

200400832A

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

平成17(2005)年3月

主任研究者 中 村 耕 三

厚生労働科学研究費補助金
難治性疾患克服研究事業

脊 柱 靱 帯 骨 化 症 に 関 す る 調 査 研 究

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中村 耕三

目 次

I. 班員構成

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班	3
------------------	---

II. 総括研究報告書

主任研究者 中村耕三 東京大学大学院医学系研究科整形外科	7
------------------------------	---

III. 分担研究報告書

1. 後縦靱帯骨化症の遺伝子解析に関する研究	15
理化学研究所・遺伝子多型研究センター変形性関節症関連遺伝子研究チーム 堀越泰三、池川志郎	
2. ゲノム全域スクリーニングによる後縦靱帯骨化症責任遺伝子同定	18
東京大学・医科学研究所 井ノ上逸朗	
3. 血清反応陰性脊椎関節症の感受性遺伝子同定に関する研究	29
滋賀医科大学整形外科 森 幹士、松末吉隆 滋賀医科大学臨床検査部 茶野徳宏、岡部英俊 理化学研究所遺伝子多型センター 池川志郎	
4. 内軟骨性骨化における石灰化関連遺伝子群の解析	31
京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野 青山朋樹 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学 中村孝志	
5. 内軟骨性骨形成におけるBMPシグナルの役割	33
大阪大学大学院医学系研究科 吉川秀樹	
6. レプチン抵抗性Rat脊柱靱帯細胞におけるインスリン・IGF-1シグナルの検討	35
東京医科大学整形外科学教室 久保宏介、馬嶋正和、山藤 崇、渡辺 淳、木村 大、渡辺 健、山本謙吾	
7. ヒト後縦靱帯骨化における骨化移行部の組織学的検討	45
福井大学医学部 整形外科 佐藤竜一郎、彌山峰史、内田研造、小久保安朗、小林 茂、馬場久敏	
8. ラットを用いた脊柱靱帯への反復伸張ストレス負荷モデル	49
：脊柱靱帯骨化症をメカニカルストレスとの関連について	

九州大学整形外科 岩本幸英、塚本伸章、前田 健、三浦裕正、細川 哲、播谷勝三 九州産業大学機械工学科 日垣秀彦、蔵田耕作	
9. 靱帯細胞と骨芽細胞のメカニカルストレス応答性に関する研究……………	56
新潟大学大学院医歯学総合研究科 川島博行	
10. 脊柱靱帯骨化症における高感度発現プロテオミクス……………	57
久留米大学医学部整形外科 永田見生	
11. 脊椎靱帯骨化症に対する薬物治療のターゲットの検索……………	59
弘前大学整形外科 ¹⁾ 、弘前大学薬理学 ²⁾ 、弘前記念病院整形外科 ³⁾ 沢田利匡 ^{1・2)} 、古川賢一 ²⁾ 、岸谷正樹 ^{1・2)} 、金丸幸太 ²⁾ 、岡田晶博 ¹⁾ 、 植山和正 ³⁾ 、元村成 ²⁾ 、藤哲 ¹⁾	
12. 後縦靱帯骨化症における高分解型18FDG-PETを用いた頸髄グルコース代謝解析 ……	62
福井大学医学部整形外科 内田研造、馬場久敏、中嶋秀明、彌山峰史、佐藤竜一郎	
13. 頸髄圧迫障害のメカニズム — 脊髄力学特性を導入した有限要素解析から — ……	67
山口大学整形外科 市原和彦、田口敏彦、金子和生	
14. 慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy)に対する神経栄養因子発現ベクターを用いた遺伝子導入 ……………	70
福井大学医学部整形外科 Xu Kan、内田研造、中嶋秀明、馬場久敏	
15. PACAPの急性脊髄損傷後のアポトーシス抑制に関する研究 ……	77
鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学 片平光昭、林 協司、松永俊二、小宮節郎	
16. 損傷脊髄の機能再生に骨髄間質細胞由来シュワン細胞移植がおよぼす効果……………	80
千葉大学医学部整形外科 ¹⁾ 京都大学大学院医学研究科生体構造医学講座機能微細形態学 ²⁾ 千葉大学医学部附属病院リハビリテーション部 ³⁾ 鎌田尊人 ¹⁾ 、国府田正雄 ¹⁾ 、出澤真理 ²⁾ 、吉永勝訓 ³⁾ 、西尾 豊 ¹⁾ 、染谷幸男 ¹⁾ 、 守屋秀繁 ¹⁾ 、山崎正志 ¹⁾	
17. 頸椎後縦靱帯骨化症診療ガイドライン開発に関する研究……………	87
独立行政法人国立病院機構大阪南医療センター 米延策雄	
18. 頸椎後縦靱帯骨化症 (OPLL) における頸椎椎弓形成術後の骨化巣の変化に関する研究 ……………	89

	How is the progression of the ossification in OPLL after cervical laminoplasty?	
	富山医科薬科大学整形外科学	
	川口善治、堀 岳史、木村友厚	
19.	頰椎OPLLに対する片開き式脊柱管拡大術の長期成績に関する研究	92
	慶應義塾大学整形外科	
	小川祐人、松本守雄、中村雅也、千葉一裕、戸山芳昭	
20.	頰椎後縦靱帯骨化症に対する前方除圧固定術と椎弓形成術の比較検討	98
	—特に術後成績に關与する因子の解析について—	
	千葉大学医学部整形外科	
	山崎正志、政木 豊、鎌田尊人、染谷幸男、大河昭彦、守屋秀繁	
21.	頰椎後縦靱帯骨化症に対する顕微鏡下前方除圧固定術と脊柱管拡大術	107
	高知大学医学部運動機能学教室	
	牛田享宏、谷口慎一郎、谷 俊一	
22.	後弯変形を伴う頰椎症およびOPLLによる頸髓症の手術治療に関する研究	110
	北海道大学保健管理センター	
	鏡 邦芳	
	北海道大学整形外科	
	伊東 学、小谷善久、角家 健、高畑雅彦、須藤英毅、安井啓吾、三浪明男	
23.	頰椎前方除圧固定術後に生じる後咽頭腔の腫脹に関する研究	113
	東京医科歯科大学医歯学総合研究科整形外科学分野	
	四宮謙一	
24.	多椎管圧迫が頸髓症の手術成績に及ぼす影響についての研究	115
	和歌山県立医科大学医科大学整形外科学講座	
	吉田宗人	
25.	C7棘突起を温存した頰椎椎弓形成術の中長期成績	117
	徳島大学大学院	
	安井夏生	
26.	脊柱靱帯骨化症に関する研究	118
	国立病院機構岡山医療センター整形外科	
	中原進之介	
27.	1838年世界初の後縦靱帯骨化症報告論文の検証—C. A. Keyの驚くべき病態考察—	120
	鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学	
	松永俊二、林 協司、米 和徳、小宮節郎	
28.	黄色靱帯骨化症による胸部脊髄症手術の臨床疫学的研究	125
	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻外科病態学講座整形外科学分野	
	相澤俊峰、田中靖久、小澤浩司、松本不二夫、星川 健、川原 央、富谷明人、国分正一	
29.	胸椎脊柱靱帯骨化症に対する小皮切による前方手術に関する研究	133
	金沢大学整形外科	

富田勝郎	
30. 胸椎後縦靭帯骨化症をより安全におこなうためには—術中モニタリングについて—	134
名古屋大学大学院医学系研究科機能構築医学専攻運動・形態外科学講座整形外科学 松山幸弘、吉原永武、酒井義人、中村博司、片山良仁、石黒直樹	
31. 頸椎後縦靭帯骨化症の術中超音波診断	141
東京大学医学部整形外科 星地亜都司、竹下克志、川口浩、東川晶郎、村上元昭、中村耕三	
IV. 頸椎後縦靭帯骨化症診療ガイドライン	147
V. 研究成果の刊行に関する一覧表	321

I 班員構成

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

区分	氏名	所属等	職名
主任研究者	中村 耕三	東京大学大学院医学系研究科整形外科	教授
分担研究者	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)	教授
	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	客員助教授
	池川 志郎	理化学研究所・遺伝子多型研究センター	チームリーダー
	岩本 幸英	九州大学医学部整形外科	教授
	馬場 久敏	福井大学医学部器官制御医学講座整形外科領域	教授
	木村 友厚	富山医科薬科大学医学部整形外科	教授
	小宮 節郎	鹿児島大学医学部整形外科	教授
	藤 哲	弘前大学医学部整形外科	教授
	鏡 邦芳	北海道大学保健管理センター	教授
	四宮 謙一	東京医科歯科大学医学部整形外科	教授
	戸山 芳昭	慶應義塾大学医学部整形外科・脊椎脊髄外科	教授
	国分 正一	東北大学大学院医学系研究科医科学専攻外科病態学講座体性外科学分野整形外科学	教授
	田口 敏彦	山口大学医学部生体機能統御学・整形外科	教授
	米延 策雄	国立大阪南医療センター整形外科	副院長
	中村 孝志	京都大学大学院医学研究科	教授
守屋 秀繁	千葉大学医学部整形外科	教授	
研究協力者	谷 俊一	高知大学整形外科	教授
	吉田 宗人	和歌山県立医科大学整形外科	教授
	安井 夏生	徳島大学医学部整形外科	教授
	中原進之介	国立病院岡山医療センター整形外科	医長
	山本 謙吾	東京医科大学整形外科	教授
	石黒 直樹	名古屋大学医学部整形外科	教授
	富田 勝郎	金沢大学大学院機能再建学講座(旧整形外科学)	教授
	松末 吉隆	滋賀医科大学整形外科	教授
	永田 見生	久留米大学医学部整形外科	教授
	川島 博行	新潟大学大学院医歯学総合研究科細胞機能制御学分野	教授
事務局		東京大学医学部整形外科 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1 TEL: 03-5800-8656 FAX: 03-3818-4082	
経理事務 担当者	山下 信一	東京大学医学部附属病院事務部管理課 〒113-8655東京都文京区本郷7-3-1 TEL:03-5800-8737 FAX: 03-5800-8727 E-mail:yamashitas@adm.h.u-tokyo.ac.jp	

Ⅱ 総括研究報告書

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究

主任研究者 中村 耕三 東京大学大学院医学系研究科整形外科教授

研究要旨 脊柱靱帯骨化症の候補遺伝子として 35 遺伝子を選択し、合計 109SNP のジェノタイピングを行った結果、1 遺伝子の SNP において OPLL 発症との相関が示唆されたが、補正後は $p=0.09$ となり、有意と結論づけられるものではなかった。OPLL との相関が報告されている 3 遺伝子 (COL11A2, NPPS, TGFB1) についても相関は再現されなかったが、偽陰性の危険が残った。

ガイドラインについては、医学文献データベースで文献検索を行った。検索は MEDLINE で 1966~2003、医学中央雑誌で 1983~2003 とし、MEDLINE で 648 篇、医学中央雑誌で 1,687 篇検出された。査読を行い、論文のエビデンスレベルを決定した。疫学・自然経過、成因・病理・病態、診断、治療の 4 項について、約 90 のリサーチクエスションの設定を行い、サイエンティフィックステートメントを作成し、推奨を示した。

分担研究者	
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）教授
井ノ上逸朗	東京大学医科学研究所ゲノム 情報応用診断部門客員助教授
池川志郎	理化学研究所・遺伝子多型研 究センターチームリーダー
岩本幸英	九州大学医学部整形外科教授
馬場久敏	福井大学医学部器官制御医学 講座整形外科学領域教授
木村友厚	富山医科薬科大学医学部整形 外科教授
小宮節郎	鹿児島大学医学部整形外科教 授
藤哲	弘前大学医学部整形外科教授
鏡邦芳	北海道大学保健管理センター 教授
四宮謙一	東京医科歯科大学医学部整形 外科教授
戸山芳昭	慶應義塾大学医学部整形外科 ・脊椎脊髄外科教授
国分正一	東北大学大学院医学系研究科 医科学専攻外科病態学講座体 性外科学分野整形外科学教授
田口敏彦	山口大学医学部生体機能統御 学・整形外科教授
米延策雄	国立大阪南医療センター整形 外科副院長
中村孝志	京都大学大学院医学研究科教 授
守屋秀繁	千葉大学医学部整形外科教授
研究協力者	
谷 俊一	高知大学整形外科教授
吉田宗人	和歌山県立医科大学整形外科 教授
安井夏生	徳島大学医学部整形外科教授
中原進之介	国立病院岡山医療センター整 形外科医長
山本謙吾	東京医科大学整形外科教授
石黒直樹	名古屋大学医学部整形外科教 授
富田勝郎	金沢大学大学院機能再建学講 座（旧整形外科学）教授
松末吉隆	滋賀医科大学整形外科教授
永田見生	久留米大学医学部整形外科教 授
川島博行	新潟大学大学院医歯学総合研 究科細胞機能制御学分野教授

A. 研究目的

脊髄麻痺を引き起こす疾患は患者および家族への身体および精神的障害が甚大である。それらの麻痺性疾患のうち慢性発症ではとくに脊柱靭帯骨化症は多発する骨化巣、時間経過にともなう麻痺の進行という特異な病態を有する。さらに一部の患者では麻痺が重篤化し介護・福祉面での社会への負担も大きい。

原因については過去の特定疾患研究班において数々の画期的な解明がなされてきたが、原因遺伝子の同定には至っておらず、原因タンパク質の特定もされていない。さらに治療の必要性・有用性を検定する際に必要となる自然経過の研究は未だ散発的であり、また疾患の進行を予測する指標の選定も充分には行われていない。また診断基準は作成されているが、診断確定に至るまでに必要な診察・検査のアルゴリズムは含まれていない。すなわち診断の手順や個々の症例に則したテイラーメイド的治療法を目指した包括的なガイドラインはこれまで策定されていない。

原因については過去の特定疾患研究班において数々の画期的な解明がなされてきたが、原因遺伝子の同定には至っておらず、原因タンパク質の特定もされていない。さらに治療の必要性・有用性を検定する際に必要となる自然経過の研究は未だ散発的であり、また疾患の進行を予測する指標の選定も充分には行われていない。また診断基準は作成されているが、診断確定に至るまでに必要な診察・検査のアルゴリズムは含まれていない。すなわち診断の手順や個々の症例に則したテイラーメイド的治療法を目指した包括的なガイドラインはこれまで策定されていない。

本研究は、脊柱靭帯骨化症に対して、これまでの特定疾患研究班の研究成果を踏まえ

つつ、基礎研究として原因遺伝子のさらなる絞り込みと原因候補のタンパク質等の検討、臨床研究としてはガイドラインの作成を行うことで、病態解明と診療体系の確立を意図するものである。

B. 研究方法

遺伝子検索では孤発性 OPLL 患者 711 例、OPLL のない対照 1016 例を対象とし、理研 SNP データベースの情報に基づき選択した遺伝子特異的な一塩基多型(以下 SNP と略記)を遺伝的マーカーとして、症例対照相関解析を行った。また、症例群を性別、年齢、罹患椎体数により層別化し、それぞれ独立に解析を行った。統計学的解析には χ^2 自乗検定、もしくは Fisher の正確検定を用いた。

ガイドライン作成は日本整形外科学会による整形外科・脊椎外科疾患領域のガイドライン作成の一環としても行った。文献検索・取得には国際医学情報センターに一部委託しつつ、リサーチクエスションの設定後、文献を査読しガイドラインを策定した。ガイドラインは仮策定後、日本脊椎脊髄病学会・日本整形外科学会での評価ならびに検証を行った。また現時点での診断・治療における問題提起を行い、単施設の研究では困難であった研究課題に対する多施設研究の設定を検討する。

分担研究者の研究では阪大・吉川らは BMP の内軟骨性骨化における役割を解明するために、骨・軟骨特異的に BMP シグナルの活性化と不活化を行った。医科研・井ノ上らはこれまでの OPLL ゲノム解析に加え、OPLL に類似した疾患として知られている diffuse idiopathic hyperostosis (DISH)での COL6A1 遺伝子の関与について検討した。九大・岩本らは靭帯局所における伸張方向へのメカニカルストレスが重要な因子として注目し、生体ラットの尾椎に反復伸張ストレスを加え靭帯組織の応答を直接観察する実験モデルを開発した。福井大・馬場らは後縦靭帯骨化症の骨

化形成過程におけるサイトカインの発現、詳細な局在について解明するため、手術時に採取した頸椎後縦靭帯骨化巣に対し骨化伸展様式の組織学的検討を行った。富山医薬大・木村らは頸椎後縦靭帯骨化症(OPLL)に対し頸椎椎弓形成術を施行し、5年以上経過した症例55例を対象としてOPLLの骨化伸展の特徴を検討した。鹿児島大・小宮らは1838年世界初の後縦靭帯骨化症報告論文の検証・調査した。弘前大・古川らは脊柱靭帯骨化症に対する薬物治療のターゲットの検索を行った。東京医科歯科大・四宮らは頸椎前方除圧固定術後に生じる後咽頭腔の腫脹に関する研究をおこなった。慶応大・戸山らは片開き式脊柱管拡大術の長期成績について、特に重症度別の予後不良因子と術後頸髄症再悪化に着目して検討した。東北大・国分らは宮城県で手術が行われた14,333例を対象に、黄色靭帯骨化症による脊髄症の手術数と臨床疫学を検討した。山口大・田口らは脊髄力学特性データを有限要素法に導入し頸髄圧迫コンピュータ・シミュレーションを行い、バーチャル急性および慢性脊髄損傷実験を行った。京大・中村らは内軟骨性骨化における石灰化関連遺伝子群の解析を行った。千葉大・守屋らは損傷脊髄の機能再生に骨髄間質細胞由来シュワン細胞移植がおよぼす効果ならびに頸椎後縦靭帯骨化症に対する前方除圧固定術と椎弓形成術の比較検討を行った。高知大・谷らは脊柱管占拠率が50%以上或いは50%未満の頸椎後縦靭帯骨化症手術症例において前方法と後方法の合併症の有無およびその手術成績を比較した。和歌山県医大・吉田らは多椎管圧迫が頸髄症の手術成績に及ぼす影響についての研究を行った。徳島大・安井らはC7棘突起を温存した頸椎椎弓形成術の中長期成績を調査した。岡山医療センター・中原らは頸椎後縦靭帯骨化症に対して手術的加療を行った症例について術後成績の評価ならびに、外傷契機により発症した症例と比較検討を行った。東京医大・山本

らはレプチン抵抗性Rat脊柱靭帯細胞におけるインスリン・IGF-1シグナルの検討を行った。名古屋大・石黒らは胸椎OPLLにおける術中脊髄モニタリングについて検討した。金沢大・富田らは胸椎脊柱靭帯骨化症に対する小皮切による前方手術に関する研究を行った。滋賀医大・松末らは血清反応陰性脊椎関節症の感受性遺伝子同定に関する研究を行った。久留米大・永田らは脊柱靭帯骨化症における高感度発現プロテオミクス解析を行った。新潟大・川島らは靭帯細胞と骨芽細胞のメカニカルストレス応答性に関する研究を行った。

(倫理面での配慮)

本研究は血液サンプルに関しては、文部科学省・厚生労働省・経済産業省合同により平成13年3月29日に告示された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従って行われた。DNA検体については、当調査研究班に参加する17の医療施設における倫理委員会の承認の下、書面による被験者のインフォームドコンセントを得た後に収集されたものである。

C. 研究結果 および D. 考察

候補遺伝子として35遺伝子を選択し、合計109SNPのジェノタイプングを行った結果、1遺伝子のSNPにおいてOPLL発症との相関が示唆された(χ 自乗検定: $p=0.00083$)。しかし、多重検定に対するボンフェローニの補正後は $p=0.09$ となり、完全に有意と結論づけられるものではなかった。また、性別、年齢、罹患椎体数によって層別化したグループに特異的な相関が認められたものはなかった。過去にOPLLとの相関が報告されている3遺伝子(COL11A2、NPPS、TGFB1)について、我々の症例を用いて検証を試みたが、3遺伝子の

いずれにおいても相関は再現されなかった。我々の結果が偽陰性である可能性の検証目的に、それぞれに遺伝子型危険率を3と仮定した場合のアレル β 過誤率を算出した。COL11A2、TGFB1 の β 過誤率はともに 0.05 以下となり、偽陰性を充分否定できたが、NPPS では 0.13 となり、わずかではあるが偽陰性の危険が残った。結論を得るには今後さらなる解析が必要である。

ガイドライン策定に関しては米延策雄大阪南医療センター副院長を中心としてガイドライン委員会が作られた。本症の診療上の判断において求められるリサーチクエストを 4 章、12 節、約 100 項目設定し、リサーチクエストを分析し、これに対するエビデンス検索のためのキーワード設定をおこなった。設定したキーワードによる文献一次検索により、日本語文献約 800 篇、英語文献約 400 篇を選定した。さらに弁別・取捨選択をおこなって採用した文献を査読委員に委ね、エビデンステーブルを作成した委員によるサイエンティフィックステートメントが作成後、委員会において校閲の後、完成した。これらは現在進行している日本整形外科学会による整形外科・脊椎外科疾患領域のガイドライン作成の一環でもあり、特に頸椎症性脊髄症および腰椎椎間板ヘルニアガイドラインとの整合性にも配慮している。今後、日本脊椎脊髄病学会などでの評価検討を行う予定である。

分担研究者では阪大・吉川らは BMP は軟骨で活性化すると軟骨と骨を増大させる方向に働くが、骨で BMP シグナルを活性化し続けると、骨構造の破綻が起きることを明らかにした。医科研・井ノ上らは COL6A1 多型はチェコ DISH 患者との関連は認めなかったものの、イントロン 32(-29) 多型で日本人 DISH と有意な

相関を認め、COL6A1 遺伝子は日本人における骨化傾向と関連する遺伝子と推測した。九大・岩本らはラット後縦靭帯、前縦靭帯は純粋な伸張ストレスの影響で、靭帯の肥厚、変性を伴った異所性の軟骨・骨形成がもたらされることが確認した。福井大・馬場らはヒト OPLL 組織における内軟骨性骨化過程では、non-OPLL 組織において認めた骨棘先端部での骨化形成過程に比べ特に石灰化前線部での活動性の亢進を明らかにした。富山医薬大・木村らは骨化伸展の様式は、およそ以下の 3 群に分けられると報告した。第 1 群:術直後の骨化伸展は緩徐で、1 年以降に大きく伸展が見られるものであり、これらは 40 歳代の比較的若く、連続型、混合型の OPLL に多いという特徴。第 2 群:術直後に骨化伸展が著しく 1 年以降には伸展が緩徐になるものであり、これらは 50 から 60 歳代の高齢者で、連続型、混合型の OPLL に多いという特徴。第 3 群:骨化伸展が顕著でない症例であり、年齢は問わず分節型に多く認められるという特徴。鹿児島大・小宮らは後縦靭帯骨化症の世界初の発表論文を検証し本症の成因に関する考察で大変興味深い知見を得た。弘前大・古川らは治療薬のターゲットとして検討の意義があると報告した。東京医科歯科大・四宮らは最も腫脹が強くなるのは術後 1~2 日であった。また、固定範囲が C4 椎体以上におよぶもの、手術時間が 3 時間以上におよぶもので腫脹が強くなる傾向があることを報告した。慶応大・戸山らは 10 年以上経過観察をした 30 例中 2 例(6.7%)にのみ骨化の進展による頸髄症の再悪化を認めた。このことから本術式の除圧効果は長期的にも維持されると報告した。東北大・国分らは OLF 単独による胸髄症の症例は 141 例、OLF に後縦靭帯骨化(OPLL)を

合併した症例は 25 例であったこと、術前の胸髄症スコアは 11 点満点で平均 5.2 点であり、術後平均 2.8 年の経過観察で平均 7.9 点に改善していた。平均改善率は 47%であったと報告した。山口大・田口らは外傷性急性脊髄損傷モデルでは、脊髄内応力は急激に上昇し、脊髄は高度に傷害された、長年ゆっくと脊髄圧迫が進んでいくCSMやOPLLモデルでは脊髄内応力は常に低く保たれ、脊髄傷害は起こしにくく、症状も出にくいと考えられること、またCSMやOPLLの急性悪化モデルは、前方からの慢性圧迫状態に後方から動的圧迫が加わることで再現できたこと、そして脊髄内応力は脊髄の後方を中心に急上昇し、指のしびれ、Numb clumsy hand、手指巧緻運動障害や歩行障害などの臨床症状を説明できたと報告した。京大・中村らは同定された石灰化を促進あるいは抑制していると考えられる遺伝子群の中から OB cadherin に注目し解析を進めた結果、OB cadherin が内軟骨性骨化において重要な役割を果たす事が明らかにした。千葉大・守屋らは脊髄損傷に対する骨髄間質細胞由来 Schwann 細胞移植の有用性が証明され、細胞移植療法への応用の可能性を示唆し、また椎弓形成術の成績不良因子として、脊髄の後方移動が不十分なことに加え、最大圧迫高位での椎間可動性の存在を示唆した。高知大・谷らは頸椎部 OPLL に対して前方除圧固定術を施行する場合、顕微鏡を用いて骨化巣を丁寧に、かつ、慎重に薄く削り、骨化巣を前方へ浮上させることで脊髄損傷を回避すれば、後方法に比べて良好な手術成績を得ることができると報告した。和歌山県医大・吉田らは圧迫性頸髄症全体では画像上の多椎間圧迫と JOA 改善率の間には統計学的に有意な相関を認めなかったが、疾患別の検討

では OPLL で脊髄圧迫数と JOA 改善率が相関する傾向($p=0.09$)を認めると報告した。徳島大・安井らは頸椎症性脊髄症に対するC7 棘突起温存、椎椎弓形成術は長期間にわたり、神経学的改善が維持されていたと報告した。岡山医療センター・中原らは外傷の有無による差異がなかったことを報告した。東京医大・山本らは主にIRS-1を介する細胞増殖シグナルの亢進がその靭帯骨化過程に関与することを免疫組織学的に示した。名古屋大・石黒らは術中脊髄モニタリングの重要性を報告した。金沢大・富田らは胸椎靭帯骨化症に対する前方・後方アプローチによる脊髄全周除圧術において、我々は前方アプローチを約7 cmの小皮切で展開し手術を施行した。小皮切で行うことにより患者の侵襲を小さくすることができ、術後疼痛も軽減することができたと報告した。滋賀医大・松末らは CYP17 の遺伝子多型(-34T>C)は日本人男性 HLA-B27 陰性 SNSA 患者の発症に有意に関連していると報告した。久留米大・永田らは蛍光染色による高感度発現プロテオーム解析を行うことにより、より多くのタンパク質を検索し、糖鎖修飾作用を観察したところ、タンパク質と糖鎖との共有結合の違いを示した。新潟大・川島らは靭帯細胞には、MS によって誘導される石灰化刺激に対する抑制機構が働いていることが明らかにし、この抑制機構は、以前報告した Msx2 を介する抑制機構とは異なるもので、両者は協調的に作用していると考えられると報告した。

E. 結論

骨・軟骨代謝にかかわる遺伝子群の知見は年々増え続けている。より効果的、効率的な原因遺伝子検索に向けて、家系内発症例を用いた連鎖解析は非常に強力なツールとなり

うる。具体的には、複数の患者を含む大家系を用いたパラメトリック連鎖解析、もしくは罹患同胞対を用いたノンパラメトリック連鎖解析でゲノム上の責任遺伝子座を大まかに絞った後に、孤発症例を用いた相関解析によって原因遺伝子をピンポイントで特定するという手法である。大家系については、OPLL の発症好発年齢が中年以降であることを考慮すると、症例収集は困難を極めることが予想される。しかし、同胞相対危険度が 30%近い本疾患では、罹患同胞対の収集は比較的容易なはずであり、多数の罹患同胞対を用いたノンパラメトリック連鎖解析は、現時点でとり得る最も有効な方法の一つであろう。そのため今後の班研究では分担研究者を大幅に増加することで、同胞・大家系例の収集を目指す。

出版やインターネットなどによる公開でガイドラインの普及を目指す一方で、未解決の臨床問題への多施設研究を行っていく。脊柱靭帯骨化症の実態調査は昭和 60 年に大規模に行われているが、20 年が経過して脊柱靭帯骨化症の理解が広まり、手術治療を中心とした治療法の進歩や患者数・年齢の変化などにより現状と一致しない点が多くなりつつある。したがって公衆衛生学教室の協力のもとにガイドライン普及前における疾患特異的な実態調査を行い、診療の基礎データ収集を行っていく。

F. 健康危険情報

現在、介入をおこなう研究は行われておらず、またゲノム研究においては「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)」に従っており、検体の提供者からは、書面によるインフォームドコンセントを取得し、

特に、個人情報の保護に留意している。

Ⅲ 分担研究報告書

後縦靱帯骨化症の遺伝子解析に関する研究

分担研究者 堀越泰三¹⁾ 池川志郎²⁾

理化学研究所・遺伝子多型研究センター

変形性関節症関連遺伝子研究チーム 1) 研究員 2) チームリーダー

研究要旨:我々は後縦靱帯骨化症 (Ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine: OPLL) の原因解明のため、分子遺伝学的手法による疾患感受性遺伝子の特定を試みている。今回我々は OPLL 症例 711 例、対照 896 例を対象に、SNP を遺伝的マーカーとして候補遺伝子アプローチによる症例対照相関解析を行った。その結果、1 遺伝子に弱い相関が示唆された。また、過去に OPLL との相関が報告されている 3 遺伝子について検証を行ったが、相関は再現されなかった。今後予定される罹患同胞対、あるいは大疾患家系を対象とした連鎖解析に進むべく、家系内発症サンプル収集を引き続き行っている。

A. 研究目的

本研究の目的は、分子遺伝学的手法により、OPLL 発症に関与する感受性遺伝子を同定することである。

B. 研究方法

1) 孤発性 OPLL 患者 711 例、OPLL のない対照 896 例から収集したゲノム DNA を用い、遺伝子特異的な一塩基多型(以下 SNP と略記)を遺伝的マーカーとした症例対照相関解析を行った。また、症例群を性別、年齢、罹患椎体数により層別化し、それぞれ独立に解析を行った。候補遺伝子として 35 遺伝子を選択し、合計 108SNP のジェノタイピングをインベーター法もしくはは

Taqman 法により行った。症例対照間のアレル分布を比較し、統計学的解析には χ^2 乗検定もしくは Fisher の正確検定を用いた。

2) OPLL 疾患家系から収集したゲノム DNA を用いてパラメトリック連鎖解析を行い、責任遺伝子座を同定する。遺伝的マーカーにはマイクロサテライトマーカーを使用する。その後、責任遺伝子座に存在する遺伝子特異的 SNP を用いた相関解析を行い、責任遺伝子多型を同定する。

3) OPLL 罹患同胞対から収集したゲノム DNA を用いてノンパラメトリック連鎖解析を行い、責任遺伝子座を同定する。過去の厚生労働省特定疾患対策研究事業において鹿児島大、弘前大を中心に収集済みの

140 対に加え、研究班に参加する全国の共同研究機関より、新たに 50-100 対の罹患同胞を収集する。遺伝的マーカーにはマイクロサテライトマーカーを使用する。その後、責任遺伝子座に存在する遺伝子特異的 SNP を用いた相関解析を行い、責任遺伝子多型を同定する。

(倫理面への配慮)

本研究に用いられた DNA 検体は各検体の収集医療施設における倫理委員会の承認の下、書面による被験者のインフォームドコンセントを得た後に収集されたものである。本研究は文部科学省・厚生労働省・経済産業省合同により平成 13 年 3 月 29 日に告示された「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い行われた。

C. 研究結果

- 1) 1 遺伝子の SNP において OPLL 発症との相関が示唆された。しかし、多重検定に対するボンフェローニの補正を加えた場合、5%の危険率で有意な相関を示すものではなかった。過去に OPLL との相関が報告されている 3 遺伝子 (*COL11A2*、*NPPS*、*TGFBI*) について、我々の症例を用いて検証を試みたが、3 遺伝子のいずれにおいても相関は再現されなかった。また、性別、年齢、罹患椎体数によって層別化したグループに特異的な相関が認められたものはなかった。
- 2) 現在までに 2 つの小規模疾患家系を収集済みである。
- 3) 現在までに 15 罹患同胞対を収集済

みである。

D. 考察

今回弱い相関が示唆された 1 遺伝子については、さらなる遺伝学的、機能的検証が不可欠ではあるが、重要な感受性候補遺伝子の一つと考えられる。また、本研究の結果から、既報の OPLL 感受性候補遺伝子群が疑陽性である可能性が示唆された。この結果は、過去の相関解析においては、本研究と比較して対象集団が小さく、十分な検出力が得られなかったことに起因すると推察する。

E. 結論

本研究において我々は、SNP を遺伝的マーカーとした大規模症例対照相関解析を行い、1 遺伝子に OPLL との相関が示唆された。また、過去に OPLL への関与を疑われた 3 遺伝子についてその相関を検証し、おおむね否定的な結果を得た。OPLL 感受性遺伝子検索における本手法の有効性は明らかであり、今後予定される罹患同胞対、および疾患家系を用いた連鎖解析と合わせ、さらなる成果が期待できると結論する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

- 1.論文発表 なし
- 2.学会発表 2件

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班

平成 16 年度第 1 回班会議（平成 16 年 1
月 31 日）

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班
平成 16 年度第 2 回班会議（平成 17 年 1
月 29 日）

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

ゲノム全域スクリーニングによる後縦靭帯骨化症責任遺伝子同定

分担研究者 井ノ上 逸朗 東京大学・医科学研究所 客員助教授

A. 研究目的

近年、ヒトのゲノムドラフト配列の解明や数百万個から数千万個ともいわれるヒト遺伝子多型 (SNPs) の報告、データベース構築などにより、一気にゲノムサイエンスが加速し、ポストシーケンスへ向かっている。医学領域においては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、比較的弱い遺伝的背景にさまざまな環境要因が複雑に絡み合っただけで発症する多因子疾患である。脊椎後縦靭帯骨化症 (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、脊柱靭帯骨化症調査研究班を中心に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。OPLL 同胞での危険率は 10 (relative risk to sibling) とされており、高齢発症疾患ながら common disease の中では遺伝背景が強い疾患といえる。遺伝背景の強い疾患では、家系を収集し、連鎖解析により遺伝子座を特定し、その領域から疾患関連遺伝子を同定する戦略が有効と考えられる。本研究班の組織的な協力により罹患同胞対を収集し、ゲノム全域にわたるノンパラメトリック連鎖解析

をおこなった。結果、21 番染色体テロメア領域に最も強い連鎖を認めた。連鎖不平衡領域の網羅的 SNP スクリーニングにより OPLL 感受性遺伝子として collagen 6A1 (COL6A1) 遺伝子の同定ができています。OPLL 感受性遺伝子同定作業を継続しつつ、同定できた遺伝子の機能的関与から OPLL 発症メカニズムを解明し、治療法開発への基礎研究とする。

B. 研究方法

患者検体収集：罹患同胞対連鎖解析により、ゲノム上での遺伝子座の特定を試みた。その目的に罹患同胞対が必要で、鹿児島大学、弘前大学を中心に本研究班の協力で、現在までのところ 141 対の OPLL 罹患同胞対を得ることができている。同様にアソシエーション・スタディに必要となる OPLL 患者、非 OPLL 患者 (単純 X 線で OPLL を否定できたグループ)、それぞれ 342 例、298 例を収集できている。それぞれの患者について、発症年齢、症状、OPLL 臨床型 (連続型、分節型、混合型、その他型)、骨化している頸椎の位置など詳細にわたる臨床情報をエクセルファイルに保存している。なお個人情報に関しては個人情報管理者により