

多施設研究

頸椎後縦靱帯骨化症における神経症状発現予測因子に関する大規模横断的研究 中間報告

松永俊二 今給黎総合病院整形外科副院長

井尻幸成 鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学講師

分担研究者 小宮節郎 鹿児島大学大学院運動機能修復学講座整形外科学教授

研究要旨 頸椎後縦靱帯骨化を有する患者における脊髄症状発現を予測することは現時点では困難である。本研究では頸椎後縦靱帯骨化を有する患者における脊髄症状発現に関係する因子を検討する目的で多施設による大規模横断的研究を企画した。本研究班の全班員に調査用紙を郵送し回収してデータを解析した。今回はこの研究を実施するために各研究施設に配布する調査用紙を作成し調査方法について検討した。全国 13 医療施設から 156 例の症例の調査用紙を回収したが、画像情報が得られた症例は 100 例であった。2 次調査でさらなる画像情報の収集を実施し脊髄症状発現因子の検討を行う。

A. 研究目的

頸椎後縦靱帯骨化を有する患者では大きな骨化であっても脊髄症状を発現しない患者がいることは良く知られている。しかし、比較的小さな骨化でも脊髄症状が発現する場合もある。これまで脊髄症状発現について一般的には 50%以上の脊柱管狭窄例では脊髄症状が発現するとされてきたが、これは古典的レ線撮影を用いた解析であり、CTあるいはMRIによる3次元解析は十分にはなされておらず診療ガイドラインにおけるエビデンスは低い。さらに本症において重篤な麻痺を起こす外傷による骨傷のない頸髄損傷発生の疫学についても詳細にはなされていない。脊髄症状発現の予測因子を確立できれば本症の手術適応のガイドライン作成に重要な情報を与える。本研究では頸椎後縦靱帯骨化を有する患者における脊髄症状発現に関係する因子を検討する目的で多施設による大規模横断的研究を企画した。

B. 研究方法

多施設研究を行うための各研究所に配布する調査用紙を作成して記入方法や回収方法、そして統計学的な解析方法を検討した。以下のエントリー基準で対象を収集した。

研究対象のエントリー基準

1. 頸椎に後縦靱帯骨化を認める
2. 最低5年以上追跡できた患者
3. 初診時の頸椎レントゲン写真がある
4. 患者情報の研究使用に同意された患者

全国 13 医療施設から計 156 例の症例の調査用紙を回収することができた。X PおよびC Tなどの画像情報が得られた症例は 100 例であった。

(倫理面での配慮)

研究対象者に対する人権擁護と研究対象者に対する不利益や危険性の排除や説明と理解(インフォームドコンセント)のための書類を作成し、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究に関する倫理委員会において審査を受け研究の実施の許可を得た。

C. 研究結果

1. 収集された患者の背景

手術治療を受けた患者は 82 例でありそのうち 77 例は脊髄症状を呈していた。保存治療で加療された患者は 74 例であり脊髄症状を認めない患者が 50 例、脊髄症状がある患者が 14 例、不明が 10 名であった。全経過を通じて脊髄症状が出現しなかった患者 55 名（男性 35 名、女性 20 名）は調査時平均年齢が 68.9 歳であり経過観察期間は平均 9.8 年であった。骨化型は混合型 8 例、連続型 29 例、分節型 18 例であった。経過観察中に新たに脊髄症状を発症した症例は 6 例（男性 5 例、女性 1 例）であり、骨化型は混合型 2 例、連続型 1 例、分節型 2 例であった。初診時既に脊髄症状を認めた症例は 85 例であり調査時年齢は平均 64.2 歳であった。骨化型は混合型 29 例、連続型 21 例、分節型 35 例であり脊髄症状を出現しない群に比べ混合型と分節型の比率が高かった。

D. 考察

後縦靭帯骨化症は後縦靭帯の骨化に起因した脊髄あるいは神経根症状が認められた場合を意味しており、画像上確かな骨化が認められても無症状の場合は後縦靭帯骨化と呼ぶべきである。このような概念の背景には後縦靭帯骨化が認められても脊髄症状が実際に認められるのは外来受診時には 30%から 51%であり、また長期的に患者を追跡しても初診時に脊髄症状がない患者で新たに脊髄症状が出現するのは 17%であるといような報告がある。しかし、その一方でこの症例のように外傷を契機として骨傷のない頸髄損傷が起こり患者の予後に影響を与える症例があることも事実である。

今回の 1 次調査で本症における脊髄症状発症群と非発症群における患者背景としては骨化型以外には明らかな差が認められなかったことから今後 2 次調査で各症例の X P, C T 画像所見と対比して解析すれば今後脊髄症状発症の予測因

子が見出せる可能性がある。頸椎後縦靭帯骨化を認める患者において将来その患者が脊髄症状を発現するか否かを予測することができれば手術適応の決定など臨床における貴重な情報となる。未回収の画像所見と未回収の症例について再度調査しデータを解析してゆく。

E. 結論

頸椎後縦靭帯骨化を有する患者における脊髄症状発現に関係する因子を検討する目的で多施設による大規模横断的研究を実施し 1 次調査を終了した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 松永俊二 頸椎後縦靭帯骨化症 整形外科診療実践ガイド, 守屋秀繁, 糸満盛憲, 内田淳正, 荻野利彦, 黒坂昌弘, 戸山芳昭 編 文光堂 747-749, 2006
- 2) 松永俊二 頸椎黄色靭帯石灰化症 整形外科診療実践ガイド 守屋秀繁, 糸満盛憲, 内田淳正, 荻野利彦, 黒坂昌弘, 戸山芳昭 編 文光堂 749-750, 2006
- 3) 松永俊二 頸椎分離すべり症 整形外科診療実践ガイド 守屋秀繁, 糸満盛憲, 内田淳正, 荻野利彦, 黒坂昌弘, 戸山芳昭 編 文光堂 750-751, 2006
- 4) Matsunaga S, Sakou T. OPLL: Overview of Epidemiology and Genetics. OPLL (Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament) 2nd ed. Yonenobu K, Nakamura K, Toyama Y. (Eds.) Springer Japan 7-9, 2006
- 5) Matsunaga S, Sakou T. OPLL: Disease Entity, Incidence, Literature Search, and Prognosis OPLL (Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament) 2nd ed. Yonenobu K, Nakamura K, Toyama Y. (Eds.) Springer Japan 11-17, 2006
- 6) 松永俊二 胸郭出口症候群 今日の治療指針 2007年版 私はこう治療している 山口 徹, 北原光夫, 福井次矢 編 医学書院 746, 2007
- 7) Yone K, Hayashi K, Yamamoto T, Nagatomo Y, Shimada H, Matsunaga S, Komiya S

- Delayed segmental motor paralysis following laminoplasty: two case reports. Spinal Cord 44: 461-464, 2006
- 8) Imamura K, Matsunaga S, Nagata M, Nakamura K, Yokouchi M, Yamamoto T, Hayashi K, Komiya S. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the thoracic spine in association with poly cystic ovary syndrome. Neurology India 54:448-450, 2006
 - 9) 松永俊二, 林 協司, 小宮節郎 脊柱靱帯骨化症: そのシステムチックレビュー 頤椎後縦靱帯骨化症の成因・病態について 脊椎脊髄ジャーナル 19: 107-116, 2006
 - 10) 松永俊二, 小宮節郎, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 今村勝行, 武富栄二, 砂原伸彦, 米延策雄 関節リウマチ患者における頤椎手術の新しい成績評価基準に関する研究 九州リウマチ 25:136-139, 2006
 - 11) 今村勝行, 長友淑美, 松永俊二, 山元拓哉, 宮口文宏, 鶴 亜里沙, 中村和史, 横内雅博, 林 協司, 米 和徳, 小宮節郎 頤椎後縦靱帯骨化症患者における術後のしびれの経過について 整形外科と災害外科 55: 22-24, 2006
 - 12) 廣田仁志, 山元拓哉, 長友淑美, 宮口文宏, 林 協司, 松永俊二, 米 和徳, 小宮節郎 脊柱管内椎間関節嚢腫の治療経験 整形外科と災害外科 55: 25-27, 2006
 - 13) 石堂康弘, 武富栄二, 砂原伸彦, 永田政仁, 中村俊介, 松永俊二, 米 和徳, 小宮節郎 THAまたはTKAを施行されたリウマチ患者の腰椎病変 整形外科と災害外科 55:186-187, 2006
 - 14) 山元拓哉, 米 和徳, 松永俊二, 林 協司, 宮口文宏, 長友淑美, 今村勝行, 永田政仁, 小宮節郎 脊髄腹側のC2神経根 Schwannomaに対する側方進入摘出術の小経験 整形外科と災害外科 55:316-319, 2006
 - 15) 米 和徳, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 永田政仁, 中村俊介, 松永俊二, 小宮節郎 高齢者の圧迫性脊髄症の治療成績 整形外科と災害外科 55: 293-296, 2006
 - 16) 宮口文宏, 山元拓哉, 林 協司, 松永俊二, 米 和徳, 小宮節郎 頤・胸椎後縦靱帯骨化症の後方除圧術の適応について-X線上の胸椎後彎角と脊柱管内の骨化部分の占拠率から 整形外科と災害外科 55:500-502, 2006
 - 17) 松永俊二, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 米 和徳, 小宮節郎 脊椎脊髄疾患の治療戦略 頤椎後縦靱帯骨化症 脊椎脊髄ジャーナル 19: 471-476, 2006
 - 18) 田邊 史, 廣津匡隆, 古賀公明, 武富栄二, 築瀬光宏, 川内義久, 石堂康弘, 山元拓哉, 松永俊二, 米 和徳, 小宮節郎 椎間孔部神経根障害を呈した変性側弯の検討 西日本脊椎研究会誌 32:9-13, 2006
 - 19) 山元拓哉, 米 和徳, 松永俊二, 林 協司, 宮口文宏, 長友淑美, 小宮節郎, 武富栄二, 川内義久, 築瀬光宏, 鮫島浩司, 井尻幸成, 古賀公明, 石堂康弘, 田邊 史 下肢神経症状を有す腰椎変性側弯症の術後成績 西日本脊椎研究会誌 32:25-28, 2006
 - 20) 山元拓哉, 米 和徳, 松永俊二, 林 協司, 長友淑美, 小宮節郎, 古賀公明, 宮口文宏 胸腔鏡補助下の小切開開胸手術の経験 西日本脊椎研究会誌 32:136-139, 2006
- ## 2. 学会発表
- 1) 石堂康弘, 武富栄二, 砂原伸彦, 松永俊二, RA上位頤椎病変に対する後横骨スクリューを用いた後頭頤椎固定術の検討, 厚生労働省科学研究費補助金「免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業」リウマチ頤椎病変の治療に関するエビデンス形成のための体制確率と技術開発研究班 平成17年度第2回班会議 東京 2006/01/21
 - 2) 武富栄二, 石堂康弘, 砂原伸彦, 松永俊二 RA頤椎病変患者におけるMRI angiographyによる椎骨動脈の検討 厚生労働省科学研究費補助金「免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業」リウマチ頤椎病変の治療に関するエビデンス形成のための体制確率と技術開発研究班平成17年度第2回班会議 東京 2006/01/21
 - 3) 松永俊二, 林 協司, 山元拓哉, 長友淑美, 米 和徳, 小宮節郎 超高齢健康者の頤椎レントゲン所見からみた変性の位置づけ 第35回日本脊椎脊髄病学会 東京 2006/04/2
 - 4) 長友淑美, 廣田仁志, 山元拓哉, 松永俊二, 米 和徳, 小宮節郎 脊柱管内椎間関節嚢腫の治療経験 第35回日本脊椎脊髄病学会

- 東京 2006/04/21
- 5) 山元拓哉, 米 和徳, 松永俊二, 林 協司, 石堂康弘, 長友淑美, 廣田仁志, 小宮節郎, 武富栄二 Foraminal stenosis と椎間板楔状変形の関連についての検討 第35回日本脊椎脊髄病学会 東京 2006/04/21
 - 6) 小田剛紀, 米延策雄, 藤村祥一, 石井祐信, 中原進之介, 松永俊二, 清水敬親, 松本守雄, 武富栄二, 小坏知明 関節リウマチ頸椎病変による脊髄症状進行例 (Ranawat IIIb) に対する手術成績 第35回日本脊椎脊髄病学会 東京 2006/04/21
 - 7) 松永俊二, 砂原伸彦, 武富栄二, 山元拓哉, 小宮節郎, 米延策雄 関節リウマチの頸椎手術に対する新しい成績評価基準作成に関する研究 第50回日本リウマチ学会 長崎 2006/04/22
 - 8) 小田剛紀, 米延策雄, 藤村祥一, 石井祐信, 中原進之介, 松永俊二, 清水敬親, 松本守雄 関節リウマチ頸椎手術による脊髄症重症例 (Ranawat IIIb) に対する手術成績 第50回日本リウマチ学会 長崎2006/04/22
 - 9) 林 協司, 米 和徳, 松永俊二, 山元拓哉, 長友淑美, 小宮節郎 下垂足を呈した胸腰椎移行部圧迫障害における神経症候と特徴 第79回日本整形外科学会総会 横浜 2006/05/18
 - 10) 中村俊介, 砂原伸彦, 片平光昭, 松永俊二, 武富栄二, 小宮節郎 RA骨粗鬆症におけるステロイドの影響 第79回日本整形外科学会総会 横浜 2006/05/18
 - 11) 松永俊二, 小宮節郎 健康高齢者の頸椎レントゲン所見の特徴—一般高齢者との違いについて— 第6回日本抗加齢学会 東京 2006/05/20
 - 12) 松永俊二, 小宮節郎 健康高齢者の頸椎レントゲン所見からみた健康の鍵 第43回日本リハビリテーション医学会 東京 2006/06/03
 - 13) 松永俊二, 長友淑美, 宮口文宏, 川畑了大, 救仁郷 修, 山元拓哉, 井尻幸成, 米 和徳, 小宮節郎 超健康高齢者の心理的特徴について 第111回西日本整形災害外科学会 2006/06/17
 - 14) Matsunaga S, Ishidou Y, Nagatomo Y, Yamamoto T, Hayshi K, Higo M, Yone K, Komiya S. Hypoplastic posterior arch of atlas in children with Down syndrome—An important risk factor for occurrence of myelopathy due to atlantoaxial instability Spine Across the Sea 2006 2006/07/27
 - 15) Nagatomo Y, Matsunaga S, Yamamoto T, Hayshi K, Yone K, Komiya S The natural history of cervical spondylotic myelopathy and efficacy of surgical treatment for this disorder in elderly patients Spine Across the Sea 2006 2006/07/27
 - 16) Yamasaki K, Nagatomo Y, Matsunaga S, Yamamoto T, Hayshi K, Yone K, Komiya S. The preventive effect of SCF (Stem cell factor) on spinal cord cell apoptosis following acute traumatic injury in rat. Spine Across the Sea 2006 2006/07/27
 - 17) Setoguchi T, Yamasaki K, Nagatomo Y, Matsunaga S, Yamamoto T, Hayshi K, Yone K, Komiya S. The nuclear export of OLIG2 regulates astrocyte differentiation. Spine Across the Sea 2006 2006/07/27
 - 18) 松永俊二, 長友淑美, 山元拓哉, 川畑了大, 宮口文宏, 救仁郷 修, 井尻幸成, 米 和徳, 小宮節郎 頸椎後方手術における成績評価の進歩 福岡 第65回西日本脊椎研究会 2006/06/16
 - 19) Matsunaga S, Yamamoto T, Nagatomo Y, Yone K, Komiya S The roentgenographic characteristics of the cervical spine in healthy elders. 21th Annual Meeting of North America Spine Society Seattle, USA 2006/09/27
 - 20) 松永俊二, 小宮節郎 加齢と運動器: 細胞・分子レベルの新知見 加齢に伴う頸椎椎間板変性の基礎と臨床—老化促進マウスと健康高齢者の観察から— 第21回日本整形外科学会基礎学術集会 長崎2006/10/20
 - 21) Matsunaga S, Ishidou Y, Nagatomo Y, Yamamoto T, Miyaguchi F, Kawabata R, Ijiri K, Yone K, Komiya S. The potential "Double jeopardy" of the upper cervical spine in children with Down syndrome. 34th Annual Meeting of Cervical Research Society Palm Beach, Florida, USA 2006/12/01

- 22) 松永俊二, 古賀公明, 川畑直也, 湯浅伸也, 今給黎尚典, 長野芳幸, 井尻幸成, 米 和徳, 小宮節郎 頸椎後縦靱帯骨化を呈した二卵性双生児姉妹 第112回西日本整形災害外科学会 米子 2006/11/18
- 23) 松永俊二 頸椎後縦靱帯骨化症患者の長期追跡調査から得られた知見について 難治性疾患克服研究事業 脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班 平成18年度第1回班会議 東京 2006/06/03
- 24) 松永俊二 頸椎後縦靱帯骨化における神経症状発現予測に関する大規模横断的研究-中間報告- 難治性疾患克服研究事業 脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班 平成18年度第2回班会議 東京 2006/11/11

G. 知的財産の出願, 登録状況

本研究について特許取得や実用新案登録の予定はない。

患者立脚型健康関連 QOL 尺度を用いた脊柱靭帯骨化症患者の痛みの実態調査

東京大学整形外科

竹下克志、星地亜都司、川口浩、中村耕三

名古屋市立大学看護学大学院看護学研究科

藤原奈佳子

研究要旨 OPLLにおける痛みや痺れがもたらすADL/QOLの低下を班内多施設調査により患者立脚型健康関連 QOL 尺度で検討する。痛みの程度とともに骨化巣の特徴、治療経過ならびに心理的評価、社会的背景を調べ、頸髄症を対照として解析する。昨年の調査票作成と倫理委員会承認を経て、現在収集中で 239 の調査票が回収された。

A. 研究目的

OPLL が引き起こす病態の中で、最も深刻な障害を引き起こすものは神経麻痺であり、これまでの OPLL 研究の多くが神経麻痺の予防あるいは治療を最終的な目標として行われてきた。しかし痛みや痺れがもたらす ADL/QOL の低下は看過できるものではない。OPLL 患者が最上位に挙げる痛み・痺れの問題を探り、より高い QOL で生活することができる方策を見出すことが研究のテーマである。

B. 研究方法

研究期間は倫理委員会承認後、平成 19 年まで行う。対象は各施設に受診した外来患者で脊柱靭帯骨化症あるいは頸椎症性脊髄症を中心とし、一部健常者も対照とする。圧迫の病態・麻痺の程度・治療経歴・社会的背景・抑うつなどの心理的状況などが痛みにどう影響しているかを統計学的に解析する。具体的には患者背景として年齢・身長・年齢・性・家族関係・治療経過を、痛みとしびれの評価として身体部位ごとに Numerical Rating Scale、頸部の痛みとして Neck Disability Index、全体の痛み評価として Chronic Pain Grade を、脊柱靭帯骨化症では骨化巣の形態と圧迫率を、神経障害

の評価としては日整会頸髄症治療成績判定基準(旧 17 点法と平成 17 年度に開発されたもの)を、心理評価として miniPOMS を、全体的 QOL 評価として SF-8 を、さらに介護者や医師との関係と満足度を調査票(図)にまとめ、患者ならびに医師に記載を依頼する。患者には文書による同意を得たのち、帰宅後に記載してもらい郵送で回収する。

(倫理面での配慮)

依頼においては自由意志による参加であることと本人に不都合な点に関しては回答する必要がないことを文章による記載ならびに口頭での説明を行う。記載されたアンケートは解析者のみが連結可能な ID 化を行い、二重に施錠した特定の者しか入れない部屋に保管する。

データ解析の結果については集団全体のみであり、個人情報が発表されることはない。

平成 18 年 1 月に東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会による承認を得た。

C. 研究結果

現在、23 施設からの患者データが送付され、239 の調査票が回収された。

D. 考察

OPLL 班会議はガイドライン作成やゲノム解析などの活動を通じて患者との関係がより密になってきており、昨年は班会議に患者の会(全国脊柱靱帯骨化症患者家族連絡協議会)の代表の方も参加いただいた。その際、代表の杉山氏が要望事項として“痛みや痺れを緩和する研究の推進”を第一に挙げておられた。OPLL における痛み・しびれの実態がより把握できるように、来年度中に解析を行っていききたい。

E. 結論

ほぼ昨年の計画通りに進行しており、現在239 の調査票が回収された。来年度に解析予定である。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む.)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

強直性脊椎炎の原因遺伝子同定を通じての
脊椎後縦靭帯骨化症の原因遺伝子同定に関する研究

研究者 森 幹士、猿橋康雄、高橋 忍、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 (Ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine: OPLL)、強直性脊椎炎 (Ankylosing spondylitis: 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。これまでの研究で遺伝的要因が明らかである AS について、理化学研究所にて既に収集している SNP marker (約 5 万個) を用い、ゲノム全体のスクリーニング (ゲノムスキャン) を行なう。段階的スクリーニングにより遺伝子との相関を検討し、有意と思われる相関の得られたマーカーを起点に、連鎖不平衡マッピングを行ない、疾患遺伝子/責任遺伝子多型を同定する。AS の原因遺伝子の同定を通じ、類似所見をもつ OPLL の原因遺伝子の同定を目指す。

A. 研究目的

AS の原因遺伝子の同定、及び原因遺伝子の同定に基づく、AS の遺伝子レベルでの診断、病態の解析、遺伝子診断システムの構築である。同時に、OPLL が AS と同じように示す「脊柱靭帯の異所性骨化」という観点に立ち AS での原因遺伝子解析を通じ、OPLL での異所性骨形成の機構の解明を目的とする。

B. 研究方法

滋賀医科大学、順天堂大学等で AS 患者の DNA サンプル、疾患関連情報を収集し、理化学研究所にて遺伝子多型のタイピングを行う。さらに、台湾との共同研究により、日本人 AS 患者で認められた相関が台湾人 AS 患者においても認められるか解析を行なう。

1. 理化学研究所にて既に収集している、SNP marker (約 5 万個) を用いて、日本人 AS 患者のゲノム全体のスクリーニング (ゲノムスキャン) を行なう。

2. 段階的スクリーニングにより遺伝子との相関を検討し、有意と思われる相関の得られたマーカーを起点に、連鎖不平衡マッピングを行ない、疾患遺伝子/責任遺伝子多型を同定する。日本人で得られた結果が、台湾人でも再現されるか検討する。

3. 同定した原因遺伝子、責任遺伝子多型の機能解析 (発現解析、プロモーター解析等) を行ない、AS の病態との関係を検討

することにより、AS の分子病態を明らかにしていく。

4. AS で同定した原因遺伝子を通じ、OPLL の原因遺伝子の同定を目指す。

(倫理面への配慮)

本研究の遂行にあたっては、ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) に従っている。検体の収集を含めた研究計画については、理化学研究所、及び各検体の収集施設において予め倫理委員会の承認を得ている。検体は、書面によるインフォームド・コンセントを取得後に収集している。

C. 研究結果

1. 段階的スクリーニングを行なうが、理化学研究所にて既に収集している SNP marker (約 5 万個) を用いて、まず、100 人の日本人患者 DNA サンプルで 1 次スクリーニングを行なった。

2. 1 次スクリーニングを通過した約 1000 個の SNP marker に対して 2 次スクリーニングを行なった。

3. その結果、有意と思われる相関の得られたマーカーを起点に、日本人患者の DNA サンプルで連鎖不平衡マッピングを行なっている。

4. 上記により得られた候補遺伝子多型について、台湾人患者で、相関を検討す

る。

D. 考察

本研究の第一の特色は、ゲノム全体のスクリーニング（ゲノムスキャン）を行なう点と複数人種での解析を行う点である。ASの原因遺伝子の同定において、過去に本研究のような複数の施設、人種による大規模な case-control 相関解析を行なった研究はない。

疾患遺伝子が単離され、遺伝子レベルでの診断方法が確立されれば、目下、有効な診断方法のない AS という難病に苦しむ患者にとっていうまでもなく大きな福音である。さらに、AS の原因遺伝子の解析を通じて、同様な脊柱の靭帯骨化をきたす OPLL での骨形成の機構の解明も大いに期待できる。

E. 結論

ゲノムスキャンにより AS の感受性遺伝

子を同定する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, Hirabayashi S, Sugimori K, Matsumoto M, Kawaguchi H, Takahashi M, Inoue H, Kimura T, Matsusue Y, Inoue I, Baba H, Nakamura K, Ikegawa S. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet.* 2006; 119(6):611-6.

2. 学会発表

該当するものなし。

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当するものなし。

V 分 担 研 究 報 告 書

PLZF, FAZF の骨芽細胞分化制御への関与

分担研究者 井ノ上逸朗

東海大学医学部基礎医学系分子生命科学

研究要旨

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は進行性靭帯異所性骨化を特徴とする多因子疾患であり、神経圧迫によりさまざまな程度の神経症状をきたす。われわれはゲノム全域連鎖解析から感受性遺伝子同定をおこない、collagen 6A1 の関与を見出している。感受性遺伝子の同定のみでは異所性骨化の成因解明は困難であったので、骨化傾向を有する OPLL 患者靭帯細胞を骨芽細胞への分化させた際に発現上昇する遺伝子の同定より、OPLL の骨化制御機構の解明を目指した。OPLL 患者および対照として頸椎症性脊髄症患者から得られた靭帯細胞において骨芽細胞系への分化に伴う遺伝子発現の変化を網羅的にマイクロアレイ解析で検討した。多くの遺伝子発現変化が観察され、その中で OPLL 患者により発現上昇が確認された PLZF (promyelocytic leukemia zinc finger protein) に注目した。同時にホモログである FAZF (fanconi anemia zinc finger protein) の骨分化への関与も検討した。転写因子である PLZF は骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが期待されたので、この遺伝子発現を抑える目的で siRNA を 2ヶ所で設計しリポフェクトアミンで hMSC へ取り込ませた。その結果効率よく遺伝子発現抑制が、RT-PCR で確認でき同時に alkaline phosphatase の上昇をマーカーとした骨芽細胞への分化は抑制された。次に C2C12 細胞で強制発現させたところ、骨芽細胞への分化促進が確認された。これらの結果から、PLZF が骨芽細胞分化に重要な因子であるのみでなく、OPLL の治療につながる可能性が示唆された。FAZF は PLZF のホモログであり相同性の高い BTB domain を有する。FAZF は OS によって誘導されず、BMP-2 によって誘導された。また BMP パスウェイの下流として骨分化に関与することを明らかにできた。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は後縦靭帯が骨化することによると考えられているが、その骨化制御機構に関しては、ほとんど理解されていない。本研究では OPLL の成因解

明、および治療法の開発を目指す。その目的に OPLL 患者から得られた靭帯細胞から骨芽細胞への分化に重要な遺伝子、PLZF を同定し、その遺伝子を制御することで OPLL の治療につなげる。またホモログ遺伝子、FAZF の骨分化への役割も検討する。

B. 研究方法

OPLL 患者および対照として頸椎症性脊髄症患者から得られた靭帯細胞において骨芽細胞系への分化への影響および分化に伴う遺伝子発現の変化を網羅的にマイクロアレイ解析で検討した。骨芽細胞分化誘導には ascorbic acid, β -glycerphosphate, dexamethasone (OS)を用いた。また OPLL 患者により分化誘導後 (OS) 発現上昇が確認された PLZF に注目した。転写因子である PLZF が骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが期待されたので、遺伝子発現を抑える目的で siRNA を 2ヶ所で設計し hMSC へ取り込ませた。次に C2C12 細胞で PLZF を強制発現させた。

C. 研究結果

PLZF が骨芽細胞分化に重要な役割を果たすことが期待されたので、この遺伝子発現を抑える目的で 21 塩基の二本鎖 RNA (siRNA) を 2ヶ所で設計しリポフェクトアミンで hMSC へ取り込ませた。その結果効率よく遺伝子発現抑制が、免疫蛍光染色法で確認でき同時に ALP, COL1A1 の発現上昇をマーカーとした骨芽細胞への分化は抑制された (Fig.3A and B)。次に C2C12 細胞で PLZF を強制発現させたところ、PLZF の核への発現が確認され、さらに骨芽細胞への分化促進が確認された。また、PLZF を強制発現させた結果、CBFA1 の発現上昇が確認された。しかしながら、PLZF の BTB domain を欠く mutant では、骨芽細胞分化に影響を与えなかった。

FAZF は PLZF のホモログで zinc finger domain と BTB domain を有する。FAZF は BMP-2 添加により発現上昇した。FAZF

の強制発現により CBFA1 を始めとする骨分化マーカーの上昇を認めた。Zinc finger domain を欠落した FAZF は骨分化誘導能を失っていた。

D. 結論

PLZF は骨芽細胞分化に重要な遺伝子である。また PLZF は CBFA1 の遺伝子発現を調節していた。またホモログである FAZF は BMP-2 により誘導され、骨分化を制御している。これらの結果から、PLZF, FAZF はそれぞれ OS, BMP-2 で誘導されており、両遺伝子とも CBFA1 の上流で働き、骨芽細胞分化に重要な因子であるのみでなく、OPLL の治療につながる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Iwasawa T, Iwasaki K, Sawada T, Okada A, Ueyama K, Motomura S, Harata S, Inoue I, Toh S, Furukawa K-I. Pathophysiological role of endothelin in ectopic ossification of human spinal ligaments induced by mechanical stress. *Calcif Tissue Int* 79, 422-430, 2006.

Ikeda R, Yoshida K, Inoue I. Identification of FAZF as a novel BMP2-induced transcription factor during osteoblastic differentiation. *J Cell Biochem* in press.

Ikeda R, Yoshida K, Ushiyama M, Yamaguchi T, Iwashita K, Futagawa T, Shibayama Y, Oiso S, Takeda Y,

- Kariyazono H, Furukawa T, Nakamura K, Akiyama S, Inoue I, Yamada K. The small heat shock protein alphaB-crystallin inhibits differentiation-induced caspase 3 activation and myogenic differentiation. *Biol Pharm Bull* 29, 815-819, 2006.
- Tsukahara S, Ikeda R, Goto S, Yoshida K, Mitsumori R, Sakamoto Y, Tajima A, Yokoyama T, Toh S, Furukawa K, Inoue I. Tumor necrosis factor alpha stimulated gene-6 inhibits osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells induced by OS and BMP-2. *Biochem J* 398, 595-603, 2006.
- Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, Hirabayashi S, Sugimori K, Matsumoto M, Kawaguchi H, Takahashi M, Inoue H, Kimura T, Matsusue Y, Inoue I, Baba H, Nakamura K, Ikegawa S. A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet* 119:611-616, 2006.
- Inoue I, Ikeda R, Tsukahara S. PLZF and TSG-6 identified by gene expression analysis play roles in the pathogenesis of OPLL. *J Pharmacol Sci* 100, 205-210, 2006.
- Inoue I. Genetic susceptibility to OPLL. In: Yonenobu K, Nakamura K, Toyama Y (eds) Ossification of the posterior longitudinal ligament. Springer, Tokyo
2. 学会発表
井ノ上 逸朗 多因子疾患のゲノム解析から病因・病態解明へ 骨代謝学会シンポジウム 7月 東京
- H. 知的所有権の出願・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

骨形成における Wnt アンタゴニスト Sfrp4 の in vivo 解析

中西りか、秋山治彦、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 骨形成、骨代謝に Wnt シグナリングは重要な働きをしている。我々は老年性骨粗鬆モデルマウスを用いた研究から Wnt ライガンドのアンタゴニストである分泌蛋白 Secreted frizzled-related protein 4 (Sfrp4) が骨形成を抑制するとの知見を得た。本研究においては骨組織特異的に Sfrp4 を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し in vivo での機能を解析した。

A. 研究目的

我々はすでに in vitro にて Sfrp4 が骨芽細胞における Wnt シグナリングを抑制し、骨芽細胞活性を抑える事を確認している。本研究の目的は in vivo において Sfrp4 の骨組織における機能を明らかにする事である。

B. 研究方法

はじめに、in situ hybridization を用いて Sfrp4 の骨組織における発現を調べた。

マウス コラーゲンタイプ 1A1 プロモーター下に Sfrp4 を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、マイクロ CT を用いた骨量解析、骨形態計測、骨代謝マーカー測定を行った。

C. 研究結果

Sfrp4 は新生児マウス長管骨において骨膜、骨髓などに発現していた。

2ヶ月齢トランスジェニックマウスは野生型と比べ大腿骨遠位部海綿骨が約 10%低下していた。(図1) 骨形態計測では骨芽細胞面および骨形成率の有意な低下がみられた。同齢において骨形成マーカー、血清オステカルチンは有意に低下していた。血清中にトランスジェン由来の Sfrp4 蛋白は検出されなかった。

D. 考察

以上の結果から、Sfrp4 が骨芽細胞においてオートクラインあるいはパラクラインに働き骨形成を抑制すると考えられた。

E. 結論

Sfrp4 は骨芽細胞の活性を抑制し、骨形成を負に制御しうる分泌蛋白であり、さらにその制御メカニズムを解明していく。

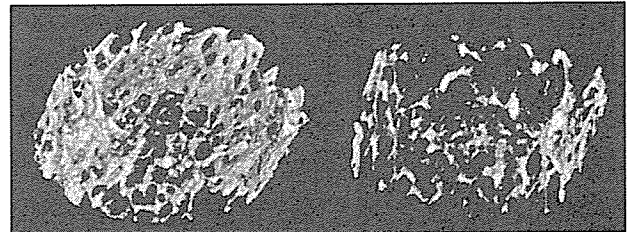


図1.
2ヶ月齢野生型(左)、Tg(+/-)マウス(右)の大腿骨遠位骨幹端部

F. 研究発表

1. 論文発表

Secreted frizzled-related protein 4 is a negative regulator of peak BMD in SAMP6 mice. Journal of bone and mineral research. 21(11): 1713-21, 2006

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他
特になし

XI 型コラーゲン α 2 鎖 (COL11A2) 遺伝子の骨組織における
発現メカニズムの解析に関する研究

分担研究者 安井 夏生 徳島大学整形外科教授

研究要旨：後縦靭帯骨化症の疾患感受性遺伝子の一つとされている XI 型コラーゲン α 2 鎖 (COL11A2) 遺伝子について、その骨組織における発現メカニズムの解析を行った。骨芽細胞様細胞 Saos-2 細胞において、COL11A2 遺伝子の発現にはプロモーター領域に存在する Sp1 結合部位が重要であり、転写因子 Sp1 ファミリーがそれらを介して発現制御を行っていることが明らかとなった。

A. 研究目的

COL11A2 遺伝子は後縦靭帯骨化症で発現しており、疾患感受性遺伝子の一つとされている。これまで軟骨特異的細胞外マトリックス成分を規定する COL11A2 遺伝子の骨組織における詳細な検討はなされていない。そこで我々は、骨芽細胞様細胞 Saos-2 細胞を用いて骨組織における COL11A2 遺伝子の発現制御メカニズムについて調査を行った。

B. 研究方法

Saos-2 細胞で RT-PCR 法またはウエスタンブロット法により COL11A2 遺伝子の発現を検討した。COL11A2 遺伝子のプロモーター領域を様々な含むレポーターベクターを作成し、これを Saos-2 細胞に導入し、重要な転写制御領域を同定した。同定された転写制御領域に DNA オリゴを作成し、ゲルシフトアッセイを行うとともに転写因子 Sp1 ファミリーとの相互作用をクロマチン免疫沈降法にて評価した。さらに、免疫沈降法にて Sp1 ファミリーと相互作用する他の転写制御因子を検索した。次に、Sp1、Sp3、Sp7 の発現ベクターを用いた各々の強制発現と、siRNA を用いた抑制効果の COL11A2 遺伝子に対する影響を検討した。

C. 研究結果

Saos-2 細胞は RNA レベルあるいはタンパク質レベルで発現していた。プロモーターアッセイにより重要な転写制御領域は、軟骨細胞で重要とされている領域ではなく、さらに下流の 3 つの Sp1 結合部位であることが示された。これらの領域はゲルシフトアッセイで Saos-2 細胞の核抽出物と相互作用し、クロマチン免疫沈降法では *in vivo* で Sp1、Sp3 と結合していることが判明した。また、Sp1、Sp3 は HDAC、CBP、p300 と複合体を形成していることが示された。Sp1、Sp3 各々を強制発現させることで COL11A2 遺伝子の発現は活性化され、逆に各々を選択的にノックダウンすることでそれらは抑制された。さらに、COL11A2 遺伝子の骨組織特異的発現調節に関して Sp1 ファミリーの一つで骨芽細胞分化に必須の転写因子である Sp7 (osterix) に注目し、同様の検討を行った。Sp7 は Saos-2 細胞内で COL11A2 遺伝子のプロモーター領域に結合しており、強制発現させると COL11A2 遺伝子は活性化され、逆にノックダウンすると COL11A2 遺伝子は抑制されることが判明した。

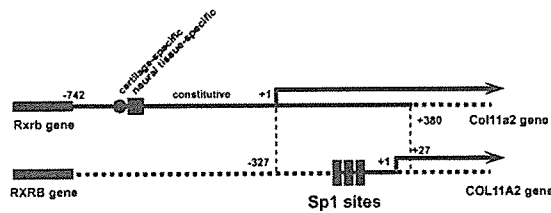


図 1: COL11A2 遺伝子の転写制御領域。上段にマウス、下段にヒトを示す。軟骨細胞で重要とされる軟骨組織、神経組織特異的領域、また、今回同定された骨組織で重要とされる Sp1 結合領域を模式的に示す。

D. 考察

骨組織における COL11A2 遺伝子の発現は、骨折時の仮骨、骨軟骨腫瘍、異所性骨化などの未分化な骨組織における報告がある。また、COL11A2 遺伝子は後縦靭帯骨化症の疾患感受性遺伝子として注目されている。本研究において、骨組織では軟骨と異なる機序により COL11A2 遺伝子の発現が誘導されており、後縦靭帯骨化症における異所性骨の発現起源や病態を考察する上で非常に興味深い。

E. 結論

骨芽細胞様細胞 Saos-2 細胞では転写因子 Sp1 ファミリーが HDAC、CBP、p300 といった転写制御因子と複合体を形成し、Sp1 結合部位を介して COL11A2 遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。また、骨組織特異的発現制御には Sp7 (Osterix) が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Goto T, Matusi Y, Fernandes RJ, Hanson DA, Kubo T, Yukata K, Michigami T, Komori T, Fujita T, Yang L, Eyre DR, Yasui N. Sp1 family of transcription factors regulates the human alpha2 (XI) collagen gene (COL11A2) in

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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) に対する応答性を比較検討した。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。一方、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、石灰化や Runx2 の活性化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 $\alpha 7$ とこれに対する結合性分子が担うものと考えられ、現在この分子の取得を試みている。

A. 研究目的

我々は、当研究室で樹立した歯周靱帯細胞 PDL-L2 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、Flexorcell 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。MS の受容体として作用する

と考えられるインテグリン分子の発現を調べたところ、インテグリン $\alpha 7$ が靱帯細胞に発現し、骨芽細胞には発現していないことがわかった。この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。電気泳動により単一なタンパクと思われる画分を数個取得し解析を続けている。

D. 考察

靱帯細胞には MS 誘導性の石灰化刺激に対して抑制的に働く機構が存在し、上記インテグリンおよびそ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。

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：

川島博行：メカニカルストレスと細胞応答。
下野正基他編集 歯の移動の臨床バイオメカニクス、142-150、2006。

2. 学会発表：

川島博行他：第 24 回日本骨代謝学会学術集会国際シンポジウム、東京、8 月 6 日、2006。

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

脊柱靱帯骨化に対する Runx の作用に関する研究

分担研究者 四宮 謙一 東京医科歯科大学整形外科教授

研究要旨 OPLL モデルマウスである *ttw* マウスと内軟骨性骨化の重要因子である *Runx2*・*Runx1* 遺伝子の欠損マウスを交配し得られたマウスの異所性骨化について検討した。*ttw* マウスでみられる異所性骨化は、*Runx2* ヘテロ欠損で軽減する傾向を認めた。骨や軟骨における組織特異的な *Runx1* 欠損では明らかな変化は認められなかった。これらの結果から、OPLL でみられる異所性骨化において *Runx family*、特に *Runx2* の関与が示唆された。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化症における異所性骨化の機序、主に *Runx family* の役割について明らかにする。

B. 研究方法

OPLL モデルマウスである *ttw* マウスと *Runx2* ヘテロ欠損マウスとを交配、得られた二重変異マウスの骨化部位を μ CT を用いて定量し、さらに組織学的に解析した。

また、骨特異的 *Runx1* 欠損マウス・軟骨特異的 *Runx1* 欠損マウスと *ttw* マウスとの交配により得られた二重変異マウスについても同様の検討を行った。

(倫理面での配慮)

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

・*ttw* マウスでみられる異所性骨化は、*Runx2* 遺伝子のヘテロ欠損 *ttw* マウスで軽減する傾向を認めた。組織学的にも石灰化部位が減少していた

・*ttw* マウスでみられる異所性骨化は、骨特異的 *Runx1* 欠損マウスや軟骨特異的 *Runx1*

欠損マウスとの二重欠損マウスにおいても組織学的に明らかな変化は認められなかった

D. 考察

OPLL における異所性骨化には内軟骨性骨化が関与することが指摘されており、*BMP* や *TGF- β* 等のサイトカインの発現の報告もあるが、未だ詳細は明らかにされていない。OPLL モデルマウスの異所性骨化は、内軟骨性骨化に必須の *Runx2* 遺伝子のヘテロ欠損により軽減したことから、OPLL における異所性骨化には *Runx2* を介する内軟骨性骨化が関与することが考えられた。

E. 結論

OPLL でみられる異所性骨化において *Runx family*、特に *Runx2* の関与が示唆された。

F. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者由来靭帯細胞における遺伝子発現への Runx2 ノックダウンの影響

岸谷正樹(弘前大学・薬理学、整形外科)、工藤整(弘前大学・整形外科)、
金丸幸太(弘前大学・薬理学)、横山徹(弘前大学・整形外科)、
植山和正(弘前記念病院・整形外科)、元村成(弘前大学・薬理学)、
藤哲(弘前大学・整形外科)、古川賢一(弘前大学・薬理学)

研究要旨

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は遺伝的背景に種々の因子が関与する多因子疾患と推定され、OPLL の成因解明の為には、遺伝的要因 (病態関連遺伝子) の解明が必須である。本研究では患者脊柱靭帯組織由来培養細胞 (OPLL 細胞) を用い、骨軟骨細胞分化特異的転写因子 Runx2 によって調節を受ける遺伝子を網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ) ならびにリアルタイム PCR によって同定することで、OPLL に特異的に関与する病態関連遺伝子を明らかにして、病態の解明ならびに薬物治療の標的を見出すことを目的とした。OPLL 細胞と対照細胞 (非 OPLL 細胞) において骨化誘導初期 (デキサメタゾン添加 48 時間以内)、さらに RNA 干渉による Runx2 ノックダウンに伴い発現変化した遺伝子を比較検討した。マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析により、骨化誘導刺激により骨軟骨細胞分化因子と共に種々の血管新生誘導因子の発現変動が確認された。リアルタイム PCR にて詳細に検討した結果、内軟骨性骨化を示唆する遺伝子 (Col2a1, Aggrecan-1) ならびに血管新生誘導因子 (Angiopoietin-1, VEGF-A) が mRNA 発現レベルで経時的に変動する傾向が示された。さらに Angiopoietin-1 は Runx2-siRNA によって特異的に発現を抑制されたことから、Runx2 による発現調節を受けていることも明らかになった。内軟骨性骨化のステップには、血管侵入促進あるいは抵抗性が重要な役割を果たしており骨化進展過程において血管新生が関与していることが推測される。今回の結果より脊柱靭帯骨化進展に内軟骨性骨化が重要な役割を果たし、更に血管新生が関与している可能性が示唆された。これらのデータは、OPLL 進展メカニズムを解明する鍵になると期待される。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は遺伝的背景に種々の因子が関与する多因子疾患と推定され、OPLL 成因解明の為には、遺伝的要因 (病態関連遺伝子) の解明が必須である。本研究では患者脊柱靭帯組織由来培養細胞 (OPLL 細胞) を用い、骨軟骨細胞分化特異的転写因子 Runx2 によって調節を受ける遺伝子を網羅的遺伝子発現解析 (マイクロアレイ) ならびにリアルタイム PCR によって同定すること

で、OPLL に特異的に関与する病態関連遺伝子を明らかにし、病態の解明ならびに薬物治療の標的を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

1. ヒト脊柱靭帯細胞の単離と培養

弘前大学医学部倫理委員会の承認ならびに術前に患者およびその家族に十分なインフォームドコンセントを行い、同意を得た上で術中に摘出した OPLL 患者、非 OPLL 患者の脊柱靭帯組織から骨化部分を除き

outgrowth法にて靱帯細胞を単離し、10%FBS 添加 DMEM 培地中で 37°C、5%CO₂ 気相下にて培養した。また骨芽細胞も購入培養した。

2. RNA 干渉

35mm dish に OPLL 細胞、非 OPLL 細胞を継代培養した。5 代目の細胞を培養し 80%コンフルエント到達後、Runx2 を siRNA にて特異的にノックダウンし、24 時間後骨化誘導培地 (1%FBS 添加 + DMEM 培地 + Dexamethasone 10⁻⁷M) に交換、更に 48 時間骨化誘導培地下に培養した。

3. 培養細胞の総 RNA 抽出、DNA 合成

OPLL 細胞、非 OPLL 細胞、骨芽細胞を使用し、1) 骨化誘導 0h、2) 骨化誘導 48h、3) RNA 干渉 24h 後・骨化誘導 48h の各サンプルより総 RNA を各々抽出し、DNA 合成、マイクロアレイ、リアルタイム PCR に使用した。

4. マイクロアレイ解析

500ng の総 RNA から cDNA に逆転写し、cRNA を cyanine 3-dCTP (Cy3) あるいは cyanine 5-dCTP (Cy5) でラベリング、human 1A ver.2 oligo-DNA microarray (Agilent Technologies) 上にハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション、洗浄・固定後、BioDiscovery Microarray analysis Software (ImaGene ver.6.0, GeneSight ver.4.1) によりクラスタリング解析を行った。アレイの条件は以下の3つである。Array 1 (非 OPLL 細胞 : 骨化誘導 48h/骨化誘導 0h) (n=2)、Array 2 (OPLL 細胞 : 骨化誘導 48h/骨化誘導 0h) (n=2)、Array 3 (OPLL 細胞 : RNA 干渉 24h 後・骨化誘導 48h/骨化誘導 48h) (n=2)。発現比が 2 以上、あるいは 0.5 以下を有意な変化と見なした。

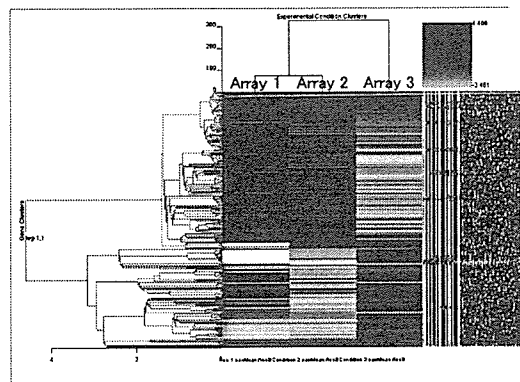
5. リアルタイム PCR

骨化誘導下における骨化関連因子 (Runx2, アルカリフォスファターゼ (ALP))、軟骨関連因子 (Col2a1, Aggrecan-1)、血管関連因子 (Angiopoietin-1, VEGF-A, ChM-1) の各 mRNA レベルでの発現、RNA 干渉の効果を OPLL 細胞、非 OPLL 細胞、骨芽細胞を用いてリアルタイム PCR 法で定量し

た。

C. 研究結果

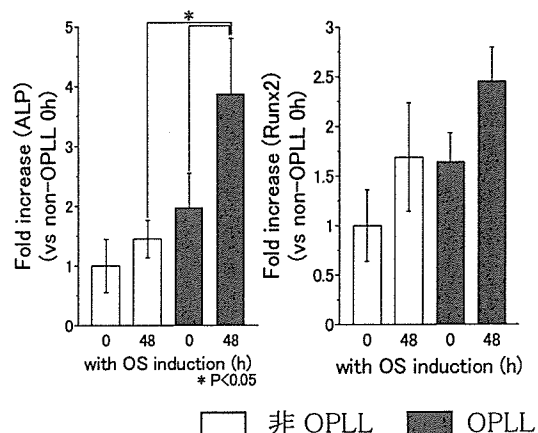
1. マイクロアレイ解析 (網羅的遺伝子解析)



骨化誘導により有意に発現変化を認められた遺伝子群の中でも、OPLL 群で発現が増加し、非 OPLL 群では発現が変化しなかった遺伝子群のうち、更に RNA 干渉によりその発現が有意に低下した遺伝子群に注目した。つまり、Runx2 によるコントロールを受け、更に OPLL 細胞で特異的に発現していると考えられた遺伝子群を 22 遺伝子同定した。それらの中で、骨芽細胞や血管内皮細胞に特異的に発現しているとされ、血管新生、幹細胞ニッチに関して重要な因子とされる Angiopoietin-1 に注目した。

2. リアルタイム PCR

1) 骨芽細胞関連因子: ALP, Runx2



骨芽細胞関連因子の ALP ならびに Runx2 は、共に非 OPLL に比べて、OPLL で発現が高い