

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業)
分担研究報告書

後縦靭帯骨化症の骨化前線部の内軟骨骨化における
軟骨細胞分化・成熟に関する転写紳士発現に関する研究

研究分担者 杉田 大輔 福井大学整形外科助教
中嶋 秀明 福井大学整形外科助教
内田 研造 福井大学整形外科准教授

研究要旨 OPLL の骨化巣の進展様式は内軟骨骨化の形態をとるといわれている。本研究では頸椎前方除圧固定術を行った OPLL 患者から採取した骨化巣を含んだ後縦靭帯組織を利用して OPLL 骨化前線部の細胞の持つ遺伝子学的特性、転写因子の組織学的な局在について検討した。マイクロアレイ解析では、骨化巣を含むサンプルで *Ihh*、*Runx 2* の遺伝子発現の増加がみられ、その他、*Ihh signaling* の *GLI2*、*GLI3* や *Sox9*、*BMP2*、*VEGF*、*COL 11 A2* などの遺伝子発現の上昇がみられた。また、*Hedgehog signaling* の pathway 解析では *Ihh*、受容体である *GLI2*、*GLI3*、*PTCH* を含む 7 個の遺伝子の発現上昇が確認できた。OPLL から得た培養細胞に *cyclic tensile strain* を加えたところ、*Ihh signaling* に関与する遺伝子の発現変化が確認でき、また *Western Blotting* 法でタンパク発現量の半定量的評価では、*cyclic tensile strain* によるタンパク発現の増加がみられた。免疫組織学的検討では骨化前線周囲に局在がみられ、*Ihh*、*Sox9* は前肥大軟骨細胞、*Runx2* は肥大軟骨細胞で陽性細胞が多く観察できた。四肢の内軟骨骨化で重要な役割を果たす *Ihh signaling* の *cyclic tensile strain* による発現亢進が OPLL 骨化巣進展に関与している可能性が考えられた。

A . 研究目的

これまで我々はヒト頸椎 OPLL の手術で得られた標本を観察して、OPLL 骨化前線部の組織学的な特徴や、多様なサイトカインや成長因子の発現とその局在を骨化に関する重要な所見と考え報告してきた¹⁻³⁾。

OPLL の骨化巣は内軟骨骨化と同様の形態をとることが指摘されており、四肢の内軟骨骨化では *Indian Hedgehog (Ihh)* とその *signaling* が重要な因子と考えられている。本研究では OPLL 骨化前線部における *Ihh* の発現とその局在を OPLL 前方手術から得られた培養細胞および標本を用いて検討を行

った。

B . 研究方法

2013 年までに頸椎 OPLL に対して前方除圧固定術を行った 185 例のうち、骨化巣を *en bloc* に摘出した 35 例の標本を用いて実験を行った。標本から *Explant* 法で培養細胞を得て *Flexercell 3000* を用いて *cyclic tensile strain* を 24 時間与え、*strain* 前後の培養細胞の遺伝子発現の変化を *Microarray* を用いて解析を行った。

また、*strain* を加えた培養細胞における *Ihh signaling* のタンパク発現量の変化を *Western Blotting* 法を用いて半定量化して

評価した (Ihh, Runx 2, Sox9, PTHrP, Gli2, Gli3)。

得られた標本からは薄切切片を作成し骨化前線部における Ihh signaling の局在を検討した (Ihh, Runx 2, Sox9, Gli2, Gli3, SMO)。

(倫理面での配慮)

手術前の患者には摘出した骨化巣の医学的な研究目的の使用について十分な説明を行い、書類での同意を得た。得られた標本はすべて OPLL の骨化形態と年齢、性別のみを記録して暗号化し個人情報の保護に努めた。

C . 研究結果

マイクロアレイでは OPLL の 2 サンプルで Ihh, Runx 2 の遺伝子発現の増加がみられた。その他、Ihh signaling の Gli2, Gli3 や Sox9, BMP2, VEGF, COL 11 A2 などの遺伝子発現の上昇がみられた。また、Hedgehog signaling の pathway 解析では Ihh, 受容体である Gli2, Gli3, PTCH を含む 7 個の遺伝子の発現上昇が確認できた。

Western Blotting 法によるタンパク発現量の半定量化では Cyclic tensile strain によって Ihh は 12 時間以降、Sox9 は 24 時間以降優位にタンパク発現量が上昇しており、Gli2, Gli3 は 6 時間でタンパク発現量が優位に増加していた。

免疫組織学的検討では Ihh, Sox9 は前肥大軟骨細胞、Runx2 は肥大軟骨細胞で陽性細胞が多く観察できた。PTHrP は前肥大軟骨細胞、肥大軟骨細胞層に多く見られ、Gli2, Gli3 は前肥大軟骨細胞層に陽性細胞が多くみられた (図 1)。

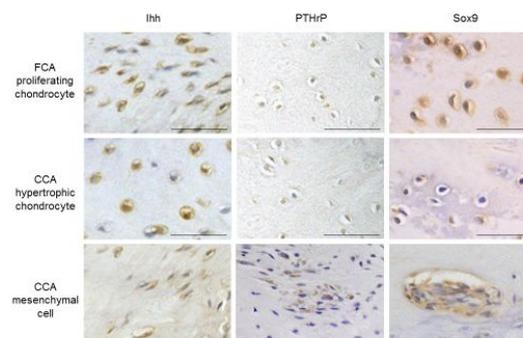


図 1

D . 考察

OPLL 骨化巣進展において cyclic tensile strain は重要な local factor として考えられており、これまで我々は cyclic tensile strain による組織学的、生物学的な変化についても報告してきた⁴⁾。

また、OPLL は多因子疾患であり特に近年は遺伝子学的研究が進み、OPLL と関連のある遺伝子や染色体について報告がされているがそれらの遺伝子と cyclic tensile strain の関係は未だ解明されていない。

Ihh signaling は正常骨幹端部での軟骨成長において重要な役割を持つが、Ihh は PTHrP との共作用のみでなく Sox9, Runx2 とそれぞれ連携することで軟骨細胞分化および肥大に促進的、抑制的の両方の面で働いている可能性が報告されており^{5,6)}、OPLL において Ihh とその受容体の発現が見られたことから軟骨細胞の肥大、成熟の調節に関わっている可能性が考えられた。

我々のこれまでの研究を踏まえると OPLL において局所因子としての cyclic tensile strain が加わることで骨化前線での弾性繊維の変性、新生血管の増生と間葉系の未分化細胞の流入に加え、軟骨細胞の肥大、分化が autocrine / paracrine に進行してい

く可能性が考えられた。

E . 結論

1. ヒト OPLL 靭帯由来培養細胞を用いて cyclic tensile strain 負荷による遺伝子発現量変化をマイクロアレイを用いて観察した
2. 軟骨細胞の肥大、分化に関与する Ihh と受容体 Gli2, Gli3 についてマイクロアレイでその遺伝子発現量の増加が見られ、Western Blotting 法でも mRNA 発現量の増加を確認できた
3. OPLL 骨化前線 で cyclic tensile strain によって Ihh、受容体の発現の亢進が軟骨細胞分化、肥大の調節に関わり骨化巣進展に寄与している可能性が考えられた

【Acknowledgment】

This work was supported by Health Labour Sciences Research Grant .

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

1. Uchida K, Nakajima H, Guerrero AR, Johnson WE, Masri WE, Baba H. Gene therapy strategies for the treatment of spinal cord injury. Ther Deliv 5 (5): 591-607, 2014
2. Uchida K, Nakajima H, Takeura N, Yayama T, Guerrero AR, Yoshida A, Sakamoto T, Honjoh K, Baba H. Prognostic value of changes in

spinal cord signal intensity on magnetic resonance imaging in patients with cervical compressive myelopathy. Spine J 14 (8): 1601-1610, 2014

3. Sugita D, Yayama T, Uchida K, Kokubo Y, Nakajima H, Yamagishi A, Takeura N, Baba H. Indian Hedgehog signaling promotes chondrocyte differentiation in enchondral ossification in human cervical ossification of the posterior longitudinal ligament. Spine 2013 Oct 15; 38(22): 1388-1396.

2.学会発表

1. 杉田大輔、内田研造、中嶋秀明、本定和也、坂本拓己、山岸淳嗣、馬場久敏：メカニカルストレスはヒト OPLL においてインディアンヘッジホッグ (Ihh) とその受容体の発現増加を促進させ軟骨細胞の成長を進行させる、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2014.10.9-10)、鹿児島
2. Sugita D, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Yoshida A, Baba H. Indian Hedgehog signaling induces hypertrophy and differentiation of chondrocytes in the ossification front of human cervical OPLL. Euro Spine 2014 (October 1-3) Lyon, France.

3. 杉田大輔、内田研造、中嶋秀明、竹浦直人、吉田藍、馬場久敏. 頸椎後縦靱帯骨化症の骨化巣における軟骨細胞分化・肥大に関する遺伝子学的検討. 第43回日本脊椎脊髄病学会学術集会(2014.4.17-19)、京都
4. 杉田大輔、内田研造、中嶋秀明、竹浦直人、吉田藍、馬場久敏. 頸椎 OPLL の骨化前部における軟骨細胞分化、肥大に関する転写因子のマイクロアレイを用いた検討. 第122回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会(2014.4.11-12)、岡山

H. 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

文献

- 1、Furusawa N, Baba H, Imura S, Fukuda M. Characteristics and mechanisms of the ossification of posterior longitudinal ligament in the tip-toe walking Yoshimura (*twy*) mouse. Eur J Histochem, 1996; 40(3): 199-210.
- 2、Sato R, Uchida K, Kobayashi S, Yayama T, Kokubo Y, Nakajima H, Takamura T, Bangirana A, Itoh H, Baba H. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine : histopathological findings around the calcification and ossification front. J Neurosurg Spine. 2007 Aug; (2): 174-183.
- 3、Uchida K, Yayama T, Sugita D, Nakajima H, Yamagishi A, Takeura N, Baba H. Initiation and progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in heredity in spinal hyperostotic mouse (*twy/twy*). Eur Spine J. 2012 Jan; 21(1): 149-155.
- 4、Cai HX, Yayama T, Uchida K, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, Yoshida A, Baba H. Cyclic tensile strain facilitates the ossification of ligamentum flavum through β -catenin signaling pathway: in vitro analysis. Spine 2012 May15; 37(11): 639-646.
- 5、Shimoyama A, Wada M, Ikeda F, Hata K, Matsubara T, Nifuji A, Noda M, Amano K, Yamaguchi A, Nishimura R, Yoneda T. Ihh / Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx 2 expression and function. Mol Biol Cell. 2007 Jul; 18(7): 2411-2418.
- 6、Amano K, Hata K, Sugita A, Takigawa Y, Ono K, Wakabayashi M, Kogo M, Nishimura R, Yoneda T. Sox 9 family members negatively regulate maturation and calcification of chondrocytes through upregulation of parathyroid hormone-related protein. Mol Biol Cell. 2009 Nov; 20(21): 4541-4551.

