

脊柱靱帯骨化症特異的タンパク質の探索研究、遺伝子解析を行うことを目的とし、ベルモント原則、①**人格の尊重**、②**善行**、③**正義**を守り、被験者保護のために、研究の実施の指針となる倫理原則を明確にし、平成15年12月25日、「**ヒト後縦靱帯骨化症の発症に係わる遺伝子及び発現タンパク質の解析**」として、研究代表者、永田見生、久留米大学生命に関する倫理委員会の承認を得た。

久留米大学倫理委員会は、久留米大学医の倫理に関する規程施行細則、久留米大学生命に関する倫理委員会内規、久留米大学医療に関する倫理委員会内規は、厚生労働省・臨床研究に関する倫理指針、文部科学省・厚生労働省・経済産業省、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、文部科学省・厚生労働省、疫学研究に関する倫理指針、文部科学省・生命倫理・安全に対する取組のなかの「**医学研究等における個人情報**の取扱いの在り方等について」この基本原則に則っている。

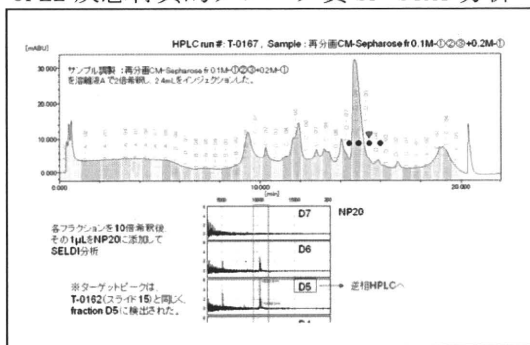
具体的には、被験者に対し、自由意思による同意に基づく研究への参加、インフォームド・コンセントに基づく研究への参加、対象者のプライバシーおよび秘密が保護されること、対象者には不利益な条件なしに研究の参加を取り止める権利があることを説明し、我が国のGCP第51条、ヘルシンキ宣言第22条に基づいた同意説明文書の説明、紙面上の同意を得る。対象者のプライバシー、秘密の保護に関しては、久留米大学個人識別情報管理により、患者からの試料、個人情報はすべて、FDAの連邦規則第21条第11章(21CFR Part11)の基準から、フリーザーワークス (FDAのバリデーシ

ョン：2004年整備)にて、情報の匿名化を厳守した。

実験動物に関しては、動物の愛護及び管理に関する法律(平成11年12月21日、法律第221号)、実験動物の飼養及び保管等に関する基準(昭和55年3月27日総理府告示第6号)、動物の処分方法に関する指針(平成7年7月4日、総理府告示第6号)である基本原則に則った、久留米大学実験動物施設による動物実験計画書の認可制度の承認を受け、3Rs (Replacement by alternatives : 代替法の開発、Reduction in numbers : 動物数の削減、Refinement of method : 苦痛の軽減)を十分に考慮し、薬物代謝実験に使用するマウスは、生きてままでの経過観察が可能な画像解析装置を整備し、動物数の最小限を実施するなどの考慮を行っている。

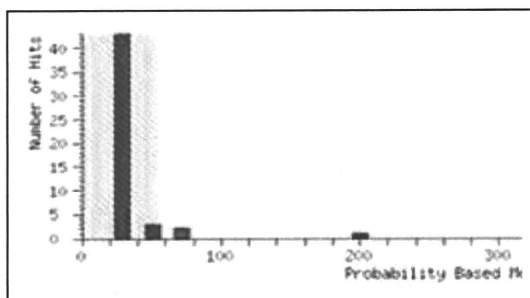
C. 研究結果

OPLL 疾患特異的タンパク質 SP-STAT 分析

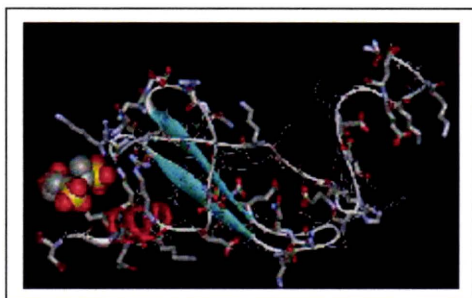


OPLL 疾患特異的タンパク質マトリックス

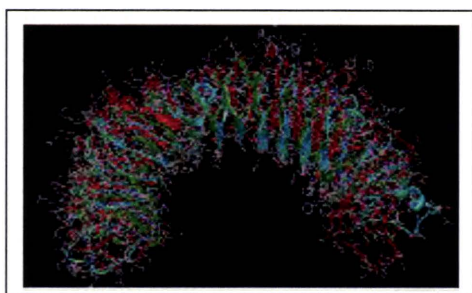
サーチ結果



OPLL 疾患欠損タンパク質



OPLL 疾患発現タンパク質



D. 考察

厚生労働省特定疾患である脊柱靭帯骨化症の中でも、重篤な麻痺を発症する後縦靭帯骨化症の医療受給者証交付数は、平成 19 年度 26,471 人、前年度から比較すると 1,447 人の増加が見られ、平成 16 年度より年々増加傾向を示している。

わが国の医療費は年間 31 兆円を徐々に上回る増加傾向にあり、なかでも、老人医療費の伸びは著しく財政を逼迫している。脊柱靭帯骨化症は、患者の運動機能を蝕み、生活の QOL を著しく低下させることで、周りの介護者にも切実な問題である。我々は、難治性疾患である脊柱靭帯骨化症を克服することで、脊柱靭帯骨化症患者の麻痺機能不全による療養病床（医療型 24 万床、介護型 14 万床）を減らすことが期待できる。特に、介護保険、老人医療費の削減という国家政策に貢献できる。

本研究の開発研究を促進することで、脊柱靭帯骨化症の患者数を減らし、家系遺伝による発症予備軍の発病を抑え、予防し、根治的治療方法、脊柱靭帯骨化症の標準治療へのガイドラインの政策提言をすることが可能となる。同時に、国内製薬企業の選定と PMDA への医療用医薬品の審査承認へ努力し、日本国内でのいち早い臨床試験を推進することで、国内経済産業の発展となる社会的成果を生むことができる。

国民の健康をつかさどり、安全で安心な、厚生労働科学研究の意義を国民へ示すことができる。

1. 靭帯骨化欠損サイトカイン G タンパク質受容体の活性化
2. オーファン7回膜貫通型G-タンパク質共役受容体のシグナル伝達機能研究
3. アンタゴニストの非ペプチド化研究から低分子誘導體形成

E. 結論

このヒト後縦靭帯骨化症の特異的タンパク質の発見の研究成果は、これまでの研究履歴に合わせ研究設備を準備した功績であり、本研究法は、メカニズムの解明を重視した *In vitro* 実験と *In vivo* 実験であり、そのための研究経費は、試薬類を中心としたもので、日本人に多く発症している頸椎後縦靭帯骨化症の解明と治療、予防のための社会貢献のために、必要な研究費であると考えられる。

また、この研究は、世界で初めて、ヒト後縦靭帯骨化症の特異的タンパク質を発見した実績に基づく、世界中の頸椎後縦靭帯骨

化症の研究に重要なものである。

さらに、本研究では、異所性骨化に関するメカニズムを解明し、靭帯骨化以外の神経系との明確な診断、治療方法の研究に繋がることが考えられる。

日本の国民に還元する研究として、日本人に多発する難病である後縦靭帯骨化症の治療方法のためにも、我々が発見している発症に影響する特異的タンパク質のアミノ酸構造解析は、靭帯骨化治療剤、家系遺伝からくる発症予防として、靭帯骨化予防剤の開発が急務であり、そのために、基盤研究を行う必要性が高い。

世界をリードする知的資産の形成と継承のための重要研究である。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

公開不可

2. 学会発表

第74回西日本脊椎研究会（主題：脊柱靭帯骨化症の諸問題）、脊柱靭帯骨化症疾患特異的タンパク質の発見からの創薬研究、厚生労働科学研究補助金脊柱靭帯骨化症に関する調査研究分担研究、津留美智代、佐藤公昭、永田見生、2010, 11, 12, 福岡市

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得

名称：脊柱靭帯骨化症のマーカールペプチド

発明者：永田見生、津留美智代

権利者：学校法人久留米大学

種類：特許

出願番号：特願 2009-254357

出願年月日：2009/11/5

国内外の別：国内出願

2. 実用新案登録

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

脊椎靭帯骨化症患者における全脊椎骨化巣の評価と骨化領域に関わる全身因子、血中ミード酸値と脊椎靭帯骨化領域の関連

Serum level of 5,8,11-eicosatrienoic acid (20:3n-9) in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament and the ligamentum flavum

研究者 川口善治（富山大学医学部整形外科学臨床教授）
中野正人（富山大学医学部整形外科学助教）
安田剛敏（富山大学医学部整形外科学助教）
関 庄二（富山大学医学部整形外科学助教）
堀 岳史（富山大学医学部整形外科学）
浜崎 景（富山大学医学部公衆衛生学助教）
木村友厚（富山大学医学部整形外科学教授）

研究要旨

頰椎に後縦靭帯骨化（OPLL）が認められた 101 名を対象とし、multidetector CT を用いて全脊椎における OPLL および黄色靭帯骨化（OLF）の実態を調査し、骨化巣の広がりとその関連する全身因子を検討した。その結果、OPLL は高頻度に全脊椎（胸椎 47%、腰椎 54%）に認められた。また今回新たに骨化の重症度と関わる全身因子として血中ミード酸値を挙げる事ができ、OPLL の病因を探る手がかりになる可能性があると思われた。

A. 研究目的

近年脂肪酸の一つであるミード酸が骨代謝に関連することが分かってきた。すなわち in vitro のデータでは、ミード酸を加えると骨芽細胞の activity は低下することが示されていた。¹⁾今回は、1) multidetector CT を用いて全脊椎における OPLL の実態を調査すること、および 2) 脊椎後縦靭帯骨化（OPLL）における全身の骨化巣の広がりが全身因子、特にミード酸を含む血清中脂肪酸値に関連するか否かを検討することを目的とした。

B. 研究方法

単純 X 線側面像にて頰椎に OPLL が認められた 101 名（男 60 名、女 41 名、平均年齢 67.3

歳）を対象とした。コントロールとして OPLL を認めない患者 16 名（男 6 名、女 10 名、平均年齢 68.9 歳）を年齢をマッチさせて選んだ。OPLL の診断は X 線と multidetector CT にて行った。頰椎 X 線では OPLL のタイプを分類した。また全脊椎の CT（尖状断像と水平断像）にて、頰椎、胸椎、腰椎各レベルの脊柱管内骨化病変（OPLL および OLF）を検者 2 人で評価した。その結果から、脊柱管内に骨化巣の見られるレベル（椎間数と椎体数）を合算して骨化係数とした。さらに全患者およびコントロールより採血を行い、血中の電解質、血糖値、高感度 CRP 値、骨代謝マーカー値（ucOC 値）、26 種類の脂肪酸値（ラウリン酸、ミリスチン酸、ミリストレイン酸、パルミチン酸、パルミトレ

イン酸、ステアリン酸、オレイン酸、ヴァクセン酸、リノール酸、 γ -リノレン酸、 α -リノレン酸、アラキジン酸、11-エイコセン酸、エイコサジエン酸、ミード酸、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ベヘン酸、エルシン酸、ドリグノセリン酸、ネルボン酸)を測定した。以上の値について、OPLL患者とコントロールの相違および、OPLL患者においては骨化係数と関連する全身因子を検討した。

C. 研究結果

1) 全脊椎における OPLL および OLF の存在範囲と骨化係数：頸椎 OPLL が胸椎および腰椎の OPLL または OLF を合併する頻度は、それぞれ胸椎 47%、腰椎 54%であった。連続型や混合型の頸椎 OPLL を持つ患者に胸椎、腰椎 OPLL または OLF を合併する頻度が高い傾向にあった。また胸椎と腰椎での骨化係数が 20 を超える骨化の著しい患者は 14 例

おり、女性が 12 例を占めた。

2) 脊柱靱帯骨化と血液検査所見の関連：脊柱靱帯骨化患者とコントロールの間で電解質、血糖値、高感度 CRP 値、骨代謝マーカー値には有意差は認めなかった。

3) 脊柱靱帯骨化と脂肪酸との関連：脊柱靱帯骨化患者とコントロールの間でオレイン酸、リノレン酸、ミード酸、ドコサテトラエン酸の値に有意差を認めた。骨化係数と全身因子との関連では、ミード酸、パルミトレン酸、オレイン酸が統計学的に有意な関連を示した。特にミード酸値は骨化係数と正の相関を示した。(図 1)

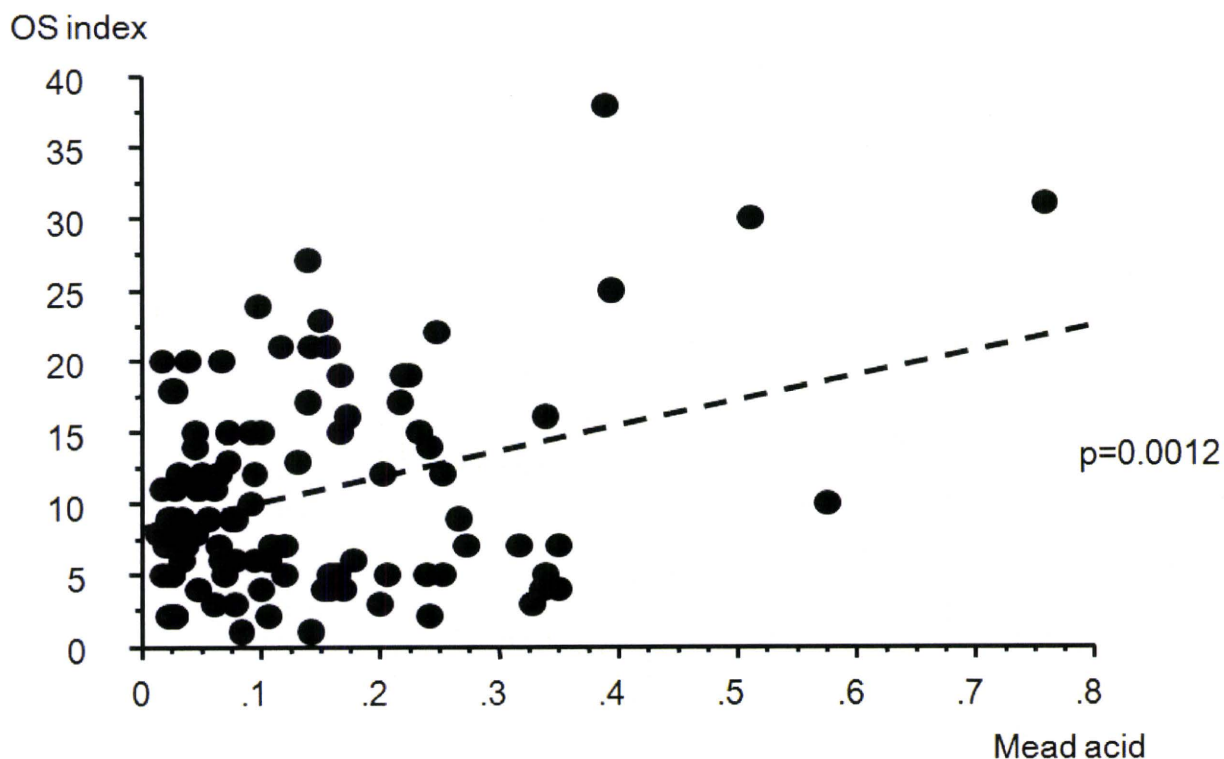


図 1

D. 考察

本研究の結果より、約半数の頸椎 OPLL 患者では脊柱管内の靭帯骨化が、胸椎や腰椎にも生じていることが分かった。また新たな知見として、血中ミード酸値が脊柱靭帯骨化患者とコントロールの間で有意差があり、かつ骨化領域の範囲と相関することが明らかとなった。以上より、ミード酸を含む脂肪酸代謝が脊柱靭帯骨化の病因を探る手がかりになる可能性があると考えられた。

参考論文

1) Hamazaki T, Suzuki N, Widyowati R, Miyahara T, Kadota S, Ochiai H, Hamazaki K. The depressive effects of 5,8,11-eicosatrienoic acid (20:3n-9) on osteoblast. Lipid 2009;44:97-102.

E. 結論

- 1) 約半数の頸椎 OPLL 患者では脊柱管内の靭帯骨化が、頸椎のみならず胸椎や腰椎にも生じていた。
- 2) 血中ミード酸値が脊柱靭帯骨化患者とコントロールの間で有意差があり、かつ血中ミード酸値と骨化領域の範囲との間に相関を認めた。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Kawaguchi Y, Hamazaki K, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Hori T, Hamazaki T, Kimura T. Serum level of 5,8,11-eicosatrienoic acid (20:3n-9) in patients with ossification of the posterior longitudinal ligament and the ligamentum flavum (投稿予定)

学会発表

1. 川口善治、中野正人、安田剛敏、関 庄二、金森昌彦、木村友厚：脊椎靭帯骨化症患者における全脊椎骨化巣の評価と骨化領域に関わる全身因子。第 83 回日本整形外科学会、平成 22 年 5 月、東京。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

本研究においては予定なし。

脊柱靱帯の骨化における P2Y1 の役割 — 過剰発現による解析

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、細胞外 ATP による P2Y1 刺激により ALP の mRNA 発現が上昇し、P2Y1 アンタゴニストの投与によりメカニカルストレスによる ALP の mRNA 発現上昇が抑制されることをすでに報告している。そこで我々は頸椎 OPLL の靱帯骨化に P2Y1 が関与しているのではないかと考え、頸椎 OPLL および非 OPLL（non-OPLL）患者由来の脊柱靱帯細胞を用い、これらの細胞に P2Y1 を一過性に過剰発現させて骨化関連遺伝子の発現に与える影響を調べた。その結果、P2Y1 過剰発現により OPLL 患者由来の細胞でのみ BMP-2 の mRNA の発現増加が観察され、P2Y1 と BMP-2 との mRNA 発現比には有意な正の相関が認められた。OPLL、non-OPLL どちらの群でも Sox9 の mRNA 発現が誘導されたが、OPLL 群でより多くの発現がみられた。これらの発現は免疫染色でも確認され、P2Y1 のアンタゴニストである MRS2279 の添加により、P2Y1 過剰発現による BMP-2、Sox9 の発現誘導が抑制された。P2Y1 過剰発現から 6 日後、OPLL 患者由来の細胞でのみ Alizarin red S 染色陽性の石灰化が観察された。以上の結果より、OPLL 患者においては P2Y1 の発現は細胞の Osteochondroprogenitor 様分化を誘導し、靱帯骨化を引き起こすトリガーになりうることを示された。

A. 研究目的

これまで当講座では、頸椎 OPLL 患者由来の脊柱靱帯細胞にメカニカルストレスを加えると BMP2 や ALP、Cbfa1 など骨化を促進する遺伝子の発現が亢進することを示してきた^{1) 2)}。その中で近年 Sawada ら³⁾ は、OPLL 患者由来の細胞では Purinoceptor のサブタイプの 1 つ、P2Y1 が高発現していることを示した。P2Y1 受容体は、細胞外ヌクレオチド(ATP や ADP、UTP など) の受容体で、7 回膜貫通型の G 蛋白共役型受容体である。Sawada らはまた、脊柱靱帯細胞に対してメカニカルストレスを加えると細胞外 ATP の濃度が増加すること、培養液中に ATP を添加する

と OPLL 患者由来の脊柱靱帯細胞では ALP mRNA の発現が増加し、P2Y1 受容体拮抗薬である MRS2179 を添加することでこれが抑制されることを示した。これらの結果から脊柱靱帯の骨化に P2Y1 が関与していることが示唆されるが、脊柱靱帯細胞に発現する P2Y1 の機能的な役割は不明である。

そこで我々は頸椎 OPLL の靱帯骨化に P2Y1 が関与しているのではないかと考え、頸椎 OPLL および対照として非 OPLL（頸椎症性脊髄症、頸椎椎間板ヘルニア）患者由来の脊柱靱帯細胞を用い、これらの細胞に P2Y1 を過剰発現させて骨化関連遺伝子の発現に与える影響を調べた。

B. 研究方法

本研究は弘前大学大学院医学研究科倫理委員会の承認を得て行った。患者の同意を得た上で、頸椎 OPLL 患者から術中に採取した頸椎黄色靭帯組織片（以下 OPLL 群）を用いた。対照として、非 OPLL（頸椎症性脊髄症、頸椎椎間板ヘルニア）患者から採取した黄色靭帯組織片（以下 non-OPLL 群）を用いた。

1. ヒト脊柱靭帯細胞の単離と培養

黄色靭帯組織片をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄後、靭帯成分以外を取り除き、2mm³ 角に碎片し、10% ウシ胎児血清 (FBS) 添加ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) を用いて 37°C、5%CO₂ 気相下で培養し、遊走してくる線維芽細胞様細胞を継代し、第 5 継代の細胞を実験に用いた。35mm ゼラチンコーティングディッシュに 2.0 × 10⁵ 個ずつ細胞を撒き、48 時間経過後に P2Y1 過剰発現操作を行った。

2. P2Y1 過剰発現

ヒト P2Y1cDNA を組み込んだサイトメガロウイルスベクター (OriGene) を遺伝子導入に用いた。SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN) をベクターとともにディッシュに加えて 3 時間反応させた後、10%FBS 添加 DMEM 培地 2ml 中で 48 時間培養し、P2Y1 を一過性に過剰発現させた。Antagonist 投与群では、P2Y1 過剰発現操作の直後に P2Y1 の特異的 antagonist である MRS2279 (TOCRIS bioscience) を 10nM 添加した。

3. 免疫染色

細胞を 4%ホルマリンで 30 分間固定した後、一次抗体としてウサギ由来抗ヒト P2Y1 抗体 (SANTA CRUZ BIOTECH, INC.)、マ

ウス由来抗ヒト pro-BMP-2 抗体 (SANTA CRUZ BIOTECH, INC.)、マウス由来抗ヒト Sox9 抗体 (SANTA CRUZ BIOTECH, INC.) を各々、実験に応じて over night で反応させた後、ヤギ由来 FITC 標識抗ウサギ IgG 抗体 (ZYMED Laboratories)、ヤギ由来抗マウス IgG 抗体 DyLight™ 549 (ROCKLAND) を二次抗体として 2 時間反応させ、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (OLYMPUS, 495nm) にて観察し、細胞表面における P2Y1 ならびに BMP-2/Sox9 の発現を調べた。

4. Total RNA 回収、RT 反応、Real-time PCR

OPLL 群、non-OPLL 群それぞれで、P2Y1 過剰発現を行った群 (P2Y1 群)、P2Y1 過剰発現を行わず培地交換のみを行った群 (control 群) とに分け、48 時間後に免疫染色および total RNA 回収を行った。Total RNA 回収後、RT 反応、real-time PCR により P2Y1 ならびに骨化関連遺伝子 (BMP2、Osterix、ALP、COL1A1) の mRNA 発現を調べた。Real-time PCR では G3PDH を内部標準として $\Delta\Delta Ct$ 法にて control 群を基準に各サンプルにおける mRNA の発現比を求めた。

5. Alizarin red S 染色

P2Y1 過剰発現から 6 日後 (Day 6)、石灰化を評価するため Alizarin red S 染色を行った。

6. 統計処理

統計処理は Excel を用いて、*t* 検定またはピアソンの積率相関分析を用い、有意水準を 5% 未満とした。

C. 研究結果

1. P2Y1 発現の変化 (免疫染色)

免疫染色の結果、OPLL 患者由来の細胞では non-OPLL 群に比べ P2Y1 が高発現していた。また、P2Y1 過剰発現操作により、OPLL 群、non-OPLL 群それぞれで細胞表面に P2Y1 が強制発現されたことが確認された。

2. Real-time PCRによるP2Y1ならびに骨化関連遺伝子の変化

Real-time PCR により P2Y1 過剰発現前の mRNA 発現を見ると、OPLL 群は non-OPLL 群に比べて P2Y1 が約 3 倍多く発現していたが、他の骨化関連遺伝子については有意な差はなかった。P2Y1 過剰発現操作により P2Y1 の mRNA 発現は non-OPLL 群で平均 4.6 倍、OPLL 群で平均 5.5 倍となった。同時に、骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein; BMP)-2 の mRNA が OPLL 群では約 3.64 倍となったのに対して、non-OPLL 群では 0.57 倍とむしろ減少した。一方、Sox9 の発現比は、non-OPLL 群で 4.63 倍、OPLL 群で 6.44 倍とどちらも増加を認めたが、OPLL 群でより高い発現を示していた。

以上の結果より、P2Y1 を過剰発現させると OPLL 群では BMP2 の発現も増加することが示唆された。しかし、過剰発現時の P2Y1 の発現比は常に一定ではなくある程度のばらつきがみられた。そこで、P2Y1 と BMP-2 との間に関連性があるかどうかをさらに明らかにするため、P2Y1 発現比と BMP-2 の発現比との関連をプロットすると、non-OPLL 群では P2Y1 の過剰発現により BMP-2 の発現は有意な負の相関を示した ($n = 7, r = -0.773, P < 0.05$) のに対し、OPLL 群では P2Y1 の発現比と BMP2 の発現比との間に有意な正の相関 ($n = 28, r = 0.736, P < 0.01$) を認めた。

3. 免疫染色による P2Y1、BMP-2、Sox9 発

現の評価

BMP-2、Sox9 の発現誘導が P2Y1 を過剰に発現した細胞で起こっていることを確認するため、P2Y1 と BMP-2、P2Y1 と Sox9 の免疫二重染色をそれぞれ行った。また、P2Y1 過剰発現直後に P2Y1 antagonist である MRS2279 を添加し BMP-2、Sox9 の発現へ及ぼす影響を調べた。Non-OPLL 群、OPLL 群とともに control に比較して P2Y1 が強発現されたが、BMP-2 は OPLL 群でより多く発現し、これは MRS2279 の添加により抑制された。また、P2Y1 過剰発現により non-OPLL 群、OPLL 群とともに Sox9 の発現が誘導されたが、これらは MRS2279 の添加により抑制された。

3. Alizarin red S 染色による石灰化の評価

以上の結果より、P2Y1 過剰発現により OPLL 群では BMP-2 および Sox9 の発現が、non-OPLL 群では Sox9 の発現が誘導されたことが示唆された。BMP-2 は細胞の骨分化を誘発することが知られている。そこで、P2Y1 過剰発現後から 6 日目 (Day 6) に Alizarin red 染色を行ったところ、P2Y1 を過剰発現させた OPLL 群でのみ石灰化が観察された。

D. 考察

P2 受容体ファミリーは細胞外ヌクレオチド (ATP、ADP、UTP) の受容体であり、骨芽細胞においては shear stress により発生した ATP を受容することにより細胞の分化を促進するとされる。しかし、骨芽細胞系においても、P2Y1 が骨化関連遺伝子の発現に直接関与していることを示した報告はない。

本研究では、黄色靭帯由来細胞に P2Y1 を過剰発現させると、OPLL 群の細胞は

BMP-2 mRNA の発現が増加し、P2Y1 と BMP-2 の mRNA 発現比に有意な正の相関がみられた)。一方 non-OPLL 群の細胞では、P2Y1 を過剰発現しても BMP-2 mRNA の発現は増加せず、むしろ減少した。これまでの我々の研究^{1)~3)}でも OPLL 患者由来の細胞と non-OPLL 患者由来の細胞とではメカニカルストレスに対する反応が異なり、OPLL 患者由来の細胞は骨芽細胞に類似した性質を有する可能性が示唆されている。これらのことから、OPLL 患者の脊柱靭帯細胞には P2Y1 が高発現しているのみならず、P2Y1 刺激に対する反応性の異常が存在する可能性が示唆された。

骨化した脊柱靭帯組織の免疫染色研究では、骨化層から少し離れた部位に BMP-2 や Sox9 が発現していることが報告されている⁴⁾。特に BMP-2 は強力に石灰化を引き起こす作用があることが知られているが、脊柱靭帯の骨化過程において BMP-2 が発現するメカニズムは詳細には明らかとなっていなかった。これまで当講座における研究において、OPLL 患者由来の細胞に対するメカニカルストレスが BMP-2 の mRNA の発現を誘導すること報告されているが¹⁾、本研究の結果から、その過程に P2Y1 が関与している可能性がさらにはっきりと示された。

P2Y1 を過剰発現させると、non-OPLL 群、OPLL 群ともに Sox9 の発現が亢進した。Sox9 は軟骨分化の開始に必須の転写因子であるとされるが、近年、Sox9 の発現のみが増加するのみでは軟骨分化は起こらず、他の転写因子や発現遺伝子と協調して軟骨分化を調節していることが明らかとなってきた⁵⁾。本研究において P2Y1 の過剰発現により、non-OPLL 群、OPLL 群ともに Sox9 の発現

が誘導されたが、おそらく Sox9 単独の発現亢進では骨・軟骨分化誘導は十分ではなく、Sox9 とともに BMP-2 の発現も増加した OPLL 群の細胞でのみ osteoprogenitor 様の分化が促進され、その結果最終的に石灰化が生じたのではないかと考えた。

本研究とこれまでの我々の研究結果から、脊柱靭帯の石灰化メカニズムとして以下の機序が考えられる。脊柱靭帯に対するメカニカルストレスは細胞外 ATP の産生を促進し、受容体である P2Y1 を刺激する。OPLL 患者では、何らかの原因により P2Y1 の発現量とその応答性に異常があり、P2Y1 刺激により、Sox9 および BMP-2 の発現が誘導され、細胞の osteoprogenitor 様分化が促進される結果、石灰化が生じる。したがって、P2Y1 拮抗薬は P2Y1 刺激による Sox9 や BMP-2 の発現誘導を抑制することで、OPLL 患者における靭帯骨化を抑制できる可能性がある。

E. 結論

OPLL 患者由来の脊柱靭帯細胞に P2Y1 を一過性に過剰発現させたところ、BMP-2、Sox9 の発現増加と石灰沈着が観察された。

F. 論文発表

Tanaka S, Kudo H, Asari T, Ono A, Motomura S, Toh S, Furukawa K-I. P2Y1 Transient Overexpression Induced Mineralization in Spinal Ligament Cells Derived from Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Cervical Spine. *Calcified Tissue Int.*, *In press.*

G. 参考文献

1) Tanno M. et al. Uniaxial cyclic stretch

induces osteogenic differentiation and synthesis of bone morphogenetic proteins of spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligaments. *Bone* 33: 475-484, 2003.

2) Iwasaki K. et al. Uni-axial Cyclic Stretch Induces Cbfa1 Expression in Spinal Ligament Cells Derived from Patients with Ossification of the Posterior longitudinal Ligament. *Calcif Tissue Int* 74: 448-457, 2004.

3) Sawada T. et al. Possible Role of Extracellular Nucleotides in Ectopic Ossification of Human Spinal ligaments. *J Pharmacol Sci.* 106: 152-161, 2008.

4) Sato R. et al, Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: histopathological findings around the calcification and ossification front. *J Neurosurg Spine* 7(2): 174-183, 2007.

5) Kim Y. et al., Generation of transgenic mice for conditional overexpression of Sox9. *J Bone Miner Metab.* [Epub ahead of print], 2010.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

Cyclic tensile stress が脊柱靭帯骨化に細胞に及ぼす影響

彌山峰史、内田研造、Hong-Xin Cai、中嶋秀明、杉田大輔、馬場久敏
福井大学医学部 器官制御医学講座 整形外科領域
研究分担者 内田 研造 福井大学整形外科准教授

研究要旨

胸椎黄色靭帯骨化症（OLF）由来の培養細胞に cyclic tensile stress を加えた際の転写因子の発現について検討した。OLF 由来の培養細胞は stress を加えていない条件下で、非骨化靭帯（NON-OLF）由来細胞と比較して β -catenin、Sox9、Runx2、Osteopontin の mRNA 発現が上昇していた。Cyclic tensile stress を加えると、NON-OLF 由来細胞では Sox9 以外の因子では有意な上昇を認めなかったのに対して、OLF 由来細胞では stress を 24 時間加えることで各因子の mRNA 発現は有意に上昇した。この結果より、OLF 由来培養細胞は基盤として骨形成に関連する因子の発現が高くなっており、cyclic tensile stress が加わることでさらにこれら因子が過剰発現状態になることが骨化形成・伸展の病態に関与する 1 つの原因と考えられた。

A. 研究目的

脊柱靭帯の骨化過程は、病理学的には内軟骨性骨化の形態を呈し¹⁾、骨化巣の移行部には層状構造を呈する骨化前線が存在している。本症における骨化形成過程の背景には遺伝的素因、代謝異常、環境要因など種々の因子が存在し^{2,3)}、その病態にはこれらの因子が複雑に相関していると考えられる。我々のこれまでの研究では、骨化の初期段階において線維配列の破綻、軟骨性基質の拡大を認め、また頸椎 OPLL、胸椎 OLF の骨化形態によって骨化前線部の層状構造と細胞分化、骨化前線部の軟骨細胞の性質が異なることを報告した^{4,6)}。しかし骨化形態が個々の症例によって多様であることや、骨化伸展方向を規定する因子、骨化が脊柱靭帯に限局する理由など、未だ不明な点も残されている。

今回、胸椎 OLF より得た培養細胞に対して cyclic tensile stress を加えた際の生物学的特徴を観察した。また薄切標本における骨化前線部の種々の因子の局在について、免疫組織化学的に検討した。

B. 研究方法

胸椎 OLF に対して後方手術時を行った際に採取した骨化靭帯 8 例（男性 4 例、女性 4 例、手術時平均 71.0 歳）を対象とした。採取した黄色靭帯は骨組織を切除した後に細切し、explant 法にて細胞を遊走させ、5 継代培養して実験を行った。Cyclic tensile stress は Flexercell FX-3000 を用いて行い、ストレス反応時間は 0、6、12、24 時間とした。この際の β -catenin、Sox9、Runx2、Osteopontin、Osterix の発現を免疫組織化学的染色および real time RT-PCR 法にて評価

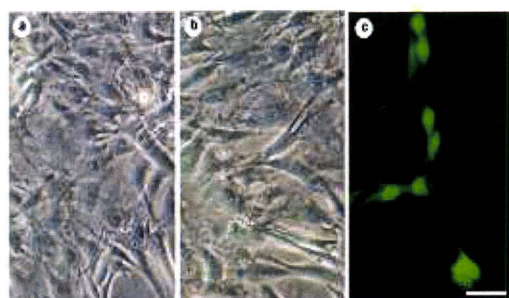
した。また骨化靱帯の一部は脱灰固定して薄切標本を作製し、上記の因子について免疫組織化学染色を行った。比較対象には非骨化黄色靱帯 5 例（男性 3 例、女性 2 例、手術時平均 69.1 歳）を用いた。

（倫理面での配慮）

本研究を遂行するにあたり、研究対象者の人権擁護を最大限に配慮し、研究内容が苦痛を伴うものではなく、社会的不利益を蒙るものではなく、危険性を完全に排除し、疾患の病態解析のみが目的であることを説明及び同意を得ている。

C. 研究結果

培養細胞の形態は、OLF 細胞は大型で重層化する傾向にあり、これに対して NON-OLF 細胞は紡錘形で細長い傾向にあった。Cyclic tensile stress をかけた際の細胞の生存率は OLF 細胞では 24 時間で 93%、NON-OLF 細胞では 91%であり、有意差はみられなかった。

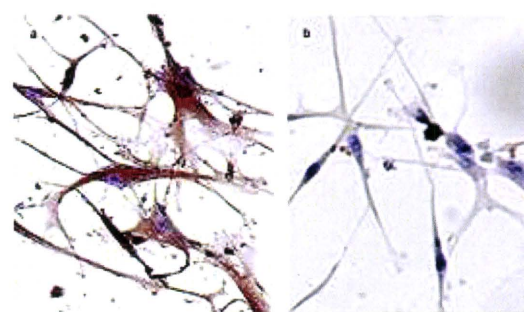


(a: OLF 細胞、b: NON-OLF 細胞、c: Live/Dead assay)

非ストレス条件下において、OLF 由来細胞と NON-OLF 由来細胞に対する real time RT-PCR による各因子の mRNA 発現の比較では、OLF 由来細胞において β -catenin、Sox9、Runx2、Osteopontin の mRNA の発現が有意に上昇しており、特に Runx2 は 2.58 倍、

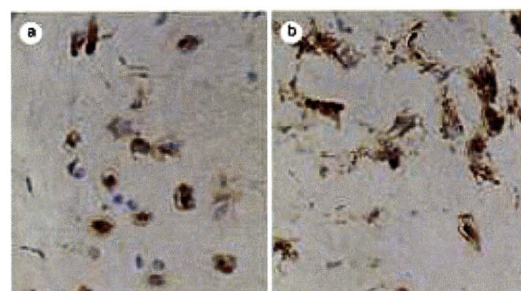
Osteopontin は 2.67 倍の発現を認めた。

Cyclic tensile stress を加えると、OLF 由来細胞では 6 時間のストレス添加後より β -catenin、Sox9 の発現は有意に上昇し、24 時間のストレス添加後では Runx2、Osterix、Osteopontin を含め、全ての因子で有意な上昇を認めた。これに対して、NON-OLF 由来細胞ではストレス添加によって Sox9 の mRNA 発現は上昇したが、それ以外の因子では明らかな発現の変化はみられなかった。



(a: OLF 由来細胞、b: NON-OLF 由来細胞、 β -catenin の免疫組織学的発現では、細胞質に陽性であった。)

脱灰薄切標本における骨化前線の観察では、骨化前線の幅の拡大、石灰化前線周囲を中心とした軟骨細胞の集簇が認められた。免疫組織化学染色において、 β -catenin は増殖期軟骨細胞に強く陽性であり、Sox9 は増殖期から成熟軟骨細胞に強陽性であった。また、Runx2、Osteopontin、Osterix は成熟軟骨細胞、肥大軟骨細胞に強く発現していた。



(a: β -catenin、b: Sox9、脱灰薄切標本の免疫組織化学的染色)

D. 考察

脊柱靱帯骨化の骨化前線において、特に石灰化前線近傍に多数の軟骨細胞が集族しており、非常に細胞活性の高い部位であると考えられている。この軟骨細胞は Sox9、Runx2 といった転写因子により^{7, 8)}、autocrine/paracrine に分化・脱分化が調節されており、さらに cyclic tensile stress を加えることで軟骨細胞の分化が促進されることが示唆された。

Wnt/ β -catenin signaling は Sox9、Runx2 の発現を調節する役割を有し、内軟骨性骨化過程における軟骨細胞と骨芽細胞の分化に関連することが報告されている⁹⁾。また、この signaling の異常活性は骨端線閉鎖異常をもたらすとされている¹⁰⁾。今回の我々の結果では、cyclic tensile stress によって Wnt/ β -catenin signaling の活性は異常上昇し、このことが骨芽細胞の分化を促進させることが推測された。

分化・成熟した軟骨細胞は種々のサイトカインや転写因子を発現し、基質への血管進入と石灰化の促進をもたらす、さらに骨芽細胞の分化・誘導の促進をもたらすと考えられる。Wnt/ β -catenin signaling の持続的かつ過剰発現はこれらの系を異常促進させ、骨化伸展に関与する1つの要因と考えられた。

E. 結論

脊椎靱帯骨化の骨化前線において中心的な役割を果たす軟骨細胞と骨芽細胞は、サイトカイン、転写因子を介して分化、誘導されている。Cyclic mechanical stress は Wnt/ β -catenin signaling の過剰な活性上昇をもたらす、骨化巣の形成を促進させること

が推測された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし。

論文発表、参考論文

- 1) Miyasaka K, Kaneda K, Sato S, Iwasaki Y, Abe S, Takei H, et al. Myelopathy due to ossification or calcification of the ligamentum flavum: radiologic and histologic evaluations. *AJNR Am J Neuroradiol* 4: 629-632, 1983.
- 2) Sakou T, Taketomi E, Matsunaga S, Yamaguchi M, Sonoda S, Yashiki S. Genetic study of ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine with human leucocyte antigen haplotype. *Spine* 16: 1249-1252, 1991.
- 3) Inamasu J, Guiot BH, Sachs DC. Ossification of the posterior longitudinal ligament: an update on its biology, epidemiology, and natural history. *Neurosurgery* 58: 1027-1039, 2006.
- 4) Baba H, Furusawa N, Fukuda M, Maezawa Y, Imura S, Kawahara N, et al. Potential role of streptozotocin in enhancing ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (*twy/twy*). *Eur J Histochem* 41: 191-202, 1997.
- 5) Sato R, Uchida K, Kobayashi S, Yayama T, Kokubo Y, Nakajima H, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: histopathological findings

- around the calcification and ossification front.
J Neurosurg Spine 7: 174-183, 2007.
- 6) Yayama T, Uchida K, Kobayashi S, Kokubo Y, Sato R, Nakajima H, et al. Thoracic ossification of the human ligamentum flavum: histopathological and immunohistochemical findings around the ossified lesion. J Neurosurg Spine 7: 184-193, 2007.
 - 7) Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, et al. Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. J Bone Miner Metab 23: 337-340, 2005
 - 8) Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, et al. Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with P13K-Akt signalling. J Cell Biol 166: 85-95, 2004
 - 9) Timothy FD, Yingzi Y. Wnt and Hedgehog signalling pathways in bone development. J Bone and Joint Surg Am 90: 19-24, 2008
 - 10) Yuasa T, Kondo N, Yasuhara R, Shimono K, Mackem S, Pacifici M, et al. Transient activation of Wnt/ β -Catenin signaling induces abnormal growth plate closure and articular cartilage thickening in postnatal mice. Am J Pathol 175: 1993-2003, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

OPLL 発症機序における PGE2 と BMP2 の関連に関する研究

研究分担者 小坂泰一 澤地恭昇 木村大 遠藤健司 山本謙吾
東京医科大学整形外科

研究要旨

平成 20・21 年度報告のなかで、メカニカルストレスが OPLL 細胞において低濃度の PGE2 の産生を惹起すること、EP4 agonist が濃度によって OPLL 細胞の Sox9 および FGF18 を上昇させることを報告した。しかし PGE2 は複数の受容体を持つため全体としては異なる反応を示すことも考えられる。よってメカニカルストレスにより惹起される PGE2 の役割をさらに明らかにする目的で、先行研究の EP4 受容体刺激+BMP2 に加え PGE2 刺激+BMP2 についても施行し比較検討を行った。結果として今回検討した濃度では PGE2 は骨軟骨分化最終段階において抑制的に働くと考えた。

A. 研究目的

OPLL 発症機序において、メカニカルストレスにより惹起される PGE2 の役割をさらに包括的に明らかにする目的で、と BMP2 と PGE2 または EP4 受容体刺激の相互作用について検討を行った。

対象：術中に摘出した OPLL 患者 5 例、非 OPLL 患者 3 例の脊柱靭帯組織

B. 研究方法

プロナーゼ E およびコラゲナーゼにより酵素的に消化することにより単離し、10% ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む DMEM 培地を用い培養した。

実験には、継代 4-5 の細胞を用いた。

コンフルエントまで培養した細胞をトリプシン/EDTA で剥離し、48 well plate (BD falcon 社製) に 1 ウェル当たり 20,000 個になるように播種し、一晚培養した。翌日、細胞を 0, 50, 100 ng/ml の BMP2 (PeproTech 社製) 単独または 1 mM の EP4 受容体刺激剤

(EP4 agonist)、100mM PGE2 とそれぞれ同時処理し、5 日間培養した。

total RNA を採取、COLX I、FGF18、Aggrecan、ALP をパラメーターとして real time PCR を用いて mRNA レベルで検討した。

(倫理面での配慮)

人権の擁護には個人情報保護が必要であり、検体は匿名化して用いる。また、今回は手術の際に切除した組織から検体を取り出す為、手術時に発生する手術自体の危険性以外に、新たに発生する危険性は無い旨を十分説明した。

C. 研究結果

real time PCR

- FGF18 は EP4 刺激単独では上昇する傾向にあったが BMP2 との併用ではむしろ抑制傾向にあった。BMP2+PGE2 で明らかに抑制された。(FIG 1)

- COLtype11A1 は EP4 刺激および PGE2 単独添加で上昇する傾向にあり、BMP2 併用むしろ抑制される傾向にあった。(FIG 2)
- Aggrecan は、BMP2+EP4 受容体刺激剤、BMP2+PGE2 とともに明らかに抑制された。(FIG 3)
- ALP は BMP2 単独でもむしろ抑制傾向であり、EP4 および PGE2 刺激でさらに抑制された。

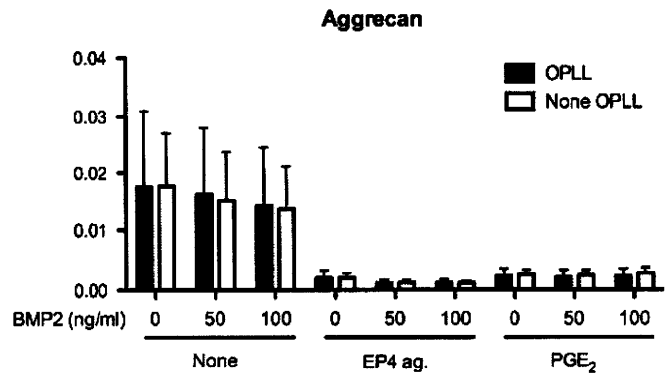


FIG3

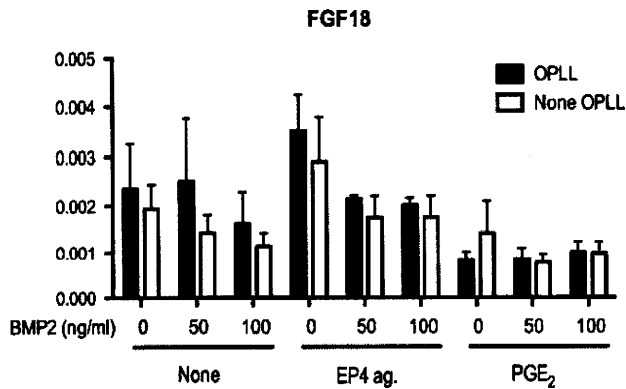


FIG1

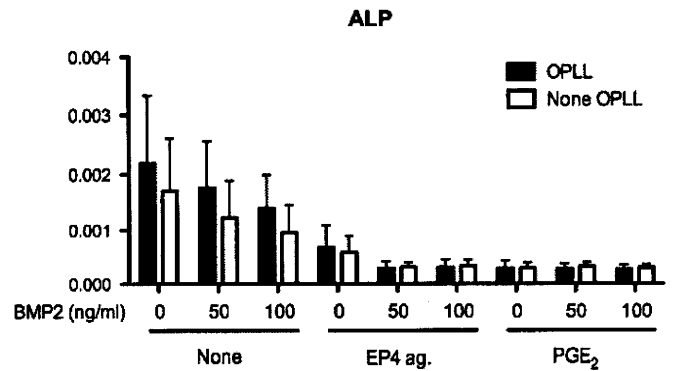


FIG4

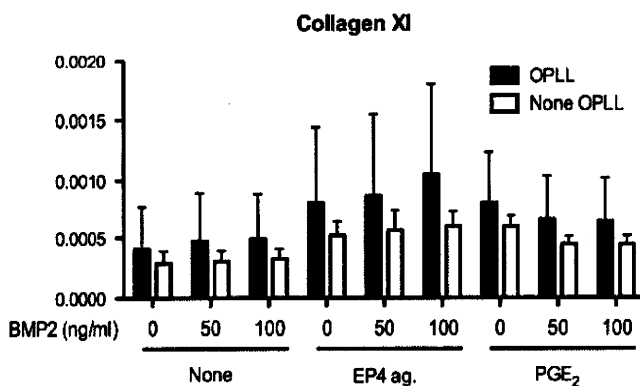


FIG2

D. 考察

平成 21 年度の当研究班報告書において OPLL 発症機序における EP4 受容体刺激と BMP2 の相互作用について検討を行った。骨軟骨化の初期段階の指標として検討した FGF18 は EP4 受容体刺激剤により明らかに上昇し、COLtype11A1 は BMP2 と EP4 受容体刺激剤の併用により上昇する傾向にあった。よって PGE2/EP4 経路が未分化な間葉系細胞の軟骨分化の初期段階に関与する可能性を示唆していると考察した。しかし PGE2 は複数の受容体を持つため全体としては異なる反応を示すことも考えられる。よってメカニカルストレスにより惹起される PGE2 の役割をさらに明らかにする目的で、先行

研究の EP4 受容体刺激+BMP2 に加え PGE2 刺激+BMP2 についても施行し比較検討を行った。

今回の結果では PGE2 と BMP2 の相互作用という観点では、PGE2 は最終的な骨軟骨化にはむしろ抑制的に働く傾向にあると考える。PGE2 には複数の受容体があり、EP4 受容体以外の刺激が骨軟骨化抑制的に作用している可能性が示唆された。今後それぞれの受容体の作用をさらに研究することで、OPLL への治療応用の可能性を検討する予定である。

E. 結論

PGE2 は最終的な骨軟骨化にはむしろ抑制的に働く傾向にある。

F. 健康危険情報 なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会
S1058

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし

脊柱靱帯骨化に関する調査研究

研究分担者 千葉 一裕 慶應義塾大学整形外科准教授
松本 守雄 慶應義塾大学整形外科准教授

研究要旨 後縦靱帯骨化症では異所性に骨が形成され、結果として骨髄腔で維持される造血幹細胞が、本来の骨髄以外の異所性骨中に分散維持されるようになることが考えられる。そこで、後縦靱帯骨化症モデルマウスとして知られる TWY-ttw マウスの長管骨の骨髄中に存在する造血幹細胞の解析を行ったところ、コントロールマウスに比して有意に減少していることを見出した。

A. 研究目的

異所性骨化が出現した後縦靱帯骨化症において、長管骨の骨髄中に存在する造血幹細胞の頻度を解析することを目的とする。

B. 研究方法

後縦靱帯骨化症モデル動物である TWY-ttw マウスとそのコントロールマウスである TWY-c の長管骨の骨髄細胞を回収し、骨髄細胞中に存在する造血幹細胞（LSK 細胞；Lineage- c-Kit+ Scap+）の頻度をフローサイトメトリーにて解析する。

（倫理面での配慮）

動物実験については動物実験委員会の承認を得ている

C. 研究結果

後縦靱帯骨化症モデル動物 TWY-ttw マウスでは同週令のコントロールマウスに比して、長管骨の骨髄中に存在する造血幹細胞の頻度が有意に減少していた。

D. 考察

後縦靱帯骨化症モデル動物である TWY-ttw マウスでは、異所性に骨形成が誘

導されるため、本来長管骨の骨髄に存在する造血幹細胞が異所性骨中に分散維持される可能性が示唆された。

E. 結論

後縦靱帯骨化症モデル動物 TWY-ttw マウスでは、長管骨の骨髄中に存在する造血幹細胞が減少している。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura M, Tsuji O, Fujiyoshi K, Watanabe K, Tsuji T, Ishii K, Matsumoto M, Toyama Y, Chiba K. Cordotomy for patients with thoracic malignant astrocytoma.

J Neurosurg Spine. 13(4):418-423. 2010

Watanabe K, Lenke LG, Matsumoto M, Harimaya K, Kim YJ, Hensley M, Stobbs G, Toyama Y, Chiba K. A novel pedicle channel classification describing

osseous anatomy: how many thoracic scoliotic pedicles have cancellous channels?

Spine (Phila Pa 1976). 35(20):1836-1842. 2010

Watanabe K, Matsumoto M, Tsuji T, Ishii K, Takaishi H, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K. Ball tip technique for thoracic pedicle screw placement in patients with adolescent idiopathic scoliosis.

J Neurosurg Spine. 13(2):246-252. 2010

Okada E, Matsumoto M, Ichihara D, Chiba K, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Hashimoto T, Watanabe M, Inoue T, Takahata T. Development of stiff shoulder in asymptomatic volunteers during ten-year follow-up in Japan.

J Back Musculoskelet Rehabil. 23(2):69-75. 2010

Matsumoto M, Okada E, Ichihara D, Chiba K, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Hashimoto T, Inoue T, Watanabe M, Takahata T. Prospective ten-year follow-up study comparing patients with whiplash-associated disorders and asymptomatic subjects using magnetic resonance imaging.

Spine (Phila Pa 1976). 35(18):1684-1690. 2010

Matsumoto M, Okada E, Ichihara D, Watanabe K, Chiba K, Toyama Y, Fujiwara H, Momoshima S, Nishiwaki Y, Hashimoto T,

Takahata T. Age-related changes of thoracic and cervical intervertebral discs in asymptomatic subjects.

Spine (Phila Pa 1976). 35(14):1359-1364. 2010

Matsumoto M, Watanabe K, Ishii K, Tsuji T, Takaishi H, Nakamura M, Toyama Y, Chiba K, Imanishi Y, Kishi K, Kawana H. Complicated surgical resection of malignant tumors in the upper cervical spine after failed ion-beam radiation therapy.

Spine (Phila Pa 1976). 35(11):E505-509. 2010

Miyauchi Y, Ninomiya K, Miyamoto H, Sakamoto A, Iwasaki R, Hoshi H, Miyamoto K, Hao W, Yoshida S, Morioka H, Chiba K, Kato S, Tokuhisa T, Saitou M, Toyama Y, Suda T, Miyamoto T. The Blimp1-Bcl6 axis is critical to regulate osteoclast differentiation and bone homeostasis.

J Exp Med. 207(4):751-762. 2010

Hakozaki A, Yoda M, Tohmonda T, Furukawa M, Hikata T, Uchikawa S, Takaishi H, Matsumoto M, Chiba K, Horiuchi K, Toyama Y. Receptor activator of NF-kappaB (RANK) ligand induces ectodomain shedding of RANK in murine RAW264.7 macrophages.

J Immunol. 184(5):2442-2448. 2010

Ishii K, Matsumoto M, Takahashi Y, Okada E, Watanabe K, Tsuji T, Takaishi H,