

## Runx2の異所性骨化誘導に関する研究

分担研究者 四宮 謙一 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科整形外科学分野教授  
共同研究者 竹田 秀 東京医科歯科大学COE特任助教授

研究要旨 Runx1, 2あるいは3を軟骨に過剰発現するマウス(以下Runx1, 2, 3tg)を作成した。Runx2tgとRunx3tgでは異所性に肋軟骨が石灰化し生後早期に死亡した。Runx1tgは出生時には明らかな異常はないが、生後数ヶ月から脊椎の側彎を認めた。生存しえたRunx2tgでも同様の異常を認めた。組織学的には椎間板の変性と肥大軟骨細胞の出現を認めた。これらの結果からRunx1, 2および3は軟骨分化において各々特異的な機能を有することが示唆された。

### A. 研究目的

脊柱韧带骨化症(以下OPLL)の発症には遺伝学的素因が深く関与していることが知られているが、その詳細は不明である。我々はこれまでに骨芽細胞、軟骨細胞分化に重要な転写因子であるRunx遺伝子を軟骨特異的に過剰に発現させたマウスで骨や軟骨の異所性石灰化を見出した。そこで、Runx遺伝子がOPLLの発症および進展に関与している可能性を検討すべく本研究を行った。

### B. 研究方法

①Runxファミリー遺伝子のRunx1, 2, 3の骨、軟骨における発現をin situ hybridizationにより検討した。②また、軟骨特異的なプロモーターを用いて各Runxを過剰発現するマウス(以下Runx1, 2, 3tg)を作成し組織学的に検討した。

(倫理面への配慮)本研究は学内動物実験委員会の承認のもと施行された。動物に侵襲的な操作を加えるときは規定の麻酔を用いて苦痛を軽減した。また、組織学的な検討では麻酔下で安楽死した動物より採取した臓器を用いた。

### C. 研究結果

①Runx1の発現は胎生12日に間葉系細胞で認められたが、その後は次第に減弱した。Runx2の発現は胎生12日ごろより前肥大軟骨細胞、肥大軟骨細胞を認められたが、発生とともに減弱した。出生時には骨特異的な発現が認められ、軟骨でのそれはほぼ消失していた。Runx3の発現は胎生期半ばから主に前肥大軟骨細胞

にて発現が認められ、その強度は経時的に大きな変化はなかった。またRunx2の発現は四肢では中枢よりで高く末梢で低下する傾向を示したのに比して、Runx3の発現はむしろ四肢末端、特に手指で強かった。

②Runx2tgとRunx3tgは肋軟骨に異所性の骨化を示し、そのほとんどが出生時に死亡した(図1)。組織学的には永久軟骨の肥大化と血管の進入が認められた。また、頭蓋軟骨で軟骨分化が促進し、野生型に比べて頭蓋底が早くに骨化していた。一方で、Runx1tgではこうした異所性の骨化は認められなかった。Runx1tgおよび生存しえたRunx2tgは生後数ヶ月で脊椎の側彎を示した(図2)。組織学的には椎間板において髓核に細胞外基質の蓄積、肥大軟骨細胞の出現を認めた。

### D. 考察

これまでRunx2およびRunx3が軟骨の分化を調節することは知られていたが、それぞれの分化調節作用に相違があるかは不明であった。また、おなじ遺伝子ファミリーに属するRunx1の軟骨分化における作用は未知であった。本研究では胎生期においてRunx1, 2, 3がそれぞれ異なった時期に異なった発現パターンを示すことが明らかとなった。このことから軟骨分化においてRUNXが互いに相補的な機能を有している可能性が考えられた。また、Runx1, 2tgで椎間板の変性が認められたことからRUNXの発現異常が椎間板変性に関わっていることが示唆された。今後、

ヒトにおいても椎間板や靭帯の変性におけるRUNXの機能について興味を持たれる。

#### E. 結論

RUNXは軟骨分化、椎間板の恒常性維持において各々独自の機能を有することが明らかとなった。RUNX1およびRUNX2が椎間板の変性に関与している可能性が示された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

1) Runx遺伝子は軟骨細胞分化を促進し椎間板変性を惹起する

佐藤信吾、麻生義則、木村文子、竹田秀、四宮謙一

第23回日本骨代謝学会学術集会 一般口演 平成17年7月21日

2) S. Takeda, J. Ozdemir, S. Sato, Y. Aso, A. Kimura, K. Shinomiya, G. Kasrenty.

Runx1, 2 or 3 Regulates Chondrocyte Differentiation with Different Efficacy and Induction of Runx in Intervertebral Disk Leads to Disk Degeneration

ASBMR 27th Annual Meeting in Nashville, Tennessee, 2004

3) Runx遺伝子は軟骨細胞分化を促進し椎間板変性を惹起する

佐藤信吾、麻生義則、木村文子、竹田秀、四宮謙一

第20回日本整形外科学会基礎学術集会 一般口演 平成17年10月20日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）なし

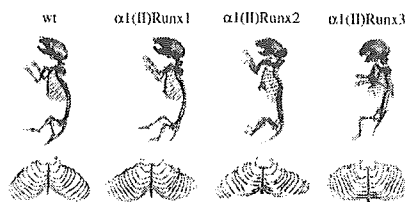


図1 Runx2, Runx3tgマウスは異所性骨化、内軟骨性骨化の促進を示す

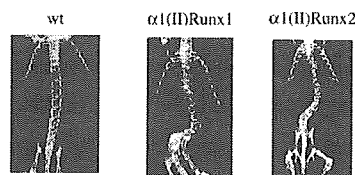


図2 Runx1, Runx2tgマウスは側弯を呈する

# Zucker Fatty Rat におけるインスリン-IGF-1 シグナルの検討

主任研究者 中村 耕三 東京大学整形外科学教室 主任教授

## 分担研究者

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)  
久保宏介 (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)  
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】

肥満環境下におけるインスリン-IGF-1 シグナルの骨形成作用が脊柱靭帯骨化症の異所性骨化に及ぼす影響について検討した。遺伝的にレプチンの受容体機能異常を有する Zucker Fatty Rat (ZFR) は過食により高インスリン血症および肥満を呈するが、今回、作製した Monosodium glutamate (MSG) 処置 Rat も高インスリン血症を呈し、表現型も非常に類似していた。しかしながら、病理組織学的には、ZFR では線維輪の破綻と脊柱靭帯 entheses 部に肥大軟骨細胞を多数認めたのに対し、MSG 処置 Rat では軟骨終板の不整を認めるのみで繊維輪構造は保たれていた。また、ZFR の靭帯 entheses 部には IRS-1 陽性細胞の増加と IRS-1、ERK42/44MAPKinase の蛋白発現の増加を認め、MSG 処置 Rat においては IRS-2 陽性細胞数の増加と PI3Kinase 蛋白の発現を認めた。ZFR の脊柱靭帯部にはレプチンによる IRS-2 を介した骨化調節作用の欠如が関与し、主に IRS-1 を介した細胞増殖作用の亢進により靭帯骨化来発す可能性が示唆された。

## A 研究目的

脊柱靭帯骨化症 (OPLL) は骨化した脊柱靭帯により脊髄が圧迫され重篤な体幹四肢の脊髄性麻痺を生じる難治性疾患として知られている。当教室においてはこれまで脊柱靭帯骨化モデルである Zucker Fatty Rat (ZFR) を使用して OPLL の骨化機序の解明に基礎的研究を行ってきた。すなわち、ZFR の骨化様式は軟骨性骨化を主体とし脊柱靭帯 entheses 部を中心に軟骨細胞の増殖と軟骨基質の形成を認めること<sup>1)</sup>。本症に臨床、而糖能異常を合併する例が多く、ZFR が成人発症型糖尿病に類似した臨床症状を呈するモデルラットであり、さらにインスリンの生理作用として糖代謝作用の他に細胞増殖作用・骨形成促進作用があることに着目し ZFR の脊柱靭帯骨化は高インスリン血症下におけるインスリン-IGF-1 (insulin-like growth factor-1) シグナルを介した細胞増殖作用が関与していることなどを報告してきた<sup>2)</sup>。さらに近年、抗肥満作用及びインスリン感受性増強作用を持つレプチ

ンの代謝作用が解明されつつあり、これらをもまえ、今回我々は ZFR 及び MSG 投与により摂食中枢を破壊することにより過食を呈する MSG 処置 Rat を作製し、同肥満環境下における、後繊維帯のインスリン-IGF-1 シグナルならびにレプチンシグナルの関与を検討した。

## B 研究方法

実験動物は遺伝的にレプチン受容体機能異常があり靭帯骨化モデルである ZFR 群、Control として Non Fatty Rat (NFR) 群、さらに NFR の新生仔ラットに、モノソジウム・グルタメートを出生日より 5 日間 体重 1 g あたり 4mg を皮下投与し視末下部弓状核摂食中枢を破壊した MSG 群の 3 群で生後 10~12 ヶ月齢の雄、各群 20 匹使用した。吸入麻酔下に開胸し左心室より採血を施行。血清より空腹時血糖値、インスリン値、IGF-1、レプチン値を測定した。環流固定後上位胸椎を摘出、脊柱靭帯付着部における矢状薄切パラフィン切片を作製し、病理組織学的に HE 染色、さらに

LSAB 法でインスリン受容体基質 (IRS : insulin receptor substrate) 1と2 (Santa cruze 社) について免疫組織染色を行った。また、上位胸椎椎間帯付着部および椎間板を摘出、凍結保存の後 Western Blotting 法により IRS-1, 2 (Santa cruze 社)、PI3kinase p85, ERK42/44 MapKinase (cell signalling 社) について蛋白定量化を行った。

(倫理的配慮)

東京医科大学動物実験施設にもとづき実験を行った。

C 結果

I, 表現型と血液所見

ZFR はレプチンの受容体機能異常により、而糖能異常と肥満を呈するが、今回、対象に作製した MSG 処置 Rat も過食により過度肥満を呈した。表現型としては、ZFR は3週齢ころより肥満を呈したが、MSG 処置 Rat も月齢2ヶ月ころより体重増加を認め、6ヶ月には両者非常に類似した過度肥満を呈していた (図1)。

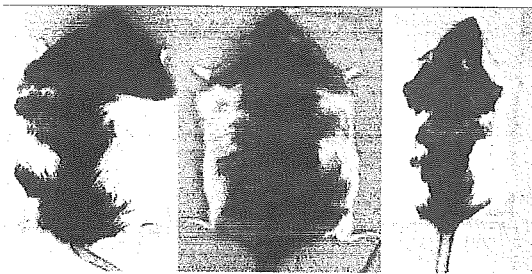


図1 表現型

空腹時血糖は、ZFR 群、MSG 群が軽度高値を呈した。血中インスリン濃度は ZFR 群、MSG 群共に8ヶ月齢以降 NFR 群の約5倍の高値を示した。血中 IGF-I 濃度は3群に有意な差はないが、血中レプチン濃度は、8ヶ月齢以降、ZFR 群、MSG 投与とも NFR 群の約10倍の高値を示した (図2)。

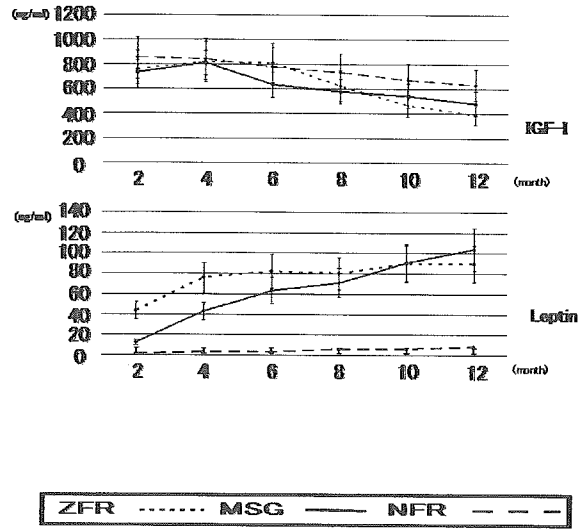
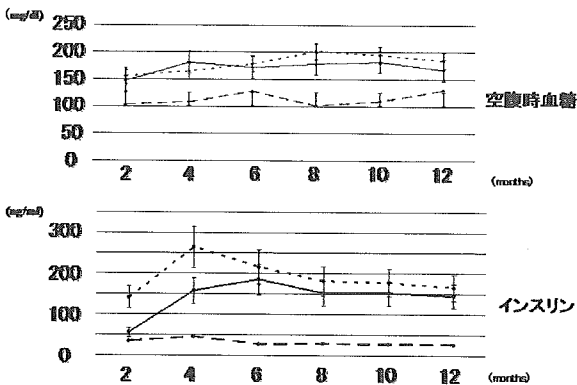


図2 血液所見

II, 病理、免疫組織学的所見

3群の上位胸椎椎間板の矢状断 HE 染色を示す。ZFR 群では線維輪の破綻、弾性繊維の変性、軟骨終板及び靭帯付着部へ骨芽細胞の出現と石灰化を認めた。靭帯付着部境界は不明瞭、軟骨終板の肥厚と肥大軟骨細胞の増加を認める。他の2群の線維輪構造は保たれている (図3)。

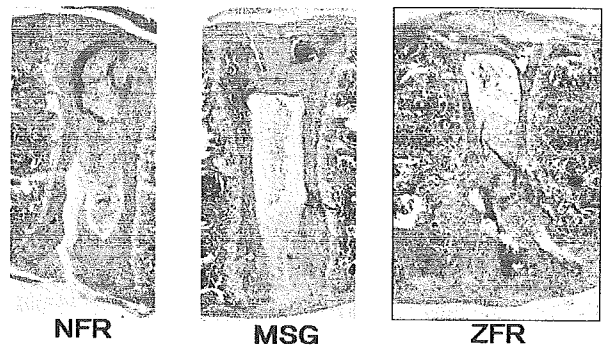
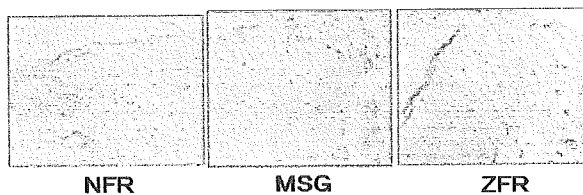


図3 上位胸椎椎間板

抗インスリン受容体基質-1抗体染色では ZFR 群の破綻した線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を認める。MSG 群では線維輪内の陽性細胞の軽度増加を NFR 群と比べ認める (図4)。抗インスリン受容体基質-2抗体染色においては、コントロール群である NFR 群では線維輪内に陽性細胞を認めたが、ZFR 群では陽性細胞数の減少がみられた。MSG 群ではあるが、一部線維輪及び軟骨終板部に陽性細胞を認める (図5)。

NFR MSG ZFR

図4 IRS-1抗体



NFR MSG ZFR

図5 IRS-2抗体

### III, Western Blotting

Western Blotting ではZFR 群において IRS-1 の蛋白発現量は他の2群に比べ多く、一方で IRS-2 蛋白は3群とも蛋白発現は認めるものの、3群間の差は明らかでなかった。ERK42/44MapKinase ではZFR, MSG 群で蛋白発現を認め、その発現はZFR 群が多かった。また、PI3kinase ではMSG 群で蛋白発現を多く認めた (図6)。

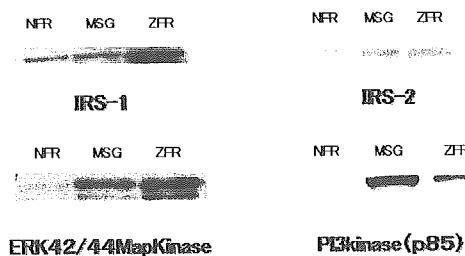


図6 Western Blotting

### D 考察

OPLL の骨化の発生機序については依然不明な点が多いが、研究の進展に伴い 脊柱靭帯の骨化はインスリン-IGF-1 シグナルを介した細胞増殖作用が関与することが報告されてきた。インスリンは筋肉・肝臓・脂肪を標的とする血糖降下作用ホルモンであるが、一方で骨形成として骨同化作用をもつ事も

知られており、細胞膜上のインスリン受容体 (IR) に結合し内在するチロシンキナーゼが活性化され細胞内のインスリン受容体基質 (IRS) にその作用を伝達する。これらの情報よさらに、主に糖新生、グリコーゲン合成、脂肪合成など糖代謝に関与する PI3Kinase 系と細胞増殖作用を有する MAPKinase 系へと伝達され、血糖調節とともに骨形成に重要な役割を担っている。IGF-1 は骨芽細胞および成熟軟骨細胞から分泌され autocrine / paracrine に作用し骨形成を促進する成長因子の1つであるが、受容体構造がインスリン受容体と類似し、インスリンが IGF 受容体とまた IGF がインスリン受容体と相互に結合することが知られている。

また、インスリン受容体基質 (IRS) には IRS-1 から IRS-4 というそれぞれ異なった遺伝子にコードされる4つのイソフォームが存在し、インスリン作用発現では IRS-1、IRS-2 が主要な役割を果たすと考えられている。IRS-1 および IRS-2 は比較的広範な組織分布を示すが、主に IRS-1 は骨格筋で IRS-2 は視床下部、肝でのインスリン作用に関与し糖代謝作用を調節している。

一方で IRS は骨代謝作用も有し、阿久根らによると、IRS-1、2 のノックアウトマウスを用いた研究から IRS-1 は骨芽細胞において、骨形成、骨吸収ともに促進的に働き、骨代謝回転の維持を担うが、IRS-2 は骨形成に促進的に骨吸収には抑制的に働き、骨同化作用のバランスを保つ作用があり、インスリン-IGF-1 シグナルの骨形成作用を有する伝達は主に IRS-1 を介していることを明らかとした<sup>3)</sup>。

以上より高インスリン血症下において、この強力な骨形成作用を有するインスリン-IGF-1 シグナルは亢進し、共通経路を介して脊柱靭帯 enthesis 部の骨芽細胞および肥大軟骨細胞に作用し骨化をきたすと考えられる。しかしながら、今回、対照として作製したMSG 処置Rat はZFR と同じく肥満、高インスリン血症を呈したが靭帯骨化は来たさなかった。

山崎らは肥満NIDDM モデルラットの脊柱靭帯部に異所性骨化を認めないことを報告した<sup>4)</sup> 他、木村らもMSG 処置 Wister 種Rat の脊柱靭帯に明らかな変化を認めないことを報告<sup>5)</sup> し、高インスリン血症のみでは、異所性骨化を発生させるには不十分であることを指摘している。高インスリン血症下、レプチン不応性のないMSG 処置Rat の脊柱靭帯細胞に骨化を認めないのに対しZFR に靭帯骨化の前段階であると考えられる繊維輪の破綻や enthesis 部に肥大軟骨細胞の増加を認めたことはZFR の脊柱靭帯部細胞のレプチンシグナルに対する感受

性の差異がインスリン-IGF-I シグナルに何らかの影響を及ぼしていると考えられた。

当教室が保有するZFRは突然変異体としてZuckerにより発見されレプチン受容体異常により高血糖、高インスリン血症、肥満を呈し、靭帯骨化モデルとともに、II型糖尿病モデルとしても知られている<sup>2)</sup>。レプチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンであり、視床下部のレプチン受容体を介して摂食、エネルギー消費を制御している。レプチン抵抗性肥満をきたし、インスリン感受性を低下させることが知られているが、荒木らはIRS-2ノックアウトマウスを用いた実験からレプチンの視床下部における摂食の調整がIRS-2を介する事を報告し、末梢においてもIRS-2を介したインスリン調節作用と関連しているとしており<sup>9)</sup>、OPLの骨化はインスリン受容体器質であるIRS-1とIRS-2が深く関与し、レプチンシグナルもそのIRSを介し骨化に関わる可能性が指摘されている。

今回、免疫組織学的検索にて、ZFR 脊柱靭帯部を中心にIRS-1陽性細胞の増加とIRS-1、ERK42/44MAPKinase 蛋白発現量の増加を認めたことは、インスリン-IGF-Iシグナルとくに細胞増殖作用の亢進を示唆する結果であり、MSG処置Rat 靭帯細胞においてIRS-2陽性細胞数の増加とPI3kinase 蛋白発現増加はIRS-2を介したレプチンシグナルの伝達がIRS-1以下の細胞増殖作用に働き、骨化を調節している可能性が示唆された。

すなわち、MSG 脊柱靭帯において、インスリン-IGF-Iシグナルは主にIRS-1を介した経路によりPI3Kp85以下の代謝作用とMAPK以下の細胞増殖を担っている。高インスリン血症下、そのシグナルは亢進傾向にあるが、MSGRatにおいて、高レプチン血症下、IRS-2を介したレプチン作用は、PI3Kp85をさらに活性化し、ネガティブフィードバックという形で亢進したIRS-1シグナルに働き、結果、IRS-1、MAPK経路を介した細胞増殖作用は調節され、骨化は来たしにくいと考えられる。一方、ZFRでは、高レプチン血症下においてもレプチン受容体の機能異常により、そのシグナルは欠如しPI3Kp85の活性化によるネガティブフィードバック機構は低下し、結果、IRS-1、MAPK経路を介した細胞増殖作用は亢進し靭帯骨化に至ると推測され、このレプチン受容体を介した靭帯細胞の感受性の差異が骨化に影響を及ぼしていると考えられた(図6,7)。

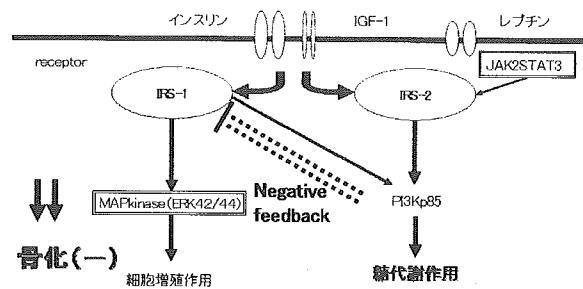


図7 MSG Ratにおけるシグナル経路

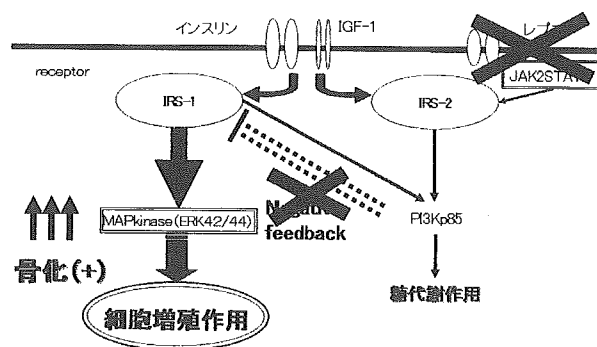


図8 ZFRにおけるシグナル経路

#### E 結論

脊柱靭帯骨化モデルである Zucker Fatty Rat (ZFR)の脊柱靭帯細胞におけるインスリン-IGF-Iシグナルの検索を行った。ZFRでは靭帯附着部を中心にIRS-1陽性細胞数の増加とIRS-1蛋白およびERK42/44MAPKinase 蛋白発現量が多く、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

#### <参考文献>

- 1) 三浦幸雄ら: Zucker fatty rat における脊柱靭帯骨化. 整形外科44: 1107-1113, 1993
- 2) 山本謙吾: Zucker fatty rat における脊柱靭帯骨化. THE BONE Vol. 16 No. 3 2002-5
- 3) 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
- 4) 山崎正志: 骨形成(骨吸収因子)肥満NIDDMモデルラット(OLETF)における脊柱靭帯組織の角質 厚生労働省特定疾患対策研究12年度研究報告書 脊柱靭帯骨化症に関する調査

研究92-94 2001

5) 木村大: 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62 巻3号253-260 2004

6) 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

知的財産権の出願・登録状況

なし

## Zucker Fatty Rat における交感神経系活動低下と靭帯骨化

分担研究者

東京医科大学整形外科

山藤 崇 馬嶋 正和 久保 宏介 木村 大 山本 謙吾

研究要旨 近年、交感神経系の中で $\beta 2$  アドレナリンが視床下部を介して中枢性に骨量を調節していることが注目されているが、靭帯骨化への影響は明らかではない。レプチン受容体機能異常を認める Zucker Fatty Rat が脊柱靭帯骨化を認めると共に交感神経系の活動低下を認めることに着目し、Zucker Fatty Rat 脊柱靭帯における $\beta 2$  アドレナリンの影響を検討した。Zucker Fatty Rat 脊柱靭帯付着部では増殖した細胞群に $\beta 2$  アドレナリン受容体の発現を有意に認めた。Zucker Fatty Rat において、 $\beta 2$  アドレナリンの靭帯骨化への関与が示唆された。

### A 研究目的

アディポカインであるレプチンは摂食・エネルギー代謝調節作用に加えて、交感神経系を介した骨形成抑制作用があることが報告されている<sup>1)</sup>。その中でも $\beta 2$  アドレナリンが中心的な役割を果たしており、 $\beta 2$  アドレナリン受容体欠損マウスにて骨形成の亢進および骨吸収の低下による骨量が増加を認めている<sup>2)</sup>。今回、交感神経系を介した骨形成の調節が靭帯骨化に与える影響を明らかにすることを目的として研究を行った。実験動物である Zucker Fatty Rat (以下 ZFR) はレプチン受容体機能異常ラットであり交感神経活動の低下と靭帯骨化を併発する<sup>3) 4)</sup> ことに着目し、ZFR 脊柱靭帯におけるレプチンと $\beta 2$  アドレナリン受容体の発現を検討した。交感神経系の活動低下が靭帯骨化に与える影響が明らかになれば、 $\beta 2$  アドレナリン刺激薬などが靭帯骨化の治療薬となることも期待される。

### B 研究方法

《実験動物》

- レプチン受容体のミスセンス変異によりレプチン受容体機能異常を認める Zucker Fatty Rat 【fa/fa Rat】
  - Non Fatty Rat 【Fa/Fa Rat】 (以下 NFR)
  - NFR に生後 5 日間 Monosodium glutamate (4mg/kg. body weight) 処置を施行し視床下部弓状状を選択的に破壊した MSG Rat (以下 MSG)
- 12ヶ月齢を各20匹を使用した。

ZFR はレプチン受容体機能異常から過食・肥満・耐糖能異常および交感神経活動低下を認める脊柱靭帯骨化自然発生モデルラットである。対象として表現系が正常である NFR と、視床下部弓状核を破壊し摂食中枢異常により ZFR 同様の肥満を呈する MSG を使用した。

《検討項目》

- ① 血中レプチン値  
全身麻酔後に開胸右心室から採血を施行した。
- ② 体重  
生後2ヶ月から2ヶ月毎に測定した。



③ ヘマトキシリン・エオジン染色 (以下 HE 染色)  
全身麻酔後に 4%パラホルム還流固定施行し、高  
位胸椎摘出にて脊椎矢状断パラフィン切片を作  
成した。

④ 免疫組織化学染色

LsAB 法にてレプチン受容体 (Ob-R) 抗体、 $\beta$  2 ア  
ドレナリン受容体 ( $\beta$  2AR) 抗体の染色を施行し  
た。NIH imaging を用い陽性細胞数を測定した。  
マンホイットニー U 検定を用いて統計処理を施行  
した。

⑤ Western Blot Hyblidization

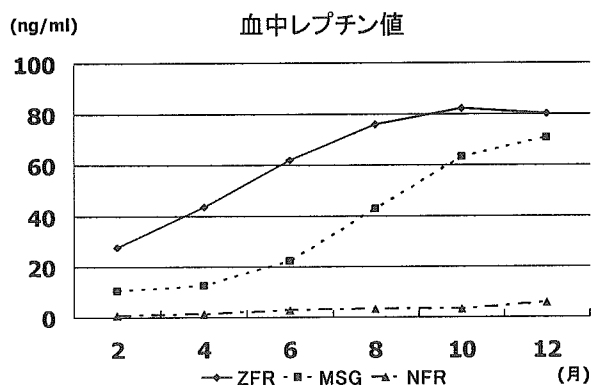
胸椎後縦靭帯を拡大鏡下に切除し検体としホモ  
ジナイズした後、Ob-R、 $\beta$  2AR の蛋白発現量を定  
量化した。上記と同抗体を使用した。

<倫理面への配慮>

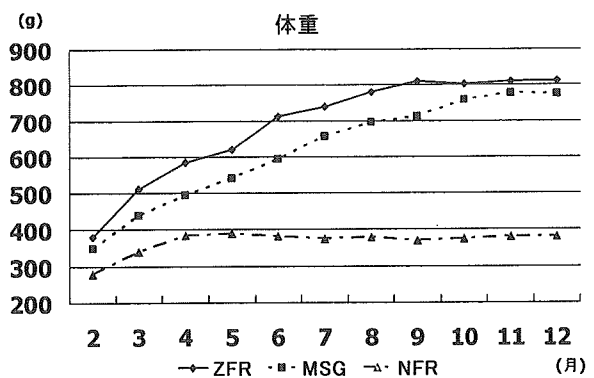
東京医科大学動物倫理委員会の規定に基づき  
実験を施行した。

C 結果

①血中レプチン値は ZFR が 2 ヶ月より他の 2 群よ  
り高くなったが、12 ヶ月にて ZFR  $80.2 \pm 8.1$ 、MSG  
 $70.9 \pm 9.2$ 、NFR  $5.7 \pm 3.5$  ng/ml と ZFR、MSG が近  
似した血中濃度となった。

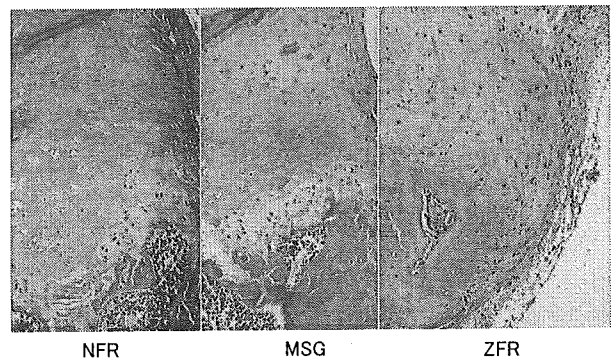


②体重は 12 ヶ月にて ZFR、MSG が高値となり、NFR  
と比べて明らかな体重増加を認めた。



③ HE 染色 (Th 5)

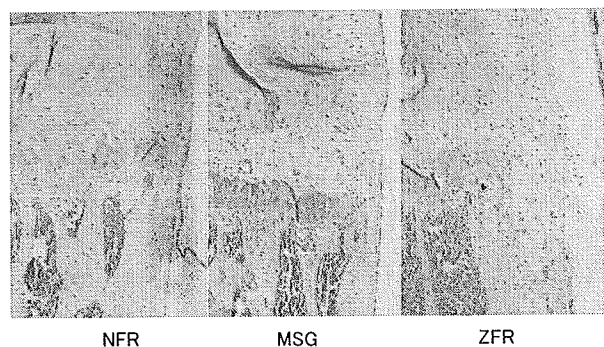
NFR では明らかな異常所見を認めないが、MSG  
にて軽度の椎間板変性と後縦靭帯付着部に軽度  
の肥大軟骨細胞様細胞の増殖を認めた。ZFR では  
椎間板は後方に膨隆し、後縦靭帯付着部を中心  
に肥大軟骨細胞様細胞と骨芽細胞様細胞の増殖を  
認めた。



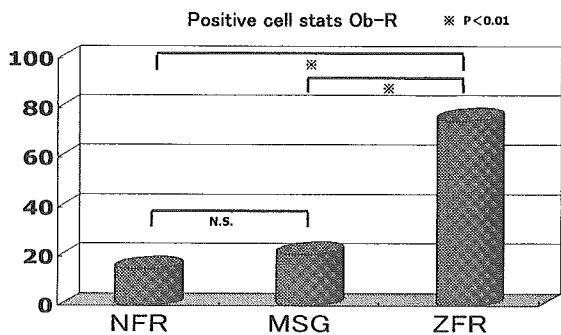
④ 免疫組織化学染色

《Ob-R》

ZFR、MSG ではほとんど陽性細胞の発現を認めない  
が、ZFR では椎間板後縁と後縦靭帯付着部の細胞  
増殖部を中心に陽性細胞の発現を認めた。

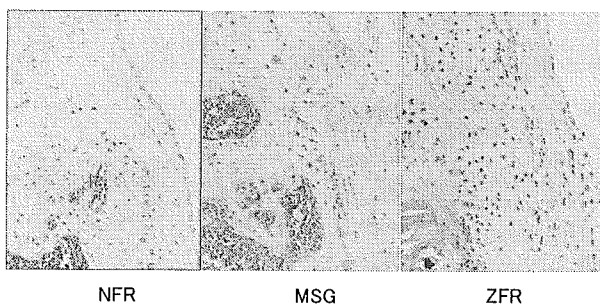


陽性細胞数は ZFR が NFR、MSG と比べ有意に多か  
った。

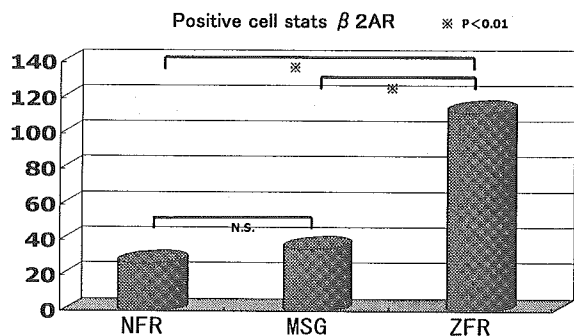


### 《β 2 AR》

Ob-R 抗体免疫組織化学染色同様に ZFR にて椎間板後縁から後縦靭帯付着部を中心に陽性細胞の発現を著明に認めた。MSG は軽度陽性細胞の発現を認めた。

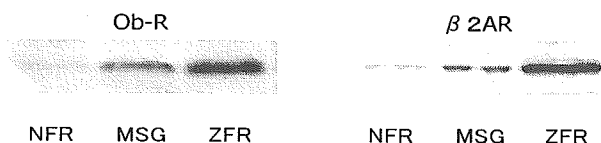


陽性細胞数は ZFR が NFR、MSG と比べ有意に多かった。



### ⑤ Western blot hybridization

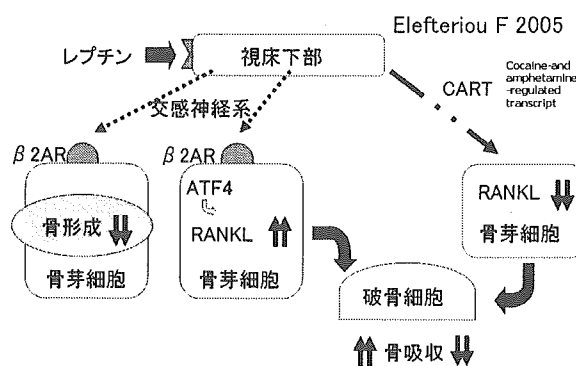
Ob-R、β 2 AR とともに 3 群とも蛋白発現を認めたが、ZFR の蛋白発現量が著明に多かった。



### D 考察

レプチンは視床下部弓状核のレプチン受容体に作用して摂食抑制の調節を行うとともに、視床下部腹側核に作用して交感神経系の活動を亢進させ骨形成を調節していることが報告されている<sup>2)</sup>。今回実験動物に使用した ZFR はレプチン受容体機能異常により摂食抑制の調節が機能せずに肥満を呈していると考えられる。しかし、ZFR における交感神経系の低下が靭帯骨化に対して影響しているか明らかではない。ZFR は 14 ヶ月齢にて 23.8% に OPLL 発生を認め<sup>5)</sup>、12 ヶ月齢の ZFR は靭帯骨化前駆状態を検討するのに適していたので今回の実験は 12 ヶ月齢の ZFR を使用して実験を行った。12 ヶ月齢の ZFR では椎間板辺縁や後縦靭帯付着部を中心に肥大軟骨細胞様細胞や骨芽細胞様細胞の発現を認め、その増殖した細胞を中心に β 2 アドレナリン受容体の発現を他の 2 群と比べ有意に認めている。近年、β 2 アドレナリン受容体は骨芽細胞上に存在し骨形成を直接的に抑制させるとともに、ATF4 のリン酸化を介して Receptor activator of NF-κB ligand (以下 RANKL) を発現させることにより破骨細胞に対して促進的に働くことが報告されている<sup>6)</sup>。

### レプチンの骨形成調節作用



ZFR では視床下部腹側核のレプチン受容体に機能異常により交感神経系の活動は低下し、β 2 アドレナリンも低下していると考えられるが、脊柱靭帯骨化前駆状態と考えられる増殖細胞には β 2 AR の発現が著明であった。この β 2 AR 以下のシグナル経路が十分に活動すれば骨形成は抑制され、破骨細胞による骨吸収も促進されると考えら

れるが、実際 ZFR では逆に靭帯は骨化傾向を示している。今回の実験で明らかになった  $\beta 2$  AR の過剰発現は交感神経の活動低下による反応性の増加とも考えられる。ZFR 脊柱靭帯における  $\beta 2$  AR の発現が明らかになったことから、 $\beta 2$  アドレナリン刺激薬の投与によって ZFR の脊柱靭帯骨化に抑制的に働くことが期待される。

現在、脊柱靭帯骨化の発生機序明らかでなく、遺伝的背景をもとに様々な環境因子や機械的因子が作用して発生すると考えられているが、 $\beta 2$  アドレナリンを中心とした交感神経系の活動低下もその発生要因の一つであることが予想される。今後、 $\beta 2$  アドレナリン刺激薬が OPLL の治療薬や予防薬へと応用できると考えられた。

#### E 結論

ZFR における交感神経系を介した骨形成の調節が靭帯骨化に与える影響を検討した。ZFR 脊柱靭帯において  $\beta 2$  アドレナリン受容体の発現を有意に認め、 $\beta 2$  アドレナリンの靭帯骨化への関与が示唆された。

#### 《参考文献》

- 1) Ducey P et al. :Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. Cell. 100(2): 197-207, 2000
- 2) Takada S et al. : Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. Cell 111(3): 305-17, 2004
- 3) Yamamoto K et al. : Effects of ethane-1-hydroxy-1,1-diphosphonate on ossification of the posterior longitudinal ligament in Zucker fatty rats. J Orthop Surg 12(1) 45-54,2004
- 4) Towa S et al. Characteristics of autonomic nervous function in Zucker-fatty rats: investigation by power spectral analysis of heart rate variability. Exp Anim. 53(2): 137-44, 2004
- 5) 三浦幸雄ら : Zucker fatty rat における脊柱靭帯骨化. 整形外科 44:1107-1113,1993
- 6) Elefteriou F et al.: Leptin regulation of bone

resorption by the sympathetic nervous system and CART. Nature 434(7032):514-20, 2004

#### G 研究発表

1 論文発表 なし

2 学会発表

① 第 20 回日本整形外科学会基礎学術集会  
(平成 17 年 10 月 20 日-21 日)

「Zucker Fatty Rat 脊柱靭帯における交感神経系を介したレプチン骨形成調節作用の検討」

② 第 45 回関東整形災害外科学会  
(平成 17 年 3 月 26 日)

「Zucker fatty rat 脊柱靭帯におけるレプチンを介した骨芽細胞増殖の検討」

#### H 知的財産権の出願・登録状況

なし

## ヒト後縦靭帯骨化における骨化伸展様式の病理学的特徴

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態別にみた骨化形成過程の特徴を解明するために、手術時に採取した頸椎後縦靭帯骨化巣を骨化形態別に分け、組織学的に比較検討を行った。Continuous Type など明らかな骨化先端を有する場合は長軸方向へ厚い石灰化層をもち、骨化が長軸方向へ盛んに行われ、Localized Type などの明らかな骨化先端を有さない場合でも、深層から浅層へ向かい薄い石灰化層をもち、わずかではあるも骨化進展を生じていると考えられ、両者間の骨化伸展様式に差異をみとめた。しかしこれらどのタイプの OPLL においても骨化前線部においては同様の cytokine の発現、局在を認め内軟骨性骨化により骨化伸展が生じている事が示唆された。

### 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。病理組織学的には骨化巣形成過程に内軟骨性骨化が主体となり、骨化過程の細胞成長因子として BMP-2, TGF- $\beta$ , といったサイトカインの役割が推測されている。しかし骨化形態別にみた骨化形成過程におけるサイトカインの発現、詳細な局在などの違いについては不明な点が存在している。今回我々は手術時に採取した頸椎後縦靭帯骨化巣について、骨化形態別にみた骨化進展様式、成長因子の免疫組織学的局在について比較検討を行った。

### B, 研究方法

頸椎後縦靭帯骨化症に対する前方手術の際

に *en bloc* に採取した骨化巣及び骨化移行部を含む後縦靭帯 25 例を対象とした。男性 19 例、女性 6 例で手術時年齢 33-78 歳 (平均 65.3 歳) であり、疾患分類は連続型 6 例、分節型 6 例、混合型 8 例、限局型 5 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。採取した組織切片に対して H-E 染色、内軟骨性骨化の評価として Type I, Type II, Type X, Type XI collagen の発現、血管進入の評価として VEGF、骨形成因子として TGF- $\beta$ 、BMP2、を用いた免疫組織学的検討を行った。

### C, 結果

比較対象とした後縦靭帯組織では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。

Localized type OPLL における骨化前線部の H.E.像では(図 1)、長軸方向へ伸びる骨化前線はほとんど観察できず、骨化層から硬膜側へ向かって伸びる幅の薄い骨化前線がみとめられた。これに対し Continuous type OPLL の骨化前線では(図 2)、線維の走行に沿って長軸方向へと伸びる幅の広い線維軟骨層、石灰化前線、石灰化軟骨層がみとめられた。両者の骨化前線部の免疫組織染色では、VEGF の発現は石灰化前線の肥大軟骨細胞において陽性であった。BMP-2、TGF- $\beta$  は骨化移行部の軟骨細胞の細胞質に陽性であり、特に石灰化前線部における肥大軟骨細胞で著明な発現を認めた。さらに BMP-2 は骨化前線とは離れた部位での線維芽細胞においても陽性であった。骨化を認めない後縦靭帯では靭帯内に BMP-2、TGF- $\beta$  の陽性細胞は認めなかった。Type I collagen は骨化層に、Type II collagen は骨化移行部の軟骨細胞層においてそれぞれ発現しており、Type X collagen は主に線維軟骨層の内層、石灰化軟骨層に存在する肥大軟骨細胞に陽性であり、Type XI collagen は主に線維軟骨層の外層に存在する軟骨細胞に陽性であった。

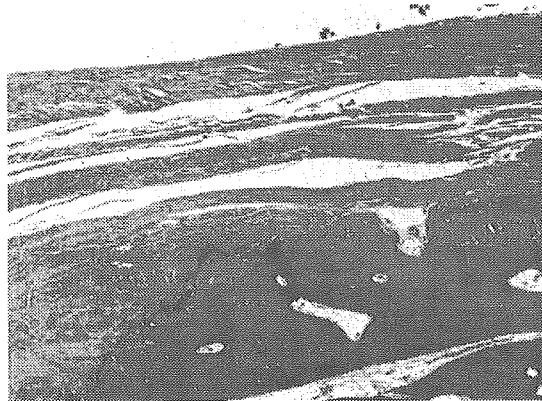


図 1 Localized type OPLL 骨化前線部  
(H. E. ×10)

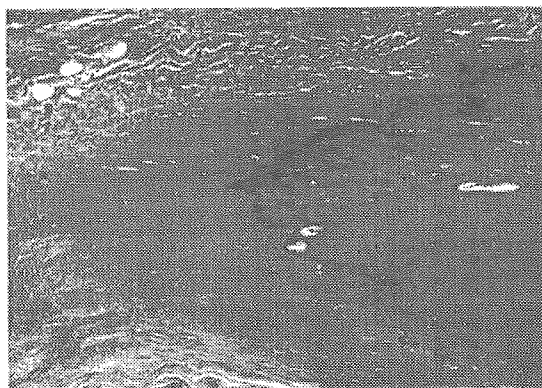


図 2 Continuous type OPLL 骨化前線部  
(H. E. ×10)

#### D, 考察

後縦靭帯骨化の骨化形成過程は内軟骨性骨化であることが指摘されている。内軟骨性骨化過程では軟骨細胞の肥大・増殖と分化及び血管進入が特徴的であり、今回の検討から石灰化前線部の肥大軟骨細胞で BMP-2、TGF- $\beta$  といったサイトカインの発現が強く、この部位での肥大軟骨細胞の活性化が内軟骨性骨化を進行させていく上で重要な役割を果たしていると推測した。骨化形態による比較では、サイトカインの局在や、アポトーシスの発現の有無に大きな差異は認めず、細胞外基質の変化も正常靭帯から骨化巣に向かって Type II、Type XI、Type X、Type I collagen に変化しており、この基質の変化も両者に共通した所見であった。しかし、Localized type では長軸方向へ伸びる骨化前線部の構造はほとんど認められず骨化巣より硬膜側へ向かい広がっているのに対し、Continuous type は長軸方向に向かって骨化前線は伸長しており、同部位は非常に活性が高くなっていることが推測され、このことから骨化伸展様式に違いが生じていること

が示された。

#### E, 結論

Continuous Type など明らかな骨化先端を有する場合は長軸方向へ厚い石灰化層をもち、骨化が長軸方向へ盛んに行われ、Localized Type などの明らかな骨化先端を有さない場合でも、深層から浅層へ向かい薄い石灰化層をもち、わずかではあるも骨化進展を生じていると考えられ、両者間の骨化伸展様式に差異をみとめた。しかしこれらどのタイプの OPLL においても骨化前線部においては同様の cytokine の発現、局在を認め内軟骨性骨化により骨化伸展が生じている事が示唆された。今後はこれらのサイトカインの発現に対し定量的検索を行い、骨化伸展形態別に比較検討行う予定である。

#### 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- $\beta$ . 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 Immunohistochemical Observations. Acta Histochem. Cytochem. 37: 109-117, 2004

#### H, 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし

#### 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: 頸椎後縦靱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- $\beta$  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

脊椎靱帯細胞の細胞死に関する研究  
—後縦靱帯骨化症例における頸椎黄色靱帯の検討—

分担研究者 中間季雄, 星野雄一, 吉川一郎, 渡邊英明, 山室健一,  
大山素彦, 大上仁志 (自治医科大学整形外科)  
菅又昌雄, 井原智美 (栃木臨床病理研究所)

## 研究要旨

後縦靱帯骨化症例 5 例を対象に頸椎黄色靱帯を採取し, 特に靱帯細胞における細胞死の形態に注目して電顕的に観察した. 靱帯細胞は, 細胞死に陥ると細胞内小器官が核の周囲にばらまかれ, 貪食, 吸収されることなくその場に留まっている像が多数観察された. 貪食系の細胞はまず観察されることはなく, このような処理されない細胞死の機構は靱帯の変性, さらに石灰化の起点として強く関わっている可能性がある.

### A. 研究目的

従来の靱帯骨化メカニズム解明のための膨大な基礎研究は, そのほとんどが遺伝子解析や増殖因子の発現, 骨化促進因子の発現, 生化学的解析などに重きをおかれていた. しかし, 靱帯組織を産生, 維持している靱帯細胞 (特に線維芽細胞) の代謝, 生存, 動態についての検討は極めて重要であるにもかかわらず, 最も基本となる靱帯細胞の形態学的な研究でさえ皆無といってよいほど見当たらない.

すでに我々は, 特に黄色靱帯 (ligamentum flavum, 以下 LF) においてその微細構造を観察し, 脊椎靱帯細胞も他の器官と同様にアポトーシスにより維持, コントロールされていること, 頸椎においては上位と下位, すなわち頸椎高位別にアポトーシスの頻度が異なることを見出し, これらの事実は脊椎靱帯の微細構造や病態を解析していくうえで貴重な基礎データとなりうることを報告した<sup>1)</sup>.

また後縦靱帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament, 以下 OPLL) においては, 頸椎症性脊髄症と比較して LF の弾性線維が断裂, 二層構造をとることなどを観察し, 靱帯骨化症例においてはすでに靱帯の構築学的変化が存在している可能性が高いことを指摘してきた<sup>2)</sup>.

今年度は OPLL の症例より採取した黄色靱帯について, 特に靱帯細胞の形態学的な変化に注目し検討した.

### B. 研究方法

頸椎後縦靱帯骨化症患者 5 例から頸椎黄色靱帯を採取した. 頸椎椎弓形成術時に C3/4 から C7/T1 までの各椎弓間において靱帯中央部より黄色靱帯の小片を採取, ただちに 1% glutaraldehyde 4% formalin 0.1M cacodylate buffer に浸し 4°C で 6 時間以上固定した. 電顕的観察のために 1% オスミウム酸で後固定の後アルコールで脱水, Epon812 に包埋, 超薄切片を作成した.

### C. 研究結果

細胞死に陥ったいくつかの段階の細胞を観察した。まず図1は、細胞死寸前の細胞と思われる。核クロマチンが偏在し、核の周囲には一部 crescent sign が認められる。

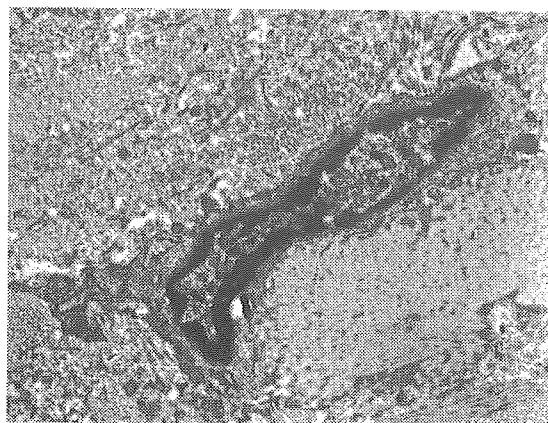


図1

図2では、細胞膜が消失し、細胞内小器官が周囲に散在している像(図2矢印)が観察された。一部の小器官は腫大している。さらに細胞死が進行した段階と考えられる。

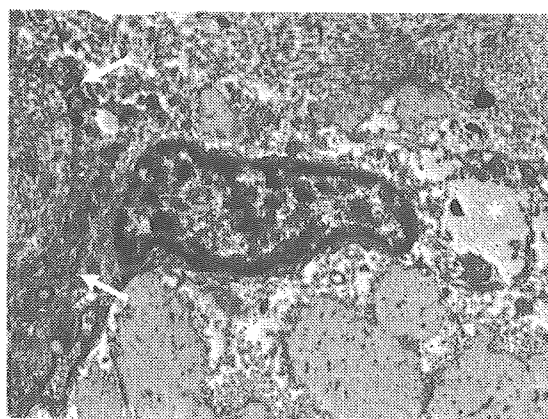


図2

細胞死に陥った細胞の周囲では、コラーゲン細線維などの弾性線維間の器質は消失し、間隙が形成されている(図2\*)。周囲の弾性線維にも断片化が起きている。

さらに細胞の破壊が進行すると核も消滅し、細胞内小器官だけが細胞間器質に散在している(図3矢印)。

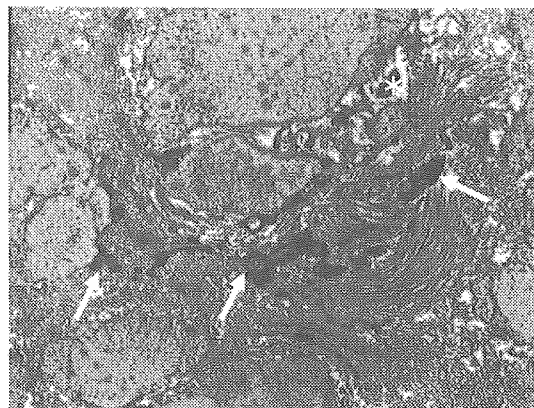


図3

図2と同様に細胞死に陥った細胞の周囲では、コラーゲン細線維間に間隙が形成されている(図3\*)。これらの小器官はいわゆる matrix vesicle に類似している。これらの細胞周囲にはマクロファージなど貪食細胞は見当たらない。

### D. 考察

生体の細胞は、外因性による壊死、あるいはプログラムされたアポトーシスに陥ると、ほとんどが何らかの吸収機序が働き清掃される。今回の観察では、細胞はまず核に変化が起これると、次いで細胞内小器官が腫大化し、ついに細胞膜が消失していく。細胞膜が消失すると細胞内小器官はほとんどがその周辺に散らばり、その場に留まっている様子が観察された。どの視野においてもマクロファージなどの貪食細胞らしき細胞は観察されず、また、毛細血管も極めて乏しい環境であることと考え合わせると、脊椎靭帯は、死におちいった細胞が貪食、



吸収されにくい環境にあるといえる。

組織が石灰化を起こす機序のひとつとして基質小胞 (matrix vesicle, MV) を介した機序がある。MV は特に骨の形成、再生において重要な働きをしているが、さらに血管壁の石灰化や脊椎靭帯の石灰化においても観察されている。MV の形成に関してはいまだ意見の一致はみられていないが、MV 様構造物が細胞の変性、死に由来することも指摘されている。今回の観察では、細胞内小器官はほとんどが周辺に散在したまま残存しており、そこに全身的な要素、たとえば副甲状腺機能など、カルシウム代謝に変化を与えるような状況が加われば MV は容易に石灰化の起点となる可能性が高い。

靭帯組織の維持には靭帯細胞 (線維芽細胞) が深く関わっており、靭帯細胞が死に陥るとその周辺の微小環境も変化する。今回の観察では、死に至った細胞の周囲は、それに呼応するようにコラーゲン細線維が消失し間隙が生じていた。この間隙の構造、成分などについてはいまだ不明であるが、石灰化やさらには骨化巣伸展の重要な鍵である可能性は高い。しかし、これらの所見が靭帯組織に共通なものなのか他の靭帯組織を含めて今後もさらに検討されなければならない。

以上の様に脊椎靭帯においては、靭帯細胞の細胞死はその周囲に構築学的な変化をもたらす。このことは石灰化、あるいは骨化の直接原因ではないが、靭帯骨化のメカニズム解明のためには、脊椎靭帯の細胞処理機構についてさらに詳細な検討が必要で

ある。すなわち、靭帯細胞の軟骨様細胞や骨芽細胞への分化、骨化巣伸展のための血管形成など骨形成という面と、今回述べてきた脊椎靭帯細胞処理機構の問題、すなわち骨化を起こしやすい場としての靭帯組織の特性、これら両面からの検討が今後も重要である。

#### E. 結論

脊椎靭帯細胞は、細胞死を起こすと食食系の細胞では処理されない可能性が高い。細胞の life span や処理機構について今後もさらに検討されるべきである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Suelo Nakama, Motoshi Kikuchi, Takashi Yashiro, Atsushi Sakamoto, Ichiro Kikkawa, Kazuo Saita, Hitoshi Ookami, Yuichi Hoshino: Regional difference in the appearance of apoptotic cell death in the ligamentum flavum of the human cervical spine. *Medical Molecular Morphology* 38(3): 173-180, 2005
- 2) 中間季雄, 星野雄一, 二瓶あき, 菅又昌雄, 井原智美: 後縦靭帯骨化症における黄色靭帯の電顕検討. 厚生労働省特定疾患対策事業 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班 平成 13 年度研究報告書: 113-116, 2002
- 3) 木村 敦, 税田和夫, 中間季雄, 星野雄一: 頰椎後縦靭帯骨化症に対する棘突起縦割法椎弓形成術 (黒川式) の中長期成績. *別冊整形外科* 45: 122-126, 2004

## 多孔性人工材料による靭帯内骨化に関する研究

藤林俊介、宗和隆、竹本充、根尾昌志、中村孝志  
京都大学大学院医学研究科整形外科

**研究要旨** 脊柱靭帯骨化症の研究をするための動物実験モデルを提案した。靭帯と組織的、構造的に類似した結合組織である腱内に骨化を起こすウサギ実験モデルを作成した。多孔性チタンを用いた実験でその内部に異所性骨化を誘導することができた。本実験モデルを用いた骨化メカニズムの研究は脊柱靭帯骨化の病因解明に関する知見が得られる可能性がある。

### A. 研究目的

脊椎靭帯骨化症の病態および原因を解明するための動物実験モデルは、Zucker fatty ratを用いた研究などがあるが、その病態の再現は難しく、実験系が極めて限られるのが現状である。基礎的な知見を得るためには有効な動物実験系の開発が必須であると考えられる。

靭帯と腱は機能、構造において類似した組織である。靭帯が比較的小さい組織で、小動物を用いた実験では方法が限定されるのに対し、腱は膝蓋腱やアキレス腱など比較的大きく使える部位もあり、小動物を用いた実験では有利である。

われわれのこれまでの生体材料の研究において、多孔性人工骨が筋肉あるいは腱内部に異所性骨化を起こすことを見いだした。この現象は靭帯内での骨化を模倣することができると考えられ、靭帯骨化症に関する知見もそこから得られると考えられる。

当研究の目的は、脊柱靭帯骨化症に類似した腱内異所性骨化モデルを作成し、さらに骨化のメカニズムや抑制方法などを検討していくことにある。

### B. 研究方法

犬筋肉内で異所性骨形成能があることがすでに証明されている生体活性多孔性チタンを用い、ウサギ膝蓋腱内で異所性骨形成を起こすことができるかを検証した。

### C. 研究結果

埋入期間1～3ヶ月の観察で、腱内に埋入した多孔性チタン内部に骨形成を認めた。

### D. 考察

われわれのこれまでの多孔性人工骨の骨誘導に関する研究の結果、筋肉内での骨誘導は犬以上の大型動物でしか発現せず、ウサギ筋肉内では骨形成能は認められなかった。しかし、今回のウサギを用いた実験結果から、腱内は筋肉内に比べて骨形成しやすい環境であることが判明し、本実験モデルを靭帯骨化の研究に用いることができる可能性が示唆された。しかし、多孔性チタンは組織切片作成手段が限られるため、今後は多孔性ハイドロキシアパタイトなどの骨誘導材料を用いた腱内の骨化現象を観察し、適切な骨化モデルを提案していきたい。

### E. 結論

脊柱靭帯骨化症モデルとして腱を用いた実験系を今後も提案していく。

### G. 研究発表

特になし

### H. 知的財産の出願、登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

特になし

脊柱靱帯骨化症患者由来靱帯細胞においてプロスタサイクリンによって誘発される  
細胞内カルシウムオシレーションの病態生理学的意義

分担研究者 古川 賢一 (弘前大学・薬理学・助教授)  
研究協力者 橋本 美貴、沢田 利匡、元村 成 (弘前大学・薬理学)  
大石 裕誉、岩澤 智宏、岡田 昌博、藤 哲 (弘前大学・整形外科学)  
植山 和正 (弘前記念病院)、原田 征行 (青森県立中央病院)、  
井ノ上 逸朗 (東京大学医科学研究所)

我々はこれまで脊柱靱帯骨化の促進因子として、臨床的にも重要性が示唆されていた靱帯にかかるメカニカルストレスに注目し、本疾患の進展には遺伝的背景と共にそこにメカニカルストレスが加わることが重要であるという仮説を立て、その検証を行ってきた。そして OPLL 患者組織由来の脊柱靱帯細胞 (OPLL 細胞) に伸展刺激を加えると、正常靱帯細胞 (非 OPLL 細胞) では見られない様々な骨化関連遺伝子の発現促進が起こることを報告した。今回、それらの遺伝子の1つであるプロスタサイクリン合成酵素に注目し、その病態生理学的意義を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、1) 本酵素によって合成されるプロスタサイクリンの遊離量が、非 OPLL 細胞に比して、OPLL 細胞では伸展刺激負荷で著しく増大すること、2) プロスタサイクリン添加によって細胞内カルシウムイオン濃度のオシレーションが OPLL 細胞でのみ起こること、3) このオシレーションを阻害すると骨化マーカー遺伝子の発現が強く抑制されることが明らかになった。この知見はプロスタサイクリンとその受容体が、脊柱靱帯骨化症の進展に関与することを強く示唆し、本疾患の薬物治療を確立する上で重要な手がかりとなると考えられる。

## A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症は、その背景となる遺伝的要因とそこに加わる様々な要因によって進展する多因子疾患である。その要因の一つとしてメカニカルストレスの重要性が臨床面から示唆されていた (1)。我々はこのメカニカルストレスの作用機序を明らかにするため、骨化患者の靱帯組織から単離培養した靱帯細胞にメカニカルストレスとしての繰り返し伸展刺激を加え、骨化関連遺伝子の発現変化を解析して、メカニカルストレスの作用機序ならびに靱帯骨化における役割の解明を目指してきた (2)。そしてメカニカルストレスがプロスタグランジ I<sub>2</sub> (プロスタサイクリン) の産生を著しく増大させ、そのプロスタサイクリンがオートクライン/パラクラインとして靱帯細胞に作用して、骨化遺伝子の発現を更に促進することを報告した (3)。今回、プロスタサイクリンによる骨化遺伝子発現亢進のメカニズムを解析し、本疾患における役割を明らかにすることで、それらをターゲットとした薬物治療法の開発に寄与することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 細胞

弘前大学医学部倫理委員会の規定に基づき、患者への十分なインフォームド・コンセントを行った。術中に摘出した OPLL 患者、非 OPLL 患者の脊柱靱帯組織より、outgrowth 法にて靱帯細胞を単離し、10%FBS 添加 DMEM 培地中で 37°C、

5%CO<sub>2</sub> 気相下で培養した。

### 2. メカニカルストレス負荷

細胞を伸縮性のシリコンチャンバーに継代し、サブコンフルエントまで培養した。その時点で FBS を 1% に下げ、更に 2-4 時間培養後、伸展刺激負荷装置にチャンバーを装着し、9 時間 (0.5Hz、20%伸長) 繰り返し伸展刺激を負荷し、メディアウム中に遊離したプロスタサイクリンを ELISA で定量した。

### 3. 細胞内カルシウムイオン濃度測定

カルシウムイオン蛍光指示試薬の fura2 を細胞に取り込ませ、2 波長励起 - 1 波長蛍光測定により細胞内のカルシウムイオン濃度変化を経時的に測定した。

### 4. アルカリフォスファターゼ活性測定

細胞を PBS で洗浄後、アルカリ性バッファーにて可溶化した。その可溶化液に p-nitrophenol phosphate を添加し、アルカリフォスファターゼによって分解されることによって生じる、p-nitrophenol を呈色反応により定量し、アルカリフォスファターゼ活性を求めた (2)。蛋白濃度はウシ血清アルブミンを標準物質としたブラッドフォード法により求め、単位時間、一定蛋白濃度あたりのアルカリフォスファターゼを求めた。

### 5. 試薬

プロスタサイクリンは加水分解され易く、不安定なため、その安定化アナログであるベラプロストをプロスタサイクリンの添加実験に使用した。

## C. 研究結果

### 1. 繰り返し伸展刺激によるプロスタサイクリンの遊離促進

9時間の静置培養中にメディウムに遊離するプロスタサイクリン量（自発性遊離）に比べて、伸展刺激誘発性の量は約3倍に増加した（図1）。

### 2. 細胞内カルシウムイオンのオシレーション

カルシウムイオン蛍光指示試薬を負荷した靱帯細胞にプロスタサイクリンの安定化アナログ、ベラプロストを添加したところ、OPLL細胞では細胞内のカルシウムイオン濃度のオシレーションが観察された（図2A）。また惹起されるオシレーションのピーク値はベラプロスト濃度依存性（1-100  $\mu$ M）であった。一方、非OPLL細胞では高濃度のベラプロストで一過性の弱い濃度上昇は認められるものの、オシレーションは起こらなかった（図2B）。

### 3. フォルスコリン、膜透過性 cAMP アナログの作用

プロスタサイクリンの受容体はアデニル酸シクラーゼと共役して、細胞内セカンドメッセンジャーの cAMP の濃度を上昇させる。オシレーションのメカニズムを解明するため、アデニル酸シクラーゼ活性化薬フォルスコリン（1 mM）を添加したところ、OPLL細胞ではベラプロスト添加時と同様な細胞内カルシウムイオン濃度のオシレーションが観察された（図3A-a）。また膜透過性 cAMP アナログであるジブチル cAMP（1 mM）を添加しても同様なオシレーションが起こった（図3A-b）。一方、非OPLL細胞ではベラプロスト添加時と同様、一過性のカルシウムイオン濃度上昇にとどまった。（図3B-a,b）

一方、cAMP 依存性リン酸化酵素阻害薬 H89 はオシレーションを強く抑制した（図4A）。

### 4. アルカリフォスファターゼ活性

ベラプロストは骨化関連マーカーとしてのアルカリフォスファターゼ活性を著しく増大させた（図4B）。更にベラプロストによって惹起されたオシレーションを強く抑制した H89 はアルカリフォスファターゼ活性も同時に強く抑制した（図4B）。

## D. 考察

患者の靱帯組織由来の細胞がメカニカルストレスに反応してプロスタサイクリンの産生ならびにアルカリフォスファターゼ活性を著しく増加させること、プロスタサイクリンに反応して細胞内カルシウムイオンのオシレーションを起こすことは OPLL 細胞の特徴であり、正常細胞では見られないか、あっても著しく弱かった。このことは OPLL の病因のひとつとして遺伝的な背景が

あり、そこにメカニカルストレスが加わることが本疾患を進展させるという我々の作業仮説を支持する（2）。

細胞内カルシウム濃度上昇が骨化関連遺伝子の発現を亢進させることは骨芽細胞で報告されている（4）。しかし、平滑筋細胞や分泌細胞においてはカルシウムシグナリングにオシレーションが認められるが、骨関連細胞では初めての報告である。プロスタサイクリンの受容体の細胞内情報伝達系として、cAMP $\rightarrow$ Aキナーゼが様々な細胞系で確認されている。OPLL細胞ではプロスタサイクリンによるカルシウムオシレーション並びにアルカリフォスファターゼ活性が、Aキナーゼによって強く阻害されることから、この系が機能していると考えられる。しかし、プロスタサイクリンの受容体そのものの発現は非OPLL細胞と有意な差はない（3）。従って両細胞系間でみられるプロスタサイクリンに対する感受性の違いは、受容体と細胞内情報伝達系のカップリングにある可能性があり、現在検討を進めている。

細胞内カルシウム濃度上昇によって活性化を受ける転写調節因子のひとつとして c-fos が挙げられる（5）。歯根靱帯細胞ではメカニカルストレス負荷で c-fos mRNA レベルが上昇する（6）。OPLL細胞でも c-fos プロモーター活性はメカニカルストレス並びにプロスタサイクリンで有意に上昇した（未発表データ）。従ってメカニカルストレス負荷で骨化関連遺伝子の発現が OPLL で亢進する過程にプロスタサイクリン $\rightarrow$ カルシウム濃度上昇 $\rightarrow$ c-fos の系が関与することが示唆される。

## E. 結論

OPLL 患者の靱帯細胞では、メカニカルストレスに反応してプロスタサイクリンの産生遊離が起こる。それがオートクライン/パラクライン的に靱帯細胞に作用して、細胞内カルシウムイオン濃度のオシレーションを惹起し、それが骨化関連遺伝子の発現増加を介して骨化の進展に寄与する可能性が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

a) Furukawa KI, Shinoda H: Current topics in pharmacological research on bone metabolism. Journal of Pharmacological Science 2006(印刷中)

b) Furukawa KI: Molecular basis of ectopic bone formation induced by mechanical stress. Journal of Pharmacological Science 2006 (印刷中)

### 2. 学会発表