を行った。まずサイレンサー領域に Snail/Slug の DNA 結合配

列である E-box(CANNTG)が存在するかどうかを、ヒト、マウス、ラットのゲノム配列で調べた。ヒトでは3つ、マウスとラットでは4つの E-box があり、これらの中に、種間で配列と位置のよく保存された2つの E-box があることがわかった (図 3A, B)。次に、このサイレンサー領域を用いたレポーター遺伝子解析を行い、この領域が ATDC5 細胞では外来性 Snail/Slug を過剰発現することで転写抑制に働くことがわかった (図 3B,C)。さらにこれらの E-box に遺伝子変異を導入することで、このサイレンサーは転写抑制能を失うことがわかった (未掲載データ)。これらの結果から Snail/Slug 転写因子が 2 型コラーゲンの遺伝子発現をサイレンサー領域を介して抑制していると考えられた。

4) Snail /Slug が 2 型コラーゲンのサイレンサー中の E-box に結合するかどうかを検討するためにゲル・シフト解析を行った。タグと Snail の融合タンパクを含む ATDC5 細胞の核抽出液により放射性標識オリゴの泳動遅延を認めた。このことから Snail は 2 型コラーゲンのサイレンサー領域内の E-box を含む配列に結合することがわかった (図 4)。

	1	2	3	4	5	6
Nuclear extract	—	+	+	+	+	+
Antibody	—	—	HA	Ctrl	—	—
Cold competitor	—	—	—	—	Wt	Mut



図 4. ゲルシフト解析. ATDC5 細胞に Haemagglutinin-tag と Snail

との融合タンパクを発現させた核抽出液を用いた。2 型コラーゲン遺伝子のサイレンサー中の E-box 配列を含む放射性ラベルした 2 本鎖オリゴ (レーン 2,3,4) は核抽出液により泳動が遅滞したバンドとして観察された (レーン 2)。このバンドは (タグに対する抗体 (HA) によってスーパーシフトされる。また 非標識のオリゴ (Wt) によって競合効果が認めれ、E-box を変異させた非標識オリゴ (Mut) では競合されない (レーン 5, 6)。

D. 考察

In situ hybridization による発現解析からスネイル・ファミリー転写抑制因子はマウス胎児の四肢の

内軟骨性骨化において、肥大軟骨細胞に強く発現していることがわかった。さらに、ATDC5 細胞の軟骨細胞分化系を用いた解析からこれらの転写因子は軟骨細胞分化に関与し、2 型コラーゲン遺伝子とアグリカン遺伝子の発現を制御することがわかった。

軟骨細胞では肥大軟骨細胞への最終分化時に 2 型コラーゲンが消失し、新たに 10 型コラーゲンが発現することが知られている。われわれの研究からスネイル・ファミリー転写抑制因子はこの段階を制御する分子であると考えられる。

近年、内軟骨性骨化では肥大軟骨細胞が骨芽細胞に作用して骨形成を促進する因子を分泌していると考えられている。骨軟骨疾患においても、変形性関節症や変形性脊椎症に見られる骨棘の形成の場に肥大軟骨細胞が異所性に出現していることが観察され、肥大軟骨細胞の病的骨形成における関与が示唆される。これらのことから、OPLL をはじめとして異所性の骨化病変の予防または治療法を開発する上で、肥大軟骨細胞に強く発現し軟骨細胞分化から骨化の段階を制御しているスネイル・ファミリー転写因子は有用な標的分子のひとつであると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kenji Seki, Toshihiko Fujimori, Pierre Savagner, Akiko Hata, Tomonao Aikawa, Naoshi Ogata, Yoichi Nabeshima, and Lee Kaechoong. Mouse Snail family transcription repressors regulate chondrocyte extracellular matrix, type II collagen and Aggrecan. *J Bio Chem*, 278 (12), 41862-41870, 2003

2. 学会発表

Kenji Seki, Toshihiko Fujimori, Pierre Savagner, Akiko Hata, Tomonao Aikawa, Naoshi Ogata, Yoichi Nabeshima, and Lee Kaechoong. D

第 26 回日本分子生物学会年回, 2003 年 12 月, 神戸

cDNA マイクロアレイを用いた慢性圧迫性脊髄障害における 遺伝子発現解析

腰塚周平（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），
関直彦（千葉大学医学部機能ゲノム学），国府田正雄（千葉大学医学部整形外科），
加藤真樹（千葉大学医学部機能ゲノム学），橋本将行（千葉大学医学部整形外科），
鎌田尊人（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）

【研究要旨】

慢性圧迫による脊髄障害の病態を分子レベルで解明することを目的とした。慢性脊髄圧迫モデルとして 23 週齢 *ttw mouse* (*ttw/ttw*) の頸髄圧迫部を用いた。cDNA マイクロアレイを用い、慢性圧迫脊髄において正常脊髄と比較して発現量が増加あるいは減少している遺伝子の検索をおこなった。16 の候補遺伝子について発現量の減少を確認した。

A. 研究目的

慢性圧迫性脊髄障害は、椎間板ヘルニア・変形性脊椎症・脊柱靭帯骨化症などにより四肢の麻痺・知覚障害などの脊髄障害を生じるものである。近年、画像診断の進歩、手術的療法の確立などによって、一定の治療成績が得られるようになってきている。しかし、一度生じた脊髄障害は完全に回復することは少なく、その原因として慢性圧迫によって不可逆的な障害が生じていると考えられる。しかしながら、慢性圧迫による脊髄障害の病態については不明な点が多く、十分な研究がなされていない。本研究の目的は、慢性圧迫性障害を生じた脊髄組織における遺伝子の発現について cDNA マイクロアレイを用いて解析し、慢性圧迫性脊髄障害の病態を解明することである。

B. 方法

対象に靭帯骨化の自然発症モデルマウスである *ttw mouse* を用いた。*ttw mouse* は後環軸膜の骨化により後外側からの脊髄の著明な圧迫をきたし、18-20 週齢でほぼ全例に脊髄障害をきたすことが知られている。脊髄圧迫の生じた 23 週齢 *ttw mouse* (*ttw/ttw*) を慢性圧迫群、脊髄圧迫の生じない 23 週齢 ICR mouse をコントロール群とした。両群とも全身麻酔下に頸髄を摘出し、TRIZOL 法にて total RNA を分離した。各群を Cy3、Cy5 でそれぞれラベルし、プローブを作成した。これらを、マウス神経幹細胞の発現遺伝子および脳由来の遺伝子 4851 種をターゲットとして配置した in-house cDNA マイクロアレイを用いて、同一スライド上で競合的にハイブリダイズさせた。色素を入れ替えての確認もおこない、2 回の解析で発現量の 2 倍以上異なる遺伝子を検出した。cDNA マイクロアレイ解析にて発現に変化を

認められた候補遺伝子について、半定量的RT-PCRを用いて発現の変化を確認した。本実験で用いたプライマーで得られたPCR産物についてはシーケンスをおこない、候補遺伝子の配列と正しいことを確認した。

C. 結果

cDNA マイクロアレイによる解析の結果、慢性圧迫性脊髄において1遺伝子に2倍以上の発現の上昇を、17遺伝子に2倍以上の発現の低下を認めた(表1)。これら18の候補遺伝子のうち、17遺伝子の発現について半定量的RT-PCRにて確認したところ、発現の低下した16遺伝子について、cDNA マイクロアレイと半定量的RT-PCRの結果が一致した。

D. 考察

慢性圧迫性脊髄障害の病態を解析するため、cDNA マイクロアレイ解析をおこなった。その結果、神経系の細胞接着因子の一つであるNCAM L1、SOD の一種であるSOD3などに減少を認めた。現在、これらの候補遺伝子の機能について解析中である。

E. 結論

cDNA マイクロアレイを用いて慢性圧迫脊髄における発現遺伝子を解析し、2倍以上の発現減少を認めた16遺伝子を同定した。現在、これらの遺伝子の脊髄組織における発現につ

いて解析を進めており、今後、これらの遺伝子の機能について検討を進める予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

cDNA マイクロアレイを用いた慢性圧迫性脊髄障害における遺伝子解析

腰塚周平、大河昭彦、関直彦、国府田正雄、加藤真樹、橋本将行、鎌田尊人、山崎正志、村上正純、守屋秀繁

2003 日本整形外科基礎学術集会

Gene expression analysis of the spinal cord under chronic mechanical compression using in-house complementary dna microarray.

Shuhei Koshizuka, Naohiko Seki, Masao Koda, Masaki Kato, Masayuki Hashimoto, Takahito Kamada, Yutaka Nishio, Katsunori Yoshinaga, Masazumi Murakami, Hidesige Moriya, Masashi Yamazaki, Akihiko Okawa

2003 National Neurotrauma Society

H. 知的財産権の出願、登録状況

特になし

Accession No.	Ratio	Genes
X66366	2.30	gephyrin
BE291425	0.45	unknown
U38261	0.45	extracellular superoxide dismutase (SOD3)
AF178669	0.45	p34
AB028840	0.44	GalNAc alpha-2, 6-sialyltransferase V
U92793	0.43	α glucosidase II α subunit
BC005594	0.42	nuclear RNA export factor 1 homolog
BC003481	0.41	unknown
M74773	0.40	β spectrin (Spcb-2)
AF363030	0.39	UDP-N-acetylglucosaminyltransferase
AB030038	0.38	mPACPL1
AF044923	0.38	HOOK1
AU051226	0.37	unknown
AU035962	0.36	NCAM L1
BC004952	0.36	NSPC1
BC006812	0.35	solute carrier family 29
AU078872	0.28	unknown
AB041542	0.27	serine/threonine protein kinase

表 1

頸椎後縦靱帯骨化症における上行性脊髄誘発電位に関する研究

高知大学医学部整形外科

岸本 裕樹 谷 俊一 牛田 享宏
谷口 慎一郎 坪屋 英志 池本 竜則

研究要旨

脊髄索路症状を伴う頸椎後縦靱帯骨化症 (OPLL) において術中に記録した上行性脊髄誘発電位 (SCEP) によって明らかとなった伝導ブロックの程度と重症度や改善率との関係、伝導ブロックのレベルと OPLL の関係について検討した。完全ブロックの症例は麻痺がより重症であることが予想されたが実際には他の症例と有意差はなかった。しかし、完全ブロック群はブロック判定不能群と比べ麻痺の改善率が有意に高く、罹病期間も有意に短かった。これは罹病期間が長くなると軸索変性が頭尾側に広がり明確な伝導ブロックとして捉えられなくなることを示唆していると思われた。また、伝導ブロックは71%の症例で OPLL の最大占拠高位に一致して起こっていたが、一致しなかった症例ではヘルニア等 OPLL 以外の脊髄圧迫因子が存在していたり、骨化の切れ目に相当する椎間での動的因子が伝導ブロックの原因になっていることが考えられた。

A. 研究目的

頸椎後縦靱帯骨化症 (OPLL) によって生じる脊髄障害のうち治療可能な障害は伝導ブロックである。そして脊髄誘発電位 (SCEP) 検査は伝導ブロックの程度とその高位を明らかにすることが出来る。そこで、SCEP によって判明した伝導ブロックの程度と脊髄症の重症度や予後との関係、および伝導ブロックの高位と OPLL の頭尾側方向の広がりや脊柱管占拠率との関係を調査した。

B. 研究方法

対象は当科にて頸椎 OPLL に対し手術を行った症例のうち、術中に上行性 SCEP を記録し、電位分析が可能であった 39 例である。男 30 例、女 9 例、平均年齢 61.1 歳、術後経過観察期間 7.5 年であった。手術は前方法 22 例、後方法 17 例であった。刺激は腰椎または下位胸椎部硬膜外腔を双極カテーテル電極を用いて行い、記録は前方手術では椎間板から、後方手術では黄色靱帯から針電極を用いて単極誘導により記録した。得られた SCEP は基線によって初期陽性波と陰性波に分け、

それぞれの振幅を計測した。潜時は初期陽性電位の頂点潜時を計測した。

伝導ブロックは、陽性電位の振幅増大を伴う陰性電位の振幅の明らかな低下を指標に判定した。その頭側で陰性電位が残存しているものを不完全ブロック群、ブロック高位よりも頭側の記録が陽性電位のみで陰性電位が見られなかったものを完全ブロック群、以上の波形変化が明らかでなく時間的分散との区別がつかない症例を判定不能群とした。また、ブロックの判定にはその尾側レベルでの陰性電位の振幅増大現象も参考にした。

麻痺の重症度は JOA スコアを用いて評価し、麻痺の改善率は平林の方法で、OPLL の脊柱管占拠率は CT を用いて評価した。

C. 研究結果

伝導ブロックは 39 例中、31 例で判定可能であり、不完全ブロックが 20 例、完全ブロックが 11 例であった。残り 8 例では伝導ブロックが明らかではなかった。

ブロック高位では陽性電位は一椎間尾側の電位に比べ明らかな振幅の増大を示し (151 %, $p=0.002$)、陰性電位は明らかな振幅の低下を示した (33 %, $p<0.0001$)。また陰性電位はブロック高位の尾側ではブロック高位に近づくにつれ増大する傾向が見られた。また、潜時もブロック高位とその1つ尾側高位の記録波形の潜時差は他の隣接椎間の潜時差と比べ有意に延長していた ($p=0.0002$)。

麻痺の重症度を JOA スコアで表すと、完全ブロック群 8.5 点、不完全ブロック群 9.3 点、判定不能群 9.3 点であり完全ブロック群では不完全ブロック群や判定不能群よりもスコアが低いものの有意差はなかった。麻痺の改善率は平林の方法で表すと、完全ブロック 53 %、不完全ブロック群 29 %、判定不能群 12% の順に改善率が低くなり、特に判定不能群は完全ブロック群よりも有意に改善率が低かった ($p=0.02$)。また、罹病期間について3群で比較すると、判定不能群 5.6 年、不完全ブロック群 3.8 年、完全ブロック群 1.4 年の順に短く、特に判定不能群は完全ブロック群よりも罹病期間が有意に長かった ($p=0.03$)。

伝導ブロックの高位は C2/3 が 1 例、C3/4 が 7 例、C4/5 が 15 例、C5/6 が 7 例、C6/7 が 1 例、CT を用い計測した OPLL の脊柱間占拠率は平均 54% であり最大占拠高位は C2/3 が 3 例、C3/4 が 10 例、C4/5 が 12 例、C5/6 が 5 例、C6/7 が 1 例であった。伝導ブロックの高位と OPLL の最大占拠高位は 71 % の症例で一致していたが、29%では一致していなかった。

D. 考察

伝導ブロックのうち完全ブロック群は麻痺の重症度が高いことが予想されたが実際には他の群と有意差はなかった。そして完全ブロック群はブロック判定不能群と比べ麻痺の改善率が有意に高く、罹病期間も有意に短かった。これは罹病期間が長くなると軸索変性が頭尾側に広がり明

確な伝導ブロックとして捉えられなくなることを示唆していると思われた。

伝導ブロックは多くの症例で OPLL の最大占拠高位に一致して起こっていたが、一致しなかった症例について画像所見を検討すると、ヘルニア等により OPLL 以外の脊髓圧迫因子が存在していたり、骨化の切れ目に相当する椎間での動的因子が伝導ブロックの原因になっていると考えられた。

E. 結論

頰椎 OPLL39 症例において術中に記録した上行性 SCEP を分析した。陽性電位の振幅増大を伴う陰性電位の低下と尾側での陰性電位の増大を指標に伝導ブロックを判定した。伝導ブロックが判定できたものは 79 %、判定できなかったものが 21%であった。判定できた群のうち、完全ブロックが 35 %、不完全ブロックが 65 %であった。伝導ブロックの有無や程度と重症度や改善率の関係では判定不能群は完全ブロック群に比べ有意に改善率が悪く、罹病期間も長かった。また、伝導ブロックのレベルと OPLL の関係では伝導ブロックの高位は 71 % の症例で OPLL の最大占拠高位に一致していた。一致しなかった症例では、OPLL 以外の脊髓圧迫因子や骨化の切れ目に相当する椎間において伝導ブロックが生じていた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

1. Inoue S, Tani T, Taniguchi S, Yamamoto H: The motor evoked potentials elicited from the deltoid muscle by transcranial magnetic stimulation with a standardized facilitation: the potential diagnostic utility for C5 radiculopathy. *Spine*

28 :276-281, 2003.

2. Taniwaki Y, Takemasa R, Tani T, Mizobuchi H, Yamamoto H: Enhancement of pedicle screw stability using calcium phosphate cement in the osteoporotic vertebra: an *in vivo* biomechanical study. *J Orthop Sci* 8: 408-414, 2003.
3. Ishida K, Tani T, Ushida T, Zinchuk VS, Yamamoto H: Recovery of spinal cord conduction after surgical decompression for cervical spondylotic myelopathy: serial somatosensory evoked potential studies. *Am J Phys Med Rehabil* 82, 130-136, 2003.
4. Tani T, Kawasaki M, Taniguchi S, Ushida T: Functional importance of degenerative spondylolisthesis in cervical spondylotic myelopathy in the elderly. *Spine* 28, 1128-1134, 2003.
5. Kishimoto H, Tani T, Ueta E, Ushida T, Taniguchi S, Zinchuk VS, Yamamoto H: Paradoxical enhancement of spinal cord evoked potentials rostral and caudal to the site of progressive cord compression in the cat. *Spinal Cord* 41: 231-238, 2003.
6. Tani T, Ushida T, Ishida K, Iai H, Noguchi T, Yamamoto H: Relative safety of anterior microsurgical decompression versus laminoplasty for cervical myelopathy with a massive ossified posterior longitudinal ligament. *Spine* 27: 2491-2498, 2003.

学会発表

岸本裕樹、牛田享宏、谷口慎一郎、坪屋英志、池本竜則、谷 俊一：頸椎後縦靱帯骨化症における上行性脊髄誘発電位の検討。第26回脊髄機能診断研究会(東京) 2004. 2. 14.

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

SNPs を用いた *COL11A2* 遺伝子の関連解析および連鎖不平衡解析

浜田大輔、酒井紀典、高田洋一郎、東野恒作、加藤真介、安井夏生

徳島大学感覚運動系病態医学講座運動機能外科学

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

研究要旨

脊椎後縦靭帯骨化症は遺伝的要因、環境要因がともに発症に関与する多因子疾患と考えられており、遺伝的要因の一因として *COL11A2* 遺伝子の関与が報告されている。本研究では散発 OPLL 症例および非 OPLL 症例を対象に SNPs を用いた関連解析、連鎖不平衡解析を行うことにより *COL11A2* 遺伝子と OPLL の関連を検証した。

A. 研究目的

脊椎後縦靭帯骨化症(OPLL)はその発症に遺伝的要因と環境要因が関与する多因子疾患と考えられている。Type XI collagen $\alpha 2$ 鎖をコードする *COL11A2* 遺伝子は遺伝的要因の一因であることが示唆されているが、病態への関与は未だ不明である。そこで今回我々は OPLL 散発症例および非 OPLL 症例を対象に *COL11A2* 遺伝子内の SNP (single nucleotide polymorphism)を用いた関連解析および連鎖不平衡解析を行い、疾患との関連を検討した。

B. 研究方法

徳島県全域の OPLL 患者75名、非 OPLL 患者285名よりヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針に基づき、口頭および書面にてインフォームドコンセントを得て末梢血を採取し、リンパ球よりゲノム DNA を抽出した。OPLL 症例から抽出したゲノム DNA は採取後数年を経て劣化したものが存在したため GenomiPhi を用いた whole genome amplification を行った。データベースを検索し *COL11A2* 遺伝子に存在する SNP を抽出、日本人健常者46名の DNA を用いてその頻度調

査を行った。このうち minor allele 頻度が10%を超える 13SNP に対して TaqMan chemistry を行った。

384well の PCR plate 各 well にゲノム DNA5ng を分注後乾燥させ、Assays on Demand SNP Genotyping Product (Applied Biosystems)を用いた4 μ lの反応系でPCR反応を行いABI 7900HT Sequence Detector Systems を用いて蛍光シグナルを検出しジェノタイピングを行い、アレル頻度に対する χ^2 検定を実施した。

また近年ゲノムには連鎖不平衡が比較的保たれたハプロタイプブロックと組換えのため多型間の連鎖不平衡が低下する hot spot と呼ばれる部分が交互に存在することが報告されており、*COL11A2* 遺伝子周辺の連鎖不平衡の状態を観察するため、得られたデータを SNP Alyze (Dynacom)を用いて連鎖不平衡解析を行った。連鎖不平衡解析は非 OPLL 285名のタイピングデータをもとに pair-wise の連鎖不平衡を連鎖不平衡係数 $|D'|$ を用い評価を行った。

C. 研究結果

TaqMan chemistry による Genotyping success

rate は99.6%であった。

今回の解析に用いた SNPs では OPLL 群、非 OPLL 群間に有意差は検出されなかった(表1)。

また非 OPLL 症例285名を用いた連鎖不平衡解析では今回の解析に用いた intron 4 から intron 62 の SNP はほぼ完全な連鎖不平衡にあることが判明した(図1)。

D. 考察

非 OPLL 症例285例を用いた連鎖不平衡解析では intron 4 から intron 62 は同一のハプロタイプブロックの中にあると考えられた。つまり、この領域は日本人集団で比較的組換えの起こっていない保存された部位であることが明らかになった。

今回の解析では OPLL 症例が75例と少数であったこともあり疾患と遺伝子多型との相関は検出できなかった。今後症例数を増やした大規模な関連解析が必要である。試験的に導入した TaqMan chemistry はタイピングの精度も高く今後大量のサンプルを高速で処理する解析について

も使用可能と考えられる。

最近新たに罹患同胞対解析より疾患への関与が示唆された領域内の *COL6A1* 遺伝子と OPLL との相関が報告された。このことから複数の遺伝子が発症に関与していることが示唆され、他の疾患感受性候補遺伝子についても解析を進め病因を解明することが望まれる。



図1 非 OPLL 症例285例における pair-wise LD (Threshold $|D'| > 0.9$)

E. 結論

今回用いた SNPs において OPLL 群、非 OPLL 群間に有意な相関は観察されなかった。

SNP (position)	Genotype non-OPLL						Genotype OPLL						Allele1 versus Allele2	
	11	12	22	Sum	Minor allele frequency	HWE	11	12	22	Sum	Minor allele frequency	HWE	χ^2	P
Intron4 (+537)	225	58	2	570	0.109	0.402	60	14	0	148	0.095	0.369	0.24952	0.6174
Intron4 (+1441)	234	49	2	570	0.093	0.745	65	9	0	148	0.061	0.578	1.54139	0.2144
Intron4 (+1483)	225	58	2	570	0.109	0.402	61	13	0	148	0.088	0.408	0.55042	0.4581
Intron17 (+32)	225	58	2	570	0.109	0.402	60	14	0	148	0.095	0.369	0.24952	0.6174
Intron19 (+70)	161	107	16	568	0.245	0.746	46	25	2	146	0.199	0.517	1.37112	0.2416
Intron25 (+88)	161	108	16	570	0.246	0.703	45	26	3	148	0.216	0.753	0.5574	0.4553
Intron27 (+215)	223	58	3	568	0.113	0.719	60	14	0	148	0.095	0.369	0.39543	0.5295
Intron27 (+812)	223	59	3	570	0.114	0.679	59	15	0	148	0.101	0.332	0.19092	0.6622
Intron28 (+142)	224	58	3	570	0.112	0.725	61	13	0	148	0.088	0.408	0.73319	0.3919
exon43 (+18)	162	107	16	570	0.244	0.76	46	25	3	148	0.209	0.862	0.7694	0.3804
exon51 (+40)	243	42	0	570	0.074	0.179	59	11	3	146	0.116	0.022	2.80983	0.0937
Intron51 (+334)	198	78	9	570	0.168	0.699	56	16	2	148	0.135	0.519	0.96101	0.3269
Intron62 (+151)	89	123	73	570	0.472	0.024	20	35	19	148	0.493	0.643	0.21397	0.6437

表1 *COL11A2* 遺伝子における関連解析結果 (HWE: Hardy-Weinberg equilibrium)

脊柱靱帯骨化症における靱帯骨化メカニズム —糖代謝との関わりを細胞膜プロテオーム解析から究明する—

分担研究者 永田見生 久留米大学医学部整形外科学教授

研究要旨

脊柱靱帯骨化症は、高頻度で糖尿病を合併する生活習慣病を原因とする要因が強く考えられるが、環境的因子と遺伝的因子の相互関係があることは明らかである。我々は、脊柱靱帯骨化の解明のために、脊柱靱帯骨化組織を、細胞膜と細胞質に分画し、各々のプロテオーム解析を行い、質量分析装置にて発現タンパク質の解析を行った。今回その結果として可溶性細胞膜の発現タンパク質には、IRS,IGF,グルコース輸送タンパク質などが存在したが、可溶性細胞質にはそれらのタンパク質を見ることが出来なかった。これからのますますの解析が必要であるが、グルコース輸送タンパク質が細胞膜に存在することは、IRSなどの刺激が関係していることが考えられる。

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症の靱帯骨化組織中の発現タンパク質の可溶性細胞膜プロテオーム解析と可溶性細胞質プロテオーム解析を行うことにより、脊柱靱帯骨化症の発現を解明する。

B. 研究方法

(倫理面への配慮) この研究を行うにあたり、久留米大学倫理委員会の承認を得、研究対象者に対する人権擁護上の配慮、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除などのインフォームドコンセントを行い、理解、協力を頂く対象者には、文書にて署名捺印を保存し、対象者の試料は、久留米大学個人情報情報管理システム (FDA, 21CFR part11 認可) において、患者情報の匿名化を行った。この研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守した。

匿名化された試料は、可溶性細胞質抽出試薬に溶解し、水中にて超音波後、14000g, 45 分, 4℃遠心分離においてペレット (膜・オルガネラ蛋白質) と上清 (細胞質蛋白質) に分け、ペレットには再度可溶性細胞質抽出試薬に懸濁し、14000g, 45 分, 4℃遠心分離を行い、ペレットには、細胞およびオルガネラ膜可溶性試薬を加え、水中にて超音波を行い、14000g, 45 分, 15℃遠心分離にて上清を抽出し、TBP,Iodoacetamide それぞれインキュベート後、可溶性細胞膜蛋白質とした。細胞質蛋白質は遠心分離後の上清液を混合し、凍結乾燥 16 時間後、可溶性蛋白質再懸濁試薬を加え、TBP,Iodoacetamide それぞれインキュベート後、可溶性細胞質蛋白質とした。可溶性細胞膜蛋白質と可溶性細胞質蛋白質液は、各々を一次元ゲル及び二次元ゲルに展開後、クーマシー・ブルー染色を行い、そのすべての発現タンパク質を抽出し、酵素処理後、発現タンパク質を抽出し、TOF-MSにて解析を行い、各々の蛋白質の同定をマスショットにて <http://www.matrixscience.com/> 行った。

C. 研究結果

今回の我々の研究は、クーマシー・ブルー染色 (感度 8ng) までの感度では、脊柱靱帯骨化組織の可溶性細胞膜と可溶性細胞質のプロテオーム解析から、分離した可溶性細胞膜の発現蛋白質には、IRS (insulin receptor substrate)、IGF (insulin-like growth factor) 受容体、グルコース輸送タンパク質の存在が明らかとなり、可溶性細胞質蛋白質からはそのような蛋白質は、認められなかった。

D. 考察

膜蛋白質は、小胞体 (endoplasmic reticulum:ER) に結合したリボソームで合成され、ER を経由してゴルジ、リソソーム、細胞表面などの最終目的地へ輸送される。これらの蛋白質のフォールディングは ER の中で行われ、正しい立体構造を形成したもののみが選別されてゴルジ以降の分泌経路に進む。一方、正しくフォールディングされていない分泌蛋白質は、ER のなかにとどまって蓄積する。この病態が ER ストレスと考えられている。膵β細胞におけるシグナル伝達、インスリン受容体から IRS-1 から PI3 キナーゼの系は、グルコース依存性インスリン分泌に関与しており、IRS-2 を介する系は PI3 キナーゼ、Akt を介しβ細胞の調節をしていることが報告されており、IRS-2 の上流には IGF-1 受容体の存在が示唆されている。脊柱靱帯骨化組織中に IRS,IGF,グルコース輸送タンパク質が存在していることは、インスリンシグナル伝達の関与が考えられ、IRS から PI3,グルコース輸送タンパク質の細胞膜移動という細胞動態が考えられる。

E. 結論

脊柱靱帯骨化組織の細胞膜中にインスリンシグナル伝達分子が確認されたことは、糖代謝異常が靱帯骨化のメカニズムに関与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

第 18 回日本整形外科学会基礎学術集会、展示発表

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

靱帯・腱および脊柱靱帯骨化症における Msx2 遺伝子の発現とその意義に関する研究

研究協力者 川島 博行 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授

研究要旨：マウス靱帯株細胞 PDL-L2 をモデルにして靱帯細胞の骨芽細胞との相違について検討した結果、靱帯細胞では Runx2 の転写活性が抑制されることにより、骨芽細胞への分化ならびに石灰化が抑制されていることが示された。Runx2 の転写抑制は、Msx2 が Runx2 と結合し、HDAC1 活性を誘導することで生じる。昨年報告したように、OPLL 患者の靱帯骨化部では Msx2 の著明な減少が認められたところから、Msx2 発現量減少の原因究明が OPLL の発症と治療に必須であると考えられた。また、靱帯細胞 PDL-L2 は、骨芽細胞とは異なり、メカニカルストレスを負荷しても骨芽細胞の分化マーカーを発現したり石灰化したりすることはなかった。メカニカルストレスの受容とシグナル伝達においても特異な機構が働いていることが示唆された。

A. 研究目的

我々は、当研究室で樹立した歯周靱帯細胞 PDL-L2 細胞を用い、靱帯細胞は骨芽細胞に分化し得る性質を保持しているものの、通常の生理的条件下では石灰化抑制機構が働いていること、また、OPLL 患者の靱帯骨化部ではこの機構が破綻していることを明らかにした。石灰化抑制機構の存在は、靱帯が強力なメカニカルストレス (MS) に曝されながら石灰化しないという性質に寄与していると考えられる。本研究では、この機序の詳細を調べるとともに、靱帯細胞と骨芽細胞の MS 応答性についても検討した。

B. 研究方法

PDL-L2 および MC3T3-E1 を培養し、細胞外基質の石灰化抑制機構の詳細について、RT-PCR, Reporter assay, Western blot analysis, Double immunostaining 等を用いて検討した。さらに、Flexor cell を用い、MS の石灰化に及ぼす効果についても比較検討した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を用いた研究であるため、倫理面への配慮は不要である

C. 研究結果

Msx-2 の発現量が高く維持されると石灰化は抑制される。Msx-2 の石灰化抑制作用は、骨芽細胞特異的転写因子として知られる Runx2 の転写活性を抑制することで発揮されるが、このとき Msx2 は、Runx2 とタンパク・タンパク相互作用で結合すること、また、Msx2 は TLE1 と協調的に HDAC1 複合体を誘導することがわかった。また、

MS 負荷により、MC3T3-E1 では石灰化が促進されるのに対し、PDL-L2 では石灰化が抑制されたままであった。MS を負荷すると、MC3T3-E1 では、FAK および Ner1/2 のリン酸化、Runx2 転写活性、オステオカルシン遺伝子発現、石灰化の全てが増加したが、PDL-L2 ではこのような変化は認められなかった。

D. 考察

靱帯細胞では Msx2 が Runx2 の転写活性を抑制するため、骨芽細胞への分化や石灰化の抑制状態にある。この機構の破綻の原因を探ることが OPLL の病態解明につながるかと予想される。また、MS 応答性が骨芽細胞と靱帯細胞とで異なることも上記の機構と関連する可能性がある。

E. 結論

靱帯細胞では、石灰化抑制機構および特異的な MS 受容機構が存在することがわかった。

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：

Yoshizawa T et al., Mol. Cell. Biol. in press.

2. 学会発表：

Takizawa F et al., Bone 32: 5(suppl): s102 (Ab#P29F) (IBMS - JBMS First Joint Meeting, June 3-7, Osaka, 2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

分節型頸椎後縦靱帯骨化症に対する片開き式脊柱管拡大術の長期成績

—混合型・連続型との比較—

慶応義塾大学整形外科

小川祐人, 千葉一裕, 松本守雄, 中村雅也, 高石官成, 石井 賢, 戸山芳昭

【研究要旨】

頸椎後縦靱帯骨化症（以下頸椎 OPLL）のうち分節型頸椎 OPLL は他の連続型や混合型頸椎 OPLL とその骨化形態が明らかに異なる。従って、椎弓形成術後の長期成績も連続型および混合型のものとは異なる可能性がある。本研究の目的は分節型頸椎 OPLL に対する片開き式脊柱管拡大術の長期成績を非分節型に対するものと比較し、分節型頸椎 OPLL に対する本術式の有用性と問題点を検討することである。対象は頸椎 OPLL に対して片開き式脊柱管拡大術を施行し、7年以上経過を観察し得た 57 例（分節型 10 例：男性 8 例、女性 2 例、非分節型 47 例：男性 37 例、女性 10 例）である。これらの症例に対して臨床症状および画像所見を術前および術後 1, 3, 5 年、最終調査時において検討したところ、JOA スコアおよび術後改善率は術前および術後 1, 3, 5 年では分節型（以下 Segmental: S 群）・非分節型（以下 non Segmental: NS 群）の両群間に有意差を認めなかったが、最終調査時において S 群で有意に JOA スコアおよび術後改善率が低下していた（それぞれ $p = 0.03$, $p = 0.02$ ）。頸椎可動域は術前および術後 1, 3 年で両群間に有意差を認めなかったが、最終調査時では S 群で有意に可動域が大きかった（ $p = 0.01$ ）。また術後の S 群の上肢および体幹の JOA スコア再悪化例について、その程度と最終調査時の頸椎可動域の相関を検討したところ、強い正の相関を認めた（ $R = 0.75$, $p = 0.01$ ）。以上より頸椎分節型 OPLL に対する片開き式脊柱管拡大術の長期成績は非分節型に比べ劣っており、非分節型に比べ頸椎可動域が保たれていることがその原因の一つとして考えられた。

【研究目的】頸椎後縦靱帯骨化症（以下頸椎 OPLL）のうち分節型頸椎 OPLL は他の連続型や混合型頸椎 OPLL とその骨化形態が明らかに異なる。従って、椎弓形成術後の長期成績も連続型および混合型のものとは異なる可能性がある。本研究の目的は分節型頸椎 OPLL に対する片開き式脊柱管拡大術の長期成績を非分節型に対するものと比較し、分節型頸椎 OPLL に対する本術式の有用性と問題点を検討することである。

【研究方法】対象は 1983 年から 1995 年までに頸椎 OPLL に対して片開き式脊柱管拡大術を施行し、7 年以上経過を観察し得た 57 例（分節型 10 例：男性 8 例、女性 2 例、非分節型 47 例：男性 37 例、女性 10 例）である。骨化形態の分類には脊柱靱帯骨化症調査研究班によ

る分類を用いた¹。分節型（以下 Segmental: S 群）、非分節型（以下 non Segmental: NS 群）の手術時平均年齢はそれぞれ 60.1（50-66）、57.4（40-77）歳で、術前 JOA スコア・術前罹病期間・術後経過観察期間はそれぞれ 9.7（4-12）、9.3（3-16）点・26.4（2-65）、44.7（2-170）ヶ月・10.1（7-17）、10.5（7-19）年であり、両群間に統計学的有意差は認められなかった。拡大椎弓は S 群では C3-7 が 8 例、C3-T1 が 2 例で、NS 群では C3-7 が 27 例、C2-7 が 17 例、C2-T1 が 3 例であった。これらの症例に対して臨床症状および画像所見を術前および術後 1, 3, 5 年、最終調査時において検討した。検討項目は手術時間、出血量、JOA スコア、平林法による術後改善率、画像所見として単純 X-P を用いた C2-7 までの頸