

図3a HE staining (×200)

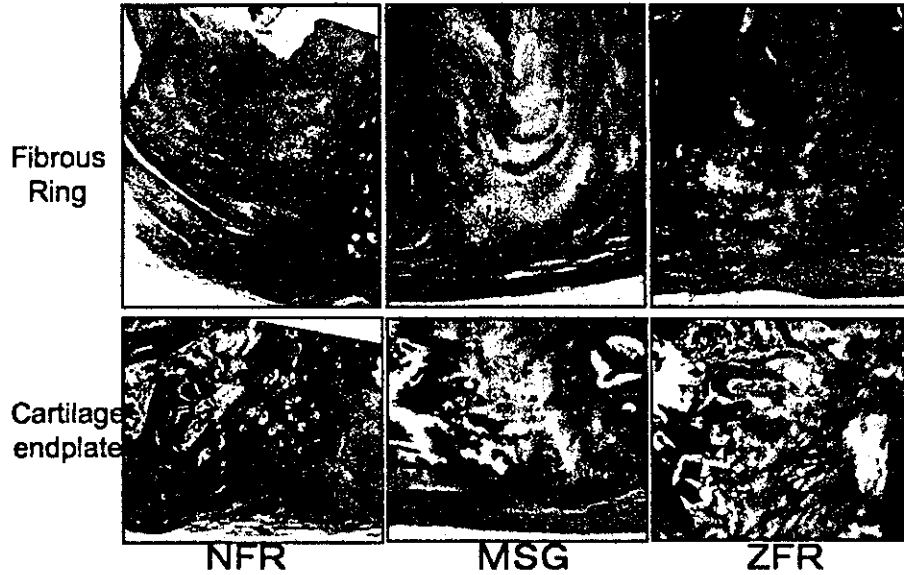
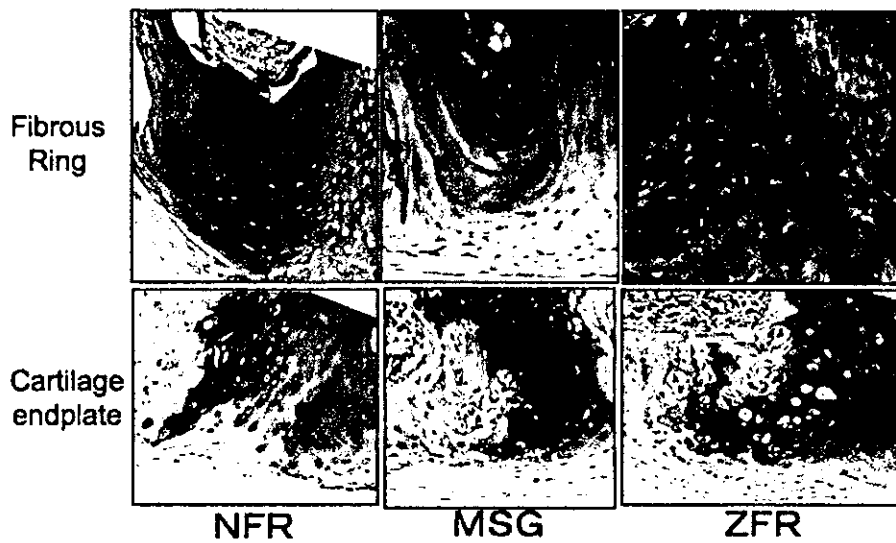


図3b T.B. staining (×200)



3) 免疫組織学的染色

抗インスリン受容体β抗体染色(図4a)では、ZFR群で繊維輪、靭帯付着部、軟骨終板の肥大軟骨細胞に有意な陽性細胞像を他の2群と比べ認め、MSG群で軽度陽性細胞数の増加を認めた。抗IGF-1受容体抗体β染色(図4b)では、ZFR群で破綻した繊維輪、そして靭帯付着部に陽性細胞数の増加を認め、他の2群は繊維輪軟骨細胞に陽性細胞を疎に認めた。

抗インスリン受容体基質-1(IRS-1)抗体

染色(図5a)ではZFR群の破綻した繊維輪部と靭帯付着部、軟骨終板の肥大軟骨細胞に有意な陽性細胞像が認められた。MSG群では繊維輪内の陽性細胞像の軽度増加をNFR群と比べ認める。抗インスリン受容体基質-2(IRS-2)抗体染色(図5b)において、コントロール群であるNFR群では線維輪内に陽性細胞像が存在するが、ZFR群では陽性細胞数の減少がみられた。MSG群では疎ではあるが、一部線維輪及び軟骨終板部に陽性細胞像を認めた。

図4a Immunohistochemical staining Insulin receptor(β) \times 100

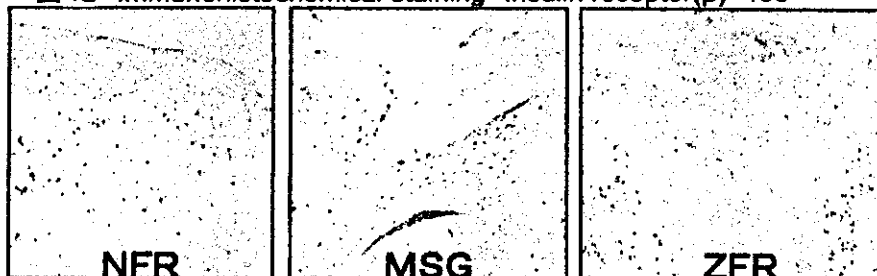


図4b Immunohistochemical staining IGF-1receptor(β) \times 100

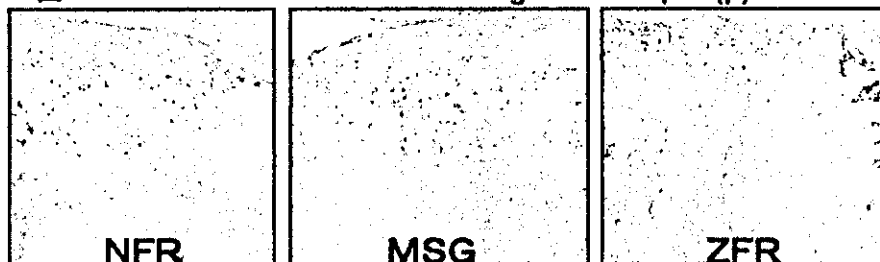


図5a Immunohistochemical staining IRS-1 \times 100

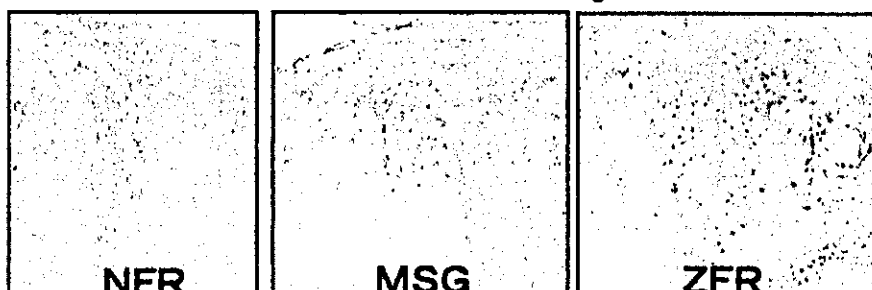
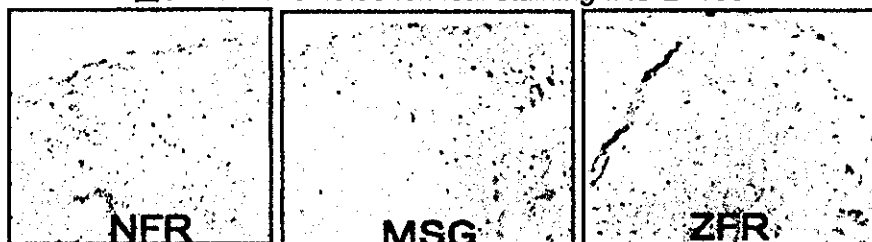


図5b Immunohistochemical staining IRS-2 \times 100



4) 陽性細胞数の検討

NIHImage を使用し、上記免疫組織学的染色で各群の靭帯付着部、同一部同面積における陽性細胞数を unpaired T 検定 (信頼区間 95%) にて各 2 群 (n=20) を比較検討した。結果は IRS-1 陽性細胞数が NFR 群 145.9 ± 43.1 (mean \pm SD)、MSG 群 115.9 ± 24.9 、ZFR 群 279.8 ± 113.1 であり ZFR 群において NFR 及び MSG 群の 2 群と比し有意に

IRS-1 陽性細胞数の増加は有意であった。

(図 6)。また MSG 群の陽性細胞数と比し ZFR 群の有意な細胞数増加を認めた。

IRS-2 陽性細胞数の検討では NFR 群 178.4 ± 48.6 、MSG 群 100.4 ± 45.1 、ZFR 群 73.6 ± 31.4 であり、ZFR 群、MSG 群の順に陽性細胞数の減少は NFR 群と比し各々有意であり、また ZFR 群は MSG 群と比べても有意な陽性細胞数減少を認めた (図 7)。

図6 IRS-1 Positive cells stats(NIH Image)

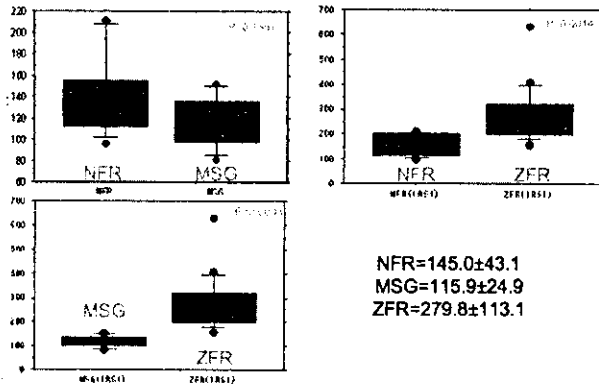
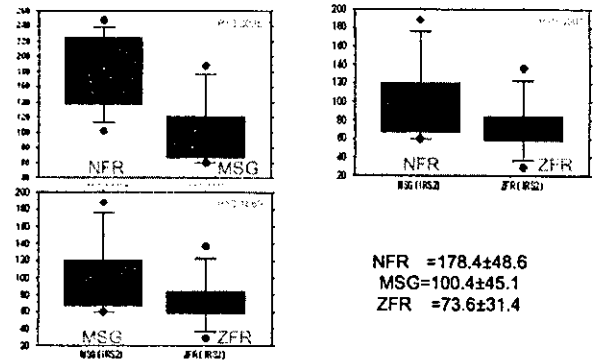


図7 IRS-2 Positive cells stats(NIH Image)



D. 考察

脊柱靱帯骨化症モデル動物でありレプチン抵抗性 *fa/fa* rat と同様な高レプチン血症、高インスリン血症を月齢6ヶ月以降呈する Monosodium glutamate 処置 *Fa/Fa* rat を作成し脊柱靱帯細胞におけるインスリン・IGF-1 シグナルにおける免疫組織学的検討を行った。

近年肥満症の研究において、レプチンの骨に対する作用が解明されつつあり、成長期の長管骨成長軟骨板にその受容体が発現し骨成長に直接作用を認めるほか、骨芽細胞分化及び脂肪細胞への分化抑制作用を持ち、骨髄脂肪細胞からの *paracrine* により骨芽細胞分化調節をしていることが分かっている²⁰⁾。一方でレプチンの中枢性骨調節作用が報告されており、骨芽細胞に発現する β 2 受容体を介し、骨量を抑制するレプチン-視床下部腹内側核-交感神経系を介する中枢性抑制経路の存在が報告されている^{21,22)}。今回提示していないが、当教室で使用する rat の脊柱靱帯部細胞及び骨髄細胞部の β 2 受容体の発現を免疫組織学的に認めており、3群の間において発現量の差があった。*fa/fa* rat はレプチン欠損 *ob/ob* マウス及びその他のレプチン受容体欠損マウスと同様に若年期の骨形成の亢進を伴う骨量の著明増

加を認めるが、その他の食事性肥満ラットやマウスでは骨量に異常を認めないことが多い。高インスリン血症と耐糖能異常環境と脊柱靱帯骨化との関連研究報告では、山崎らが肥満 NIDDM モデルラット(OLETF)において脊柱靱帯部に異所性骨化を認めないことを報告した他¹⁷⁾、当教室の木村らも monosodium glutamate 処置 Wister 種 rat において脊柱靱帯部に明らかな変化を認めないとの報告をし^{15,16)}、高インスリン血症だけでは脊柱靱帯に異所性骨化を発生させるのは不十分であることが示唆された。すなわち *fa/fa* rat におけるレプチン受容体異常による抵抗性(感受性低下)と高インスリン血症の相互作用が、骨量増加と異所性骨化亢進の原因因子となることが考えられ、*fa/fa* rat における自験例や文献例でも同 rat は若年期には骨量増加を認めるもののインスリン分泌量が低下する五十週齢以上の個体では骨量低下が同種 lean rat(*Fa/fa, FA/Fa*)よりも著明となる²³⁾事から、異所性骨化の発生に深く関わっておりこの観点からの検討が必要であると考えられる。インスリン・IGF-1 シグナル伝達におけるインスリン受容体基質のうち骨形成に関与する IRS-1、IRS-2 の局所感受性差についても脊柱靱帯異所性骨化の一因となっている

と考えられており、今回は3群において IRS-1、2 の免疫組織学的な発現量の差を検討したが、さらに下流へのシグナルの検討のためウエスタンブロッティング法による各群の定量化も現在進行中である。

IRS-2 欠損マウスによる研究では同マウスが視床下部、肝臓、血管内皮細胞などにおいてレプチン抵抗性を有し、IRS-2 を介してインスリン感受性改善などの作用を持つことが近年報告されており、その機序としてレプチンシグナルにより主に JAK2、STAT3 がチロシンリン酸化され²⁴⁾JAK/STAT 経路を介し IRS-2 のリン酸化及び下流へのシグナル伝達系を活性化しインスリン抵抗性を改善（感受性亢進）することが分かってきており、レプチンとインスリン・IGF-1 シグナル伝達系間での共通経路が報告されている。

本実験では、3群の脊柱靭帯部細胞の免疫組織学的検討により fa/fa rat の椎間板線維輪部、軟骨終板端部、靭帯付着部の軟骨細胞増生部において、IRS-2 陽性細胞は MSG 処置 Fa/Fa rat 群や Fa/Fa rat(Control)群と比べ軽度減少傾向にあったが、IRS-1 陽性細胞の有意な増加を認めており、主に fa/fa rat の脊柱靭帯細胞において IRS-1 を介する細胞増殖シグナルの亢進が示唆されたが、fa/fa rat では、視床下部腹内側核のレプチン受容体異常のため中枢性骨抑制作用が欠如し、一方でレプチンの脊柱靭帯細胞への骨形成促進作用は受容体機能異常のため

伝達は障害され、IRS-2 からの下流リン酸化低下が起こりうる可能性がある（仮説図8）。インスリンシグナル経路において、IRS-2 より下流の主に糖代謝経路である PI3Kp85、PDK1 へのシグナルは低下するため、これらを介する IRS-1 へのネガティブフィードバックは抑制され、fa/fa rat における高インスリン環境下では主に ERK1/2kinase を介す細胞増殖作用を担う IRS-1 以下下流シグナルが亢進される可能性が考えられた（図9）。

一方で、食事性肥満及び糖尿病モデルであるMSG処置 rat では高レプチン血症を呈するが、腹内側核レプチン受容体による交感神経系による骨調節作用が存在し中枢性の骨調節（抑制作用）が起こると共に、脊柱靭帯細胞部のインスリン・IGF-1 シグナル伝達における IRS-2 リン酸化は高レプチン血症の影響を受け亢進していると考えられ、食事性肥満ラットや他の遺伝的肥満、糖尿病ラットにおいてそうであるように骨量増加や脊柱靭帯骨化が認めにくいと考察された。

脊柱靭帯骨化症において、異所性骨化部のインスリン・IGF-1 シグナル特にレプチン抵抗性に起因するインスリン受容体基質の感受性の差が深く関与している可能性があり、今後下流シグナルの各種定量化や交感神経系による骨形成調節の影響が靭帯骨化の発生進展にどのような影響を与えているのか検討が必要であると考えられた。

図8 Endocrine action mechanism of Leptin in ZFR

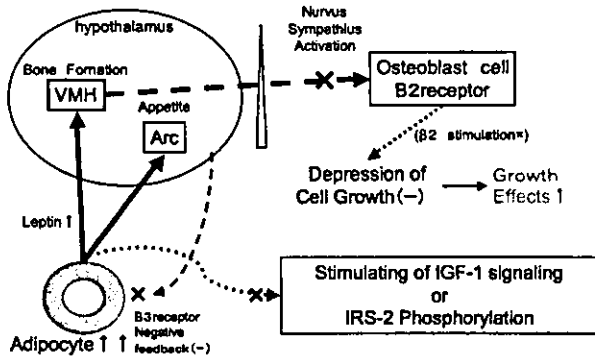
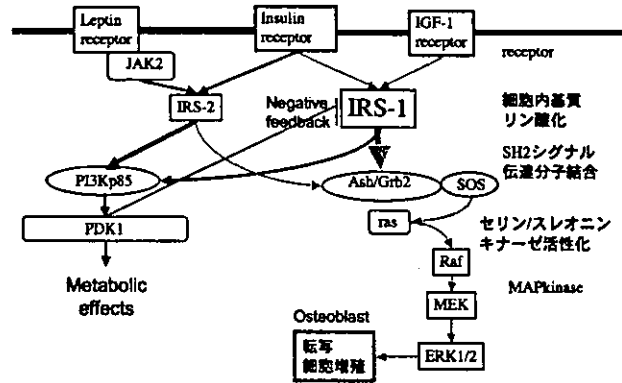


図9 Insulin/IGF-1 signals



E. 結論

レプチン抵抗性 fa/fa rat と同様の高レプチン血症、高インスリン血症を月齢6ヶ月以降呈する Monosodium glutamate 処置 Fa/Fa rat を作成し脊柱靭帯細胞におけるインスリン・IGF-1 シグナルの感受性を免疫組織学的に検討した。全身のレプチン受容体抵抗性を持つ fa/fa rat において脊柱靭帯軟骨様細胞増生部に IRS-1 陽性細胞の増加を有意に認めしたが、IRS-2 陽性細胞の増加は認めず、主に IRS-1 を介する細胞増殖シグナルの亢進が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

東京医科大学医学会総会

東日本整形災害外科学会

[参考文献]

1) 阿久根徹: 脊椎後縦靭帯骨化症における糖代謝関連因子の検討 別冊整形外科 No.45 19-23 2004
 2) 古川健亮: インスリン抵抗性の分子機構 分子血管病 vol.3 no.2 15-21 2002
 3) 石川耕: インスリン抵抗性・動脈硬化進展とアディポサイトカイン ホルモンと臨床 vol.51 29-36

4) Ogata N: Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. J Clin Invest 105:935-943 2000

5) 川口浩: 老化による骨粗鬆症化の分子メカニズム 日本骨形態誌・12 43-50,2002

6) 星和人: Insulin receptor substrate-2 遺伝子欠損マウスの骨形態の観察 THE BONE vol.18 No.2 3-6 2004-3

7) Akune T. et al: Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. J Cell Biol 159 147-156 2002

8) 荒木栄一: IRS-2 によるエネルギー平衡と女性生殖機能の調節 内分泌・糖尿病科 13(3)269-272 2001

9) Zong, C.S. et al: Mechanism of STAT3 activation by insulin-like growth factor 1 receptor J. Biol. Chem. 275 15099, 2000

10) Zucker LM et al.: Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat 'fatty'. Endocrinology 90 1320-1330 1972

11) Iida M et al.: Substitution at codon 269 of the leptin receptor (OB-R) cDNA is the only mutation found in the Zucker fatty (fa/fa) rat. Biochem Biophys Res Commun 224 597-604 1996

12) 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 5 2 (1) 19-32 1994

13)山本謙吾:Zucker fatty ratにおける脊
柱靱帯骨化。THE BONEVol.16 No q .3
2002-5

14)Ahmad I et. Al. : developemental changes
in levels of growth hormone mRNA in Zucker
rats J. Cell Biochem 43 59-66 1990

15)木村大: 遺伝性肥満ラット満腹中枢破壊
ラットの脊柱靱帯における骨化関連因子に
関する免疫組織学的検討 脊柱靱帯骨化症
に関する調査研究班平成 1 3 年度研究報告
書 102-104 2003

16)Zucker 遺伝性肥満ラットおよび
Monosodium glutamate 投与肥満ラットにお
ける骨化関連因子の発現 東京医科大学雑
誌 6 2 卷 3 号 253-260 2004

17)山崎正志 : 骨形成 (骨吸収因子) 肥満
NIDDM モデルラット (O LETF) における
脊柱靱帯組織の解析 厚生労働省特定疾患
対策研究 1 2 年度研究報告書 脊柱靱帯骨
化症に関する調査研究 92-94 2001

18)Olney,J.W.:Brain lesion,obesity and other
disturbances in mice treated with monosodium
glutamate. Science 164 719-721 1969

19)立花佳代 : monosodium L-glutamate 投
与肥満マウスの血清レプチン値と摂食行動
の解析 京 都 府 立 医 大 誌
109(2)101-110,2000

20)杉原茂孝 : 小児発育とレプチン BIO
Clinica 18(1), 54-58 2003

21)竹田秀, Gerard Karsenty : レプチンと骨
代謝 実験医学 Vol.20No17 (増刊) 2002

22)竹田秀, Gerard Karsenty : レプチンに
よる骨代謝の中枢性調節 交感神経系を介
したメカニズム Molecular
MedicineVol.40 No.6 696-701 2003

23)関あずさ : 糖尿病肥満ラット (Zucker
fatty rat) の骨密度測定及び形態計測 日

本骨形態計測学会雑誌 1 0 卷 1 号 S 1 5
2000

24)中島欽一 : レプチン受容体のシグナル伝
達機構 BIO Clinica 1 3 (2)29-34 1998

ヒト後縦靭帯骨化における骨化移行部の組織学的検討

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

研究要旨 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。OPLL で観察された骨化移行部は、骨層、石灰化軟骨層、石灰化前線、線維軟骨層の構造体を形成しており、特に骨化移行部の石灰化前線は骨付着部と比較して凹凸不整像を呈しており、さらにその近傍には肥大軟骨細胞の著明な増生、骨層からの軟骨層への血管の侵入が確認された。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が確認された。

A, 研究目的

後縦靭帯骨化 (ossification of posterior longitudinal ligament; OPLL) の発症の背景には、加齢に伴う靭帯の退行性変化、遺伝的素因、代謝性疾患、環境素因などの全身性因子、および椎間板の変性、mechanical stress といった局所性因子が指摘されており、本症の発生・進展にはこれら双方の要因が複雑に関与していることが推測されている。病理組織学的には骨化巣形成の過程に内軟骨性骨化が関与することが明らかとされており、内軟骨性骨化過程の細胞成長因子として BMP-2, TGF- β , IGF-1 などのサイトカインの役割が指摘されている。しかし、骨化形成過程における骨化移行部の詳細な形態については不明な点も存在している。我々はヒト OPLL 組織における骨化移行部での内軟骨性骨化過程を明らかとするために non-OPLL 患者の骨棘での骨化移行部と OPLL 患者の骨化移行部について組織学的、免疫組織学的手法を用い比較検討おこなった。

B, 研究方法

頸椎後縦靭帯骨化症に対する前方除圧固定術の際に en block に採取した骨化巣及び骨化移行部を含む後縦靭帯 20 例を対象とした。男性 16 例、女性 4 例で手術時年齢 33-77 歳 (平均 63.6 歳) であり、疾患分類は連続型 4 例、分節型 10 例、混合型 6 例であった。比較対象として頸椎椎間板ヘルニア 4 例、頸椎症性脊髄症 6 例 (男性 5 例、女性 5 例、手術時年齢 32-75 歳; 平均 61.2 歳) の前方手術時に採取した後縦靭帯を用いた。これら採取した組織切片に対して H-E 染色、Type I collagen、Type II collagen の発現、血管進入の評価として CD34 用いた免疫組織学的検討を行った。

C, 結果

比較対照とした後縦靭帯組織では膠原線維の肥厚性変化や部分断列像を認めたが、線維の配列構造は比較的保たれていた。また、椎体後縁の骨棘形成は椎体後下縁部から連続波及的に伸長しており、骨組織は微少で後縦靭帯付着部にまで及ぶものは認めなか

った。これに対し骨化を認めた靭帯では骨付着部から後縦靭帯深層及び浅層にかけて骨構造の形成を認め、骨化巣内部では膠原線維の配列構造は消失していた。骨付着部と骨化巣辺縁部に存在する骨化移行部は、骨層、石灰化軟骨層、石灰化前線、線維軟骨層の構造体を形成しており、特に骨化移行部の石灰化前線は骨付着部と比較して凹凸不整像を呈しており、さらにその近傍には肥大軟骨細胞の著明な増生を認めた(図1)。石灰化軟骨層に接した骨層部には石灰化軟骨層への管腔構造が形成されない開放型の血管侵入が確認された(図2)。免疫組織化学的には、Type I collagen の発現は主に骨化巣部において陽性であり(図3)、これに対し Type II collagen は石灰化前線を境に石灰化軟骨層において強陽性であった(図4)。

D, 考察

後縦靭帯骨化は線維内に生じた異所性骨化であり、その骨化過程は内軟骨性骨化であることが指摘されている^{1,2}。今回の検討において Type I collagen の発現をみとめる骨化巣との境にある石灰化前線に Type II collagen を認めたことより、同部はマトリックスの産制と組織の成長能を有する増殖軟骨細胞であることが推測された³。また石灰化軟骨層と骨層の間に認めた血管の周囲には肥大軟骨細胞が集積している像が散見され、逆に軟骨細胞が粗の部には血管の侵入を認めなかった。この軟骨層内に進入する血管の中には肥大軟骨細胞の配列に向かって伸びる、管腔構造が形成されない開放型の血管が認められ、血管内皮細胞が軟骨内へ侵入していく過程であることが推測された。OPLL 組織に観察された骨化過程と、

non-OPLL 組織において認めた骨棘先端部での骨化形成過程を比較すると、OPLL 組織においては明らかに軟骨層への血管の侵入を豊富に認め、石灰化前線は凹凸不整であり、骨化形成が亢進していることが示唆された。

E, 結論

これらの組織学的所見は内軟骨性骨化過程に酷似するものであり、OPLL における骨化過程は内軟骨性骨化によって生じていることが確認された。また non-OPLL 組織の骨棘部における骨化に比べ、OPLL 組織で認められた骨化部においては明らかに骨化形成が亢進していると考えられた。この骨化形成には BMP, TGF- β などのサイトカインが局所因子として関与していることが報告されている^{4,5}。今後これらサイトカインが内軟骨性骨化過程において果たす詳細な役割、局在について免疫学的手法を用いて検討を行う予定である。

G, 研究発表

・論文発表

1. Yayama T., Furusawa N., Baba H., Kokubo Y., Yoshizawa K., Fukuda M. Calcium Crystal Deposition in the Ligament Flavum of the Lumbar Spine: Role of Sex Hormones and Transforming Growth Factor- β . Acta Histochem. Cytochem. 36: 83-91, 2003
2. Kokubo Y., Kobayashi S., Uchida K., Noriki S., Imamura Y., Furusawa N., Yayama T., Nakajima H., Fukuda M., Baba H. Herniated and Spondylotic Intervertebral Discs of the Human Cervical Spine: Histological and Immuno-

histochemical Observations. Acta
Histochem. Cytochem. 37:109-117, 2004

II, 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

参考文献

1. Ono K et al.: Ossified posterior longitudinal ligament; a clinicopathological study. Spine 2:126-138, 1977
2. 都築 暢之, 今井 卓夫, 堀田 芳彦: 頸椎後縦靭帯骨化症骨化の病理組織学的所見とその意義. 日整会誌 55:387-397, 1981
3. Yasui N, Ono K, Yamamura I et al. Immunohistochemical localization of type I, II, III collagens in the ossified posterior longitudinal ligament of the human cervical spine. Calcif Tissue Int 35:159-163, 1983
4. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y et al: Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. Spine 17:33-36, 1992
5. Kon T, Yamazaki M, Tagawa M et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates differentiation of cultured spinal ligament cells from patients with ossification of the longitudinal ligament. Calcif Tissue Int 60:291-6, 1997



図1 石灰化前線部 (H.E. ×10)



図2 石灰化軟骨層へ侵入する開放型の血管 (H.E. ×20)



図3 collagen I抗体による免疫染色像

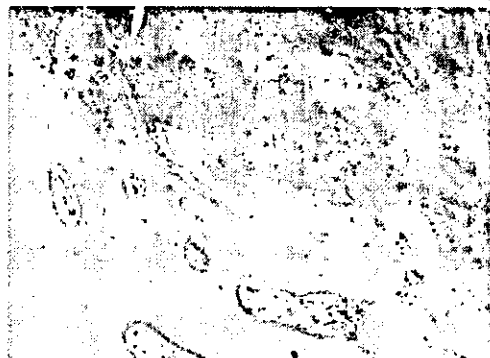


図4 collagen II抗体による免疫染色像

研究成果の刊行に関する一覧表 (雑誌)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takafumi Yayama,	Calcium Crystal Deposition in the Ligament Flavum of the Lumbar Spine :Role of Sex Hormones and Transforming Growth Factor- β .	Acta Histochem.Cytochem.	36(1)	83-91	200 3
Yasuo Kokubo,	Herniated and Spondylotic Inter-vertebral Discs of the Human Cervical Spine:Histological and Immunohistochemical Observations.	Acta Histochem.Cytochem.	37(2)	109-117	200 4

ラットを用いた脊柱靭帯への反復伸張ストレス負荷モデル : 脊柱靭帯骨化症をメカニカルストレスとの関連について

分担研究者 岩本幸英(九州大学整形外科教授)

研究協力者 塚本伸章, 前田 健, 三浦裕正, 細川 哲, 播広谷勝三 (九州大学整形外科)
日垣秀彦, 蔵田耕作 (九州産業大学機械工学科)

研究要旨

後縦靭帯骨化症(OPLL)や黄色靭帯骨化症(OLF)に代表される脊柱靭帯骨化症の成因はいまだ解明されていないが、脊柱靭帯局所への伸張メカニカルストレスの関与がその一つとして示唆されている。我々は前回、独自の刺激装置を用いて、in vivo にてラットの尾椎に反復伸張ストレスを負荷できる実験モデルを開発し報告した[1]。今回、脊柱靭帯のより詳細な観察のために、体幹の脊椎と構造が類似したより頭側の尾椎を対象とした。10N、2週間の伸張刺激により後縦靭帯の肥厚、靭帯付着部より広範にわたる軟骨細胞、軟骨基質の増生像がみられ、周囲では骨形成因子である BMP-2 の発現が免疫染色にて観察された。この結果は、脊柱靭帯骨化の成因におけるメカニカルストレスの関与を強く示唆するものである。

A. 研究目的

本研究の目的は独自の機械的刺激装置を用い、ラット尾椎脊柱靭帯に反復伸張ストレスを負荷した際の形態的变化を詳細に観察することである。

B. 研究方法

B.1 機械的刺激装置の概要

この装置はラット尾椎に一定の直達的な反復伸張ストレスを負荷するために九州産業大学機械工学科の協力を得、作成されたものである。この装置はコンピュータ制御により、ラットを乗せた台座が前後に往復運動することによって尾椎を固定した2つのアクリル製 immobilizer の間に、一定の張力を1Hzにて反復して発生させることができる (Fig.1)。

B.2 対象と刺激方法

対象は成体 Wistar ラット(メス)を用いた。刺激実験に先立ち X 線撮影像と触診所見を参照しながら第8番尾椎中央部に1.2mm ステンレスワイヤ(Kirschner wire)を冠状面に平行になるように電動ドリルを用いて経皮的に刺入した (Fig. 2)。近位側はワイヤ刺入が困難なため、ラット骨盤部を台座と近位 immobilizer との間にストラップで固定した。それにより骨盤と仙骨を介し、尾椎に牽引力を負荷することが可能になった (Fig. 3)。刺激プロトコールは 10N, 600cycles/day, 5 days/week, 期間2週間にて施行した (Fig.4)。観察対象部位は第3～5番尾椎とした。ワイヤ刺入処置、各回の実験はペントバルビタール(40 mg/kg)の腹腔内投与による全身麻酔の下で行った。刺激実験時以外はワイヤ刺入部の感染、ワイヤの脱落を

防ぐために自作の亚克力製固定具にて尾椎ワイヤ刺入部を保護した。飼育はケージの中で放し飼いとし、自由な行動を許容した。

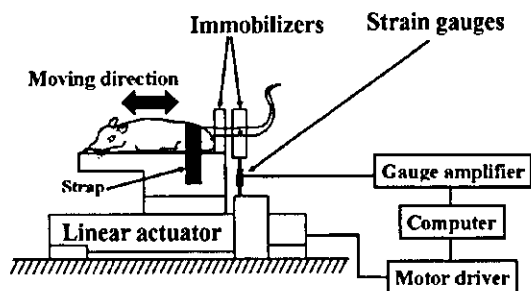


Fig. 1. A schematic drawing of the stimulating apparatus.



Fig. 2. A rat after wire insertion.

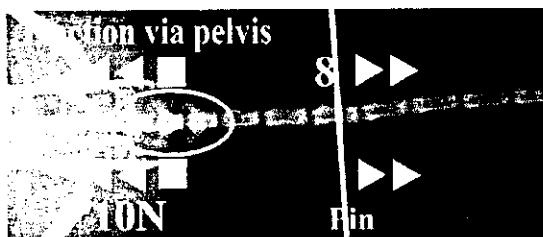


Fig. 3. A control X-ray after wire (pin) insertion. The circle indicates the target caudal vertebrae (CV), and the arrowheads indicate the sites where tensile forces were transmitted.

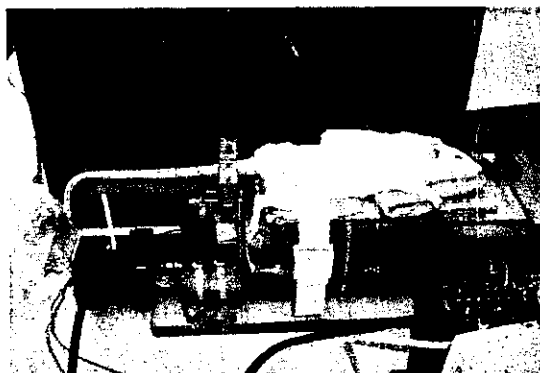


Fig. 4. A photograph image of the stimulating sessions.

B.3 評価

実験期間中は適宜尾椎の軟 X 線撮影 (Softex) を行い、ラット屠殺後にはマイクロ CT 撮影 (Hitachi Medico, Tokyo) を行い、骨の形態変化を観察した。摘出尾椎は4%パラホルムアルデヒドにて固定、その後、EDTA 溶液による脱灰処理を行い、パラフィンにて包埋した。標本は正中部矢状断にて5 μ mの薄切切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色、Safranin O 染色を施行した。また、一部の標本については抗 S100 蛋白抗体 (DAKO Corporation, CA, USA), 抗 Sox9 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), 抗 BMP-2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) にて酵素抗体法による免疫染色を施した。

B.4 倫理面への配慮

この実験は九州大学医学部動物実験倫理委員会の審査を受け、規定に基づいて行われた。

C. 研究結果

ラット尾椎の近位部分、特に第3~5番尾椎にかけては椎体とともに椎弓、脊柱管の構造が認められ、組織学的には椎体後面に存在す

る後縦靭帯、椎弓間に存在する黄色靭帯の構造がはっきり観察された(Fig. 5, 6)。

刺激実験により軟 X 線上やマイクロ CT 画像上では明らかな尾椎骨格の形態変化は見られなかった(Fig. 5)。

HE 染色組織標本では、後縦靭帯組織(PLL)の肥厚が見られ、靭帯付着部からは、椎間部付近から椎体中央部にかけて広範にわたり、線維束に囲まれる形で円形の軟骨様細胞が数珠状に増生していた。黄色靭帯、椎間板、および骨組織には明らかな変化は認められなかった(Fig. 7)。

軟骨様細胞の周囲は Safranin O 染色にて赤く陽性に染まり、グリコサミノグリカンを中心とした軟骨基質が発生していることが示された(Fig. 8)。

免疫染色では、成熟した軟骨様細胞内において S100 蛋白, Sox9 の発現が観察され、これらが軟骨細胞として機能していることが示された(Fig. 9-(A)(B))。また、異所性軟骨細胞周囲の不定形な細胞内では BMP-2 の発現が認められた(Fig. 9-(C))。

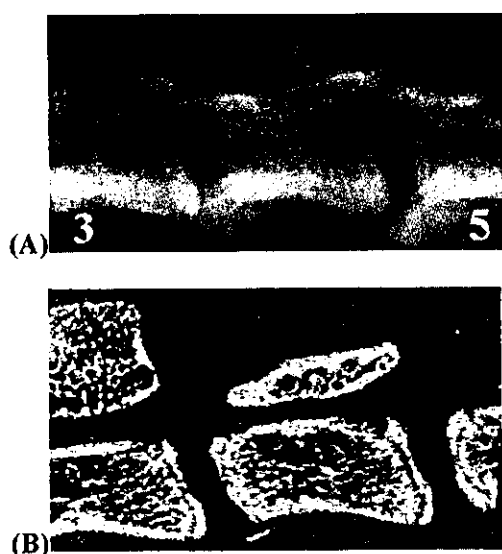


Fig. 5. X-ray (A) and micro CT image (B) of the 3rd to 5th CV after the stimulating sessions.

D. 考察

今回の実験により、ラット尾椎に伸張ストレスを加えると、尾椎脊柱靭帯の肥厚、軟骨化生などの形態変化がもたらされることがわかった。特に軟骨化生は後縦靭帯の付着部(enthesis)付近に広範に分布していたことが特徴的であった。靭帯の付着部は硬組織と軟組織の互いに隣接した部位であり、メカニカルストレスが集中しやすいといわれている。そこには、軟骨細胞・基質が介在し境界部にかかるメカニカルストレスに対する緩衝機構として機能すると考えられている[2]。今回の実験で与えられた個々の伸張ストレスは後縦靭帯付着部に集中・蓄積することで、細胞レベルの応答、または微小な損傷などによる治癒機転の影響により靭帯細胞の増殖、未分化な軟骨細胞の軟骨細胞への分化がもたらされたものと考えられた。

また、増殖した軟骨細胞周囲の不定形な細胞内では免疫染色により BMP-2 の発現が確認された。今回の一連の軟骨細胞への分化の過程には BMP-2 をはじめとした軟骨・骨形成因子の関与も直接示された。

実際の脊柱靭帯骨化症の特徴について、過去の報告によると、①靭帯骨化に先立ち靭帯の肥厚が観察されること[3,4]、②靭帯骨化部の境界は線維軟骨様構造を呈し、周囲の靭帯組織は線維の乱れや軟骨化生などの変性所見を伴うこと[5,6,7]、③骨化巣周囲では BMP-2 などの因子が異常発現すること[8,9,10]、などがあげられている。脊柱靭帯骨化症とメカニカルストレスとの関与については、これまで OPLL 症例の X 線画像や病理学組織の解析により脊柱靭帯に異常な張力がかかっている部位に骨化が伸展しやすいことが示されてきた[11,12,13]。



Fig. 6. Photomicrographs of the 4th CV of a control rat. H-E stain.

(A): The vertebral body and dorsal element of the 4th CV in Lower magnification. Arrowheads show PLL.

(B): PLL in higher magnification.

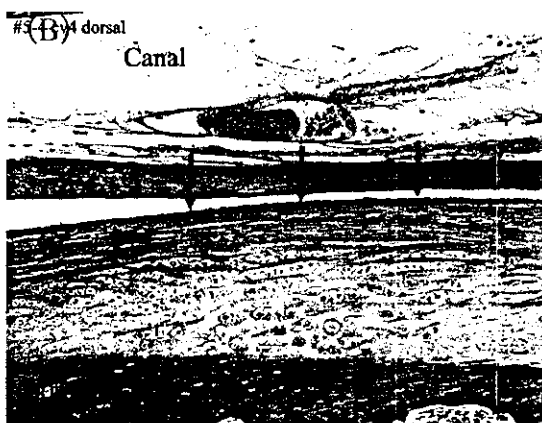
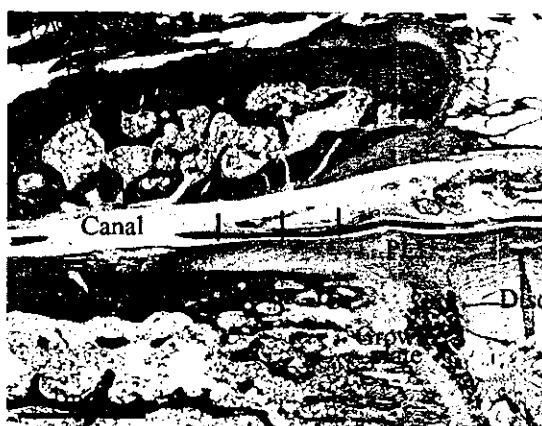


Fig. 7. Photomicrographs of the 4th CV of a rat after 2 weeks of the stimulating sessions. H-E stain.

(A): Arrows show hypertrophic and degenerative change in PLL.

(B): PLL in higher magnification. Note columnar clusters of chondrocyte-like cells were observed to arise widely from PLL insertion, and ligament cells proliferated in superficial layer of PLL.



Fig. 8. Safranin O staining demonstrated the existence of developing cartilage matrix around the chondrocyte-like cells.

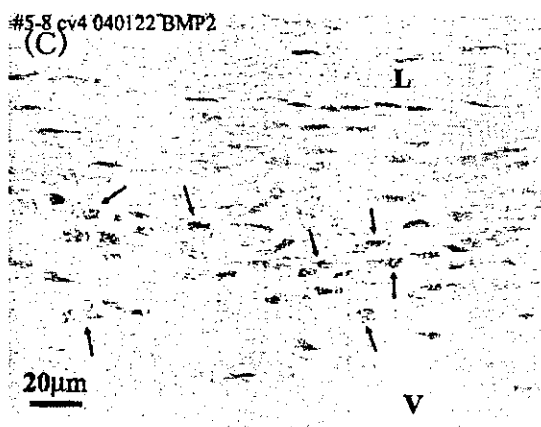
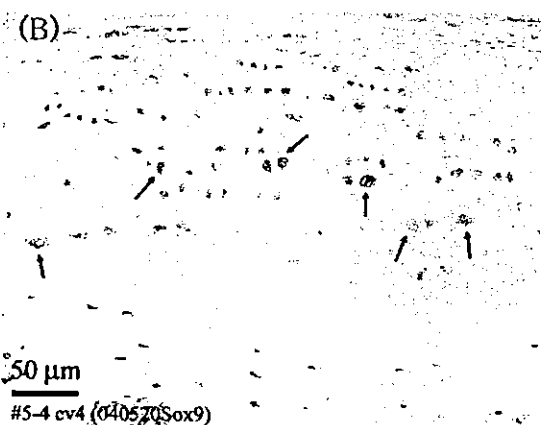
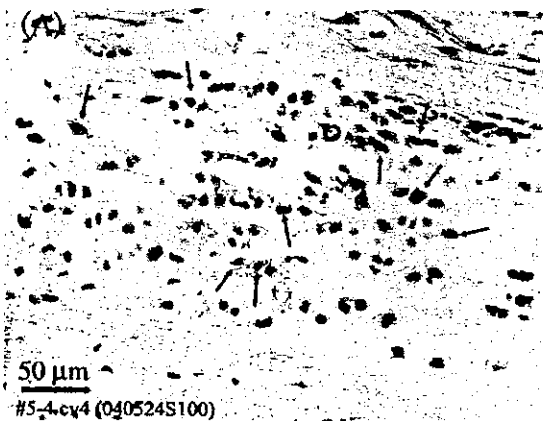


Fig. 9. Immunohistochemical expressions of S100 protein (A), Sox9 (B) and BMP-2 (C). Arrows show representative positively stained cells.

また、臨床的にも椎弓形成術などの後方除圧術後に OPLL が進行した症例の報告があり [14,15]、術後に後縦靭帯にかかる張力の増大が骨化伸展を促進しているのではないかと考えられている。さらに *in vitro* の研究において、OPLL 靭帯細胞はメカニカルストレス負荷に反応して BMP, BMP-receptor, *cbfal* などの骨化関連因子の産生を増加させることが示されており、OPLL 靭帯細胞はメカニカルストレスに対して高感受性を持つことが示唆されている [16,17]。

我々は前回の報告において [1]、ラット中間部尾椎を対象とし 20N の力で 120 cycle/day, 5 days/ week の反復伸張刺激を行った際の形態変化を中心に述べた。そこでは、実験開始後 2 週間過ぎごろより対象尾椎腹側の周囲に異所性骨化の出現が確認された。組織学的には旺盛な線維軟骨組織の増殖と、内軟骨性骨化による woven bone の形成が認められた。しかしながら、実験対象とした中間部尾椎は円柱状の形をしており、体幹の脊椎と比べ構造が大きく異なり、組織学的にも脊柱靭帯の同

定が困難であった。そのため、今回の実験では、より脊椎を模擬できる近位尾椎を対象を代え実験をおこなった。

今回、伸張ストレスによってラット尾椎後縦靭帯にもたらされた所見、特に、①靭帯の肥厚、②軟骨化生、③BMP-2の発現という特徴についてはヒトOPLLにおける上述の特徴との類似性が見られた。脊柱靭帯骨化症は多因子性の疾患であると考えられるが、伸張ストレスは靭帯の形質を変化させ、骨化を発生・進展させる促進因子になりうると考えられた。

E. 結論

脊柱靭帯骨化症と伸張ストレスとの関係を検討するために、ラット尾椎脊柱靭帯に反復伸張ストレスを負荷する刺激実験を行った。近位の尾椎を対象とし10Nの伸張力にて刺激実験を行ったところ、後縦靭帯の肥厚、靭帯付着部周囲の軟骨化生および骨形成因子の出現を特徴とした変化が認められた。この様態は脊柱靭帯骨化症の組織像との類似性が見られ、脊柱靭帯骨化の発生にメカニカルストレスが関与している可能性がin vivoにて示された。

F. 研究発表

学会発表

口頭発表 3件

- ・ 第19回日本整形外科学会基礎学術集会 (2004年10月, 東京)
- ・ 第31回日本臨床バイオメカニクス学会 (2004年11月, 福岡)
- ・ Orthopaedic Research Society 51st Annual Meeting (2005年2月, Washington DC, USA)

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。

<参考文献>

1. 岩本幸英, 塚本伸章, 前田健, 三浦裕正ほか:ラットを用いた脊柱靭帯への反復伸張ストレス負荷モデルの確立. 厚生労働省科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業, 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 2004: 22-28
2. Benjamin M, Kumai T, Milz S, et al. The skeletal attachment of tendons – tendon ‘entheses’. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2002; 133: 931-945
3. Motegi H, Yamazaki M, Sumio G, et al. Proliferating cell nuclear antigen in hypertrophied spinal ligaments. *Spine* 1998; 23: 305-310
4. Kondo S, Onari K, Watanebe K, et al. Hypertrophy of the posterior longitudinal ligament is a prodromal condition to ossification. *Spine* 2001; 26: 110-114
5. 寺山和雄:後縦靭帯骨化症の病態. 日整会誌 1988; 62: 679-695
6. Ono K, Yonenobu K, Miyamoto S, et al. Pathology of ossification of the posterior longitudinal ligament and ligamentum flavum. *Clin Orthop* 1999; 359: 18-26
7. Mine T, Kawai S. Ultrastructural observations on the ossification of the supraspinous ligament. *Spine* 1995; 20: 297-302
8. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y, et al. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine* 1992;

- 17: S33-36
9. Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K, et al. Expression and localization of bone morphogenetic proteins and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum. *Bone* 1997; 21: 23-30
 10. Tanaka H, Nagai H, Murata T, et al. Involvement of bone morphogenic protein-2 in the pathological ossification process of the spinal ligament. *Rheumatology* 2001; 40: 1163-1168
 11. Terayama K, Ohuchi E, Iida M, et al. Biomechanical study of spinal ligaments. Proceedings of the annual meeting of the Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligament. Tokyo 1980: 184-190
 12. Okada K, Oka S, Tohge K, et al. Thoracic myelopathy caused by ossification of the ligamentum flavum. *Spine* 1991; 16: 280-287
 13. Matsunaga S, Sakou T, Taketomi E, et al. Effect of strain distribution in the intervertebral discs on the progression of ossification of the posterior longitudinal ligaments. *Spine* 1996; 21: 184-189
 14. Hirabayashi K, Miyakawa J, Satomi K, et al. Operative results and postoperative progression of ossification among patients with ossification of cervical posterior longitudinal ligament. *Spine* 1981; 6: 354-364
 15. Kawaguchi Y, Kanamori M, Ishihara H, et al. Progression of ossification of the posterior longitudinal ligament following en bloc cervical laminoplasty. *J Bone Joint Surg* 2001; 83-A: 1798-1802
 16. Tanno M, Furukawa KI, Ueyama K, et al. 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* 2003; 33: 475-484
 17. Iwasaki K, Furukawa KI, Tanno M, et al. Uni-axial cyclic stretch induces Cbfa1 expression in spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Calcif Tissue Int* 2004; 74: 448-457

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

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と骨芽細胞のメカニカルストレス (MS) に対する応答性について検討した。骨芽細胞では、MS に応答して、FAK-MEK1/2-Runx2 転写活性-オステオカルシン産生の経路が順次活性化され、最終的に石灰化が促進される。これに対して、靱帯細胞ではMSを負荷してもFAK以下の一連の経路は活性化されず、石灰化 Runx2 も認められなかった。以上の結果から、靱帯細胞には、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である。この抑制機構は、我々がすでに報告した 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。MS 誘導性の石灰化刺激に対する抑制機構は、靱帯細胞に特異的に存在するインテグリン結合性分子が担うものと考えられる。

A. 研究目的

我々は、当研究室で樹立した歯周靱帯細胞 PDL-L-2 細胞を用い、靱帯細胞には Msx2 を介する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。本研究では、メカニカルストレス (MS) に対しても抑制機構が作用しているか否かを検討することを目的とした。

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

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 のシグナルが受容され石灰化に至る機序については明らかでないが、MS を受容する分子の候補として考えられているのはインテグリンで、そのシグナルは細胞内の FAK-MEK1/2-Runx2 転写活性-オステオカルシン産生の経路へ伝えられると考えられている。骨芽細胞に MS を負荷すると、上記の過程が順次活性化され、石灰化の速度および石灰化の程度ともに亢進した。これに対して、靱帯細胞 PDL-L2 では、この経路の変化は全く認められず、石灰化も認められなかった。予

備的な検討では、両細胞のインテグリン分子の発現に差は認められなかったが、インテグリン分子の種々変異体を細胞に過剰発現して上記シグナル伝達系に対する影響を調べた結果、靱帯細胞にはインテグリン分子の細胞内ドメインに結合してMS誘導性石灰化刺激を抑制する分子が存在することが示された。

D. 考察

靱帯細胞ではMS誘導性の石灰化刺激に対して抑制的に働く機構が備わっていること、この機構においては、インテグリンの細胞内ドメインに特異的に結合し、FAKの活性化を抑制する分子が関与していること、この分子は靱帯細胞に特異的であり、この抑制機構は、Msx2を介する抑制機構とは独立に作用することが明らかとなった。

E. 結論

靱帯細胞には、少なくとも2種類の石灰化抑制機構が存在する。靱帯細胞が強力なMS刺激下にあっても石灰化しないのは、これらの機構が協調的に作用するためであると考えられる。

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. 24:3460-3472, 2004.

2. 学会発表:

滝沢史夫他, 第47回日本歯周病学会秋季学術集会 平成16年9月14日 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況:なし

脊柱靱帯骨化症における高感度発現プロテオミクス

分担研究者 永田見生 久留米大学医学部整形外科教授

研究要旨

以前、脊柱靱帯骨化症のプロテオーム解析から、脊柱靱帯骨化症に特異的タンパク質の細胞外マトリックスの糖鎖修飾作用を AXIMA-QIT 質量分析装置にて解明した。2次元プロテオミクスは、染色方法の違いから発現タンパク質の違いが影響する。今回、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が示唆された。

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症のプロテオーム解析を行い、脊柱靱帯骨化症特異的タンパク質を探し出し、そのタンパク質の解明をすることである。

B. 研究方法

脊柱靱帯骨化症の手術時に摘出された脊椎後縦靱帯骨化 (OPLL) 組織を久留米大学個人識別情報管理室 (FDA, CFR21 part11) にて、患者情報をバーコード化し、匿名化を行った。

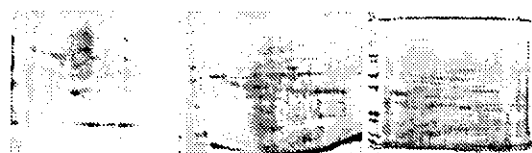
OPLL 患者 (2型糖尿病合併症+) 1例、OPLL 患者 (糖尿病合併症-) 1例をそれぞれ靱帯骨化した組織と靱帯骨化していない組織部位に分離した。Control として、正常頸椎骨組織と正常頸椎靱帯組織を検出した。

組織のタンパク質の可視化を行い、pI 等電点で分離後、SDS-PAGE で分離した。蛍光染色 (SyproRuby 染色) を行い、2次元電気泳動 PDQuest 解析ソフト (BioRad) にてスポットの解析を行い、切り出したスポットを In-Gel Digest (ミリポア) にて、ゲルからタンパク質を抽出し、AXIMA-CFR (島津製作所)、AXIMA-QIT (島津製作所) 質量分析装置にて解析を行った。

糖鎖修飾作用は、ProQ Emerald glycoprotein gel stain にて発現タンパク質を探し、MS-MS 解析を行った。

C. 研究結果

骨組織の 2D-PAGE プロテオーム解析のゲル染色方法の違いによる同一サンプルでのタンパク質発現数の違いと特徴を図 1. に示した。PI は、3 から 10 に統一している。



	クーマシーブルー染色	銀染色	蛍光染色
タンパク質検出量	~100ng	~600ng	~50pg
発現タンパク質数	30~50	200~300	900~1000
質量分析の影響	良	悪	良

図1. 骨組織の染色感度の違いによるプロテオーム解析

本研究は、SyproRuby 蛍光染色にて OPLL のプロテオーム解析を行った。銀染色の 3~5 倍のスポット数の発現の違いが見られた。

OPLL①は、糖尿病合併症+の症例であり、OPLL②は、糖尿病合併症-の症例を示す。

OPLL①と OPLL②の靱帯骨化部と正常頸椎骨組織の PDQuest 解果を図 2. に示す。PDQuest は、Gaussian modeling、数学的アルゴリズムを使用し、自動マッチングは高い精度を示す。

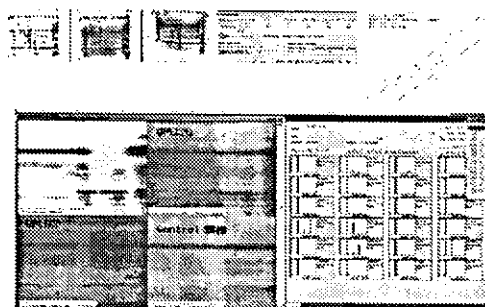


図2. OPLL①②靱帯骨化部、Control 頸椎

図 3. は、OPLL①と OPLL②の靱帯骨化部と正常頸椎骨組織の PDQuest 解析結果を図 2. に示す。

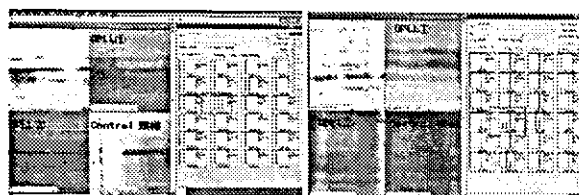


図3. OPLL①②靱帯骨化部、Control 頸椎 共通発現タンパク質

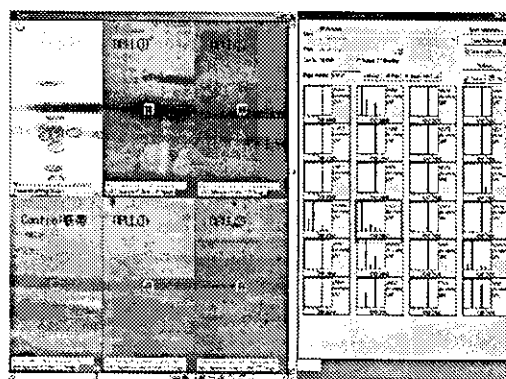


図4. OPLL①②靱帯骨化部、OPLL①②靱帯非骨化部 Control 靱帯 共通発現タンパク質

図 4. は、OPLL①②靱帯骨化部、OPLL②靱帯非骨化部、正常靱帯組織の PDQuest 解析結果を示す。

図5. は、2次元電気泳動の解析結果をディファレンシャルディスプレイにて、PDQuest 解析結果を示す。

≠OPLL DM+ 筋帯骨化部	≠OPLL DM- 筋帯骨化部	≠OPLL DM+ 筋帯骨化部 &≠OPLL DM- 筋帯骨化部	≠OPLL DM+ 筋帯骨化部 &≠OPLL DM- 筋帯骨化部 &Control: 骨	≠OPLL DM+ 筋帯非骨化部 &≠OPLL DM- 筋帯非骨化部 &Control: 筋	≠OPLL DM+ 筋帯骨化部 &≠OPLL DM- 筋帯骨化部 &≠OPLL DM+ 筋帯非骨化部 &≠OPLL DM- 筋帯非骨化部 &Control: 筋
616	950	81	16	29	3

SyproRuby染色
NuPAGE Beta 4-12% Bis Tris Gel w/RES Running Buffer
PDQuest7.11

図5. デファレンシャルディスプレイによる発現タンパク質Spots数の統計学的解析結果

PDQuest にて解析したスポットゲルを切り出し、Montage In-Gel Digest(ミリポア)にて、ゲルをトリプシン消化し、タンパク質の抽出を行い、AXIMA-CFR(島津製作所)にて質量分析を行った。タンパク質同定のために Mascot Search を行い、タンパク質を決定した。

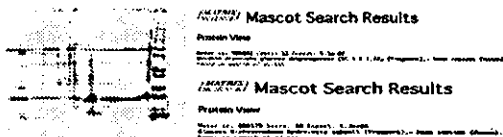


図6. ProQ Emerald glycoprotein gel stain



図6. は、2D-PAGE ゲルを ProQ Emerald glycoprotein gel stain を行った。この蛍光染色にて、糖鎖作用が見られ、その発現タンパク質を AXIMA-QIT (島津製作所) 質量分析を行い、MS-MS 解析にて、修飾作用の解析を行った。

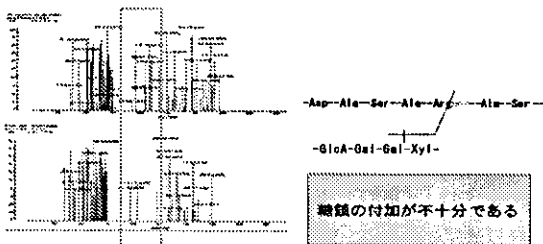
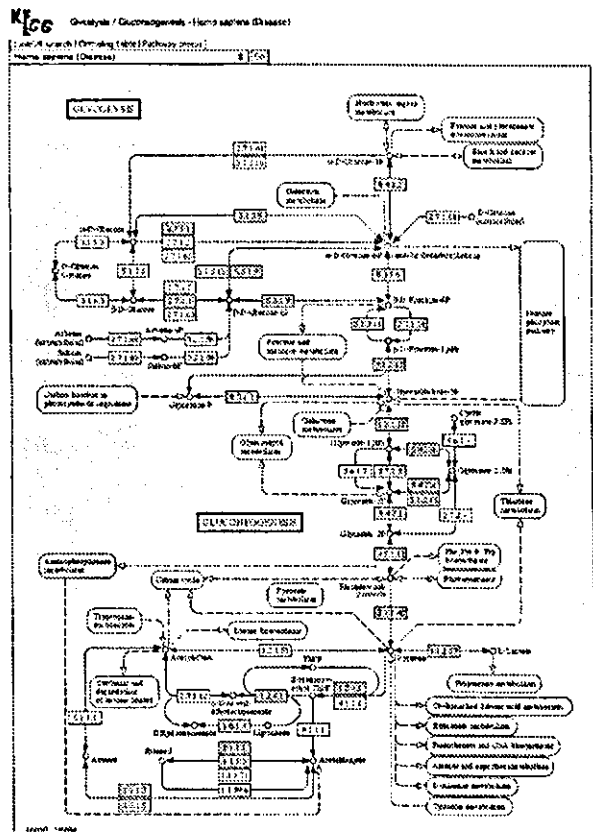


図7. 糖ペプチドのMALDI-QIT TOF MS/MS解析

解析は、do novo sequencing ソフトを用いた。

図8. は、KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) の Glycolysis/ Gluconeogenesis Protein Network(ヒト)を抜粋した。脊柱後縦靭帯骨化症の発現タンパク質とそのパスウェイを解析中である。



D. 考察

糖鎖は、細胞表面に存在し、細胞-細胞の認識、結合により構造と役割があり、個体を作り出す。しかし、その構造の違いにより、さまざまな疾病を発症させる。脊柱後縦靭帯骨化症の特異的タンパク質を見つけ出し、治療に貢献できるようにしたい。

E. 結論

脊柱後縦靭帯骨化症は、糖尿病の合併を多く見られることから、糖尿病の有無にて比較解析を行ったが、脊柱後縦靭帯骨化症は、タンパク質と糖鎖修飾のみではなく、その共有結合にも違いが示唆された。

F. 業績

永田見生 骨疾患プロテオミクス「遺伝子医学MOOK」
“疾患プロテオミクスの最前線-プロテオミクスで病気を治せるか” 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

2004 年プロテオミクスから、ヒト骨転移バイオマーカーを見つけ出し、特許申請を行った。
この経験から、患者血清中から、脊柱後縦靭帯骨化症のターゲットタンパク質を検索し、東京大学、理化学研究所の SNPs チームとの連携からタンパク質-遺伝子の解析を行う。

協力研究機関

本研究は、福井大学医学部器官制御医学講座、馬場久敏教授、佐藤竜一郎先生との共同研究であり、また、これまでのデータ解析には、九段坂病院整形外科、進藤重雄先生、国立病院機構西多賀病院、整形外科、石井祐信先生との共同研究があつてのことと、皆様に厚くお礼申し上げます。