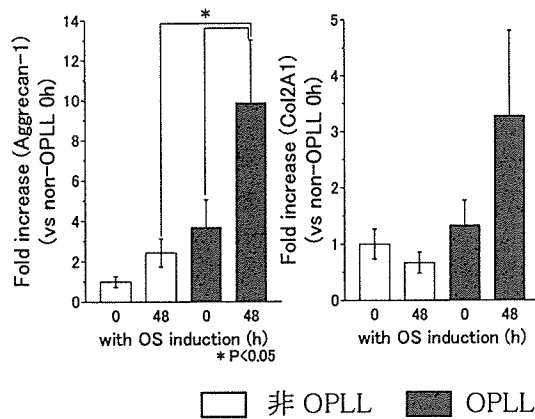


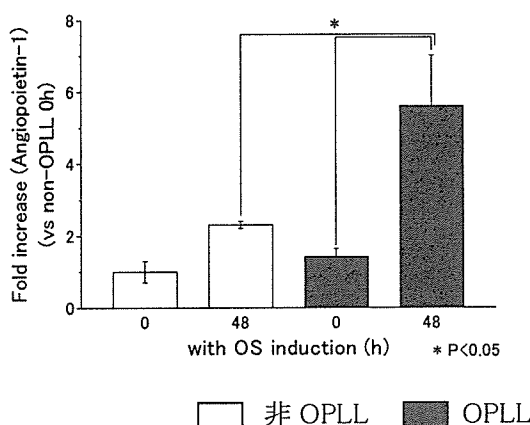
傾向にあるが、骨化誘導によってさらに強い発現誘導を受けた。

2) 軟骨細胞分化関連因子: Col2a1, Aggrecan-1



OPLL 細胞では骨化誘導により、軟骨組織に特異的な Col2a1 ならびに Aggrecan-1 の発現が強く誘導された。しかし、非 OPLL 細胞では有意な変化は認められなかった。

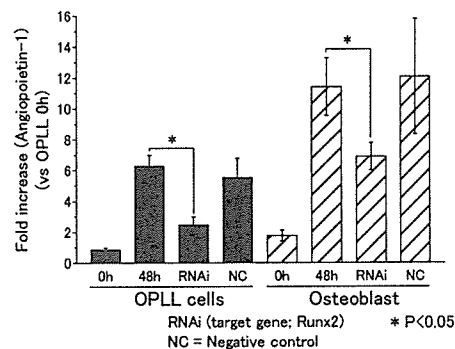
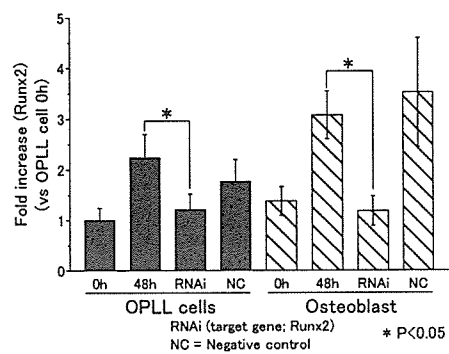
3) 血管新生因子: Angiopoietin-1



Angiopoietin-1 は骨化誘導刺激により、OPLL で顕著な発現増加を認めた。

3. RNA 干渉: Runx2, Angiopoietin-1

骨化誘導によって発現増加した Runx2 ならびに angiopoietin-1 は Runx2-siRNA により、共に発現抑制を受けた。



D. 考察

Runx2 によるコントロールを受け、血管新生に重要な役割を果たしていると考えられる Angiopoietin-1 に注目し、その発現が、非 OPLL 群に比して OPLL 群で有意に増加していることを示した。また、Runx2 ノックダウンによりその発現は有意に低下することから Angiopoietin-1 が Runx2 の下流で作用していることが示唆された。

OPLL は多因子疾患とされこれまで、多くの病態関連遺伝因子が同定されている。しかし、そのどれも病態の本質解明には至っていない。OPLL には種々の代謝性疾患（糖尿病、肥満、末端肥大症、甲状腺機能低下症、他）の合併が報告されており遺伝因子として骨芽細胞分化関連遺伝子以外の要因も推測される。我々は骨芽細胞分化のキーファクターである Runx2 ノックダウンにより変動する遺伝子群に注目した。脊椎外科医が OPLL 症例の手術において術中、術後の出血量・出血凝固傾向が非 OPLL 症例と異なるのではないかと疑問から、我々は種々の

心血管系因子を調査したところ、OPLL群で有意に術後出血量が非OPLL群に比し増加していた（投稿中）。Runx2とAngiopoietin-1が骨化、血管形成あるいは骨化進展に相互にどのような経路で関連しているかは今後の検討課題だが、少なくともAngiopoietin-1がRunx2の下流で骨軟骨分化あるいは血管新生に関与しており、OPLL骨化進展に関与している可能性が示唆される。

E 結論

マイクロアレイ解析、リアルタイムPCRの結果より骨芽細胞系の遺伝子発現変動だけでなく軟骨細胞分化関連遺伝子、血管新生関連遺伝子の発現変動が認められた。そしてそれは、OPLL細胞でより強い傾向が認められた。このことは靭帯細胞骨化に内軟骨性骨化、血管新生が関連していることが示唆される。

更に骨芽細胞を用いた結果においても、Runx2ノックダウンによりAngiopoietin-1の発現が低下することが確認された。この結果よりRunx2の下流でAngiopoietin-1がコントロールされている可能性が示唆される。

F. 学会発表

岸谷正樹、古川賢一、工藤整、元村成、藤哲：後縦靭帯骨化症（OPLL）骨化進展における血管制御機構と内軟骨性骨化：第20回日本整形外科学会基礎学術集会 2006

G. 参考文献

1. Iwasaki K, Furukawa KI, Tanno M, et al. (2004) Uni-axial cyclic stretch induces Cbfa1 expression in spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Calcif Tissue Int* 74:448-457
2. Furukawa KI (2006) Current topics in pharmacological research on bone metabolism: molecular basis of ectopic bone formation induced by mechanical stress. *J Pharmacol Sci* 100:201-204
3. Furushima K, Shimo-Onoda K, Maeda S, et al. (2002) Large-scale screening for candidate genes of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *J Bone Miner Res* 17:128-137
4. Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, et al. (2006) A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet* 119:611-616
5. Ikeda R, Yoshida K, Tsukahara S, et al. (2005) The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J Biol Chem* 280:8523-8530
6. Song J, Mizuno J, Hashizume Y, et al. (2005) Immunohistochemistry of symptomatic hypertrophy of the posterior longitudinal ligament with special reference to ligamentous ossification. *Spinal Cord*
7. el Miedany YM, Wassif G, el Baddini M (2000) Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH): is it of vascular aetiology? *Clin Exp Rheumatol* 18:193-200
8. Adams JE, Davies M (1977) Paravertebral and peripheral ligamentous ossification: an unusual association of hypoparathyroidism. *Postgrad Med J* 53:167-172
9. Komori T (2005) Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem* 95:445-453
10. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118:149-161
11. Kishiya M, Furukawa KI et al. Comparison of cardiovascular parameters between patients with ossification of posterior longitudinal ligament and patients with cervical spondylotic myelopathy. submitted to *Eur Spine J*

¹⁸F-Fluoride-Ion-PET を用いた脊椎骨代謝の定量解析

福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域 *福井大学放射線医学総合研究所
内田研造、馬場久敏、宮崎剛、中嶋秀明、彌山峰史、
佐藤竜一郎、*土田龍朗、*米倉義晴

研究要旨 骨形成能を含めた骨代謝の新たな包括的評価として ¹⁸F-Fluoride-Ion-PET を用いた脊椎骨代謝の定量解析を行った。閉経後の女性 16 例を被験者集団とし、腰椎脊椎骨 T スコアを-2 で正常群(7 例)、骨粗鬆群(9 例)の 2 群間に分け検討した。正常群、骨粗鬆群 K_i 値は、各々 0.027(0.006)、0.034(0.008)であり、局所骨芽球活性を反映する K_i 値は、骨粗鬆群で高値を示していた。腰椎 SUV 比較では正常群 5.3 ± 0.9 mg/mL、骨粗鬆群 5.9 ± 2.5 mg/mL であり、有意に局所(第 1-5 腰椎)の骨標準摂取量は高値となっていた。¹⁸F-Fluoride-Ion-PET は代謝性骨疾患の病態生理に対して新たな知見が得られると共に、靭帯骨化症(異所性骨化を含む)における局所骨化異常の変化を画像化、定量化できる非侵襲的ツールとなる可能性がある

A, 研究目的

骨形成能を含めた骨代謝の包括的評価に現在用いられている非侵襲的手技として、生化学的骨代謝回転マーカー、全身トレーサー保持法、骨親和性トレーサーである ¹⁸F-フッ素および ^{99m}Tc-メチレンジホスホネート(MDP)の全身骨血漿クリアランスなどが挙げられるが、臨床的に重要な局所に関する情報を直接的に得ることができず、海綿骨と皮質骨との相対的変化あるいは特定の部位における治療効果判定は不可能である。

¹⁸F-Fluoride Ion (¹⁸F)PET は、特定部位における骨吸収、骨形成といった骨代謝を直接定量的に評価することが可能な検査法であり、Blau ら Reeve らにより、¹⁸F 採取率と骨組織形態計測、血漿クリアランス法などから、骨代謝量や、骨血流量および骨形成能(osteoblastic activity)との関係が明らかにされた。¹⁸F-フッ素 PET および骨形成に関する組織学的骨形態計測指数を用いて得られた局所骨格動態パラメーターには、石灰化速度

とのきわめて有意な相関性がある本法の妥当性が得られている。

本研究は、閉経後骨粗鬆症を有する女性において ¹⁸F-フッ素 PET 測定による腰椎の骨代謝動態について比較し、その有用性について検討した。

B, 研究方法

平均年齢 64.0 歳(範囲、52~73 歳)である閉経後の女性 16 例を被験者集団とし、腰椎 BMD 測定; Hologic QDR4500 (Hologic, Bedford, MA)にて BMD T スコアを-2 で正常群(7 例)、骨粗鬆群(9 例)の 2 群間に便宜的に分けた。これらの被験者群は明らかなアレンドロネート投与歴、ステロイド投与歴はない。日本鋼管(NKK)製 12MeV 超小型サイクロトロンと自動合成装置を用いて作成した ¹⁸F を、10mCi (370MBq) 被験者に投与した。¹⁸F-フッ素注入投与より 2、4、10、20、30、40、50、60 分後に各静脈血試料を採取した。各試料の一部を遠心分離し、PET スキャナとクロスキャリブレーションをさせてあるウェルカウンターを用い、血漿中および全血中の ¹⁸F カウント率を測定した。

血漿中対全血中の経時的 ^{18}F -フッ素濃度比を用い、動脈血漿中投入機能を求める際に必要な血漿/全血差について補正した。骨格 ^{18}F -フッ素動態パラメーターは、Hawkins らが記述した3コンパートメントのトレーサー動態モデルを用いて推定した。反応速度定数は、 ^{18}F -フッ素のコンパートメント間輸送を示し、 K_1 は、血漿から骨組織全体までの単方向フッ素クリアランス、 k_2 は、血管外コンパートメントから血漿コンパートメントまでのフッ素逆輸送、 k_3 と k_4 とは、骨塩コンパートメントからの取込みと放出とを示すものである。ここで、 K_1 は、骨の血流および骨塩に特異的に結合するトレーサー分画 ($k_3/[k_2+k_3]$) を反映する両 K_1 値の関数である。 K_1 は、骨内の骨芽球活性レベルを表す。 K_1 と k_1 とは、単位容積当たりのクリアランス速度 (すなわち ml/分/ml) として表すのに対して、 k_2-k_4 は、分 $^{-1}$ 単位となる。5番目のパラメーターである組織領域の血管 ^{18}F -フッ素活性を考慮に入れるため、血

液量分画 (BV) を本モデルに含めることとした。対象としたその他のパラメーターは、 $k_3/(k_2+k_3)$ として算出され、骨基質と特異的に結合する血管外組織間隙中のトレーサー分画、骨血管外コンパートメントによって占められた概念的容積を表す K_1 対 k_2 比、 $k_4 \times k_2/(k_2+k_3)$ として産出され、および骨塩から血漿コンパートメントに戻るフッ素の流出量である。これらの数学的モデルを基に、Advance PETscanner で撮像、画像再構築を行い、画像解析装置にて腰椎椎体中央部に 10×10 (mm) に関心領域 (ROI) を設定し、局所 (第1-5腰椎) の骨標準摂取量 ; standardized uptake value (SUV) を測定した。組織と血漿の時間放射能曲線に関する非線形回帰分析を実施し、上述の反応速度定数を推定した。各パラメーター値は、椎骨ごとに求め、これを平均して被験者ごとの局所動態パラメーターを得た。動態パラメーターの差は、対応のある Student の t 検定または Wilcoxon の符号付順位和検定を用いて比較した。

Table 1

^{18}F -フッ素動態パラメーターと局所 (第1-5腰椎) の骨標準摂取量 ; standardized uptake value (SUV)

	正常群 ; T ≥ -2.0 (p=7)	骨粗鬆群 ; T < -2.0 (p=9)
K_1 (ml/min/ml)	0.027 (0.006)	0.034 (0.008) *
K_1 (ml/min/ml)	0.137 (0.046)	0.149 (0.101)
k_2	0.442 (0.213)	0.287 (0.120) *
k_3	0.110 (0.045)	0.102 (0.041)
k_4	0.012 (0.005)	0.010 (0.007) *
$k_3/(k_2 + k_3)$	0.207 (0.056)	0.255 (0.046)
K_1/k_2	0.383 (0.147)	0.454 (0.138)
$k_4 \times k_2/(k_2 + k_3)$	0.009 (0.004)	0.007 (0.005)
SUV (mg/ ml)	5.3 \pm 0.9	5.9 \pm 2.5*

* p<0.05

C, 結果

BMD T スコアを-2 以上の正常群、骨粗鬆群 K_1

値は、各々0.027(0.006)、0.034(0.008)であり、骨内の骨芽球活性レベルは骨粗鬆群で高値を示していた。以下各動態パラメーターを表す(table1)。腰椎 SUV 比較では正常群 5.3±0.9mg/mL、骨粗鬆群 5.9±2.5 mg/mL であり、有意に局所(第1-5腰椎)の骨標準摂取量は高値となっていた(Table 1)。

D, 考察

今回の動的 ^{18}F -Fluoride Ion (^{18}F)PET では、局所ROIにおける骨の血流および代謝について直接的に評価することが可能となり、閉経後の骨粗鬆症を有する女性では、対照と比較して、骨の血流と代謝をそれぞれ反映する腰椎中の K_1 と K_2 が有意に高い結果を得た。Hawkingらは、骨の血流と代謝とを反映する所反応速度定数を得る目的で、初めて動的 ^{18}F -フッ素 PET スキャンを使用したことについて報告した。3 コンパートメントモデルを用いて、血流を反映する腰椎での K_1 値は、イヌ柱状骨にて得られた K_1 値と同等であることを見出すとともに、非線形回帰分析を用いた K_1 値と Patlak グラフ分析を用いた同パラメーターとの間には、高い相関性があることを見出した。他の研究では組織学的形態計測を用いた評価ならびに血清アルカリホスファターゼ濃度から、腎性骨異栄養症患者には、 K_1 値と骨形成速度とのきわめて有意な相関性が認められると報告している。 K_1 および K_2 には、腸骨稜における組織学的形態計測から求めた石灰化速度との有意な相関性があることも報告されている。若年性骨粗鬆症を有する被験者およびペーজেット病を有する被験者において K_1 値および K_2 値が高いことわかっており、このような病態に伴う骨の血流と代謝回転とが大きいという点と一致している。ペーজেット病の椎骨では、同一患者の正常椎骨と比較

して血流を反映する K_1 値と骨形成を反映する K_2 値とが2倍も高いことを示された。また本研究における骨の血流を反映する骨組織へのフッ素クリアランス推定値 (K_1) および骨塩による正味のフッ素クリアランス (K_2) は、他の研究者が健常男性志願者および健常な女性の腰椎にて観察した結果と同等であった。

局所血流を反映する K_1 値には、石灰化速度との有意な相関性が報告されており、 K_1 値が骨形成に関連することを裏付けている。本研究では、 K_1 値<0.15ml/分/ml の場合、 K_1 値が局所血流を反映すると仮定することができる。

E, 結論

骨代謝の新たな包括的評価として ^{18}F -Fluoride-Ion-PET を用いた腰椎骨代謝の定量解析を行った。局所骨芽球活性を反映する K_1 値は、骨粗鬆群で高値を示し、腰椎 SUV 比較では有意に局所(第1-5腰椎)の骨標準摂取量は高値となっていた。 ^{18}F -Fluoride-Ion-PET は代謝性骨疾患の病態生理に対して新たな知見が得られると共に、靭帯骨化症における局所骨化異常の変化を画像化、定量化できる非侵襲的ツールとなる可能性がある。

参考文献

- 1) Blau M, Ganatra R, Bender MA 1972 ^{18}F -Fluoride for bone imaging. Semin Nucl Med 2: 31-37.
- 2) Reeve J et al. 1988 Skeletal blood flow, iliac histomorphometry, and strontium kinetics in osteoporosis: A relationship between blood flow and corrected apposition rate. J Clin Endocrinol Metab 66:1124-1131.

3) Hawkins RA et al. 1992 Evaluation of the skeletal kinetics of fluorine-18-fluoride ion with PET. J Nucl Med 33: 633-642.

脊柱靱帯の特性に関する研究
—ラット黄色靱帯における靱帯骨化の場としての検討—

自治医科大学整形外科

中間季雄, 遠藤照顕, 井上泰一, 安食孝士, 大山素彦

分担研究者 星野雄一 自治医科大学整形外科教授

研究要旨 ラット黄色靱帯の組織特性を検討する目的で, ラット大腿骨に骨孔を作成し同種性に採取した黄色靱帯, 筋組織, アキレス腱, 脂肪組織の薄片を埋め込み形態学的に観察した. 黄色靱帯には多数の骨髄由来細胞が遊走浸潤し, 骨形成も良好であった. 一方, 筋組織, 脂肪組織, アキレス腱にはほとんど細胞浸潤は認められなかった. 黄色靱帯は間葉系細胞の細胞遊走においては極めて至適な環境であると予想される.

A. 研究目的

我々は, 頚椎症性脊髄症の患者より採取したヒト頚椎黄色靱帯 (ligamentum flavum) においてその微細構造を観察し, 脊柱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, 頚椎においては上位と下位, すなわち頚椎高位別にアポトーシスの頻度が異なることを見出し, これらの事実は脊柱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¹⁾.

さらにヒト後縦靱帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament, 以下 OPLL) においては, 頚椎症性脊髄症と比較して黄色靱帯の弾性線維が断裂, 二層構造をとるなど靱帯に構築学的変化が生じていること, 細胞死に陥った細胞はマクロファージなどの細胞により処理されにくい環境にあることなどを報告し²⁾, 脊柱靱帯組織の特性, すなわち骨化を起こしやすい場としての検討が極めて重要であることを強調してきた²⁾³⁾.

今年度は, 脊柱靱帯を他の組織と比較検

討することによって脊柱靱帯の特性を明らかにすることを目的とし, ラットを用いて in vivo における各種組織 (脂肪, 筋肉, 黄色靱帯) への bone ingrowth, すなわち間葉系細胞の migration に主眼をおき観察, 検討した.

B. 研究方法

Adult LEW ラットを用いた. Pentobarbital 麻酔下で大腿骨外側を露出させ, 大腿骨骨幹中央部にエアードリルを用いて径 1mm の骨孔を作成した. 他の LEW ラットより黄色靱帯, アキレス腱, 筋組織 (腓腹筋), 脂肪組織の薄片を採取し, それぞれを 1 つの大腿骨につき 1 つずつ骨孔より髄腔内に挿入し閉創した. 1 週間後に大腿骨を摘出して直ちに固定, EDTA で脱灰後切片を作成, HE 染色, Elastica Van Gieson 染色, PAS 染色を施し顕微鏡で観察した.

C. 研究結果

1) コントロール群 (移植なし)

血腫はほとんど吸収され肉芽組織に置き換

わり、骨髄内には骨形成も認められる(図1).

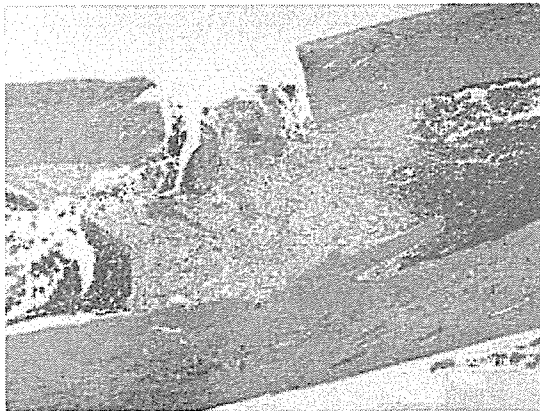


図1 コントロール例

2) 脂肪片の移植

移植した脂肪組織には周囲からの細胞浸潤はほとんどみられず、移植片は骨外に押し出されるように存在している。しかし骨髄内にはある程度の骨形成は認められる(図2).

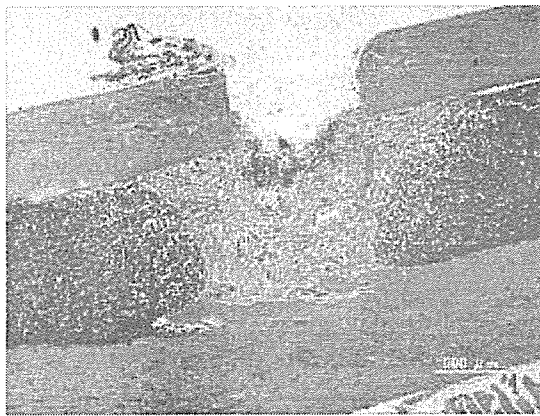


図2 脂肪片移植例

脂肪片は骨皮質に押しやられている。

3) 筋肉片移植

筋組織も脂肪組織と同様にほとんど細胞浸潤をうけることなく骨外に押し出されるように存在している。筋組織の周囲は肉芽様組織で覆われ深部には骨形成が認められる(図3).

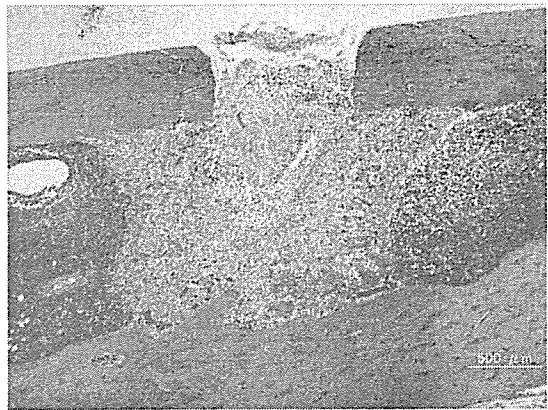


図3 筋組織移植例

筋組織は変化することなく皮質側に押しやられている。

さらに強拡大でみても筋細胞間、筋周膜には細胞浸潤はほとんどみられない。

4) アキレス腱移植

腱組織の周囲には細胞が集積している部位もあるが、コラーゲン線維間にはほとんど細胞浸潤は見られない(図4)。また骨形成もわずかである。

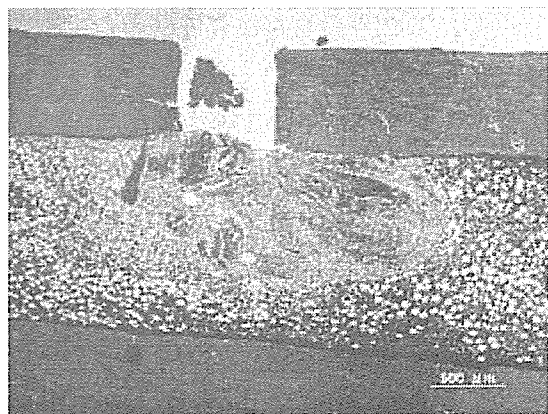


図4 アキレス腱移植例

腱の内部にはほとんど細胞の遊走は認められない。

5) 黄色靭帯の移植

一方、黄色靭帯移植例では、弾性線維間

に多数の細胞が浸潤し（図5）、あたかも弾性線維が取り込まれるように存在し、骨組織と一体化していた。



図5 黄色靭帯移植例

強拡大では弾性線維の周囲には良好な骨形成が認められた（図6）。

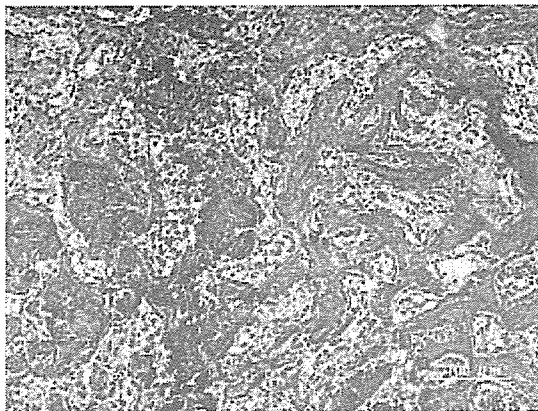


図6 黄色靭帯移植例

弾性線維は骨組織に取り囲まれるように存在している。

D. 考察

本実験結果から、脂肪組織や筋組織は細胞浸潤の起こりにくい環境であるのに対して、黄色靭帯すなわち脊柱靭帯は、骨髄細胞（間葉系細胞）の細胞遊走においては極めて至適な環境であると予想される。脂肪組織は脊椎外科領域でも癒着防止のために

用いられていることから、細胞外マトリックスの少ない環境は細胞移動には不適切な環境といえる。遊離筋組織も筋細胞間の筋内膜、筋周膜には線維芽細胞や結合組織が存在するにも関わらず細胞浸潤は起きにくい環境であると考えられる。

黄色靭帯は弾性線維とコラーゲン線維から構成される。しかしほとんどコラーゲンで構成されるアキレス腱は細胞遊走には不適切な環境であった。コラーゲン線維が密に存在すると細胞遊走には不向きな環境といえる。黄色靭帯においては、靭帯細胞が細胞死におちいるとその周囲のコラーゲンが減少し石灰化の起点になりやすいこと²⁾、OPLL ではすでに靭帯の構築学的変化が生じていること、などを考え合わせると、脊柱靭帯の特性、すなわちコラーゲンの変性や配列など靭帯の微細環境と骨化の関係についてさらなる検討が必要である。

しかし、なぜ健常生体では脊柱靭帯に骨化、すなわち細胞遊走が起きにくいのかという疑問が残る。健常者では脊柱靭帯は微小血管に乏しく、今回用いた骨埋没モデルは骨髄内という細胞成分が豊富で血管形成も豊富な組織であり、脊柱の enthesis とはかなり異なる環境である。よって今後は細胞接着や細胞遊走を阻止する因子、すなわち骨化を阻止する因子についての検討も必要となるであろう。

E. 結論

脊柱黄色靭帯の構造は間葉系細胞の遊走に適した環境である。今後も靭帯の微細構造の解明、細胞接着因子、細胞遊走因子の解明が重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Nakama S, Kikuchi M, Yashiro T, Sakamoto A, Kikkawa I, Saita K, Ookami H, Hoshino Y: 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) Nakama S, Ihara T, Sugamata M, Endo T, Ooyama M, Hoshino Y An ultrastructural study on the ligamentum flavum of the cervical spine in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Med Mol Morphol* 39(4): 198-202, 2006

3) 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, 菅又昌雄, 井原智美 脊椎靭帯細胞の細胞死に関する研究 - 後縦靭帯骨化症例における頸椎黄色靭帯の検討 - 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 脊柱靭帯骨化に関する調査研究 平成17年度総括・分担研究報告書(主任研究者 中村耕三): 57-59, 2006

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Zucker Fatty Rat アキレス腱培養細胞における骨化因子の検討

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】

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、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。今回、ZFR、MSG、NFR のアキレス腱細胞を単離培養し、細胞分化による形態変化と ALPase 活性を観察した。ラットのアキレス腱細胞は経代に伴い、骨芽細胞様に分化する可能性が示唆され、ZFR および MSG の ALPase 活性は NFR よりも高く、NFR の ALPase 活性も継代回数の増加に従い高くなる様子が観察された。この結果は加齢により全例にアキレス腱の骨化を認める *in vivo* の data と一致していた。

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靭帯骨化症との関与が指摘されている。具体的には脊柱靭帯骨化特に、OPLL における疫学的研究により発症患者は高率に耐糖能異常を合併するが、その重症度はインスリン非依存性糖尿病 (NIDDM) 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わかってきた¹⁾。そのような背景から、我々は、Zucker fatty rat (ZFR) 及び MSG 処置 Fa/Fa rat を使用し肥満環境下における後縦靭帯、靭帯付着部における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検討してきた^{2) 3)}。インスリンは強力な骨形成作用を有し、BMP などの骨形成因子は、高インスリン血症化、早期に骨化を来したが、MSG 処置 Rat の脊柱靭帯には、骨化は認めなかった^{4) 5)}。つまり、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 の脊柱靭帯部細胞における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-1 シグナルに何らかの影響を及ぼしているかと推測された。

今回、我々は、これら *in vivo* の結果を踏まえ、ZFR 並びに MSG 処置 Rat のアキレス腱、脊柱靭帯細胞を培養し、それぞれの細胞の起源に注目し、遺伝子発現の解析をすべく、現在進行中の実験経過について報告する。

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 群に、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 を皮下投与し視床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。後縦靭帯と同様に内軟骨骨化が見られるアキレ

ス腱を、摘出し Outgrowth 法により単離培養した。ZFR、MSG、NFR それぞれの細胞について同条件で継代培養を繰り返し、p=3、p=5 および p=8 において、細胞膜上の ALPase 活性を染色法により観察した。また、脊柱靭帯に関しても、培養中であるが、組織片が微小であることから、安定した細胞培養が行えていない。

(倫理的配慮)

東京医科大学動物実験指針にもとづき実験を行った。

C 結果

I, 表現型

ZFR はレプチンの受容体機能異常により、耐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)。

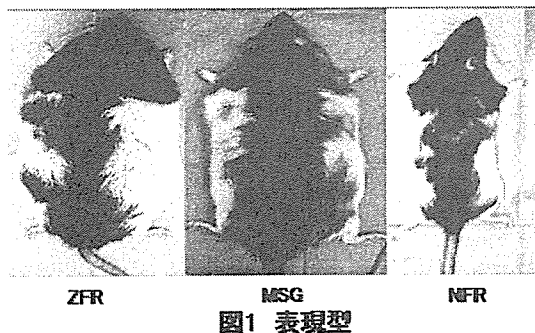


図1 表現型

II, 細胞培養

アキレス腱培養細胞は分裂能に富み、約 1 週間で Confluent に達した。細胞形状は紡錘形であった。p=3 においては何れの細胞も ALPase 活性ならびに石灰化を示さなかった。一方、p=5 においては ZFR および MSG において NFR よりも明らかに高い ALPase 活性(青色に染色)が認められた。p=8 においても ZFR および MSG の ALPase 活性は NFR よりも高いが、NFR の ALPase 活性も継代回数の増加に従い高くなる様子が観察された (図 2)。

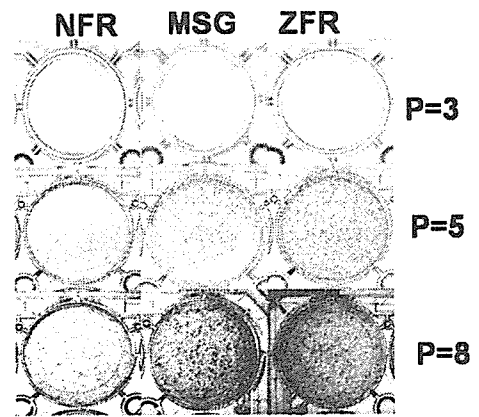


図2 アキレス腱細胞のALPase活性

D 考察

ラットのアキレス腱細胞は経代回数 (分裂回数) の増加に従い、骨芽細胞様に分化する可能性が示唆された。しかし、骨芽細胞であるか否かは、骨芽細胞のマーカー遺伝子 (オステオカルシン、cbfa1、Type I collagen など) の発現パターンを確認しなければ判定できず、今後の課題である。また、NFR よりも ZFR や MSG の方が早い段階で分化が進むように見られたが、今回は培養条件や継代の条件を統一して実験を行っているに過ぎず、分裂回数の違いなどは否定できない。この点を一致させることは理論的にも困難であることから、動物の例数を増やして検討を重ね、統計学的解析を行う必要がある。NFR においても ALPase 活性が徐々に出現してくるようであったが、渡辺らによると、NFR でも MSG や ZFR よりも遅いが、加齢により全例にアキレス腱の骨化を認めており、今回の結果は in vivo のデータと一致している可能性も示唆された⁶⁾。これら in vivo のデータと併せて今後例数を増やし、遺伝子発現パターンとともに解析して行く予定である。

E 結論

脊柱靭帯骨化モデルである Zucker Fatty Rat (ZFR) および MSG 処置 Rat アキレス腱を、摘出し単離培養した。ZFR および MSG の ALPase 活性は NFR よりも高かったが、NFR の ALPase 活性も継代回数の増加に従い高くなる傾向にあり、加齢により全例にアキレス腱の骨化を認める in vivo の結果と一致していた。

F 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

日本結合組織学会

関東整形災害外科学会

<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) 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

3) 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

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解析 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) 渡辺健：Zucker Fatty Rat アキレス腱における異所性石灰化形成に関する検討 東京医科大学雑誌 60 巻 1 号 29-39 2002

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

脊柱靱帯骨化と後期糖化産物(AGEs : Advanced Glycation End-Products) に関する研究

分担研究者 永田 見生 久留米大学整形外科教授

研究要旨 後期糖化産物 (AGEs)は糖尿病関連物質であり、代謝回転の遅い軟骨細胞や靱帯細胞などによく蓄積する。また、ヒト間葉系細胞や血管内皮細胞において、骨への分化を誘導するとの報告がある。その受容体である RAGE(AGEs レセプター)と結合することにより、様々な細胞応答が引き起こされる。そこで、今回我々は、臨床上、糖尿病との合併が高率に認められる後縦靱帯骨化症に着目し、AGEs との関連について検討した。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化症の原因については、糖尿病、物理的ストレス、遺伝との関連が報告されており、また、BMPs とその受容体の関連が示唆されている。しかし、靱帯骨化を起こすメカニズムは未だ明らかにされていない。後期糖化産物 (AGEs)は糖尿病関連物質であり、代謝回転の遅い軟骨細胞や靱帯細胞などによく蓄積する。また、ヒト間葉系細胞や血管内皮細胞において、骨への分化を誘導するとの報告がある。その受容体である RAGE(AGEs レセプター)と結合することにより、様々な細胞応答が引き起こされる。そこで、今回我々は、臨床上、糖尿病との合併が高率に認められる後縦靱帯骨化症に着目し、AGEs との関連について検討し、脊椎靱帯骨化の発症メカニズムとして、靱帯組織への AGEs の蓄積が、靱帯骨化へと導くのではないかと仮定した。

B. 研究方法

【方法】

(1)後縦靱帯骨化症患者より後縦靱帯組織を採取し、パラフィン切片を作成、抗 AGE 抗体、抗 RAGE 抗体にて免疫染色を行い、その局在

について検討した。(2)後縦靱帯骨化症患者より採取した黄色靱帯細胞を分離・単層培養し、1ug/ml 濃度の AGEs にて 6 日間刺激したのち、real-time PCR にて各遺伝子 ; BMP-2,-7(Bone morphogenetic protein-2, -7), Osteocalcin, Cbfa1 (an osteoblast-specific transcription factor), ALP (alkaline phosphatase)の発現量を半定量化し、比較検討した。

C. 研究結果

【結果】

(1)ヒト後縦靱帯組織および黄色靱帯組織の免疫染色にて、AGE の蓄積と RAGE の発現を認めた。(図1, 2) (2) 1ug/ml 濃度の AGEs 刺激により、ヒト黄色靱帯細胞の BMP-2,BMP-7, Cbfa1,Osteocalcin の遺伝子発現量は、137.1% (p<0.01)、172.7% (p<0.01)、135.3% (p<0.01)、172.4% (p<0.05)と有意差をもって増加した。(グラフ1, 2)

D. 考察

【考察】

今回の研究にて、(1)ヒト後縦靱帯組織に

AGE の蓄積と RAGE の発現を認めた。このことから AGEs は直接的に後縦靭帯組織に作用することが可能であると考えられる。(2)AGEs 刺激により、ヒト黄色靭帯細胞の BMP-2,BMP-7,Osteocalcin,Cbfa1 -mRNA の発現が優位に増加したことから、AGE は靭帯細胞に作用し、骨形成因子を介して、骨化を促進する事が示唆された。

E. 結論

- (1)ヒト後縦靭帯組織に AGEs の蓄積および RAGE の発現を認めた。
- (2)AGEs によりヒト黄色靭帯細胞の BMP-2,-7, Osteocalcin の発現が促進された。
- (3)AGEs により靭帯骨化が誘導される可能性が示唆され、今後更なる研究が必要である。

F. 研究発表

1.論文発表

Immunohistochemical Demonstration of Advanced Glycation End-Products (AGEs) and the Effects of AGEs in Ossified Ligament Tissues in vitro

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

2.学会発表

第 21 回日本整形外科学会基礎学術集会

第 35 回日本脊椎脊髄病学会

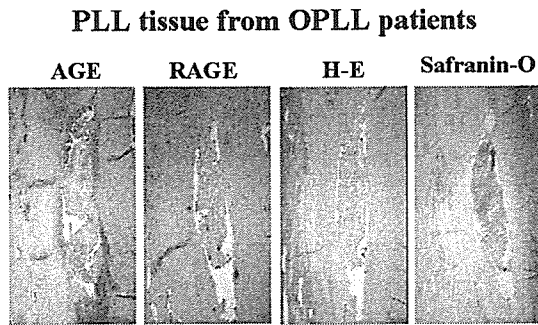
第 36 回日本脊椎脊髄病学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

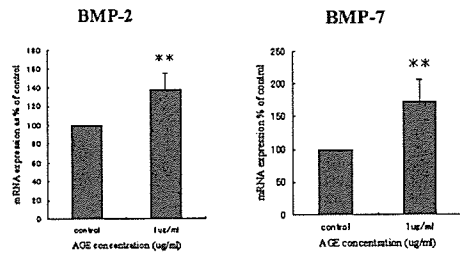
- 1.特許取得 なし
- 2.実用新案登録 なし
- 3.その他

(図 1)



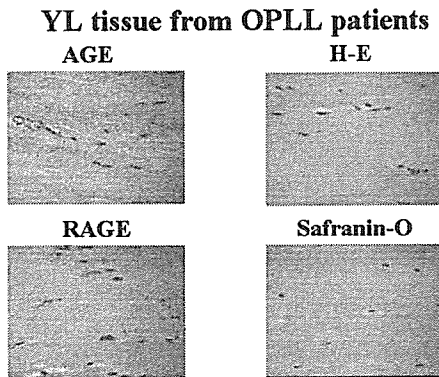
(グラフ 1)

Expression of mRNA
(by Real-time PCR)



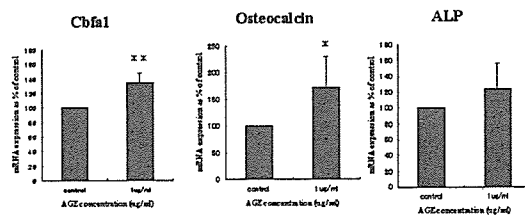
* : p < 0.05 N=5
** : p < 0.01

(図 2)



(グラフ 2)

Expression of mRNA
(by Real-time PCR)



* : p < 0.05 N=5
** : p < 0.01

脊柱靱帯骨化症に関する研究

分担研究者 阪本 桂造 昭和大学整形外科 教授

研究要旨：本年度は、脊柱靱帯骨化症の発生危険因子を探るため脊柱靱帯骨化を有する人のゲノム解析を実施するにあたり、昭和大学ゲノム委員会の承諾を得た上で、患者本人や同胞・家族にゲノム解析の必要性を説明し、了承を得た2組合計4名のゲノム解析を行うことができた。また当科で過去に取り扱った脊柱靱帯骨化症の患者さんたちに対して、本研究に協力していただけるよう外来診察来院時をお願いをしている。

A. 研究目的

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班（中村耕三主任研究者）の分担研究として脊柱靱帯骨化症の発生危険因子を解明するため、脊柱靱帯骨化症を有する患者・同胞のゲノム解析を行うことを本研究の最終目的とする。

B. 研究方法

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班の分担研究として脊柱靱帯骨化症を有する人の同胞・家族のゲノム解析を実施するにあたり、昭和大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会に研究申請を行い、同委員会の承認を得た上で、ゲノム解析を行う。

（倫理面への配慮）

分析は匿名化するが個人情報管理者は引き続き昭和大学整形外科医局長が就任している。

C. 研究結果

平成19年1月末現在において頰椎後縦靱帯骨化症を有する2名の患者とその同胞より検体の提供を得られた。もう一組は患者の検体は得られたものの同胞からの検体が未だ得られていない。

D. 考察

脊柱靱帯骨化症に限らずゲノム解析の重要性は理解できるが、ゲノムというかなり個人・家族の内面に立ち入った解析

となるため同意の取得が極めて困難で多くのゲノム解析は得られないと考えられる。

E. 結論

患者の同胞に患者と似たような症状を呈するものがないかを尋ねると、遠方のせいもあって最近疎遠で会っていないので分からないという返答が多かった。時間をかけ多くの後縦靱帯骨化症の患者に問いかけていかなければならないと考ええる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Sakamoto K, Nakamura T, Hagino H, Endo N, Mori S, Muto Y, Harada H, Nakano T, Ito i E, Yoshimura M, Norimatu H, Yamamoto H, Ochi T: Effects of unipedal standing balance exercise on the prevention of falls and hip fracture among clinically defined high-risk elderly individuals: a randomized controlled trial. J Orthop Science 2006; 11: 467-472.

阪本桂造、中村利孝、萩野 浩、遠藤直人、森 論史、武藤芳照、原田 敦、中野哲雄、井樋栄二、吉村光生、乗松尋道、山本博司、越智隆弘：片足起立訓練の転倒と大腿骨頸部骨折予防介入効果。日整会誌2006； 80:892-893.

萩野 浩、阪本桂造、中村利孝、遠藤直人：老人骨折の発生・治療・予後に関する全国調査（2003～2005年のまとめ）。日整会骨粗鬆症委員会報告書2006； 1-41.

阪本桂造：骨粗鬆症診療の新たな展開—長寿社会での診療に埋もれさせないために 骨粗鬆症の予防・非薬物療法：基礎治療としての生活習慣病の改善と疼痛管理 運動指導の目的と実施上の留意点—。カレントセラピー2006；24：788-791.

2. 学会発表

神與市、八木貴史、村島一平、平泉裕、阪本桂、宮岡英世：馬尾型腰部脊柱管狭窄症により尿閉をきたした2症例。第41回日本脊髄障害医学会、2006：169.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1996年（識別番号595005927）のみ。

2. 実用新案登録・3. その他はなし。

脊柱靱帯骨化症に関する研究

分担研究者 遠藤 直人 新潟大学整形外科教授

研究要旨 後縦靱帯骨化症の遺伝解析研究。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化症の遺伝子解析研究への資料提供。ならびに、後縦靱帯骨化症の治療法の有効性に関する調査への協力。

B. 研究方法

兄弟もしくは姉妹で後縦靱帯骨化症に罹患している患者さんに十分な説明を行った後に血液を採取し、共同研究機関である理化学研究所に送付する(倫理面での配慮)
新潟大学医学部遺伝子倫理診査委員会の承認を得、研究対象者に十分な説明を行った上で、同意書を得た。

C. 研究結果

現在のところ2家族の協力を得ることが決まり、それぞれ資料の作成や採血が始まっている。

D. 考察

今回は資料の提供だけのため、特別な考察はない。

E. 結論

共同研究として、遺伝子倫理委員会の承

認を受けた上で、研究対象者に研究に対する十分な説明を行い、同意書を得た上で資料採取、送付を行った。

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。)

1.特許取得

なし。

2.実用新案登録

なし。

3.その他

なし。

後縦靭帯骨化血清プロテオミクスからの特異的タンパク質の発見
 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

我々は、後縦靭帯骨化症患者血清のプロテオミクス Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization (SELDI) から、後縦靭帯骨化症に特異的なタンパク質を発見し、妥当性を統計学的に検証中である。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症の特異的発現タンパク質をプロテオミクスから見つけだし、その特異的タンパク質のアミノ酸解析と構造解析を行い、特異的タンパク質の阻害剤をデザインし、創薬プロテオミクスを完成させる。

B. 研究方法

この後縦靭帯骨化症のプロテオーム解析、ゲノム解析に関する研究は、久留米大学倫理委員会の承認を得ている。それに則り、後縦靭帯骨化症の患者へのインフォームドコンセントを行い、患者と担当医師の間で、その承諾を書面にて取り交わした。患者情報や患者組織及び血清は、米国 FDA バリデーションされた久留米大学個人識別情報管理室にて匿名化・バーコード化され、保存されたものである。

【目標症例数】臨床試験のデータの信頼性を高めるサンプルサイズ(95%検出力、両側有意水準 5%)の症例数を集め、統計学的に α エラー=0.1、 β エラー=0.1 を条件とした症例数では、骨化部位分類により各 46 症例以上

Differential display 法にて行った。後縦靭帯骨化症の血清は、採血方法、採血時間、血清分離条件など一定した手法を行った。健康者は画像診断において後縦靭帯骨化が見られない、健康診断の採血を採血方法、採血時間、血清分離条件など一定した手法で採取し保存した。将来、後縦靭帯骨化の予防薬となる創薬を作製することを目的としたために、低分子化合物の特異的タンパク質を探索する方法 SELDI (Surface-enhanced laser desorption/ionization) 法を選択した。チップ表面に固定した化学官能基や分子を利用し、試料中に存在している特定の性質を持つ分子をチップ上に捕捉、精製し、その後レーザー照射をすることで捕捉された分子の脱離、イオン化を行い TOF-MS を用いて質量分析の測定を行った。

血清成分中には数千種類のタンパク質が含まれているが、そのうち 22 種類のタンパク質が全体の 99% の存在量を占めている¹。そのため種々の高分子量タンパク質を除去する方法は、多くのペプチド成分をも除去していることになるため、血清中からターゲットタンパク質のみを抽出する北里法(特許)からアミノ酸解析、構造解析を行うことで、バイオインフォマテックスのみではなく、アミノ酸配列の解析が可能となった。

C. 研究結果

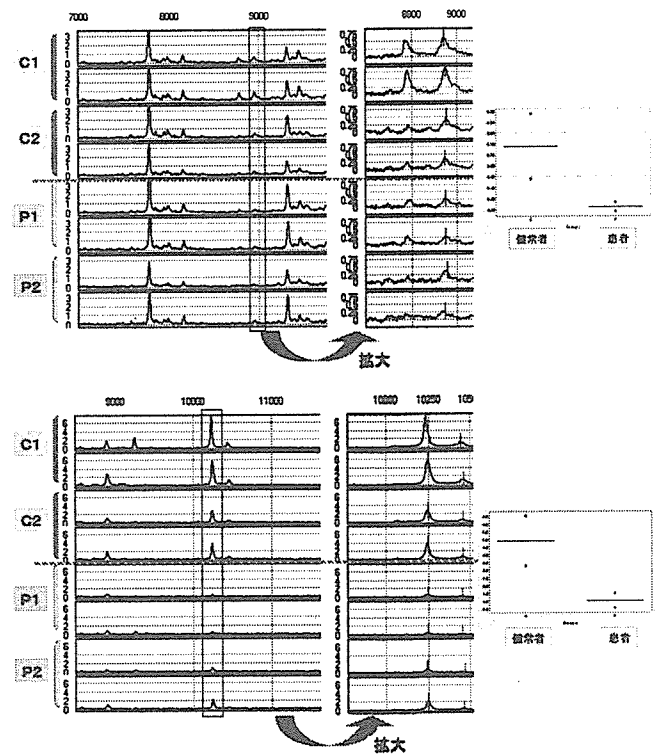


図1. 患者群の血清プロテオミクスにより、減少の
見られたピーク

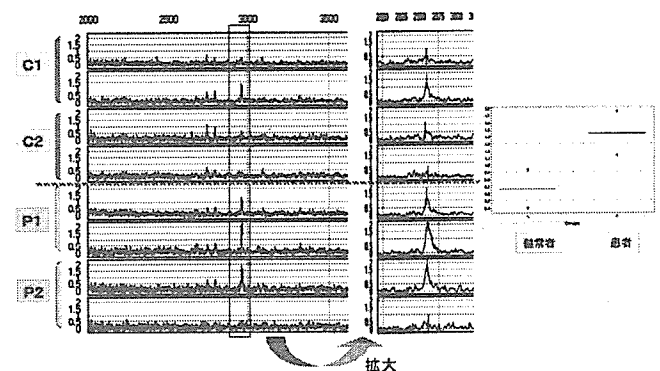


図2. 患者群の血清プロテオミクスにより、増加の
見られたピーク