

匿名化かつ管理されており、臨床データとしては入力されていない。血液からのゲノム DNA 精製は常法に従った。

疾患感受性については人種差があることはよく知られている。残念ながら白人では OPLL 頻度は低いので、白人サンプルの収集は困難であった。一方、diffused idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) は全身性骨化傾向をきたす疾患で白人に多く、OPLL 類似疾患として位置づけられている。チェコ・プラハ大学との共同研究により白人 OPLL、および DISH の収集を開始した。また日本人でも 100 例の DISH 患者 DNA を収集している。本研究についても医科学研究所倫理審査委員会で承認済みである。

罹患同胞対連鎖解析：ゲノム全域を網羅するマイクロサテライトマーカーセットは ABI Linkage mapping set version II を用いた。このセットは 400 個のマーカーから成り、ゲノム全域を平均 8 センチモルガン間隔で網羅している。しかしながらいくつかの問題点もあった。OPLL は高齢疾患であり、患者両親の DNA を得ることが困難なので、それぞれのマーカーについてアレル頻度から両親の遺伝型を予測し同胞間での共有アレル数を算出する必要がある。その際、高いヘテロ接合性（情報度）が要求される。元来このマーカーセットは白人ではヘテロ接合性が高いものの、日本人においては 400 マーカーのうち 40 個は多型性（情報度）の低いマーカーであった（ヘテロ接合性 < 60%）。そこで、データベースからマイクロサテライトを再度検索し、情報度の高いマーカーと差し替えた。結果、404 個からなる

日本人に適した新たなマーカーセットが構成できた。平均ヘテロ接合性は 75.6%、平均インターバルは 8.7 cM、最大インターバルは 26.8 cM である。

連鎖検定は同胞間でのアレル共有をカウントし、帰無仮説からの乖離を検討する。連鎖の検定は SIBPAL と GENEHUNTER を用いた。両方ともノンパラメトリック連鎖解析であり、メンデルの遺伝形式、侵透度、遺伝子頻度などの情報は必要でない。OPLL のような多因子疾患には適した手法であるが、検定力が弱い、特定できる領域が広い（20 センチモルガン程度）という欠点がある。

マイクロサテライトタイピング：蛍光色素でラベルされたプライマーにより PCR をおこない、ABI3700 シーケンサーで解析し、サイズの違いを検出することでタイピングをおこなった。タイピングには GENESCAN, GENOTYPER のソフトウェアを用いている。21q22 領域での 1 塩基多型 (SNP) 解析：もっとも強い連鎖を得た 21 番染色体領域(21q22)には 200 個の遺伝子が存在している。それらを領域候補遺伝子として、SNP を以下のデータベースから得た。

<http://snp.cshl.org>

[http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index\\_ja.html](http://snp.ims.u-tokyo.ac.jp/index_ja.html)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>

位置に頼らず、骨代謝と密接に関連する機能的な遺伝子も候補としていくつか選定して、同様にデータベースから SNP を同定している。データベースに SNP が存在しない場合は、直接シーケンス法により SNP を独自に開発している。

SNP タイピングには PSQ96 (Pyrosequencing AB) 及び ABI 3700 autosequencer (PE Biosystems) を使用した。SNP 頻度は患者・対照関連解析にて  $\chi$  検定を用い統計解析した。必要に応じて Odds 値をだしている。ハプロタイプ、連鎖不平衡解析は 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、弘前大学を中心として収集できた 140 対収集をタイピングした。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、住所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、厳密に管理されている。このように収集、管理されたサンプルは、鹿児島大学、弘前大学および東京大学倫理委員会の承認のもと適切に使用されている。

患者由来靱帯細胞培養 : OPLL 手術時 (対照は頸椎症性脊髄症) に摘出、処理される棘間靱帯を採取し、初代培養系を確立する。摘出サンプルを 1 mm 片に細かく切断し、培養皿にうつし、explant 細胞を DMEM で培養する。細胞から RNA, DNA を抽出し、遺伝型ごとに RT-PCR をおこなう。

#### (倫理面への配慮)

本研究はヒト遺伝子多型解析が主体なので、倫理面には当初から十分配慮して推進してきた。鹿児島大学、弘前大学、東京大学倫理審査委員会で患者 DNA 採取および靱帯組

織採取について承認を得ている。また DISH 患者は秋山脳外科との共同研究で収集しており、東京大学にて倫理承認されている。それぞれの臨床施設に個人情報管理者が置かれているので、医科研での検体、ファイルには個人情報は一切存在しない。

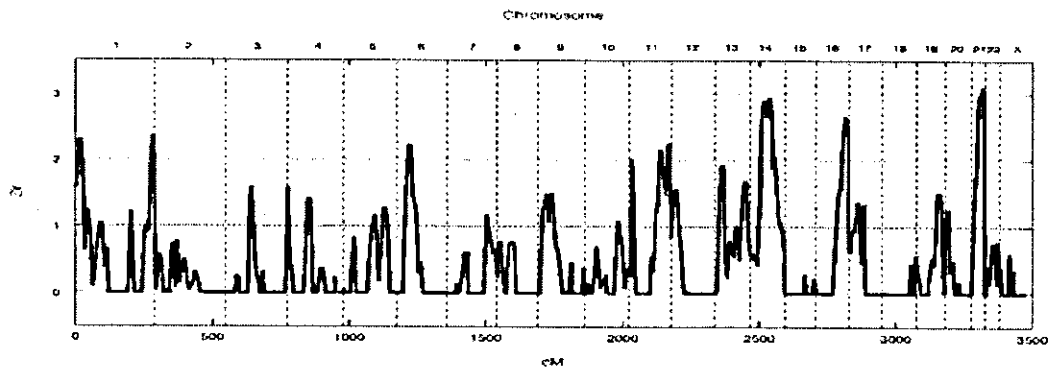
## C. 結果および考察

### C-1) ゲノム全域での連鎖解析

本研究班の全面的な協力により罹患同胞対を増やすことができている (141 対)。OPLL の相対危険率は 10 と算出されているので、この罹患同胞対でゲノム全域解析がおこなえる検定力があると判断された。同胞 250 例について 400 マーカー以上のタイピングをおこなうので、延べ 10 万タイピング以上となり膨大な量の解析となるので、自動化システムが必要である。得られたデータは GENESCAN, GENOTYPER 等のプログラムで半自動的にタイピングをおこない、その後の連鎖解析に導入した。連鎖の検定は SIBPAL, GENEHUNTER でおこなっている。404 個のマイクロサテライトセットをもちいるとゲノム全域を 10 センチモルガン以下の間隔で解析できる。罹患同胞対連鎖解析法の欠点のひとつは、組換え情報がないので狭い領域への絞り込みが不可能な点である。一方、同様の理由で 10-20 センチモルガンにわたり連鎖を認めるので、10 センチモルガン間隔での解析でも連鎖を見逃すことは少ないともいえる。通常、連鎖を認めた領域でさらに多数のマーカーをもちいた解析 (dense mapping) をおこない、確実な連鎖の検定をおこなう。OPLL の全ゲノム解

析で6ヶ所の遺伝子座を特定できた。1p, 6p, 11q, 14q, 16q,そして21qである(図1)。

図1 OPLLのゲノム全域連鎖解析



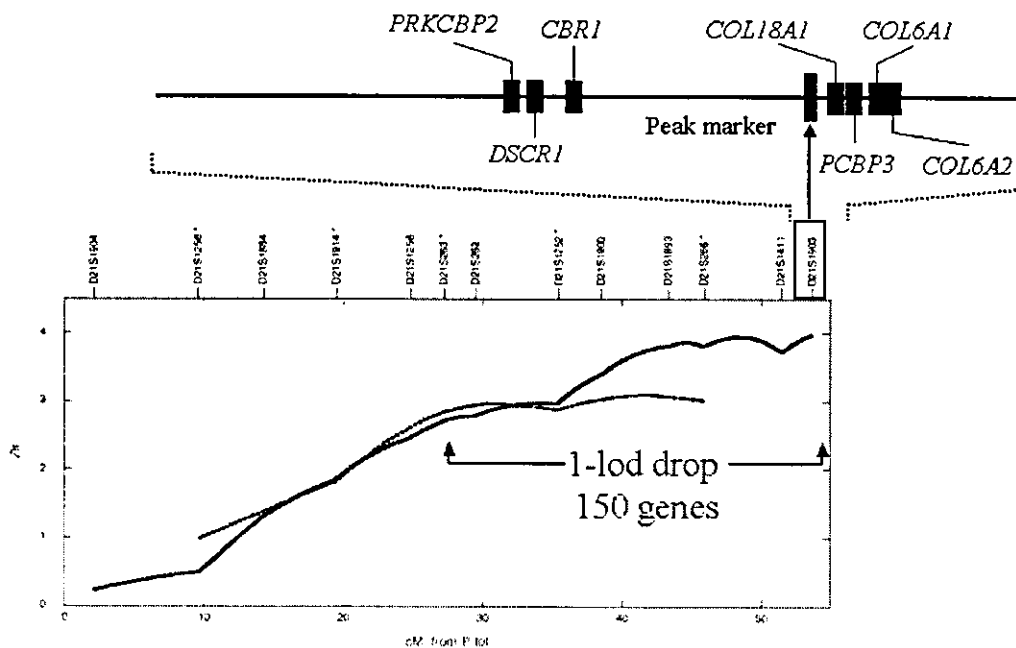
Best multipoint linkage results

| Chromosome<br>Region | Position<br>(cM)* | Width of<br>peak (cM) | Peak<br>Z <sub>h</sub> | Allele Sharing<br>* | 1 framework marker(s) nearest to the<br>peak of linkage |
|----------------------|-------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------|
| 1p                   | 18.0              | 6.9                   | 2.31                   | 0.605               | D1S450                                                  |
| 1q                   | 285.8             | 4.9                   | 2.34                   | 0.640               | D1S2836                                                 |
| 6p                   | 48.2              | 2.9                   | 2.22                   | 0.586               | D6S276                                                  |
| 11q                  | 140.2             | 2.6                   | 2.24                   | 0.593               | D11S910                                                 |
| 14q                  | 83.0              | 41.4                  | 2.95                   | 0.640               | D14S276, D14S63, D14S258, D14S74                        |
| 16q                  | 117.0             | 19.0                  | 2.64                   | 0.597               | D16S3091, D16S520                                       |
| 21q                  | 41.7              | 23.3                  | 3.09                   | 0.677               | D21S263, D21S1252, D21S266                              |

その中でもっとも強い連鎖を認めた領域は21番染色体長腕(21q22)であり、D21S1903で  $\text{lod} = 3.6$ ,  $P = 0.000009$  と非常に強い連鎖

を得ている(図2)。この結果からD21S1903近傍に新たなOPLL責任遺伝子が存在することが強く示唆される。

図2 21q連鎖と有意差を認めた遺伝子



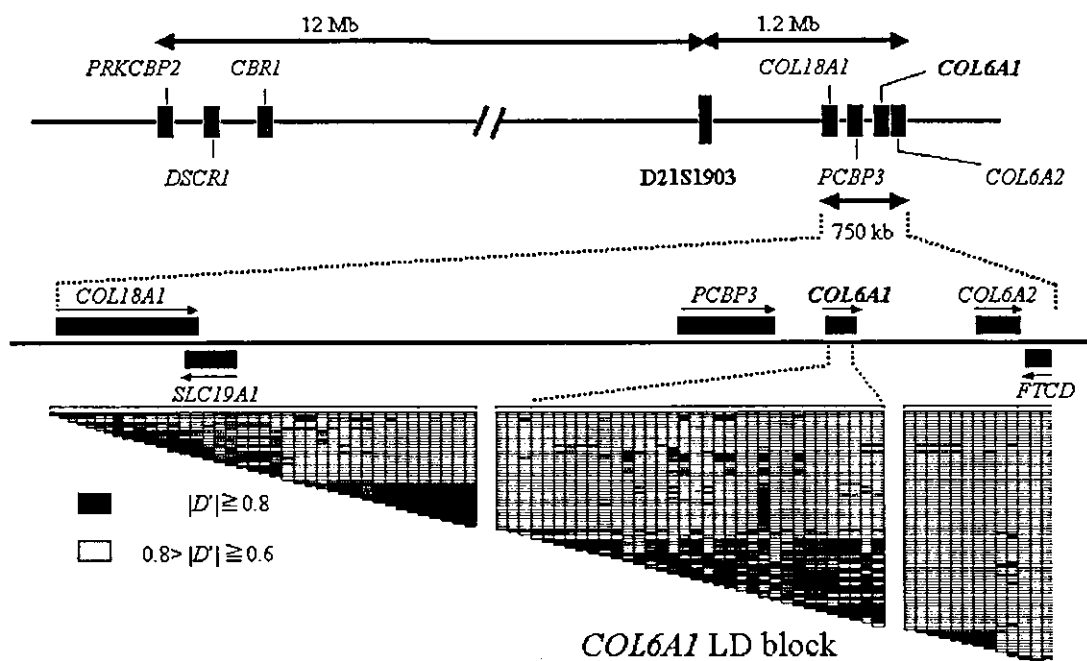
### C-2)連鎖領域の SNP スクリーニング

21 番染色体 q22.3 に連鎖のピークを認めたものの、lod 値が 2 を超える領域は染色体の半分をしめる 30 メガ塩基におよんでいた (図 2)。連鎖領域には 200 個の遺伝子が存在しており、すべての遺伝子について SNP スクリーニングを試みた。頻度の高い SNP を検出できない遺伝子も存在し、最終的に 140 遺伝子を解析した。1 次スクリーニングのタイピングは、600SNPs についてケース及びコントロールサンプルそれぞれ 96 例で行った。有意差を認めた SNP および該当遺伝子に関して、SNP を増やし、患者 (246

例) および対照 (202 例) で関連解析を行った (2 次スクリーニング)。この段階で強い有意差を得た SNP については全症例で検討した。

連鎖領域を中心にした 150 遺伝子、約 600 SNP の 1 次スクリーニングにて、7 遺伝子、14 SNP で P value<0.01 の有意差を認めている。なかでも、collagen 6A1 (COL6A1) 遺伝子の JST016808 多型は、関連解析にて約 11% のアレル頻度差があり、 $\chi^2$  検定では最も強い有意差を認め、OPLL への関与が示唆された。

図3 21q22.3連鎖領域の連鎖不平衡ブロック



COL6A1 を中心とした連鎖不平衡ブロック解析により、それぞれの遺伝子が独立に連鎖不平衡ブロックを形成していた (図 3)。すなわち遺伝子ごとに SNP 解析をおこなうこと

で、感受性遺伝子同定が可能と推測された。そこで、COL6A1 において 32 箇所の SNP を同定し、詳細なアソシエーション・スタディをおこなった。18SNP で P<0.05 の有意差を検出

Table 1

Polymorphisms of *COL6A1* and their associations with OPLL

| No. | Location <sup>a</sup>         | NCBI dbSNP ID | Nucleotide Substitution | Amino Acid Change | Allele Frequency |              | $\chi^2$ (df=1) | P-value |
|-----|-------------------------------|---------------|-------------------------|-------------------|------------------|--------------|-----------------|---------|
|     |                               |               |                         |                   | OPLL             | Non-OPLL     |                 |         |
| 1   | 5'UTR (-5)                    | rs7671        | G/C                     |                   | .323 (n=314)     | .262 (n=284) | 5.33            | .020    |
| 2   | Intron 2 (+651)               | rs2072699     | G/A                     |                   | .217 (n=92)      | .215 (n=86)  | 0.003           | .958    |
| 3   | Intron 2 (+758)               | non-dbSNP     | T/C                     |                   | .352 (n=91)      | .238 (n=86)  | 5.44            | .019    |
| 4   | Intron 3 (+1326)              | rs760437      | C/T                     |                   | .049 (n=92)      | .068 (n=88)  | 0.61            | .435    |
| 5   | Intron 4 (+13)                | rs754507      | A/C                     |                   | .320 (n=86)      | .227 (n=77)  | 3.48            | .062    |
| 6   | Intron 4 (+20)                | non-dbSNP     | G/C                     |                   | .176 (n=85)      | .132 (n=76)  | 1.23            | .267    |
| 7   | Intron 4 (+37)                | non-dbSNP     | A/G                     |                   | .203 (n=64)      | .089 (n=62)  | 6.58            | .010    |
| 8   | Intron 8 (-208) <sup>b</sup>  | rs2839076     | G/C                     |                   | .123 (n=312)     | .087 (n=281) | 4.08            | .043    |
| 9   | Intron 9 (+62)                | non-dbSNP     | T/C                     |                   | .423 (n=300)     | .346 (n=272) | 7.27            | .007    |
| 10  | Intron 9 (+188)               | rs2277813     | C/G                     |                   | .174 (n=290)     | .133 (n=267) | 3.61            | .057    |
| 11  | Intron 9 (-19) <sup>b</sup>   | rs2277814     | G/A                     |                   | .051 (n=89)      | .084 (n=89)  | 1.61            | .205    |
| 12  | Exon 15 (+39)                 | rs1980982     | T/C                     | G/G               | .402 (n=331)     | .310 (n=287) | 11.23           | .0008   |
| 13  | Intron 15 (+39)               | non-dbSNP     | C/T                     |                   | .264 (n=331)     | .200 (n=285) | 7.06            | .008    |
| 14  | Intron 18 (-138) <sup>b</sup> | rs760439      | G/A                     |                   | .031 (n=81)      | .085 (n=59)  | 3.91            | .048    |
| 15  | Intron 19 (+27)               | rs2850173     | C/A                     |                   | .137 (n=84)      | .072 (n=83)  | 3.72            | .053    |
| 16  | Intron 19 (+116)              | rs2075893     | T/C                     |                   | .455 (n=77)      | .327 (n=78)  | 5.30            | .021    |
| 17  | Intron 19 (+361)              | rs2742071     | T/C                     |                   | .043 (n=92)      | .074 (n=88)  | 1.51            | .219    |
| 18  | Intron 19 (-152) <sup>b</sup> | rs2850174     | T/G                     |                   | .132 (n=87)      | .091 (n=77)  | 1.39            | .238    |
| 19  | Intron 20 (+745)              | rs2850175     | A/C                     |                   | .133 (n=338)     | .077 (n=297) | 10.26           | .001    |
| 20  | Intron 20 (-32) <sup>b</sup>  | rs2839077     | C/T                     |                   | .417 (n=333)     | .340 (n=296) | 8.06            | .005    |
| 21  | Intron 21 (+18)               | rs2276254     | A/C                     |                   | .340 (n=316)     | .236 (n=277) | 15.37           | .00009  |
| 22  | Intron 21 (-36) <sup>b</sup>  | rs2276255     | A/G                     |                   | .076 (n=79)      | .026 (n=76)  | 3.90            | .048    |
| 23  | Intron 22 (+19)               | rs2276256     | G/C                     |                   | .234 (n=92)      | .264 (n=89)  | 0.45            | .504    |
| 24  | Intron 32 (-29) <sup>b</sup>  | non-dbSNP     | T/C                     |                   | .335 (n=336)     | .216 (n=298) | 21.99           | .000003 |
| 25  | Intron 33 (+15)               | rs2236485     | G/A                     |                   | .124 (n=342)     | .063 (n=292) | 13.44           | .0002   |
| 26  | Intron 33 (+20)               | rs2236486     | A/G                     |                   | .440 (n=342)     | .329 (n=293) | 16.27           | .00005  |
| 27  | Intron 33 (+55)               | rs2236487     | A/G                     |                   | .439 (n=330)     | .327 (n=278) | 15.95           | .00006  |
| 28  | Intron 33 (+88)               | rs2236488     | C/T                     |                   | .311 (n=323)     | .252 (n=270) | 5.08            | .02     |
| 29  | Exon 35 (+85)                 | rs1053312     | G/A                     | R/H               | .248 (n=322)     | .199 (n=271) | 4.97            | .044    |
| 30  | Exon 35 (+203)                | rs1053315     | G/A                     | A/A               | .249 (n=321)     | .199 (n=269) | 4.24            | .040    |
| 31  | Exon 35 (+205)                | non-dbSNP     | C/T                     | S/L               | .059 (n=321)     | .065 (n=269) | 0.17            | .677    |
| 32  | Exon 35 (+332)                | rs1053320     | C/T                     | S/S               | .235 (n=321)     | .180 (n=269) | 5.32            | .021    |

<sup>a</sup> indicates the nucleotide position from the start of the exon or intron with the exception of 5'UTR in which the position is numbered from the start codon.

<sup>b</sup> indicates the nucleotide position from the last intronic nucleotide.

できている。中でも、イントロン 32 (-29) 多型でもっとも強い有意差を得ている (OPLL33.5% vs. non-OPLL 21.6%,  $\chi^2=21.99$ ,  $P=0.000003$ ) (表 1)。この結果から、COL6A1 が OPLL の責任遺伝子のひとつと同定できた (Tanaka et al. Am J Hum Genet 2003)。

OPLLの感受性遺伝子としてCOL6A1が同定でき報告したものの、追試なしには確実なものとはいえない。ひとつの方策として、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。患者は日本のみでなく、チェコ・プラハ大学でも収集している。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た ( $P=0.0022$ ) (表 2)。よって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できた (Tsukahara et al. Spine in press)。

Table 2  
SNPs in COL6A1 and the associations with DISH patients

| Location <sup>a</sup> | NCBI dbSNP ID | Nucleotide substitution | Allele Frequency in Japanese $\chi^2$ |                  |                 |         | Allele Frequency in Czech subjects $\chi^2$ |               |                 |         |
|-----------------------|---------------|-------------------------|---------------------------------------|------------------|-----------------|---------|---------------------------------------------|---------------|-----------------|---------|
|                       |               |                         | subjects (No. of Subjects)            |                  | $\chi^2$ (df=1) | P value | (No. of Subjects)                           |               | $\chi^2$ (df=1) | P value |
|                       |               |                         | Japanese DISH                         | Japanese control |                 |         | Czech DISH                                  | Czech control |                 |         |
| Exon 15 (+39)         | rs1980982     | T→C                     | .351 (n=94)                           | .316 (n=291)     | 0.79            | .374    | .568 (n=81)                                 | .494 (n=79)   | 1.77            | .183    |
| Intron 15 (+39)       | non-dbSNP     | C→T                     | .189 (n=95)                           | .211 (n=291)     | 0.42            | .518    | 0 (n=82)                                    | 0 (n=83)      | 0               | 1       |
| Intron 21 (+18)       | rs2276254     | A→C                     | .298 (n=94)                           | .236 (n=277)     | 2.81            | .094    | .429 (n=92)                                 | .333 (n=90)   | 3.55            | .059    |
| Intron 32 (-29)       | non-dbSNP     | T→C                     | .328 (n=90)                           | .216 (n=298)     | 9.33            | .0022   | .354 (n=89)                                 | .365 (n=89)   | 0.05            | .825    |
| Intron 33 (+15)       | rs2236485     | G→A                     | .092 (n=92)                           | .063 (n=292)     | 1.80            | .179    | .048 (n=73)                                 | .074 (n=68)   | 0.81            | .367    |
| Intron 33 (+20)       | rs2236486     | A→G                     | .321 (n=92)                           | .329 (n=293)     | 0.05            | .826    | .293 (n=70)                                 | .333 (n=69)   | 0.53            | .467    |
| Intron 33 (+55)       | rs2236487     | A→G                     | .342 (n=92)                           | .327 (n=278)     | 0.14            | .707    | .275 (n=69)                                 | .293 (n=70)   | 0.10            | .746    |

<sup>a</sup> Numbers in parentheses indicate the nucleotide position from the start of exon or intron with the exception of intron 32 (-29), in which the number refers to its position from the last intronic nucleotide.

#### D. 考察

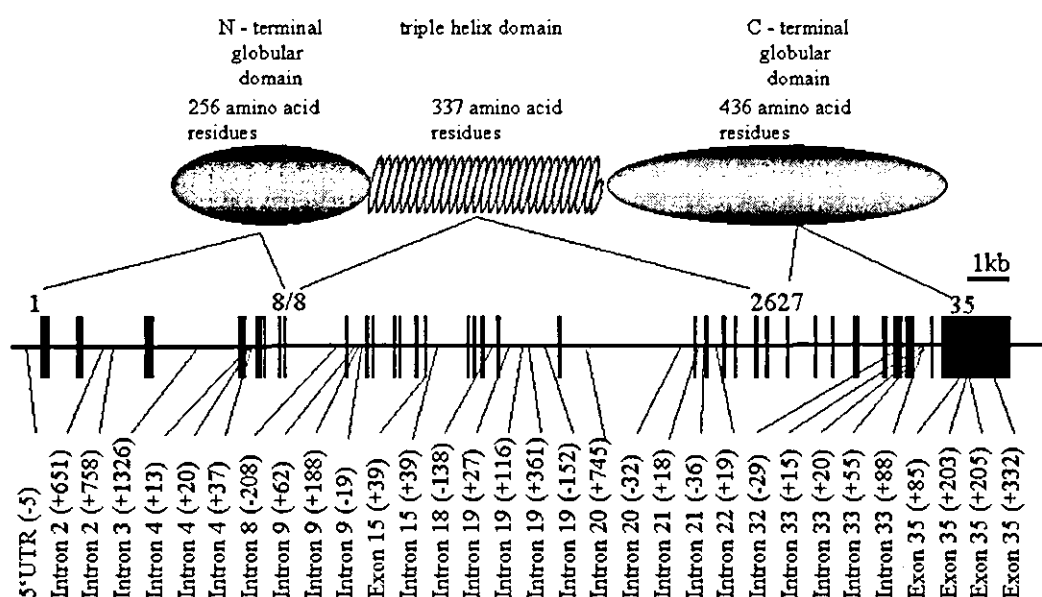
マイクロサテライトは 100 kbp に 1 個程度存

在し、リピート数の多型であるので多様度が高く連鎖解析に適している。一方、SNP はゲノム上に 300-1000 bp に 1 個と高頻度に存在するバイアレリックな遺伝子多型であり、安定した多型であるので、疾患遺伝子同定のためのツールとして有用性が高い。このような多型マーカーの特徴を活かして OPLL 責任遺伝子同定を試みた。まず、404 マイクロサテライトマーカーセットを用いたゲノム全域での連鎖解析により疾患感受性候補領域を絞り込んだ。そして連鎖領域において SNP を用いたアソシエーション・スタディ、連鎖不平衡、ハプロタイプ解析をおこない、疾患に関連する SNP、および遺伝子を同定する。

ゲノム全域スクリーニングによりもっとも強い連鎖を 21 番染色体で検出できた。連鎖領域 150 遺伝子のスクリーニングにより、最終的に COL6A1 遺伝子が OPLL と関連するこ

とを突き止めた。この成果は common disease においてポジショナル・クローニングに成功した国際的にも稀な例である。もっとも有意差の強かった SNP はイントロン 32 (-29) 多型であった。図に示すよう collagen 6A1 は N-末と C-末に球状ドメインが存在し、中間にコラーゲンに特異的な Triple helix domain を有する(図 4)。一般的にイントロン多型はスプライシングに影響を与える可能性がある、かつ COL6A1 では選択的スプライシングの存在が知られている。OPLL 患者から靭帯組織を採取し、培養靭帯細胞でのスプライシング変化を検討した。イントロン 32 (-29) C アレルのホモ接合体と T ホモ接合体の細胞での COL6A1 のスプライシングの差異を検討したが、遺伝子型による違いは検出できなかった(data not shown)。

図4 Gene organization 32 SNPs identified in COL6A1



すでに COL11A2 遺伝子の OPLL への関与を示しており、イントロン6多型が非 OPLL に多いこと、この多型によりエクソン6のスプライスアウトがおこること、またこのスプライシング変化が骨分化へ抑制的に機能することを明らかにしている (Koga et al. *Am J Hum Genet* 1998, Maeda et al. *J Bone Miner Res* 2001)。今回同定できた COL6A1 もコラーゲンファミリーなので、細胞外マトリックス形成と OPLL での異所性骨化との関連について、新たな展開が期待できる。また、それらの成果により、治療の標的を明らかにでき、治療法の開発に結実するであろう。

#### E. 結論

ゲノム全域連鎖解析にて lod 値 2 を超える領域を 6 箇所特定できた。その中で、最も強い連鎖を認めた 21 番染色体長腕テロメア領域を中心に、SNP を用いた関連解析を行った。600 SNP の解析で collagen 6A1 遺伝子多型が非常に高い有意差を示し、OPLL 感受性遺伝子と考えられた。

#### F. 健康危険情報

特記事項なし。

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

1. Ikeda R, Yoshida K, Tsukahara S, Sakamoto Y, Tanaka H, Furukawa K-I, Inoue I. PLZF promotes osteoblastic differentiation of human

mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J Biol Chem* in press.

2. Tsukahara S, Miyazawa N, Akagawa H, Forejtova S, Pavelka K, Tanaka T, Toh S, Tajima A, Akiyama I, Inoue I. COL6A1, the candidate gene for ossification of posterior longitudinal ligament, is associated with diffuse idiopathic skeletal hyperostosis in Japanese. *Spine*, in press.
3. Yamaguchi T, Park S-B, Maki K, Inoue I. Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patients. *J Dent Res*, 2004 in press.
4. Jinnai N, Sakagami T, Sekigawa T, Kakihara M, Nakajima T, Yoshida K, Goto S, Hasegawa T, Koshino T, Hasegawa Y, Inoue H, Suzuki N, Sano Y, Inoue I. Polymorphisms in the prostaglandin E2 receptor subtype 2 gene confer susceptibility to aspirin-intolerance asthma: a candidate gene approach. *Hum Mol Genet*, 13, 3203-3217, 2004.
5. Nakajima T, Wooding S, Sakagami T, Emi M, Tokunaga K, Tamiya G, Ishigami T, Umemura S, Munkhbat B, Jin F, Guan-jun J, Hayasaka I, Ishida T, Saito N, Pavelka K, Lalouel J-M, Jorde LB, Inoue I. Natural selection



- and population history in the human angiotensinogen gene (AGT): 736 AGT sequencing in worldwide chromosomes. *Am J Hum Genet*, 74, 898-916, 2004.
6. Ohmori H, Ando Y, Makita Y, Onouchi Y, Nakajima T, Saraiva MJM, Terazaki H, Sulu O, Sobue G, Nakamura M, Yamaizumi M, Munar-Ques M, Inoue I, Uchino M, Hata A. Common origin of the Val30Met mutation responsible for the amyloidogenic transthyretin type of familial amyloidotic polyneuropathy. *J Med Genet*, 41, e51, 2004.
  7. Yoneyama T, Kasuya H, Onda H, Akagawa H, Hashiguchi K, Nakajima T, Hori T, Inoue I. Collagen type I $\alpha$ 2 (*COL1A2*) is the susceptible gene for intracranial aneurysms. *Stroke* 35, 443-448, 2004.
  8. Matsui H, Suzuki K, Ohtake N, Nakata S, Takeuchi T, Yamanaka H, Inoue I. Genomewide linkage analysis of familial prostate cancer in Japanese population. *J Hum Genet* 49, 9-15, 2004.
  9. Yoshida K, Oyaizu N, Dutta A, Inoue I. The destruction box of human Geminin is critical for proliferation and tumor growth in human colon cancer cells. *Oncogene* 23, 58-70, 2004.
  10. 田嶋 敦、井ノ上 逸朗 SNPを用いた体系的アソシエーション・スタディによる疾患遺伝子研究への期待と現実 実験医学 羊土社 印刷中
  11. 井ノ上 逸朗 連鎖解析による疾患遺伝子座マッピング ゲノム研究実験ハンドブック 羊土社 302-306, 2004
  12. 井ノ上 逸朗 遺伝学的アプローチ Molecular Medicine 臨時増刊号 中山書店 210-216, 2004
- 2) 学会発表
    1. Gene-mapping strategy of human common metabolic disease of civilization in the post-genome era. Ituro Inoue Internal Society of Animal Genetics, Special lecture, 2004 September, Tokyo
    2. SNPs: tool for mapping of disease gene and understanding of population structure. Ituro Inoue The 8<sup>th</sup> GIST International Symposium on Life Science, November 2004, Gwangju.
    3. SNP as a signature of population and disease history. Ituro Inoue International Symposium of Genome Variations and Disease Association, December 2004, Seoul
  7. 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

なし

## 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

研究者 森 幹士、松末 吉隆、滋賀医科大学整形外科  
茶野 徳宏、岡部 英俊、滋賀医科大学臨床検査部  
池川 志郎、理化学研究所遺伝子多型センター

研究要旨 脊椎後縦靭帯骨化症(以下 OPLL)、強直性脊椎炎(以下 AS)はともに脊柱靭帯の異所性骨化という共通の所見を示す。これら二つの疾患について「骨化」と言う観点からアプローチし感受性遺伝子の同定を目指す。149 人の日本人男性血清反応陰性脊椎関節症(以下 SNSA)患者において androgen 生合成の key enzyme をコードする *CYP17* のプロモーター領域に存在する -34C>T 遺伝子多型について調査した。380 人の健常日本人男性をコントロールとした。AS を含む HLA-B27 陰性 SNSA 患者で、-34C>T 多型(A1 アレル)の有意な相関が認められた。A1 アレルは A2 アレルに比べ SP-1 結合領域を 1 つ欠く事になり、プロモーター活性の低下による性ホルモン生成の低下をもたらす事が示唆されている。性ホルモンは免疫にも影響を及ぼし、遺伝子多型によりもたらされた低 androgen による免疫バランスの破綻が HLA-B27 陰性 SNSA の発症に繋がると考えられる。我々はこれまでに OPLL 発症に関与する nucleotide pyrophosphatase が AS の発症に関与する事を見出しており、これは OPLL、AS は脊柱靭帯の骨化という共通の表現形をもたらす病因を共有している可能性を示唆している。*CYP17* は SNSA における HLA-B27 以外の候補遺伝子として重要であることに加え、androgen が骨代謝に重要な働きを持つことを考えれば、この遺伝子の OPLL における影響についても大変興味を持たれる。

A. 研究目的  
脊椎後縦靭帯骨化症(以下 OPLL)、強直性脊椎炎(以下 AS)はともに脊柱靭帯の骨化をきたすという共通点を持つ。「骨化」という観点に立ち両疾患の感受性遺伝子同定を目的とする。

B. 研究方法  
AS を含む日本人血清反応陰性脊椎関節症(以下 SNSA)男性患者 149 人、日本人男性健常人ボランティア(コントロール) 380 人の末梢血より DNA を採取。androgen 生合成における key enzyme である升クローム P450c17 $\alpha$  (*CYP17*)の遺伝子多型を調査した。多型頻度を統計処理し、 $p < 0.05$  を有意な相関ありと判断した。  
(倫理面への配慮)

医療従事者としての守秘義務を守る、採血後すぐにサンプルを記号化し、個人のデータが検査実施者に解らないように配慮するなど倫理面にも十分配慮し、滋賀医科大学、理化学研究所において倫理委員会の承認を得ており、倫理面の問題は無い。

C. 研究結果  
SNSA 患者全体と、コントロール間に有意差は認め

られなかったが、HLA-B27 陰性 SNSA 患者では A1 アレルがコントロールに比べ有意に多かった。より強い相関をしめす他の一塩基多型が *CYP17* 内に存在しないか -34T>C とのハプロタイプ解析をさらに進めたが -34T>C 以上の相関を示すものを見つけることは出来なかった。

D. 考察  
*CYP17* はコレステロールからのステロイドホルモン生合成に重要な役割を示す。-34T>C はプロモーター領域に存在し、A1 アレルは A2 アレルに比べ SP-1 結合領域を 1 つ欠く事になり、プロモーター活性の低下による性ホルモン産生の低下をもたらす事が示唆されている。androgen を始めとする性ホルモンは免疫にも影響を及ぼし、低い androgen による免疫バランスの破綻が HLA-B27 陰性 SNSA の発症に繋がると考えられる。AS を代表とする SNSA と HLA-B27 との強い相関は周知の通りであるが、HLA-B27 陰性患者については未知の部分が多い。種々の研究結果より SNSA の発症に、HLA-B27 以外の遺伝要因の関与が明らかであるがその報告は少ない。*CYP17* は日本人男性 SNSA の発症に関する HLA-B27 以外の感受性遺伝子と

して意義あるものと考えられる。日本人の SNSA の罹患率は他人種と大きく異なり、他の人種での相関の確認やこの多型の機能解析が必要である。また、androgen をはじめとする性ホルモンは骨代謝に大きな影響を持つことより、OPLL においてもこの遺伝子多型の関与が無いかは大変興味をもたれるところである。

#### E. 結論

*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。

#### F. 健康危険情報 特記すべきことなし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Mori K, Hukuda S, Katsuura A, Saruhashi Y, Matsusue Y. Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index (BASFI) evaluation of postoperative patients with OPLL. *J Orthop Sci.* 2004; 9: 16-21.

Mori K, Kizawa H, Ushiyama T, Chano T, Inoue H, Tsuchiya N, Okabe H, Matsusue Y, Ikegawa S. Association of *CYP17* with HLA-B27-negative seronegative spondyloarthropathy in Japanese males. *Am J Med Genet* 2004; 130-A: 169-171.

##### 2. 学会発表

該当するものなし。

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

該当するものなし。

##### 2. 実用新案登録

該当するものなし。

##### 3. その他

該当するものなし。

## 内軟骨性骨化における石灰化関連遺伝子群の解析

青山 朋樹(京都大学再生医科学研究所組織再生応用分野 助手)

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学 教授)

【研究要旨】 後縦靭帯骨化症(OPLL)の異所性石灰化は内軟骨性骨化の経過をたどる。このことから内軟骨性骨化の主要な器官である成長軟骨板における石灰化促進因子と抑制因子を同定する事は OPLL の病因解析につながると考えられる。研究者らは以前より p53-/-マウスから樹立された細胞がその細胞の分化形質を維持したまま不死化する事に着目し、p53-/-マウスの肋軟骨から成長軟骨の分化形質をもつ成長軟骨板由来細胞株 MMR32,MMR14,MMR17 を樹立し解析を進めている。これらのうち共通した親株より subcloning された MMR14,MMR17 細胞株は類似した遺伝子発現様式を示すが、MMR14 は石灰化結節を形成するのに対して、MMR17 は形成しない。そこでこれらの 2 細胞株間における遺伝子発現の違いを比較する事で、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が同定できると考えた。2 細胞間での mRNA の発現の違いを cDNA マイクロアレイを用いて比較した。このようにして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なった。

### A. 研究目的

後縦靭帯骨化症(OPLL)は本来石灰化しないはずの靭帯組織が異所性石灰化する原因不明の疾患である。このため石灰化を促進する因子と抑制する因子を同定する事は OPLL の病因を明らかにし、さらには治療につながる可能性があると考えられる。我々の骨格は膜性骨化あるいは内軟骨性骨化の過程を経て形成されるが、OPLL で認められる異所性石灰化は主に内軟骨性骨化の経過をたどる。様々な因子により発症する OPLL の異所性石灰化の過程を *in vitro* で再現する事は困難であるため、内軟骨性骨化の過程を示す成長軟骨板由来細胞株で *in vitro* の再現を試みた。成長軟骨板における成長軟骨は増殖軟骨層、肥大軟骨層、石灰化軟骨層を経て段階的に骨化に至る。このように成長軟骨板の細胞は時間的、空間的に変化する事からその形質を決定する因子の解析は困難である。研究者らはこれまでに p53-/-マウスから樹立された細胞がその細胞の分化形質を維持したまま不死化する事に注目し、p53-/-マウスの肋軟骨から成長軟骨の分化形質をもつ成長軟骨板由来細胞株 MMR32,MMR14,MMR17 を樹立し解析を進めている。これらのうち MMR14 と MMR17 は共に共通の親株を持ち、肥大軟骨細胞層に類似した遺伝子発現パターンをとるのにもかかわらず、前者は石灰化結節を形成し、後者は形成しない。そこでこの 2 細胞株の遺伝子発現の差を検討する事で成長軟骨板における石灰化機構を解析できると考えた。

### B. 研究方法

MMR14, MMR17 細胞を用いて解析を行った。

MMR14 は特別な分化誘導を行わなくても dish に播種し 1 週をすぎると石灰化結節を形成する。それぞれの細胞を  $3 \times 10^5$ /10cm dish に播種し、1 週で各々の細胞から RNA を抽出した。この RNA における遺伝子の発現の違いを cDNA マイクロアレイ法で比較した。今回用いた cDNA マイクロアレイチップは IntelliGene Mouse CHIP Ver. 1 (TaKaRa Bio.)に新たに骨、軟骨関連遺伝子 100 遺伝子を新たに spotting し作成したカスタムマイクロアレイチップである。cDNA マイクロアレイ法で発現に違いの認められた遺伝子の mRNA の発現を RT-PCR で確認した。得られた候補遺伝子を RNA 干渉法によりノックダウンあるいはベクターを用いた強制発現を行い、石灰化結節形成に対する影響を検討した。また候補遺伝子が *in vivo* の成長軟骨板で実際に発現している事を免疫組織染色にて確認した。今回の研究は京都大学動物実験に関する指針に従って行った。

### C. 研究結果

1) cDNA マイクロアレイにより抽出された遺伝子群のうち、MMR14 で発現が亢進していた遺伝子は 45 種類でこれまでも石灰化を促進することが知られている MMP13, Bmp4, Colla1, Alp などが含まれていた。これに対して MMR17 で発現が亢進していた遺伝子は 48 種類であり、大動脈における異所性の石灰化を抑制する事が知られている Mgp, Osteopontin が含まれていた。また SNP が OPLL の発症と関連していることが報告されている ENPP1 の family である ENPP2 の発現も亢進していた。

cDNA マイクロアレイの結果を RT-PCR で確認した。これらの中から MMR14 で発現が亢進してい

た OB cadherin に注目しさらに解析を行った。

## 2) OB cadherin の発現

RT-PCR で cDNA マイクロアレイの結果を解析すると MMR14 では OB cadherin の発現が時間依存性に上昇するのに対して、MMR17 では全く発現を認めなかった。この発現の違いが蛋白レベルでも認められる事を Western blotting 法で確認した。さらに免疫細胞染色法にて OB cadherin が MMR14 の細胞間接着部位に局在している事が確認できた(図 1)。

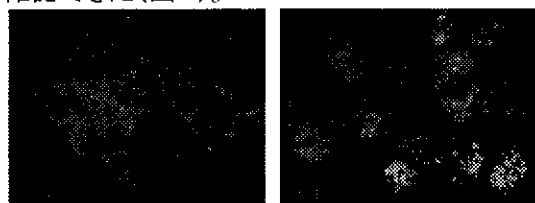


図 1 免疫細胞染色. MMR14(左). MMR14 では細胞間接着部位に沿って OB cadherin の発現が認められる。MMR17(右)。DAPI で核染色を行った。

## 3) RNA 干渉法による OB cadherin のノックダウンによる石灰化への影響

RNA 干渉法を用いて MMR14 における OB cadherin 遺伝子の発現をノックダウンすると石灰化結節の形成が抑制された。逆に MMR17 に OB cadherin を強制発現させた際には結節の形成は認められなかった。

## 4) 成長軟骨板における OB cadherin の発現

正常成長軟骨板における OB cadherin の発現を調べるために 1 ヶ月齢の野生型マウスの膝から関節軟骨、肋骨から成長軟骨板、後頭骨から組織を摘出し RT-PCR で解析した。この結果 OB cadherin は成長軟骨板、後頭骨で発現が認められたが、石灰化しない関節軟骨では認められなかった。さらに肋軟骨における OB cadherin の発現を免疫染色で解析した。この結果 OB cadherin は肥大軟骨層～石灰化軟骨層で発現している事が明らかになった。

## D. 考察

OB cadherin は cadherin family に属する細胞間接着分子でこれまで骨芽細胞に特異的に発現していると考えられていた。骨芽細胞を用いた in vitro の解析では石灰化結節の形成に主要な働きをする事が報告されているが、in vivo における OB cadherin 欠損マウスの解析結果からはあまり大きな形質異常は認められず、わずかな骨密度の低下を示すのみであった。これは in vivo では OB cadherin を欠損してもその機能を代償する機構が存在する事を示唆する結果である。今回の研究において成長軟骨板由来細胞株で OB cadherin をノックダウンすることで石灰化結節の形成が抑

制された事から成長軟骨における OB cadherin の石灰化への関与が示された。このことから内軟骨性骨化においても OB cadherin が主要な機能を持つ事が明らかであるが、前述のノックアウトマウスの結果からも、今後明らかにするべき代償機構が存在する可能性がある。

今回のマイクロアレイから抽出された遺伝子群には既に石灰化との関連が証明されている遺伝子も含まれており、内軟骨性骨化を解析する上で有用な結果であると考えられる。また今回使用した成長軟骨板由来細胞株を用いた実験系は、今後 OPLL の原因候補遺伝子が同定された際に内軟骨性骨化への関わりを解析する有用な材料になる可能性が示唆された。

## E. 結論

石灰化能の異なる 2 細胞間で遺伝子発現様式を比較する事で内軟骨性骨化に関与すると考えられる遺伝子群を抽出した。抽出された遺伝子のうち OB cadherin は成長軟骨における石灰化に関与することが示された。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Nakamata T., Aoyama T., Okamoto T., Hosaka T., Nishijo K., Nakayama T., Nakamura T., Toguchida J. In vitro demonstration of cell-to-cell interaction in growth plate cartilage using chondrocytes established from p53<sup>-/-</sup> mice. J Bone Mineral Res. 2003 18: 97-107.

### 2. 学会発表

松崎尚志、青山朋樹、岡本健、仲俣岳春、戸口田淳也、中村孝志. p53<sup>-/-</sup>マウス由来成長軟骨細胞株を用いた成長軟骨石灰化関連遺伝子群の解析. 第 17 回日本軟骨代謝学会;東京; 2004.3.12

## H. 知的財産権の出願、登録情報

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

# 内軟骨性骨形成における BMP シグナルの役割

分担研究者 吉川 秀樹 大阪大学大学院医学系研究科教授

## 研究要旨

異所性内軟骨性骨化を誘導する骨形成因子 (BMP) は脊柱骨化靭帯の成因に深く関与すると考えられる。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。軟骨における BMP は軟骨を増大させ、結果的に骨を太くする働きがある。しかし骨で 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が判明した。

### A. 研究目的

骨形成因子 (BMP) は異所性に内軟骨性骨化を誘導する物質として同定され、その関連蛋白は脊柱骨化靭帯での発現が認められている。ノックアウトマウスを含む遺伝学的研究によって、BMP は中胚葉の誘導や、パターンニングを制御することが示されたが、内軟骨性骨化における BMP の作用機序は未だによくわかっていない。これはある BMP が欠失しても他のファミリーメンバーが機能を補完するか、あるいは内軟骨性骨化がおこる以前に異常が生じるためと考えられる。そこで内軟骨性骨化における BMP シグナルの作用を調べるために、軟骨及び骨特異的に BMP シグナルを制御したトランスジェニックマウスを作製した。

### B. 研究方法

BMP シグナルを細胞外のレベルで抑えるために、BMP リガンドのアンタゴニストである noggin を発現させた。また細胞内での BMP シグナル伝達の遮断を狙い、抑制型 Smad である Smad6 を強制発現させた。軟骨特異的発現あるいは骨特異的発現を得るために、XI 型コラーゲン遺伝子 promoter/enhancer と I 型コラーゲン遺伝子 promoter 配列 2.3 kb をそれぞれ用いた。当動物実験については大阪大学医学部動物実験委員会の承認を受け、そのガイドラインに則って動物の苦痛軽減に努めている。

### C. 研究結果

軟骨において noggin を過剰発現させ、BMP シグナルを細胞外で不活化すると軟骨の形成が認められず、骨形成も著しく阻害された。このことから内軟骨性骨化には BMP が必須であることを発見した。そして BMP の軟骨過剰発現では軟骨が増大し、骨も太くなることが判明した。次いで、抑制型 Smad

である Smad6 を内軟骨性骨化の過程に強制発現させたトランスジェニックマウスを作製し、解析した。このマウスでは Smad シグナルの伝達が著しく障害されている。その結果、軟骨の肥大化が抑制され、肥大軟骨細胞層マトリックス遺伝子である X 型コラーゲン遺伝子の発現が低下した。骨量は著しく減少して骨粗鬆症様の変化が認められた。最後に BMP の骨形成に対する作用を解析するために、骨芽細胞に特異的に BMP4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製した。このマウスでは予想に反して骨量が著しく減少しており、骨構造の破綻が認められた。

### D. 考察

本研究結果から BMP シグナルを操作することによって、実際に生体においても骨・軟骨の遺伝子発現が変化し、結果として軟骨形成・分化や骨形成の障害がおきることが判明した。骨組織における BMP の活性化が骨量の減少をもたらしたことは、従来の BMP は骨を形成するという考えと相反する。BMP が直接、破骨細胞を活性化している所見が得られつつあり、今後この確認とシグナル伝達メカニズムの解明が必要である。

### E. 結論

骨・軟骨特異的に BMP シグナルを操作し、内軟骨性骨化における BMP の役割を明らかにした。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が判明した。

F. 健康危険情報 無し

G. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Horiki, M., Imamura, T., Okamoto, M., Hayashi, M., Murai, J., Myoui, A., Ochi, T., Miyazono, K., Yoshikawa, H., and Tsumaki, N.: Smad6/Smurf1 overexpression in cartilage delays chondrocyte hypertrophy and causes dwarfism with osteopenia. *J Cell Biol*, 165: 433-445, 2004.
- 2) Tsumaki, N., Kakiuchi, M., Sasaki, J., Ochi, T., and Yoshikawa, H.: Low-intensity pulsed ultrasound accelerates maturation of callus in patients treated with opening-wedge high tibial osteotomy by hemicallotaxis. *J Bone Joint Surg Am*, 86-A(11): 2399-2405, 2004.
- 3) Sakaura, H., Hosono, N., Mukai, Y., Ishii, T., Yoshikawa, H.: C5 palsy after decompression surgery for cervical myelopathy: review of the literature. *Spine*, 28:2447-2451, 2003.
- 4) Mukai, Y., Hosono, N., Sakaura, H., Ishii, T., Fuchiya, T., Fujiwara, K., Fuji, T., Yoshikawa, H.: Laminoplasty for cervical myelopathy caused by subaxial lesions in rheumatoid arthritis. *Journal of Neurosurgery*, 100:S7-12, 2004.
- 5) Ishii, T., Mukai, Y., Hosono, N., Sakaura, H., Nakajima, Y., Sato, Y., Sugamoto, K., Yoshikawa, H.: Kinematics of the upper cervical spine in rotation. In vivo three-dimensional analysis. *Spine*, 29:E139-144, 2004.
- 6) Yoshikawa, H., Nakase, T., Myoui, A., Ueda, T.: Bone morphogenetic proteins in bone tumors. *Journal of Orthopaedic Science*, 9:334-340, 2004.
- 7) 樋口周久、吉川秀樹：骨形成因子(BMP)、骨粗鬆学-基礎・臨床研究の新しいパラダイム-、*日本臨床*、62:52-56, 2004.
- 8) 細野昇、坂浦博伸、向井克容、石井崇大、吉川秀樹：圧迫性頸髄症に対する4椎弓形成術の試み、*臨床整形外科*、39:659-665, 2004.

## 2. 学会発表

- 1) M. Horiki, N. Tsumaki, A. Myoui, T. Imamura, H. Yoshikawa: overexpression of smad6 in chondrocytes distinctively disturbs terminal differentiation of chondrocytes and causes osteopenia in transgenic mice. 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 3/7-10, 2004
- 2) N. Tsumaki, M. Horiki, J. Murai, T. Iwai, and H. Yoshikawa: Role of BMP signaling in endochondral bone formation. 5th International Conference on Bone Morphogenetic Proteins

9/12-16, 2004

H. 知的財産の出願・登録状況  
該当なし



# レプチン抵抗性 R a t 脊柱靱帯細胞におけるインスリン・ I G F-1 シグナルの検討

主任研究者 山本 謙吾 東京医科大学整形外科学教室 主任教授

## 分担研究者

久保宏介 (東京医科大学整形外科学教室) 馬嶋正和 (東京医科大学整形外科学教室)

山藤崇 (東京医科大学整形外科学教室) 渡辺淳 (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) 渡辺健 (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 主任教授)

## 【研究要旨】

レプチン受容体機能的異常ラットである fa/fa rat 及び Monosodium glutamate 処置を行った Fa/Fa rat を作製し肥満環境下における後縦靱帯、靱帯付着部骨芽細胞分化におけるインスリン・ I G F-1 シグナル及びレプチンシグナルの関与を免疫組織学的染色に検討した。6ヶ月齢以降は共に高レプチン血症、高インスリン血症を呈した fa/fa rat 群、Monosodium glutamate 処置 Fa/Fa rat 群は、fa/fa rat 群で軟骨終板の膨隆、靱帯付着部における軟骨様細胞数増加を伴う線維輪破綻と線維軟骨増生が有意に見られ、インスリン・ I G F-1 受容体陽性細胞は fa/fa rat 群、Monosodium glutamate 処置 Fa/Fa rat 群での有意な増加を認めたが、 I R S-1 陽性細胞は fa/fa rat 群で有意な増加を認めたが、 I R S-2 陽性細胞は Monosodium glutamate 処置 Fa/Fa rat 群と Control 群に比較し軽度減少していた。fa/fa rat において靱帯付着部における軟骨様細胞の増生部は I R S-1 陽性細胞の増加を認めるが I R S-2 陽性細胞の増加は認めず、主に I R S-1 を介する細胞増殖シグナルの亢進がその靱帯骨化過程に関与することが免疫組織学的に示唆された。

## A. 研究目的

近年、肥満症及びそれに伴う耐糖能異常と脊柱靱帯骨化症との関与が指摘されている。具体的には脊柱靱帯骨化症における疫学的研究により同症に耐糖能異常を高率に合併するが、重症度はインスリン非依存性糖尿病 (N I D D M) 群において軽く、軽度の耐糖能異常を示す境界型において重度の骨化の頻度を高く認める事が報告されている<sup>1)</sup>。肥満症において、白色脂肪細胞より分泌されインスリン感受性を調節する TNF- $\alpha$ 、leptin、アディポネクチンといったアディポサイトカインがインスリン感受性調節に重要な役割を果たしていることが解明されてきており<sup>2,3)</sup>、これらアディポサイトカインの感受性の差によりインスリン作用が増強及び減弱することが考えられる。また、

近年インスリン受容体基質 1 及び 2 (IRS-1 及び 2) を介す骨芽細胞への insulin・IGF-1 シグナルの関与の増強/減少および骨形成能への影響が報告されており<sup>4,5)</sup>、遺伝子欠損マウスの骨形態より IRS-1 は主に骨代謝回転の維持を担い<sup>5)</sup>、IRS-2 は骨吸収の抑制作用を持つことが分かってきている<sup>6,7)</sup>。また、レプチンの作用は IRS-2 を介することが分かってきており<sup>8,9)</sup>、日本人に多発する後縦靱帯骨化症においてレプチン抵抗性の有無及び局所でのインスリン・IGF-1 シグナル感受性の差が、高インスリン環境下において脊柱靱帯部の異所性骨化との関連を考え今回の実験において検討した。

当教室が保有する fa/fa rat (Zucker Fatty Rat)<sup>10)</sup> は先天性 leptin receptor 遺伝子機

能的異常<sup>11)</sup>によるレプチンシグナル伝達障害を原因とする過食、肥満、性腺機能低下、GHホルモン分泌低下及び反応性に著明な高leptin血症、高insulin血症を呈する脊柱靭帯骨化自然発生モデル<sup>12,13)</sup>であり、我々人におけるいわゆる肥満症候群、初期II型(インスリン非依存型)糖尿病(NIDDM)患者に類維持した体内環境を有し<sup>14)</sup>、脊柱靭帯骨化と肥満及びインスリン感受性解明の実験動物として非常に適したものである。多くの液性因子による骨化増強作用が考えられるため、当教室では木村らがWister種ratの視床下部弓状核ArcをMonosodium glutamate処置にて選択的に破壊、生後摂食抑制欠如のためfa/fa ratと同様な高leptin、高insulin血症を来たすWister種ratを作製し、早期にNIDDMとなる動物群を比較群として脊柱靭帯の検討を行ったが椎間板、脊柱靭帯に明らかな細胞増殖を認めない事を報告した<sup>15,16)</sup>。また他のII型糖尿病発症モデル動物においても脊柱靭帯異所性骨化は認めず<sup>17)</sup>高血糖、高インスリン血症条件だけでは異所性骨化は発生しない事が示唆されている。しかしながら当教室の渡辺らが同ratの下腿筋層内にrhBMP-2含有1型コラーゲンスポンジを挿入し異所性骨化をX線学的検討を行ったところ、高インスリン血症を呈するMSG処置Wister種ratにおいてもfa/fa rat同様の早期骨化が認められ、高インスリン血症におけるインスリン・IGF-1シグナルの亢進がBMP-2受容体に対して、作用増強作用を持つことを示唆した。今回、同種Fa/Fa rat (Zucker lean rat) に Monosodium glutamate 処置を行い<sup>18,19)</sup>、未処置 Fa/Fa rat をコントロール群として肥満環境下に

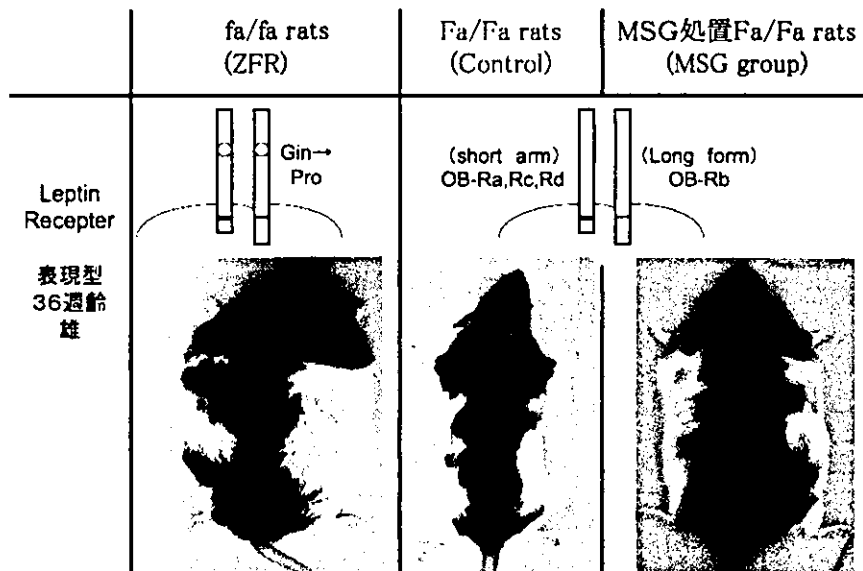
おける後縦靭帯靭帯付着部、骨芽細胞分化におけるインスリン・IGF-1シグナル及びレプチンシグナルの関与を免疫組織学的染色に検討をした。

## B. 研究方法

実験動物として①fa/fa rat(ZFR)、②Monosodium glutamate 処置 Fa/Fa rat 群(MSG)③Fa/Fa rat(control)の3群、月齢6-8ヶ月の雄個体各20匹を使用した。(図1)。Monosodium glutamate 処置は優性ホモFa/Faの交配により作成した新生ratに出生翌日より5日間連続で4mg/体重1gを皮下注射投与した。約8ヶ月齢にて全身麻酔後、開胸し右心耳より採血により脱血し、血清早朝血糖値、インスリン、IGF-1、レプチン値を測定した。また経時的に屠殺し右心室より採血を施行し上記項目を測定した。左心室より脱血と共に生理食塩水で環流後4%パラホルムによる環流固定処置を行った。Th1-6高位胸椎を摘出、48時間固定後、エタノールにて48時間脱脂し20%EDTAで約2週間脱灰を行いパラフィン薄切切片を作製した。組織学的染色はHE染色、TB染色を行った。LsAB法で免疫組織染色を行いインスリン受容体 $\beta$ 、IGF-1受容体 $\beta$ 、IRS(インスリン受容体蛋白基質)1と2について陽性細胞数をNIH Imageで検討し、各2群間をunpaired T検定にて比較した。

(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則り実験を行った。

図1 Materials & phenotype

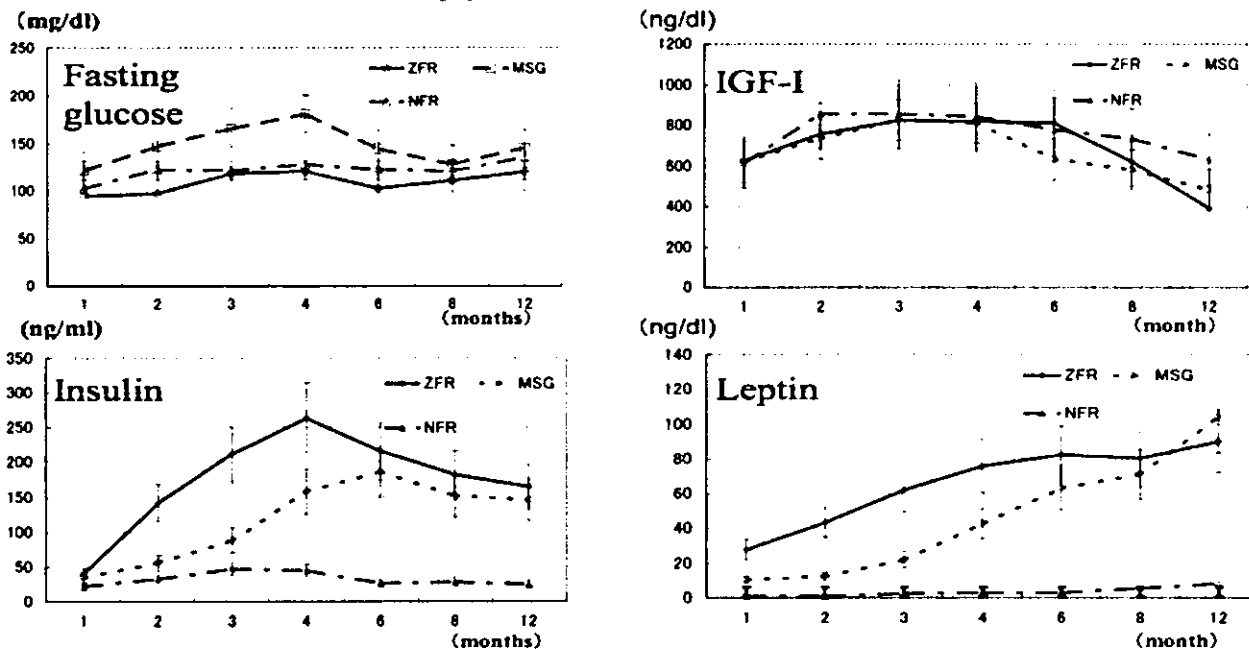


C. 研究結果

ZFR群、MSG群は共に6ヶ月齢以降高レプチン血症、高インスリン血症を呈した(表1)。軟線撮影ではZFR群に椎体高減

少と骨梁幅低下を認めた。明らかなPLLの連続性骨化例は認めなかったが、椎間板に連続する膨隆像を有意に認めた。

表1 Blood test results



1) 上位胸椎HE染色

上位胸椎(第5胸椎)椎間板HE染色において、ZFR群で椎間板線維輪の破綻、弾性繊維へ変性、軟骨終板及び靭帯付着部に骨芽細胞の出現と石灰化を認めた。靭帯付着部境界は同群で不明瞭であり、軟骨終板の肥厚と肥大軟骨細胞の増加を認める。

MSG群とControlの2群は線維輪構造は保たれている。強拡大像(200倍)においてさらにZFR群において破綻した線維輪に肥大軟骨細胞、骨芽細胞様の細胞増加を認める。軟骨終板はZFR群においてのみ基質拡大、終板不整が著明に認められた(図2a,3a)。

## 2) 上位胸椎TB染色

上位胸椎(第5胸椎)椎間板TB染色では、MSG群において軟骨終板層の肥厚及び石灰化前線の不整像を認める。ZFR群ではさらに軟骨終板端及び靭帯付着部において著明な肥大軟骨細胞様細胞を多く含む不整像及び周囲に骨芽細胞の多数の出現を伴う

石灰化を認める。線維輪及び軟骨終板部の強拡大像において、ZFR群では大きな空包を有する肥大軟骨細胞様細胞の出現と細胞数の増加を認め、靭帯付着部組織の肥厚及び繊維芽細胞及び幼弱骨芽細胞の出現に伴う細胞数増加を認めた(図2b,3b)。

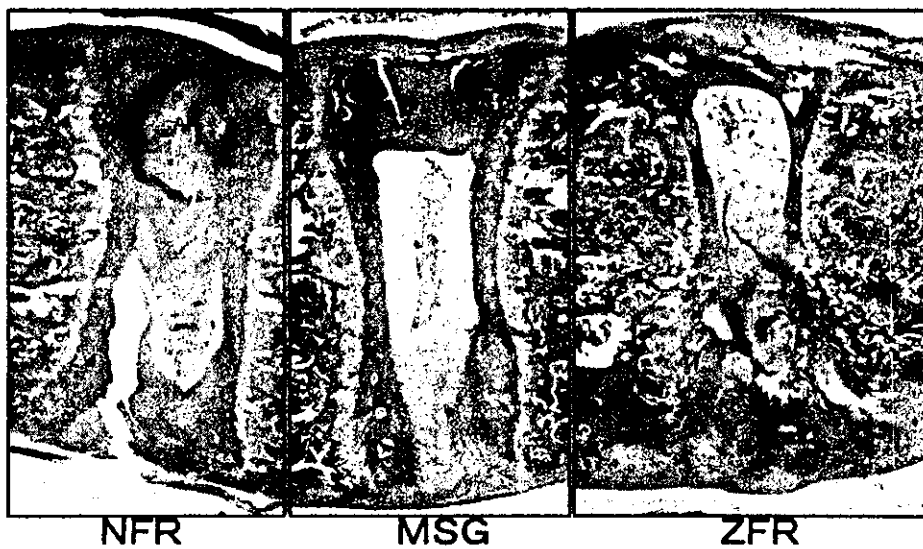


図2a 胸椎椎間板矢状断(Th5) HE stainings (×20)

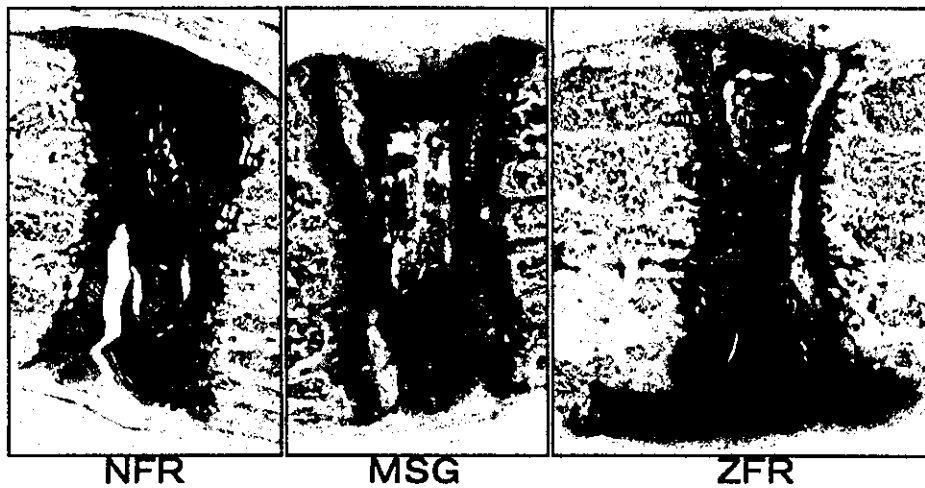


図2b 胸椎椎間板矢状断(Th5) TB stainings (×20)