

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究年度終了報告書

多施設研究

頸椎後縦靭帯骨化症患者における神経症状発現予測に関する研究

-画像以外の因子を中心として-

研究分担者	松永俊二	今給黎総合病院副院長
	戸山芳昭	慶応義塾大学医学部整形外科教授
	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教授

研究要旨 頸椎後縦靭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行った。本研究班の全班員に調査用紙を郵送し 14 施設からデータを入力し解析した。全国 14 医療施設から 156 例の症例の調査用紙が回収された。昨年度までは主にレントゲン撮影、CT、MRI 撮影の画像情報について検討したが本年度は画像以外の因子を加えて再度検討した。多因子解析の結果では 60%以上の靭帯骨化による脊柱管狭窄、頸椎可動域、CT 撮影による骨化の形状などの画像因子に加えて外傷と追跡期間が関係する因子として重要であることがわかった。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者における脊髄症状発現の機序は解明されてはいない。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次元的な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。そのため頸椎後縦靭帯骨化を発見した際にその患者が将来において神経症状を発症するか否かを予測することは難しい。本研究班における昨年までの多施設横断的研究の結果では OPLL 患者における脊髄症状発現予測に有用な画像的因子を見出すことができたが今回は画像以外の因子の関与につ

いても検討したので報告する。

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全班員の研究施設に配布した。研究対象のエントリー基準は以下とした。

1. 頸椎に後縦靭帯骨化を認める
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

下記の全国 14 医療施設から 156 名の頸椎 OPLL 患者(男性 104 名、女性 52 名)の調査用紙を回収することができた。

【研究参加施設】

弘前大学医学部整形外科
東京大学医学部整形外科
杏林大学医学部整形外科
日本大学医学部整形外科

東京医科大学整形外科
 東京女子医科大学整形外科
 名古屋大学医学部整形外科
 金沢大学医学部整形外科
 福井大学整形外科
 大阪大学医学部整形外科
 和歌山大学医学部整形外科
 山口大学医学部整形外科
 高知大学医学部整形外科
 鹿児島大学医学部整形外科 (順不同)

調査用紙とともに患者の単純レントゲン写真、CT、MRIの画像を回収して解析した。OPLLの骨化型は連続型が55例、混合型が56例、分節型が45例であった。脊髄症状の有無と画像所見および外傷の有無、初診時年齢、性別、追跡期間、全身的合併症との関係を調べた。

(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

初診時に既に90名の患者が脊髄症状を呈していた。経過観察中の新たに脊髄症状が出現した症例が6例あった。残りの60例の患者は経過観察期間には脊髄症状を発現することはなかった。初診時の単純レントゲン写真で最大脊柱管狭窄率が60%以上の患者が39例あったが全員初診時あるいは経過観察中に脊髄症状を発現していた。残りの最大脊柱管狭窄率が60%未満の患者117名においては57名(49%)に脊髄症状が発現していた。脊髄症状発現群(57名)と非発現群(60名)では単純レントゲン写真における頸椎可動域が有意

に脊髄症状発現群で大きかった。CTもしくはMRIで横断面における靭帯骨化を観察すると骨化が中央に位置するもの(中央型)と片側に偏倚しているもの(偏倚型)に分類できた。最大脊柱管狭窄率が60%以上では両型とも脊髄症状を発現していたが最大脊柱管狭窄率が60%未満では中央型が55例中16例(29%)に脊髄症状が認められたのに対して偏倚型では62例中41例(66%)と有意に脊髄症状が発現していた。経過観察中に頸椎への外傷の既往を認めた患者が35例あったが15例にその外傷を誘因として脊髄症状が発現していた。外傷例では脊髄症状発現と非発現に最大脊柱管狭窄率には有意差を認めることが出来なかったが15例中13例は混合型骨化であった。多因子解析の結果では最大脊柱管狭窄率、頸椎可動域、CTでの骨化形態の画像因子に加えて外傷の有無、追跡期間が有意な因子であることがわかった(表1)。

表1 神経症状発現に関する multivariate logistic regression analysis

factor	Odd比	95%CI
SAC	6.2	5.9-6.8
ROM	3.8	2.2-6.8
lateral deviated OPLL	3.5	2.4-5.2
頸部の外傷歴	2.9	1.9-3.7
初診時年齢	1.5	0.8-2.9
性別	1.3	0.8-3.2
追跡期間	2.1	1.7-5.5
全身的合併症	1.4	0.9-6.9

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。

昨年までの調査では靭帯骨化による最大脊柱管狭窄率が60%以上の患者では全て脊髄症状を発現しており静的圧迫の許容限界と考えられる。しかし、最大脊柱管狭窄率が60%未満の場合はむしろ頸椎可動域や脊椎横断面における骨化のパターンなど最大脊柱管狭窄率以外の関与が重要になっていると考えられた。今回画像以外の因子を含めて多因子解析を行った結果では画像因子に加えて外傷の有無と追跡期間が重要であるという結果がえられた。頸椎後縦靭帯骨化症患者における神経症状発現予測については画像因子に加えて外傷などに注意しながら追跡してゆくことが重要であると考えている。

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神経症状発現の予測につながる画像所見について知見を得た。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsunaga S, Nakamura K, Seichi A, Yokoyama T, Toh S, Ichimura S, Satomi K, Endo K, Yamamoto K, Kato Y, Ito T, Tokuhashi Y, Uchida K, Baba H, Kawahara N, Tomita K, Matsuyama Y, Ishiguro N, Iwasaki M, Yoshikawa H, Yonenobu K, Kawakami M, Yoshida M, Inoue S, Tani T, Kaneko K, Taguchi T, Imakiire T, Komiya S. Radiographic predictors for the development of myelopathy in patients with ossification of the posterior

longitudinal ligament. a multicenter cohort study
Spine 33: 2648-2650, 2008

- 2) Matsunaga S, Koga H, Kawabata N, Kawamura I, Otsuji M, Imakiire T, Komiya S. Ossification of the posterior longitudinal ligament in dizygotic twins with schizophrenia: a case report Modern Rheumatology 18: 277-280, 2008
- 3) 松永俊二、古賀公明、川畑直也、河村一郎、今給黎尚典、小宮節郎 特集：整形外科基礎研究のUp to Date 加齢に伴う頸椎椎間板変性の基礎と臨床 関節外科 基礎と臨床 27: 55-61, 2008
- 4) 鮫島浩司、川内義久、楊昌樹、松永俊二、古賀公明、川畑直也、湯浅伸也、小宮節郎 脊椎感染症に対して高気圧酸素療法を併用した治療経験 西日本脊椎研究会誌 34: 33-34, 2008
- 5) 松永俊二 多施設研究・頸椎後縦靭帯骨化症における神経症状発現の画像的予測因子に関する研究 厚生労働省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班平成19年度総括・分担研究報告書 13-16, 2008
- 6) 松永俊二 患者立脚型観点からみたリウマチ頸椎手術成績の評価に関する研究 厚生労働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 リウマチ頸椎病変の治療に関するエビデンス形成のための体制確立と技術開発平成19年度研究報告書 第1冊分189-191, 2008
- 7) 松永俊二 患者立脚型観点からみたリウマチ頸椎手術成績の評価に関する研究 厚生労働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 リウマチ頸椎病変の治療に関するエビデンス形成のための体制確立と技術開発 平成19年度総括・分担研究報告書 9-11, 2008

- 8) 松永俊二 医学研究雑感 整形外科 59: 268, 2008
- 9) 松永俊二 整形外科における生体内医療材料の安全な取り扱い 脊椎脊髄ジャーナル 21: 963-964, 2008
2. 学会発表
- 1) Matsunaga S, Koga H, Kawabata N, Imakiire T, Nakamura, Ijiri K, Komiya S
A multi-center cohort study for pathomechanism of development of myelopathy in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament
Spine Week 2008 Geneva, Switzerland
2008/5/27
- 2) 松永俊二、古賀公明、川畑直也、河村一郎、入來順一郎、今給黎尚典、井尻幸成、小宮節郎 演題腹部大動脈瘤診断における整形外科医の重要性—医療訴訟防止のための提言
第81回日本整形外科学会学術総会 札幌
2008/5/22
- 3) 松永俊二、中村耕三、古賀公明、川畑直也、今給黎尚典、井尻幸成、小宮節郎 頸椎後縦靭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 第37回日本脊椎脊髄病学会 東京 2008/4/25
- 4) 松永俊二、小宮節郎、砂原伸彦 統合失調患者における頸椎後縦靭帯骨化の頻度に関する調査 第52回日本リウマチ学会総会 東京
2008/4/22
- 5) 廣田仁志、永田政仁、松永俊二、井尻幸成、米 和徳、小宮節郎、古賀公明 小児腰椎脱臼骨折の一例 第115回西日本整形災害外科学会 小倉 2008/6/14
- 6) 上菫直弘、武富栄二、古賀公明、竹之内剛、川畑直也、恒吉康弘、砂原伸彦、松永俊二、小宮節郎 環軸関節脱臼に対してtranslaminar screw を用い後頭頸椎固定術を行った2症例 第115回西日本整形災害外科学会 小倉
2008/6/14
- 7) 山元拓哉、井尻幸成、永吉隆作、前田淑美、竹之内剛、坂本 光、河村一郎、小宮節郎、松永俊二 側彎症手術におけるfluorovision下胸椎pedicle screw設置のCT評価
第42回日本側彎症学会 奈良 2008/10/10
- 8) 松永俊二 小児ダウン症患者における上位頸椎病変の重要性 第19回日本小児整形外科学会 東京 2008/12/12
- 9) 松永俊二、小宮節郎 頸椎後縦靭帯骨化症における神経症状発現に関する大規模横断調査—経過報告と今後の展望—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
平成19年度 第2回班会議 東京 2008/6/13
- 10) 松永俊二、小宮節郎 頸椎後縦靭帯骨化症における神経症状発現に関する研究—画像以外の因子についての検討—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
平成19年度 第2回班会議 東京 2008/6/13
- 11) 松永俊二 頸椎後縦靭帯骨化症における脊髄症状発症の機序 第7回京都鴨川脊椎手術研究会 京都 2008/6/21
- 12) 松永俊二 OPLL研究の観点からみた脊椎外科医としてのの提言 第3回神戸脊椎外科カンファレンスセミナー 神戸 2008/11/29
- 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。

脊柱靭帯骨化症の痛み・しびれと関連する因子

研究分担者 竹下克志¹⁾、藤原奈佳子²⁾、中村耕三¹⁾

1) 東京大学整形外科、2) 愛知きわみ看護短期大学

研究要旨 OPLL における痛みやしびれを班内多施設調査により調査した。調査票の回収は 387 件であった。さらに骨化巣の特徴、治療経過ならびに QOL 評価、心理的評価との関連を解析した。相関のある因子は胸椎・腰椎骨化、MRI での T2 強調での高輝度変化、しびれの罹病期間、QOL とストレス状態、体の硬さであった。

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。今回は痛みやしびれに関連する因子を検討した。

B. 研究方法

調査期間は平成 18 年 7 月より平成 19 年 11 月 30 日で、対象は各施設に受診した外来患者で頸椎後縦靭帯骨化症あるいは頸椎症性脊髄症を中心とし、健常者を加えた計 387 例から回答を得た。OPLL 保存治療（以下 OPLL 保存群）80 例、OPLL 手術治療（以下 OPLL 手術群）104 例、頸椎症性脊髄症保存治療 53 例、頸椎症性脊髄症手術治療 69 例、健常者 44 例で、男性が 268 例(69%)、平均年齢は 64 歳であった。今回の解析には OPLL 保存群と OPLL 手術群を用いた。

今回の解析に用いた項目は以下の通りである。病歴としてはしびれの出現時期、麻痺の出現時期、手術例では頸椎前方あるいは後方手術のいずれかを尋ねた。骨化の画像所見とし

ては胸椎・腰椎骨化の有無、脊柱管前後径、頸椎 OPLL 骨化巣の範囲、MRI における T2 強調画像での高輝度の頭尾方向への長さを調べた。痛みとしびれの評価として痛みとしびれを別個に身体部位ごとに Numerical Rating Scale で尋ね、全体の痛み評価として Chronic Pain Grade における痛みの強さ Pain Intensity を尋ねた。機能・QOL の評価では神経障害は日整会頸髄症治療成績判定基準(旧 17 点法)、頸部脊髄症評価質問票(JOACMEQ)、全体的 QOL 評価として SF-8、さらに体の硬さとして前屈時指床間距離を質問票化した Self-Assessment Bending Scale(SABS)を選択した。また心理評価として日本語版 POMS 短縮版を使用した。さらに現状の満足度として「現在の体の状態で残りの人生を過ごすとしたらどう思われますか」と尋ね、(1)非常に不満、(2)少し不満、(3)どちらでもない、(4)少し満足、(5)非常に満足の 5 段階評価での回答を求めた。

痛み・しびれを代表する指数としてそれぞれの頸部・頭部・背部・上肢・腰部・下肢の身体部位別 NRS、痛み強さ Pain intensity を目的変数として、他の調査項目との相関関係(Pearson, Spearman)を算出した。

(倫理面での配慮)

研究への参加は任意であること、不参加の場合も不利益を受けないこと、同意後の随時撤回が可能であること、匿名であることなどに留意し、東京大学(平成18年2月13日)および名古屋市立大学(平成18年9月5日)の研究倫理審査委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

調査項目の結果については昨年度の藤原らの報告を参照されたい。追加報告としてMRIにおけるT2強調画像での高輝度はOPLL保存群38.6%、OPLL手術群62.5%で、高輝度椎体数はそれぞれ1.8椎体(1-5)、1.8椎体(1-4)であった。しびれの罹患年数はOPLL保存群で 6.6 ± 5.8 年(最長23年)、OPLL手術群で 10.4 ± 7.6 年(1-43年)、手術までの罹患年数 3.5 ± 4.7 年(最長20年)であった。痛みの強さPain IntensityはOPLL保存群で 4.45 ± 3.01 (0-9.33)、OPLL手術群で 4.27 ± 3.01 (0-10)であった。

[OPLL保存群における痛み・しびれと関連の大きい因子]

画像所見では胸胸椎骨化が腰部の痛み(相関係数0.361; $p=0.019$)と、固有脊柱管前後径が頭部・上肢・腰部の痛み(-0.273 ; $p=0.037$, -0.272 ; $p=0.035$, -0.266 ; $p=0.04$)、下肢のしびれ(-0.275 ; $p=0.034$)と、T2高輝度の頭尾方向の長さが頸部・頭部の痛み(-0.352 ; $p=0.009$, -0.328 ; $p=0.016$)と関連があった。

病歴・手術法ではしびれの罹病期間が頸部・頭部・上肢の痛み(0.310; $p=0.020$, 0.349; $p=0.009$, 0.389; $p=0.003$)、背部・腰部のしびれ(0.396; $p=0.003$, 0.301; $p=0.027$)と関連があったが、麻痺の罹病期間と関連はなかった。

QOL・心理ではほとんどのQOLに関連があ

ったが、特にSF-8とJOACMEQとは相関が強かった。ストレス評価のPOMS短縮版では緊張・不安と疲労(表1)が強く関連していた。体の硬さでは頸部・下肢の痛み(-0.371 ; $p=0.004$, -0.262 ; $p=0.047$)、頭部のしびれ(-0.286 ; $p=0.034$)と相関があった。

現状に対する満足度とは頸椎・背部・腰部・下肢の痛み(-0.371 ; $p=0.004$, -0.285 ; $p=0.033$, -0.343 ; $p=0.009$, -0.341 ; $p=0.010$)や腰部・下肢のしびれ(-0.386 ; $p=0.004$, -0.298 ; $p=0.024$)と相関があった。

[OPLL手術群における痛み・しびれと関連の大きい因子]

画像所見では胸胸椎骨化が下肢のしびれ(0.332; $p=0.003$)と、T2高輝度の頭尾方向の長さが頭部・上肢・腰部のしびれ(0.268; $p=0.014$, 0.321; $p=0.003$, 0.223; $p=0.044$)と関連があった。

病歴・手術法ではしびれの手術までの罹病期間が腰部痛みとPain Intensity(0.219; $p=0.045$, 0.242; $p=0.025$)に関連があったが、麻痺の手術までの罹病期間と関連はなかった。頸椎手術の前方と後方では有意ではなかったが、前方手術が上肢の痛みが少ない傾向であった($p=0.1$)。

QOL・心理ではJOACMEQの頸椎機能を除くほとんどのQOLとストレス評価に強い相関があった。体の硬さは痛みよりもしびれに相関が強かった。(表2)

現状に対する満足度とは特に頸椎と上肢の痛み(-0.471 ; $p=0.000$, -0.442 ; $p=0.000$)と相関があった。(図1)

D. 考察

痛みやしびれに関連の大きい因子として画像所見では胸椎・腰椎骨化、MRIでのT2高輝

度、しびれの罹病期間などがあつた。またQOLやストレスには多くの項目に強い相関が見られた。また今回の検討では体の硬さも特にしびれに関連があることがわかつた。

腰痛に対する心理的要因の関与はよく知られているが、神経圧迫性疾患であるOPLLにおいても同様なアプローチが必要であろう。また体の硬さに対する介入も検討する余地があると思われる。

E. 結論

OPLLにおける痛みとしびれには骨化巢の神経組織への圧迫、QOLの状態や心理的ストレス、さらに体の硬さが関連していた。

本研究にご協力いただきました各班員の先生方とアンケートに回答くださった方々に深謝いたします。

F. 研究発表

1. 論文発表

竹下克志、藤原奈佳子、星地亜都司、川口浩、中村耕三. 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. 厚生労働省特定疾患対策研究平成18年度研究報告書 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 2007:24-25.

藤原奈佳子、竹下克志、川口浩、中村耕三. 後縦靭帯骨化症の痛みとしびれの実態と痛みに影響する要因. 厚生労働省特定疾患対策研究平成19年度研究報告書 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 2008:17-38.

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

V. 分担研究年度終了報告書

後縦靭帯骨化症のゲノム全域 アソシエーション・スタディに関する研究

研究分担者 井ノ上 逸朗 東海大学医学部基礎医学系 教授

研究要旨 多因子疾患の感受性遺伝子同定において従来は連鎖解析が主流であったが、最近ではゲノム全域アソシエーション・スタディ(GWAS)は一般的になりつつある。本研究において後縦靭帯骨化症でのゲノム全域アソシエーション・スタディの可能性について脳動脈瘤での解析をモデルとして検討してみたい。後縦靭帯骨化症では罹患同胞対連鎖解析による疾患遺伝子同定が試みられてきたが、頻度が高く遺伝背景の強い疾患なので、アソシエーション・スタディも検討課題と考えられる。そこで、すでにタイピングされた脳動脈瘤検体データを用い、後縦靭帯骨化症でもゲノム全域スキャンにより疾患遺伝子同定が可能か、必要な検体数、またかかるコストについて試算を試みた。報告されたデータを総合すると、後縦靭帯骨化症は脳動脈瘤の2倍ほど強い遺伝背景を有すると考えられる。そこで、脳動脈瘤解析で得られたデータを基に、検定力の推定をおこなった。脳動脈瘤300例で $P=10^{-6}$ ほどのSNPが同定できているので、同数の検体数で genotypic relative risk が同定可能と推定され、後縦靭帯骨化症でゲノム全域アソシエーション・スタディをおこなう十分な根拠となると考えられた。

A. 研究目的

この1-2年で多くの疾患の感受性多型がゲノム全域アソシエーション・スタディ(GWAS)により続々と同定されるようになった。GWASは疾患遺伝子同定法としてすっかりスタンダードとなった感がある。このような中、整形外科に関連する骨系統疾患でも遺伝子解析が盛んにおこなれ成果があがっている。当然、後縦靭帯骨化症(OPLL)の遺伝解析についても新たな戦略が必要となっている。遺伝要因の関与の比較的強い疾患なので、どのような遺伝子が関与しているかを明らかにすることが、成因解明の大きな手がかりとなるだろう。

B. 研究方法

研究班において未だ現実には遂行予定にはないが、後縦靭帯骨化症でのゲノム全域アソシエーション・スタディ今後の大きな検討課題であろう。本研究では simulation study として、脳動脈瘤研究で得られた遺伝子タイピングデータから後縦靭帯骨化症感受性遺伝子同定の可能性を検討する。ゲノム全域タイピングのプラットフォームは Illumina Hap300-duo を用いた。これにより 316,237 SNP のタイピングが可能となっている。統計遺伝解析は主に PLINK (Purcell, AJHG 2006) を用いており、必要に応じて統計解析ソフト R などと組み合わせて解析する。集団階層の検討は主成分分析をベースとした EIGENSTRAT と多次元尺度構成法(MDS)を用いた。検出力の算出には Genetic

Power Calculator を用いた。

(倫理面での配慮)

今回は後縦靭帯骨化症検体の遺伝子タイピングはおこなっていないが、東京大学医科学研究所倫理審査委員会にて倫理承認は得ている。脳動脈瘤に関しては東海大学医学部医の倫理委員会にてすでに承認されている。

C. 研究結果

OPLLの遺伝要因の強さは同胞間の罹患頻度と一般頻度の比で表わされ、10程度と見積もられている。脳動脈瘤が4程度なのでOPLL遺伝背景が強いことが予想できる。また脳動脈瘤との比較で検出力の算出も可能である。アソシエーション・スタディにおける検出力の評価には genotypic relative risk が用いられる。簡単のため脳動脈瘤の2倍として OPLL での検出力を検討する。遺伝背景の強さは Genotypic relative risk で表され、脳動脈瘤感受性SNPの場合、1.5 前後と推定した。患者300例と対照200例のアソシエーション・スタディにより、P value で 10^{-6} を切る SNP は8か所だった。ただしゲノム全域アソシエーション・スタディの閾値とされるより 10^{-7} より強い感受性多型は同定できていない。実際に、GRR=1.6 での検出力は60%程度と算出されている。後縦靭帯骨化症は脳動脈瘤の2倍の遺伝背景なので、GRR=2 とすると現検体数で検出力は80%を超えている。すなわち300例程度の検体数である程度強い遺伝要因の検出は十分解析可能といえる。現実には弱い遺伝要因の同定も必要なので、検体数は少なくとも600例は必要と試算しているのではなかろうか。

理研データベースでは Illumina platform でタイピングされた900人のコントロールデータが公開されている。残念ながら個人の遺伝型は不明なため、データのフィルタリングはでき

ないと欠点はあるが、検体数の多さにより検出力が増加する。データベースコントロールを用いることにより、日本人集団でより高い検出力を得ることができ、感受性遺伝子同定の可能性が高くなる。

また Illumina Hap350 duo だと1検体あたり6万円程度でタイピングでき、コントロールデータベースを用いることも可能なので、3,600 万円程度の研究費でゲノム全域第一次スキャンが可能である。

D. 考察

これまで多因子疾患の遺伝解析は罹患同胞対連鎖解析法により遺伝子座を決定し、そこからのポジショナル・クローニングが一般的だった。後縦靭帯骨化症でもすでに本手法が成果をあげてきたことは周知であろう。また現在、罹患同胞の収集が進行中で、目標数の確保ができれば新たな知見が得られることが期待される。こゲノム全域で30-50万 SNP を同時にタイピングするプラットフォームができ、アソシエーション・スタディの重要性が高まってきた。実際に多くの感受性遺伝子同定の報告が一流誌でなされているよう、ゲノム全域アソシエーション・スタディは非常に有力な手法である。脳動脈瘤においても成功を収めることができた手法であり、OPLL でも十二分に可能と考えられる。

E. 結論

後縦靭帯骨化症の感受性遺伝子同定法のひとつとして、ゲノム全域アソシエーション・スタディがひとつの選択肢となりうることを示すことができた。

F. 研究発表

1.論文発表

1. Bilguvar K, Yasuno K, Niemela M, Ruigrok YM, Fraunberg M, Duijn CM, Berg LH, Mane S, Mason C, Choi M, Gaaal E, Bayri Y, Kolb L, Arlier Z, Ravuri S, Ronkainen A, Tajima A, Laakso A, Hata A, Kasuya H, Koivisto T, Rinne J, Ohman J, Breteler MMB, Wijmenga C, State MW, Rinkel GJE, Hernesniemi J, Jaaskelainen JE, Palotie A, Inoue I, Lifton RP, Gunel M. Susceptibility loci for intracranial aneurysm in Europe and Japanese populations. *Nat Genet* 40, 1472-1477, 2008.
2. Nishida N, Koike A, Tajima A, Ogasawara Y, Ishibashi Y, Uehara Y, Inoue I, Tokunaga K. Evaluating the performance of Affymetrix SNP Array 6.0 platform with 400 Japanese individuals. *BMC Genomics* 9, 431, 2008.
3. Kimura T, Kobayashi T, Munkhbat B, Oyungerel G, Bilegtsaikhan T, Anar D, Jambaldorj J, Munkhsaikhan S, Munkhtuvshin N, Hayashi H, Oka A, Inoue I, Inoko H. Genome-wide association analysis with selective genotyping identifies candidate loci for adult height at 8q21.13 and 15q22.33-q23 in Mongolians. *Hum Genet* 123, 655-660, 2008.

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

頸椎後縦靭帯骨化症の経年的三次元評価に関する研究

研究分担者 遠藤 直人 新潟大学整形外科教授

研究要旨 頸椎後縦靭帯骨化症例の CT 撮影を行いその DICOM データをコンピューター上で三次元画像に再構成した。期間において撮影した二回の骨化の画像を比較し、骨化が経時的にその長さや体積を増していることを確認することが可能であった。

A. 研究目的

頸椎後縦靭帯骨化症例において骨化の増大を 3 次元的に調査する。

B. 研究方法

頸椎後縦靭帯骨化症患者の CT 撮影を期間において 2 回行う。その DICOM データをコンピューターに取込み、骨化のみを三次元画像として取り出し、骨化の大きさを三次元的に比較する。

（倫理面での配慮）

研究について説明し同意を得る。

C. 研究結果

骨化巣を椎骨から切り離して三次元画像として画像化することが可能であった。2 回の CT 画像を比較し、骨化巣がその長さおよび体積が増大していることを数値化することが可能であった。

D. 考察

いままで靭帯骨化の増大については 2 次元での評価が主に行われてきている。この方法を用いることにより、骨化の増大の三次元での評価が可能になる。

E. 結論

頸椎後縦靭帯骨化の CT 画像を利用して、その三次元評価を行った。期間において撮影した 2 回の画像を比較しその増大を確認可能であった。

F. 研究発表

1.論文発表

なし。

2.学会発表

脊柱靭帯骨化症に関する調査研究平成 20 年度第 2 回班会議

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

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。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究年度終了報告書

脊柱靱帯の異所性骨化における Runx2 の役割の RNAi による解析

研究分担者 藤 哲 弘前大学整形外科教授

研究要旨 脊柱後縦靱帯骨化症（OPLL）患者由来の脊柱靱帯細胞では、骨化誘導刺激により Runx2 の発現が上昇することをすでに報告している。我々は Runx2 により調節される遺伝子を明らかにするために、骨化誘導培地にて OPLL 患者由来の脊柱靱帯細胞を培養し、Runx2 の発現上昇を確認した後、siRNA を用いて Runx2 の発現を抑制し、DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、骨化誘導により connective tissue growth factor (CTGF) や cartilage oligomeric matrix protein (COMP) のような軟骨形成因子に加えて、血管形成関連遺伝子である angiopoietin 1 (AP-1) の発現が上昇していた。骨化誘導による AP-1 の発現上昇は Runx2 の siRNA により抑制されたが、Runx2 の発現は AP-1 の siRNA で抑制されなかった。このことより、AP-1 は Runx2 により調節される遺伝子であると考えられた。また、Runx2 と AP-1 の両方を siRNA で knockdown すると、aggrecan-1 の発現は完全に抑制された。これらの結果より、AP-1 が異所性骨化に重要な役割を担っていることが考えられた。

A. 研究目的

以前に Core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) として知られていた Runx2 は、骨芽細胞の分化に重要な役割を担う、Runx ファミリー遺伝子に属する転写因子である。我々は脊柱後縦靱帯骨化症患者由来の脊柱靱帯細胞で、この Runx2 の発現が上昇することをすでに報告してきた(1)。本研究では、Runx2 と異所性骨化の関連を明らかにするために、Runx2 遺伝子を RNAi によりノックアウトし、発現変化の生じた遺伝子のプロファイリングを DNA マイクロアレイにより行い、Runx2 により調節され、異所性骨化に関与する遺伝子について検討することを目的とした。

B. 研究方法

1. ヒト脊柱靱帯細胞の単離と培養

弘前大学医学部倫理委員会の承認を得て、術前の患者およびその家族に対する十分なインフォームドコンセントの下、術中に摘出した OPLL 患者、非 OPLL 患者由来の脊柱靱帯組織から骨化部分を除去し、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。本研究には、6 名（男性 5 名、女性 1 名、平均年齢 61.2 歳）の OPLL 患者由来の細胞（OPLL 細胞）と、コントロールとして 6 名（男性 5 名、女性 1 名、平均年齢 63.0 歳）の頸椎症性脊髄症患者由来の細胞（non-OPLL 細胞）を用いた。

2. 培養細胞の total RNA 抽出

継代 5 代目の脊柱靱帯細胞がコンフルエントに達した後、骨化誘導培地（DMEM +10% FBS + 10⁻⁷M dexamethasone）を加えて 48 時間培養した群（骨化誘導群）と通常培地

(DMEM+10% FBS)にて48時間培養を行った群(通常培養群)とに分け、それぞれの細胞からtotal RNAを抽出した。

3. real-time RT-PCR

OPLL細胞、non-OPLL細胞における、Runx2、alkaline phosphatase (ALP)、angiopoietin-1 (AP-1)、Vascular endothelial growth factor A (VEGF A)、collagen-2a1 (COL2a1)、aggrecan-1の各mRNAの発現比をreal-time RT-PCR法で測定した。

4. RNA interference

OPLL細胞、non-OPLL細胞、実験用ヒト骨芽細胞に対して、Runx2とAP-1に対するsiRNAを行った。

5. DNA マイクロアレイ

500 ngのtotal RNAサンプルから逆転写反応によりcDNAを作成し、cRNA合成のテンプレートとして使用した。cyanine 3-CTP (Cy3)またはcyanine 5-CTP (Cy5)で蛍光標識したcRNAをIn Situ Human 1A ver.2 Oligonucleotide DNA microarray kitとハイブリダイズした。アレイを、次に示すcRNAとハイブリダイズした: Array 1;骨化誘導しないnon-OPLL細胞と48時間骨化誘導したnon-OPLL細胞。Array 2(OPLL);48時間骨化誘導したOPLL細胞と骨化誘導しないOPLL細胞。Array 3(RNAi OPLL):48時間骨化誘導したOPLL細胞とsiRNA 24時間処理後に48時間骨化誘導を行ったOPLL細胞。

C. 研究結果

1. 骨化誘導またはsiRNAによるOPLL細胞のRunx2発現の変化

骨化誘導群のOPLL細胞ではRunx2およびALPのmRNAの発現が上昇した。また、OPLL細胞に対するRunx2のsiRNAにより、これらの

mRNAの発現レベルは、通常培地群のOPLL細胞と同等のレベルに抑えられた。

2. OPLL細胞の骨化誘導後、siRNA後のオリゴヌクレオチドDNA マイクロアレイ解析

22,575種類のヒト遺伝子を反映するオリゴヌクレオチドDNA マイクロアレイを用いて解析したところ、OPLL細胞の骨化誘導により2倍以上のup-regulationまたは0.5倍以下のdown-regulationを認め、かつ、non-OPLL細胞では骨化誘導による変化がみられず、siRNAによるRunx2のknockdownにより著しく影響を受けた遺伝子を検索したところ、47の遺伝子がこれらのcriteriaに当てはまった。これらの遺伝子の中には、connective tissue growth factor (CTGF)、cartilage oligomeric matrix protein (COMP)などの軟骨形成促進因子や、angiopoietin-1 (AP-1)といった血管形成因子が含まれていた。また、OPLL細胞に特異的ではないものの、Runx2による調節を受けているものと考えられる遺伝子として、aggrecan-1やCOL11A1などの軟骨形成因子、Vascular endothelial growth factor B (VEGFB)などの血管形成因子を含む18の遺伝子が候補として挙げられた。

3. Real-time PCR

マイクロアレイの結果から、骨形成遺伝子のマーカーとしてRunx2、ALP、軟骨形成遺伝子のマーカーとしてaggrecan-1、collagen-2a1、血管形成遺伝子のマーカーとしてAP-1に着目し、これらのmRNA発現をreal-time PCRにより解析したところ、OPLL細胞では骨化誘導群でこれらのmRNA発現レベルが有意に上昇していたが、non-OPLL細胞では通常培養群と骨化誘導群とで有意な差はなかった。

4. Runx2のsiRNAによるRunx2およびAP-1のmRNA発現

骨化誘導群では、OPLL 細胞および骨芽細胞ではどちらも Runx2 および AP-1 の mRNA の発現レベルが有意に上昇したが、Runx2 の siRNA により、これらの骨化誘導による AP-1 の発現上昇がみられなくなった。これらの変化は、non-OPLL 細胞ではみられなかった。

5. AP-1 の siRNA による Runx2 の発現

AP-1 の siRNA により、OPLL 細胞の骨化誘導群における Runx2 の発現上昇は抑制されなかった。

6. siRNA による aggrecan-1、VEGF-A 発現

Runx2 と AP-1 を同時に siRNA により knockdown すると、OPLL 細胞の骨化誘導群における aggrecan-1 の発現上昇がみられなくなった。また、OPLL 細胞の骨化誘導群では VEGF-A の mRNA 発現レベルの減少が観察されたが、Runx2 の siRNA により VEGF-A の mRNA 発現が有意に上昇した。一方、AP-1 の siRNA により骨化誘導群の VEGF-A の発現レベルは減少せず、通常培養群と同等の発現レベルのままであった。

D. 考察

近年、Runx ファミリー転写因子は、マウスの血管内皮において血管新生に関連するサイトカインにより up-regulate されることが示され(2)、特に血管内皮細胞の遊走や分化に重要な役割を果たしている AP-1 がその調節をしていると考えられている。本研究では、OPLL 細胞を骨化誘導すると Runx2 と AP-1 の発現が誘導され、Runx2 の siRNA により AP-1 の発現が抑制された。これにより、AP-1 は Runx2 によって調節されていることが示唆された。さらに、AP-1 の siRNA は Runx2 の発現を抑制しなかったが、aggrecan-1 の発現を完全に抑制した。さらに、Runx2 の siRNA は AP-1 の発現を有意に抑制

したものの完全な抑制ではなかった。AP-1 は機能的に Runx2 の下流に存在し、少なくとも部分的に、OPLL 細胞における Runx2 の骨軟骨形成に作用している可能性がある。

これまでの報告により、OPLL は脊柱靭帯の内軟骨性骨化により生じることが示唆されており(3,4,5)、OPLL 細胞は軟骨様細胞への分化能を持つと考えられる。マイクロアレイの結果より、OPLL 細胞を骨化誘導すると CTGF などの軟骨形成因子の発現が上昇し、Runx2 の siRNA によりこれらの発現が抑制されることが明らかとなり、これは脊柱靭帯の骨化機序が内軟骨性骨化によるものであるというこれまでの報告を支持するものである。また、これらのデータは、OPLL は脊柱靭帯細胞が内軟骨性骨化のメカニズムを介した metaplasia を起こした結果生じるものであることを示唆しており、それには Runx2 が重要な役割を果たしているものと考えられる。

骨組織における内軟骨性骨化には、骨芽細胞や破骨細胞の遊走のために血管侵入が重要な役割を果たしている。異所性骨化においてもまた、血管新生が関与している可能性がある(6)。OPLL 患者は非 OPLL 患者に比べて、周術期に出血しやすい傾向があるとの報告があり(7,8)、OPLL 患者には血管新生因子により調節される微小血管の機能障害が存在する可能性を示唆する。本研究では、VEGF-A の発現が骨化誘導により downregulate され、Runx2 の siRNA により大きく up-regulate された。本研究における骨化誘導は比較的短時間(48時間)であるため、内軟骨性骨化のプロセスのうちでも early-stage を反映している可能性がある。骨形成における内軟骨性骨化のプロセスでは、血管侵入は middle~late-stage に起こるため、Runx2、AP-1、VEGF などの血管新生

関連遺伝子の発現はearly-stageには起こらない可能性もあると考えられたが、異所性骨化と血管新生との関係には不明な点も多く、これは今後の研究課題であると考えられた。

骨化誘導によるAP-1発現の上昇は、Runx2のsiRNAにより著明に抑制された。また、骨化誘導により生じるaggrecan-1の発現上昇は、Runx2およびAP-1を共にsiRNAによってknockdownすることにより完全に抑制された。OPLL細胞の骨化誘導群では、Runx2のsiRNAによりVEGF-Aの発現が著明に上昇したが、AP-1のsiRNAではVEGF-Aの発現上昇はみられなかった。これはaggrecan-1の調節(おそらくRunx2による軟骨形成)は主にAP-1を介して起こるが、VEGF-Aの調節(おそらく血管新生)は、AP-1を部分的に介して調節されるに過ぎないためと考えられた。異所性骨化におけるRunx2とAP-1のシグナル伝達経路について、さらなる研究が必要である。

E. 結論

OPLL患者由来の脊柱靭帯細胞をdexamethasone添加により骨化誘導したところ、Runx2依存的にいくつかの軟骨形成関連遺伝子とAP-1の発現レベルの上昇がみられた。AP-1は、ヒト脊柱靭帯の骨化において、Runx2シグナル伝達に少なくとも部分的に関与している可能性がある。

参考文献

- 1) Iwasaki K, Furukawa K-I, Tanno M, et al. Uni-axial cyclic stretch induces Cbfa1 expression in spinal ligament cells derived from patients with ossification of posterior longitudinal ligaments. *Calcif Tissue Int* 74, 448-457, 2004
- 2) Namba K, Abe M, Saito S, et al. Indispensable role

of the transcription factor PEBP2/CBF in angiogenic activity of a murine endothelial cell MSS31. *Oncogene* 19, 106-114, 2000.

- 3) Yamamoto Y, Furukawa KI, Ueyama K, et al. Possible role of CTGF/Hcs24 in the initiation and development of ossification of the posterior longitudinal ligament. *Spine* 27, 1852-1857, 2002.

- 4) Nakama S, Ihara T, Sugamata M, et al. An ultrastructural study on the ligamentum flavum of the cervical spine in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Med Mol Morphol.* 39, 198-202, 2006.

- 5) Song J, Mizuno J, Hashizume Y, et al. Immunohistochemistry of symptomatic hypertrophy of the posterior longitudinal ligament with special reference to ligamentous ossification. *Spinal Cord.* 44, 576-581, 2006.

- 6) Collett GD, Canfield AE. Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ Res.* 96, 920-928, 2005.

- 7) Ogawa Y, Chiba K, Matsumoto M, et al. Long-term results after expansive open-door laminoplasty for the segmental-type of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: a comparison with nonsegmental-type lesions. *J Neurosurg Spine* 3, 198-204, 2005

- 8) Kishiya M, Furukawa K-I, Yokoyama T, et al. Comparison of Cardiovascular Parameters between Patients with Ossification of Posterior Longitudinal Ligament and Patients with Cervical Spondylotic Myelopathy. *J Spin Disord Tech, in press.*

F. 論文発表

Masaki Kishiya, Toshitada Sawada, Kohta Kanemaru, et al. A Functional RNAi Screen for Runx2-Regulated Genes Associated

With Ectopic Bone Formation in Human
Spinal Ligaments. *J Pharmacol Sci* 106,
404-414, 2008.

頸椎後縦靱帯骨化症の術中超音波診断

研究分担者 自治医科大学整形外科 星地 亜都司、 星野 雄一

研究要旨 棘突起縦割法椎弓形成術を行った OPLL 患者 40 名を対象とした術中超音波所見から、頸髄の除圧状態を 3 群に分類し除圧状態を観察した。後方除圧の画像上の限界は骨化巣の厚みが 7.2mm 前後であることが予測因子として有力な指標となりうるということがわかった。アラインメント自体は後方除圧の限界を規定していなかった。しかし 2 年成績に差がなかったことから、画像上圧迫が残るケースでも後方手術の適応がないとは言えない。

A. 研究目的

頸椎 OPLL に対し手技の簡便さなどにより椎弓形成術が多用されてきている。前方法と異なり骨化巣には直接手をつけないため除圧効果に限界がある可能性があり、そのような症例を術前に察知できれば有意義である。術後のミエロ CT や MRI による先行研究では頸椎アラインメントの指標のひとつである C2/7 角が 10 度未満であること、骨化巣の厚みが 7 mm 以上であることが後方除圧の限界であると報告されている。しかしミエロ CT や MRI は静的画像であり実際には頸髄には動きがある。頸髄の除圧状態を観察するには、リアルタイムに頸髄の動態を描出できる術中超音波法が優れている。椎弓形成術における頸髄後方除圧の限界を予測できる術前画像所見を明らかにするために、術中超音波診断法による研究を行った。

B. 研究方法

1999 年 2 月より 2006 年 9 月までの期間に棘突起縦割法椎弓形成術を行った OPLL 患者 40 名を対象とした。術中超音波所見から、

頸髄の除圧状態を 3 群に分類した。1 : non-contact type ; 常に頸髄前方のクモ膜下腔が出現している、2 : contact and apart type ; 拍動性に頸髄が OPLL と接触したり離れたりにしている、3 : contact type ; 常に

頸髄と OPLL が接触し頸髄前方のクモ膜下腔が出現しない。術前の CT デジタル画像から最大骨化巣の厚みを計測し、術前中間位 X 線側面画像から C2/7 角を計測した。エコー上で除圧不十分の contact 群 13 名とそれ以外 27 名の 2 群間で術前画像計測値を比較した。群間で 2 年成績に差があるかどうかを JOA スコア上下肢運動機能の獲得スコアにより比較検討した。

(倫理面での配慮) 対象に対しては術式、検査についてインフォームドコンセントを書面で行った。

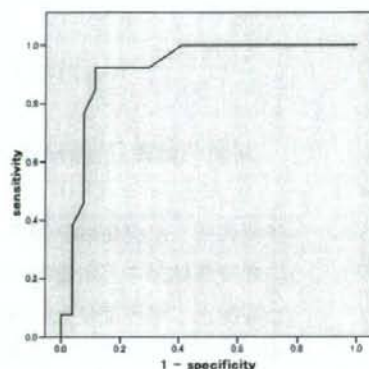
C. 研究結果

両群の背景因子には差がなかった。C2/7 角に有意差はなかった。最大骨化巣の厚みは contact 群で有意に大きく、ROC 曲線による解析で 7.2mm をもって感度特異度と

もに 0.9 を超えたカットオフ値となることが確認できた (図)。理論上は除圧不良群である contact 群とそれ以外の群とで 2 年成績には差がなかった。

D. 考察

術前に後方除圧の限界を察知できれば、術式選択 (前方か後方か、後方法にインストルメンテーションによる矯正を加えるか) を患者に説明する際に説得力がありインフォームドコンセントのうえでも有意義である。今回の結果から、後方除圧の画像上の限界は骨化巣の厚みが 7.2mm 前後であることが予測因子として有力な指標となりうるということがわかった。アラインメント自体は後方除圧の限界を規定していなかった。しかし 2 年成績に差がなかったことから、画像上圧迫が残るケースでも後方手術の適応がないとは言えなかった。さらに長期にわたって観察してゆくことで、成績との関連をさらに明確にしてゆくことが課題である。



E. 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

図 ROC 分析

曲線下面積は 0.9 を超えている。

生後の骨量調節における *Cthrc1* に関する研究

研究分担者 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 骨形成を調節する新たな遺伝子を発見するため、ATDC5 細胞株を用いた BMP 投与群、非投与群間での suppression subtractive hybridization 法を用いることにより *Cthrc1* をクローニングした。ノックアウトマウスでは骨芽細胞による骨形成の低下を認め、生後の骨量が低下していた。I 型コラーゲンプロモーターを用いて作製したトランスジェニックマウスでは骨形成が更新し、生後の骨量の増加をみた。よって *Cthrc1* は骨芽細胞増殖を刺激し、骨芽細胞性骨形成能を高めて生後骨量を調節するという重要な役割があることが推察された。また OPLL においても骨化部位に一致して発現を認めた。よって、*Cthrc1* は生理的な骨形成においても、また病的な骨形成においても機能していると考えられる。

A. 研究目的

骨形成に関わる新規遺伝子の同定を研究目的とした。

B. 研究方法

骨軟骨前駆細胞様細胞株である ATDC5 細胞において骨形成誘導因子である BMP2 の下流にある遺伝子を suppression subtractive hybridization 法でスクリーニングし、*Cthrc1* を同定した。この *Cthrc1* のノックアウトマウスおよび骨特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、骨格における表現系を解析した。またヒト OPLL での *Cthrc1* の発現を免疫染色法にて解析した。

C. 研究結果

Cthrc1 は骨に高発現していることから、骨格形成または骨量調節に関わる遺伝子であることが推測された。そこで *Cthrc1* の *in vivo* での機能を調べるために、ジーンターゲット法により、*LacZ* 遺伝子を挿入することによって *Cthrc1* 遺伝子を破壊した変異マウスを作製し

た。ヘテロ欠損マウスの *LacZ* 染色の解析から *Cthrc1* は骨格、特に骨に高発現していることを確認した (図1)。



図1

しかし、胎仔における *in situ* ハイブリダイゼーション法では骨軟骨マーカー遺伝子の発現にノックアウトマウスと野生型の間で差はなく、新生仔における骨格標本においても表現型の差異を認めないことから *Cthrc1* は骨格形成に大きな影響を与えないと考えられた。次に2か月齢マウスの骨量を比較した。脛骨のマイクロCT、腰椎骨の非脱灰標本による骨形態計測から、ノックアウトマウスでは骨量、骨梁数、骨芽細胞数の減少と骨形成能の低下を認めた (図2)。



図2 野生型 ノックアウト