

201442053A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患克服研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

後縦靱帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 松本 守雄

平成27(2015)年 3月

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患克服研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 松本 守雄

平成27（2015）年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究
委託事業による委託業務として、慶應義塾大学
医学部整形外科松本守雄が実施した平成26年
度「後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法に関す
る研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I 委託業務成果報告（総括）	
後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究-----	1
松本 守雄 慶應義塾大学医学部整形外科	
II 委託業務成果報告（ゲノム解析）	
1. 全ゲノムレベル相関解析に関する研究-----	12
池川 志郎 理化学研究所・ゲノム医科学センター	
III 委託業務成果報告（疾患特異的iPS細胞の樹立・解析）	
1. 疾患特異的iPS細胞の樹立・解析に関する研究-----	15
戸口田 淳也 京都大学再生医科学研究所	
2. 後縦靭帯骨化症の病態解明に向けた疾患特異的 iPS 細胞を用いた解析-----	18
中村 雅也 慶應義塾大学医学部整形外科	
堀内 圭輔 慶應義塾大学医学部整形外科	
IV 委託業務成果報告（疾患感受性遺伝子の発現解析）	
1. 遺伝子発現プロファイル解析-----	20
筑田 博隆 東京大学整形外科	
斉藤 琢 東京大学TE部	
V 委託業務成果報告（候補遺伝子の機能解析・治療開発）	
1. 候補遺伝子の機能解析-----	22
宮本 健史 慶應義塾大学医学部整形外科	
2. 候補遺伝子の機能解析-----	25
江面 陽一 東京医科歯科大学難治疾患研究所	
3. 候補遺伝子の機能解析-----	28
前田 真吾 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 医療関節材料開発講座	
4. 候補遺伝子の機能解析-----	30
茶野 徳宏 滋賀医科大学臨床検査医学講座	
VI 委託業務成果報告（病態解明・生体試料収集）	
1. 病態解明・生体試料収集-----	32
古川 賢一 弘前大学大学院医学研究科病態薬理学	
和田 簡一郎 弘前大学大学院医学研究科整形外科	
2. 病態解明・生体試料収集-----	37
大川 淳 東京医科歯科大学大学院整形外科	

3. 病態解明・生体試料収集-----	39
川口 善治 富山大学整形外科 浜崎 景 富山大学公衆衛生学	
4. 病態解明・生体試料収集-----	41
森 幹士 滋賀医科大学整形外科	
5. 病態解明・生体試料収集-----	44
辻 崇 北里大学北里研究所整形外科	

VII 学会等発表実績

VIII 研究成果の刊行物・別刷

I 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費
(難治性疾患克服研究事業 (難治性疾患実用化研究事業))
委託業務成果報告 (総括)

後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究

業務主任者 松本 守雄 慶應義塾大学医学部整形外科 教授

研究要旨

本研究では「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班」の成果を発展させ、「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班」、「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究班」「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム難病解析拠点」等と連携し、病態解明、新たなシーズ探索、医薬品開発を目指している。

研究班では、「ゲノム解析」、「疾患特異的 iPS 細胞の樹立・解析」、「疾患感受性遺伝子の発現解析」、「候補遺伝子の機能解析、治療開発」、「病態解明・生体試料収集」のサブグループを構築し、研究を推進する。

「ゲノム解析」では、弧発例 1,550 例の遺伝子サンプル収集を終了し、世界で初めて行った後縦靭帯骨化症 (Ossification of posterior longitudinal ligament: OPLL) に対するゲノムワイド相関解析 (genome-wide association study: GWAS) から「6つの新規遺伝子座」(6番、8番、12番、20番染色体)を明らかにした (*Nat Genet.* 2014)。

「疾患特異的 iPS 細胞の樹立・解析」では、血液サンプルが得られた 5 患者全てから iPS 細胞の樹立に成功した。樹立した iPS 細胞株の多能性幹細胞としての適切な機能・品質を確認し、分化誘導法により、骨分化能を評価した。また、ゲノムワイド相関解析から導き出された「6つの新規遺伝子座」(6番、8番、12番、20番染色体)を解析し、1家系3患者は8番染色体の伝子座に危険アリルを共通して有することを明らかにした。

「疾患感受性遺伝子の発現解析」では、病態解明の基盤情報として、正常実験動物の脊椎構造物の遺伝子プロファイルの解析を行い、顕微鏡下に組織を分別採取、cDNA ライブラリーが作成可能であった。遺伝子発現解析の手法を確立し、ヒト組織解析への応用が可能となった。

「候補遺伝子の機能解析」では、rs927485/6p21.1、rs374810/8q23.1、rs1979679/12p11.22、rs11045000/12p12.2、rs2423294/20p12.3 の遺伝子座について異所性骨化のメカニズムについて解析を進めた。

「病態解明・生体試料収集」では、ヒト脊柱靭帯組織から初めて間葉系幹細胞を単離し、靭帯組織内の所在を明らかにするとともに、患者由来の幹細胞は高い骨化能を有することを明らかにした。

担当責任者

大川淳 東京医科歯科大学大学院整形外科
教授

池川志郎 理化学研究所統合生命医科学
研究センター チームリーダー

戸口田淳也 京都大学再生医科学研究所
教授

中村雅也 慶應義塾大学医学部整形外科
教授

堀内圭輔 慶應義塾大学医学部整形外科
特任准教授

宮本健史 慶應義塾大学医学部整形外科
講師

前田真吾 鹿児島大学大学院医歯学総合
研究科医療関節材料開発講座 特任准教授

江面陽一 東京医科歯科大学
難治疾患研究所 准教授

茶野徳宏 滋賀医科大学臨床検査医学講座
准教授

斉藤琢 東京大学医学部附属病院
骨軟骨再生医療講座 特任准教授

内田研造 福井大学医学部整形外科
准教授

筑田博隆 東京大学医学部附属病院
整形外科 講師

川口善治 富山大学医学部整形外科
准教授

古川賢一 弘前大学大学院医学研究科
病態薬理学講座 准教授

和田簡一郎 弘前大学大学院医学研究科
整形外科学講座 講師

森幹士 滋賀医科大学整形外科学講座
講師

辻崇 北里大学北里研究所整形外科
副部長

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (Ossification of the posterior longitudinal ligament: OPLL) は時に脊髄麻痺を来し、患者の QOL (quality of life) を著しく障害する疾患であるにもかかわらず根本的な治療は未だ存在せず、その病態メカニズムの解明と新規治療法の確立の必要性は極めて高い。

研究班では、「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」(H23-25; 戸山班長) にて収集した OPLL 罹患同胞対 214 家系の遺伝子解析結果 (*J Bone Miner Metab* 2013) および弧発例 1600 例以上、対照群 6800 例以上の OPLL の全ゲノム相関解析 (genome-wide association study: GWAS) の結果から「6 つの新規遺伝子座」(6 番、8 番、12 番、20 番染色体) (*Nat Genet.* 2014) を明らかにしている。これらの研究成果を活用し、「ゲノム解析」、「疾患特異的 iPS 細胞の樹立・解析」、「疾患感受性遺伝子の発現解析」、「候補遺伝子の機能解析・治療開発」「病態解明・生体試料収集」のサブグループを構築して研究を推進する。

さらに、「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班」「疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究班」、「遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム難病解析拠点」と連携し、病態解明、革新的な医薬品等の臨床応用を最終的な目的とする。

研究班では H25 年度までの研究において、患者 1,600 例以上、対照群 6,800 例以上のゲノム及び血漿検体の収集を終え、世界で初めて、OPLL の GWAS を実施した。これをさらに進め、遺伝性難治疾患の網羅的エクソーム難病解析拠点 (横浜市立大学、松本直通班長) と連携して遺伝子領域の次世代

シーケンス解析により疾患感受性遺伝子多型を同定し、遺伝情報と臨床情報を統合して、疾患の発症・進展の予測モデルを開発することが期待できる。

また疾患特異的 iPS 細胞の樹立の報告も国内外に存在せず、病態解明や新規薬剤のスクリーニング等、極めて独創的な研究展開が期待できる。

以上のように、本研究班は既存の生体試料バンクを有し、かつ遺伝子解析拠点、iPS 細胞拠点、および臨床研究班が有機的な連携を行う極めて独創的かつ網羅的な体制であり、OPLL の病態解明、新規医薬品研究開発への発展が大いに期待できる。

本研究の発展により、厚生労働省の臨床調査研究分野の対象疾患である OPLL の病態の解明・治療につながる新たなシーズを発見できれば、既存薬剤の適応拡大を含めた国内での新たな薬事承認を目標とした非臨床試験または臨床試験の実施が可能となり、厚生労働行政への貢献が期待される。

B. 研究方法

1) ゲノム解析

「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班」と連携し、脊椎外科専門医の診断のもとに収集した患者サンプル（血液検体等）から genomic DNA を抽出する。これを用いて GWAS を行い、疾患感受性遺伝子を同定する。同定した疾患感受性遺伝子の機能を *in vitro* の解析により明らかにし OPLL の分子病態を解明する。

サンプルを収集した患者の臨床情報、疾患情報を検討し、診断が確実な OPLL 症例、計 1,112 例を選んだ。この OPLL 患者サンプ

ルと 6,810 例の対照サンプルのゲノム DNA を用いて GWAS を行った。次いで、最初に行った GWAS とは独立したサンプル OPLL 症例 548 例と 6,469 例の対照サンプルを用いて関連の追試を行った。

2) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・解析

後縦靭帯骨化症の発症には環境因子と、遺伝的な因子の双方が関わっていると理解されている。本研究における iPS 細胞の樹立にあたり、1) 広範な病変を有し、2) 合併症に罹患しておらず、3) 3 名以上の同胞罹患患者がいる家系をリクルートすることとした。われわれが「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」において調査した患者群の情報と照らし合わせ、2 家系、合計 5 患者を選択した。これらの患者からインフォームド・コンセントを得たのちに、血液サンプルを採取し、京都大学再生医学研究所にて従来確立されたプロトコールに沿って iPS 細胞の樹立を試みた。

(1) OPLL 患者由来 iPS 細胞の樹立：OPLL 罹患患者の末梢血細胞に、エピソーマルベクターに組み込まれた因子を導入することで iPS 細胞を樹立した。そして幹細胞マーカーの発現、*in vitro* での分化能など樹立した iPS 細胞の多能性幹細胞としての機能評価を行った。

(2) OPLL 患者由来 iPS 細胞の骨及び軟骨分化能評価：研究分担者らが樹立した神経堤細胞を介する分化誘導法を用いて、樹立した iPS 細胞から、骨及び軟骨へ分化誘導して、個々の細胞の分化能を評価した。

(3) 疾患関連 SNP に近接した遺伝子の発現解析：GWAS によって同定された SNP に近接している遺伝子の発現パターンを、iPS

細胞から骨及び軟骨分化誘導過程において評価した。

(4)ゲノム編集技術を用いた疾患関連 SNP の改変：疾患関連 SNP と近接した遺伝子の一つである *RSP02* 遺伝子のリスク SNP についてゲノム編集技術を用いて非リスクアレルに変換した細胞を作製した。

3) 疾患感受性遺伝子の発現解析

ラット、ミニブタから正常実験動物の脊椎構造物の遺伝子プロファイルの解析を試みた。脊椎を摘出、その構造物を顕微鏡視下に組織を分別採取し、mRNA を精製して逆転写し、cDNA ライブラリーを作成した。定量的 PCR にて遺伝子発現量を測定した。

4) 候補遺伝子の機能解析・治療開発

GWAS の結果から「6 つの新規遺伝子座」(6 番、8 番、12 番、20 番染色体)について、下記の 5 つの遺伝子座について分担者を決定し解析を進めた。

・ rs2423294/20p12.3

OPLL の発症と相関する 6 つの SNPs が同定されたゲノム領域の近傍にある遺伝子を中心に、以下の 8 つの遺伝子 *HAO1*、*RSP02*、*EIF3E*、*CDC91*、*EIF3H*、*CDC51*、*RSPHA*、*TMEM151B* について、マウス胚性繊維芽細胞を用いた BMP2 による骨芽細胞分化誘導系において、各々の発現変動を解析した。

・ rs374810/8q23.1

rs374810/8q23.1 座の近傍に位置する *RSP02* 遺伝子に注目し、ラットおよびミニブタ脊柱より顕微鏡下に組織を分離摘出し、組織毎の遺伝子発現を検討した。

ラット骨髄由来間葉系幹細胞および ATDC5 細胞に *RSP02* を過剰発現させ骨化傾向を Alizarin red 染色および von Kossa 染色にて評価した。

・ rs1979679/12p11.22

12p11.22 から 930kb 離れたゲノム領域に存在し、かつ線維芽細胞に比べて骨芽細胞で発現の高い遺伝子 *STK38L*(Nakajima M, et al, *Nat Genet*, 2014)を原因候補遺伝子として注目し、この間葉系細胞分化への関わりを siRNA によるノックダウン実験で検証した。

靭帯細胞のモデルとして線維芽細胞様細胞株 NIH3T3、軟骨細胞系のモデルとして C3H/10T1/2、軟骨細胞様細胞株 ATDC5、骨芽細胞系のモデルとして ST-2、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。いずれもマウスの細胞株である。分化誘導は主に BMP-6 を用い、ノックダウンはマウス *Stk38l* に対する異なる 4 つの siRNA のカクテルを用いた。分化度の評価は、分化マーカーの定量的 RT-PCR や特異的基質染色法で評価した。

・ rs11045000/12p12.2

ヒト間葉系幹細胞、骨肉腫細胞を用いて、骨分化誘導の上、rs11045000/12p12.2 の近傍に位置する LOC10050693 の発現変化を解析した。また、発現阻害による骨分化への影響を検討した。

・ rs927485/6p21.1

異所性骨化病巣を伴う様々な遺伝性疾患から、アデノシン代謝と細胞外ピロリン酸レベルの制御系の重要性が、近年、指摘されている。第 6 染色体 6p21.1 領域における遺

伝子多型 rs927485 を中心とする連鎖不平衡領域は、比較的近傍にアデノシントランスポーター分子である *SLC29A1* 遺伝子（別名 *ENT1*）が位置する点において注目に値する。この遺伝子を欠損したマウスは脊椎靭帯に著しい骨化病巣を形成することが報告されている（*J Bone Min Res, 2013*）。

そこで、細胞外基質の石灰化過程における *SLC29A1* 遺伝子と、関連する幾つかの遺伝子の発現制御について検討した。

マウス骨髄由来間質細胞を用いて、アスコルビン酸およびβグリセロリン酸を加えた石灰化誘導系における継時的な遺伝子発現解析をリアルタイム RT-PCR 法により行い、本過程における *Slc29a1* の発現レベル変動を明らかにした。また、骨化病巣の形成には微細な組織損傷に伴う炎症応答の関与が想定されるため、本培養系における炎症性サイトカイン IL-1β の影響を検討した。

5) 病態解明・生体試料収集

(1) 間葉系幹細胞研究

多分化能を有する間葉系幹細胞に注目し、脊椎靭帯組織内の存在の有無、所在、細胞の機能的特徴について検討した。

1. 間葉系幹細胞

脊椎手術時に摘出廃棄するヒト脊椎靭帯組織を、コラゲナーゼによる消化で靭帯組織内の細胞を単離し、ノンコーティングディッシュに播種し、3 時間後に培地交換して、ディッシュに付着した細胞を以降、10%FBS 添加 α-MEM 培地中で 37°C、5%CO₂ 気相下に培養した。

2. FACS (fluorescence-activated cell sorting)

間葉系幹細胞マーカー (CD73, 90, 105 陽

性、CD11b, 19, 34, 45, HLA-DR 陰性) に対する蛍光標識抗体で細胞を標識して、FACS により間葉系幹細胞を単離した。

3. 多分化能

骨、軟骨、脂肪分化誘導培地にて分化誘導を行い、それぞれ特異的染色法 (Alizarin Red S、Toluidine Blue、Oil Red O) で分化の評価を行った。また軟骨分化においては通常の平面培養ではなく、ペレットによる三次元培養を行い、ペレットをホルマリン固定し、薄切切片を作成し、それに対して染色を行った。

4. 免疫組織化学

間葉系幹細胞のヒト脊椎靭帯組織内での局在を明らかにするため、間葉系幹細胞マーカー (CD73, 90, 105) に対する蛍光標識抗体を用いて、組織切片の蛍光免疫二重染色を行った。

5. 生化学的試験

骨化能を定量するため、そのマーカー酵素の一つであるアルカリフォスファターゼ活性を、細胞を可溶化して測定した。

(2) 生体試料収集

患者手術に摘出される手術検体のクオリティを担保し均質化するために、DNA/RNA 用プロトコール、組織用プロトコール、生組織プロトコールを作製した。

(倫理面での配慮)

ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)、疫学研究に関する倫理指針 (平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)、遺伝子治療臨床研究に関する指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号) を参照する。

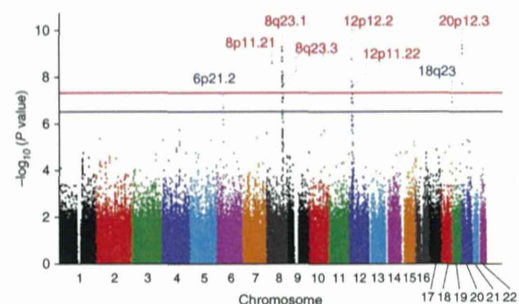
働省告示第2号)、臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針(平成18年厚生労働省告示第425号)、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)を遵守して、研究を行った。研究開始にあたっては、各施設の倫理委員会への申請を行い、サンプル採取の際にはインフォームド・コンセントを行った後に採取を行った。

C. 研究結果およびD. 考察

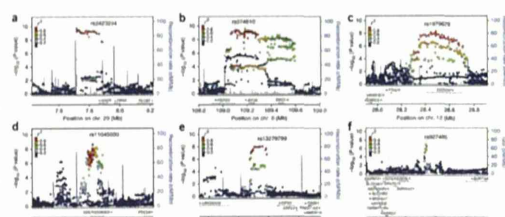
1) ゲノム解析

サンプルを収集した患者の臨床情報、疾患情報を検討し、診断が確実なOPLL症例、計1,112例を選んだ。このOPLL患者サンプルと6,810例の対照サンプルのゲノムDNAを用いてGWASを行った。その結果、Genome-wideの有意水準の閾値($P=5 \times 10^{-8}$)を超える、もしくはその閾値に近い、極めて強い相関を示す8つの遺伝子座位を発見した。

次いで、GWASとは独立の、OPLL症例、548例と6,469例の対照サンプルのゲノムDNAを用いて、8つの遺伝子座位の相関の追試を行った。その結果、6つの遺伝子座位について、相関が再現された。いずれも、過去に報告のない新規の遺伝子座位であった。



Values were plotted against their respective positions on the autosomal chromosomes. The red line represents the genome-wide significance threshold ($P = 5 \times 10^{-8}$). The blue line represents the threshold for the selection of SNPs for the replication study ($P = 5 \times 10^{-7}$).



Fine-scale plots of $-\log_{10}(P \text{ values})$ against the recombination positions of SNPs in the specific region. The genotyped SNP with the strongest association signal in each locus is represented as a purple diamond; the other SNPs are colored according to the extent of LD with this SNP. Estimated recombination rates from the HapMap project (March 2012 East Asian reference) are shown as light blue lines. (a) 20p12.3 (b) 8q23.1 (c) 12p11.22 (d) 12p12.2 (e) 8q23.3 (f) 8q23.1

更に、これらの遺伝子座位の中に存在する候補遺伝子について、ATDC5細胞等を用いた機能解析を行なった。その結果、うちひとつの遺伝子で、内軟骨骨化の初期の過程で、骨化を抑制する働きがある事が明らかになった。

今回発見した遺伝子座のうちの一つは、先に罹患同胞対を用いたゲノムレベルでのノンパラメトリック連鎖解析(sib-pair linkage analysis)(*J Bone Min Res.* 2013)により我々が同定した遺伝子座位と重複しており、遺伝学的には非常に確実なOPLL座位と考えられる。

過去の病理学的研究から、OPLLの異所性骨化は、内軟骨骨化により起こるとされている。8番染色体長腕にある遺伝子座内にある候補遺伝子は、内軟骨骨化に関連し、この遺伝子の機能の破綻が、OPLLの病態に関与することがわかった。

2) 疾患特異的iPS細胞の樹立・解析

(1) OPLL 患者由来 iPS 細胞の樹立：慶應義塾大学より提供を受けた 2 家系 5 名の OPLL 罹患者の末梢血細胞より、それぞれ 5 クローン以上の iPS 細胞を作製し、多能性幹細胞としての適切な機能を有していることを確認した。

(2) OPLL 患者由来 iPS 細胞の骨及び軟骨分化能評価：標準的 iPS 細胞を対照として用いた骨分化能評価では著しい差は検出されなかったが、骨関連遺伝子の中には発現が亢進している遺伝子も存在していた。

(3) 疾患関連 SNP に近接した遺伝子の発現解析：6 つの遺伝子は iPS 細胞から骨及び軟骨分化誘導過程において異なる遺伝子発現パターンを呈し、その中には分化過程とも亢進しているものも存在した。

(4) ゲノム編集技術を用いた疾患関連 SNP の改変：疾患関連 SNP とした遺伝子の一つである *RSPO2* 遺伝子のリスク SNP を、ゲノム編集技術を用いて非リスクアレルに変換した細胞を作製した。

OPLL 患者と非患者の分化能の差は限定されたものであると想定されたため、適切な対照細胞がなく多数例の解析が必要であると考えられてきたが、ゲノム編集技術を用いてリスクアレルを非リスクアレルに変換した細胞を用いることにより、正しく評価できると期待される。

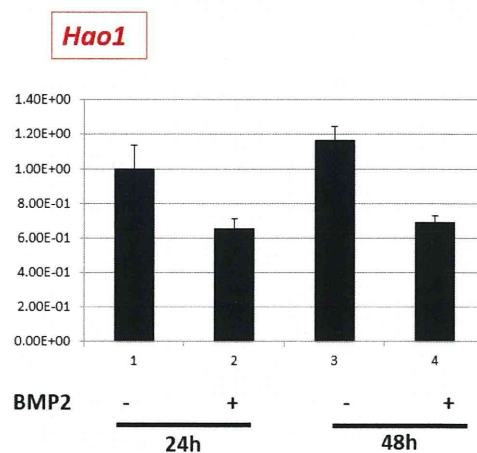
3) 疾患感受性遺伝子の発現解析

各組織のマーカー組織の発現量を測定し、サンプル回収が適切であることを確認した。疾患感受性候補遺伝子の発現量も定量した。

4) 候補遺伝子の機能解析・治療開発

・ rs2423294/20p12.3

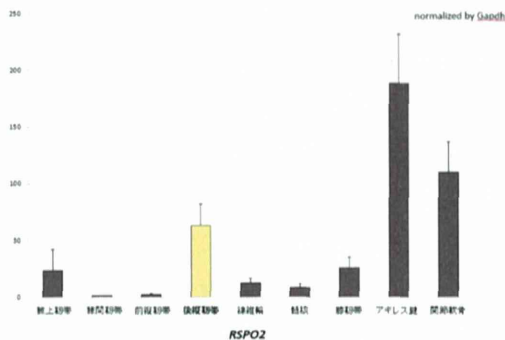
BMP2 刺激後 24 時間ならびに 48 時間後の刺激後早期の遺伝子発現変動を解析したところ、骨芽細胞分化の初期のマーカーである *Alp* の発現上昇に伴って *Hao1* の発現が有意に低下することを、8 つの異なるロットのマウス胚性繊維芽細胞で確認した。他の遺伝子については、変動は認めるものの、rs2423294/20p12.3 の近傍に位置する *Hao1* に比較してその程度は小さかった。



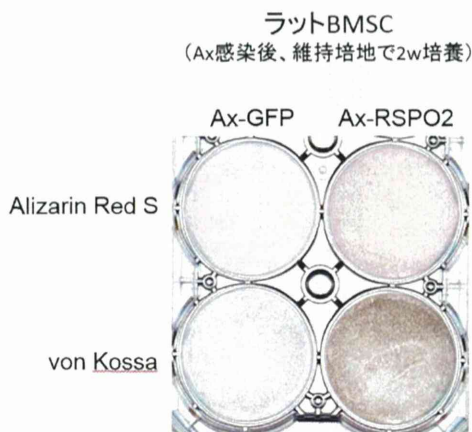
靭帯細胞やヒト細胞の培養系での発現解析ではないことが本研究での limitation であるが、肝臓に特異的であるとされる *Hao1* (Hydroxyacid oxidase 1) が靭帯細胞と比較的近い繊維芽細胞において発現が確認できたこと、また BMP2 による骨芽細胞分化誘導系において、その発現が刺激後早期に変動したことが、OPLL と関連する 6 つの遺伝子座の中で唯一であったことは、OPLL の発症と *Hao1* が何らかの関連がある可能性を示唆していると考えられる。

・ rs374810/8q23.1

RSPO2 遺伝子は後縦靭帯にて発現しており、



ラット骨髄由来間葉系幹細胞および ATDC5 細胞における *Rspo2* 過剰発現は骨化傾向を認めた。



・ rs1979679/12p11.22

OPLL 形成過程として、靭帯細胞から直接骨化変化が起こる可能性と、靭帯細胞が一旦多分化能を持つ前駆細胞に脱分化して、これが軟骨様細胞または骨芽細胞様細胞に分化して骨化の起点となるシナリオを考えた。まず各細胞株間における *Stk38l* の発現を比較すると、報告に反して線維芽細胞より骨芽細胞系で発現が低かった。NIH3T3 における *Stk38l* ノックダウンは、軟骨細胞、骨芽細胞、それぞれの分化マーカーの発現を亢進させた。逆に間葉系幹細胞マーカーは発現抑制されたので、*Stk38l* は靭帯細胞

からの直接の骨化変化には抑制的で、未分化細胞への脱分化には促進的であると示唆された。そこで未分化軟骨系細胞 C3H/10T1/2 細胞に *siStk38l* を導入すると、早期軟骨細胞分化マーカー *Col2a1* は減少し、これは ATDC5 においても同様であったが、成熟マーカー *Col10a1* の発現は不変であった。このことから、*Stk38l* は未分化細胞の軟骨細胞様への分化には促進的だが、そこから骨化に必要な成熟過程には機能しない可能性がうかがえた。次に未分化骨芽細胞系 ST-2 細胞で検討すると、*Stk38l* siRNA は *Runx2*, *Osterix (Sp7)*, *bone sialoprotein (Ibsp)* といった骨芽細胞早期分化マーカーは発現抑制したが、成熟マーカー *osteocalcin (Bglap)* は逆に促進させた。骨芽細胞に分化済みの MC3T3-E1 における *Stk38l* ノックダウンは、*Runx2* と *Sp7* は抑制したが、*Alp*, *Ibsp*, *Bglap* とより分化後期になるに従って成熟を促進した。従って *Stk38l* は靭帯細胞の中の未分化な細胞から骨芽細胞様細胞への変化は促進するものの、骨化能を持つ成熟骨芽細胞への分化には抑制的に働く可能性が考えられた。

以上の結果から、OPLL が内軟骨性骨化または膜性骨化いずれの形態をとろうとも、*STK38L* はこれらの初期変化を促進する一方で、実際の骨化には抑制的な役割を演じている可能性が示唆された。*STK38L* はセリン・スレオニン・キナーゼであるが、その基質についてはほとんど不明である。骨芽細胞成熟抑制過程におけるそのリン酸化基質の同定は、OPLL 病態の理解と分子治療につながる可能性を秘め、優先順位の高い解決命題と考えられた。

・ rs11045000/12p12.2

LOC10050693 は間葉系幹細胞、骨肉腫細胞ともに骨分化誘導後期にかけて発現上昇して来ることが明らかになり、LOC10050693 発現と骨分化との関わりが示唆された。今後、発現阻害実験を追加することにより LOC10050693 の骨分化に与える影響を明らかにする。また、rs11045000 遺伝子型 A/G と LOC10050693 発現との関連についても検討を行う。

・ rs927485/6p21.1

マウス骨髄間質細胞の培養系において、*Slc29a1* の発現は同定され、培養初期における発現レベルは石灰化必須因子としての 1 型コラーゲン遺伝子やアルカリフォスファターゼ遺伝子と比べると 10 分の 1 から 100 分の 1 ほど低いことが示されたが、骨細胞の分化形質を現す遺伝子としてオステオカルシン (*Bglap*) や骨シアロ蛋白質遺伝子 (*Ibsp*) とはほぼ同等レベルであった。このような発現レベルはピロリン酸トランスポーター遺伝子の *Ank* とも一致して、石灰化誘導の培養期間を通じてほぼ一定レベルに保たれたことは、他の骨芽細胞分化形質を現す *Bglap* や *Ibsp*、オステオポンチン遺伝子 (*Opn*) が漸増パターンを示したことは異なっていた。

この培養系に IL-1 β を加えた実験系において、25 日間に渡る石灰化誘導の効果は通常石灰化誘導培地のみの実験系や、培地にデキサメタゾンを加えた実験系と比べて大きく異なることは無く、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞における近年の報告 (*J Biol Chem* 2013) と矛盾しない結果であった。この培養系における骨芽細胞の分化形質マ

ーカー遺伝子の発現は IL-1 β により抑制傾向を示し、細胞外ヌクレオチド代謝系の脱ピロリン酸酵素 *Enpp1* の発現も抑制傾向を示した点も上記報告と合致する結果であったが、この知見に加えて *Nt5e* や *Ank*、*Slc29a1* の発現も抑制される傾向が見られた。

5) 病態解明・生体試料収集

(1) 間葉系幹細胞研究

1. 間葉系幹細胞の脊柱靭帯組織における存在証明

ヒト脊柱靭帯組織をコラゲナーゼで消化し、組織内の細胞を分散させて得た靭帯細胞を FACS に掛けると、間葉系幹細胞特異的マーカーの基準に合致した細胞が一定数得られた。

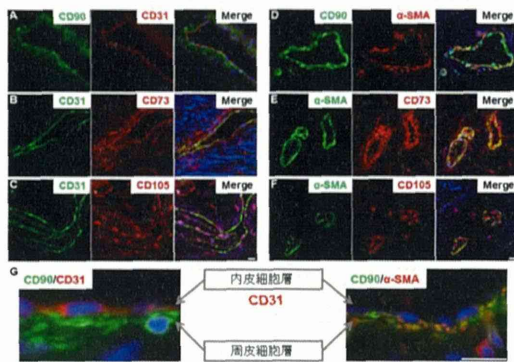
またその細胞を骨、軟骨、脂肪の誘導培地で培養し、各組織特異的染色 (Alizarin Red S, Oil Red O, Toluidine Blue) で染色し、それぞれに分化する能力を有することが示された。従って、ヒト脊柱靭帯組織に、間葉系幹細胞が確かに存在することが、初めて明らかとなった。



2. 間葉系幹細胞の局在

間葉系幹細胞が持つ細胞表面マーカー (CD73, 90, 105) と血管内皮細胞、周皮細胞の各マーカー (それぞれ CD31 と α -SMA) の抗体の組み合わせで、ヒト靭帯組織切片

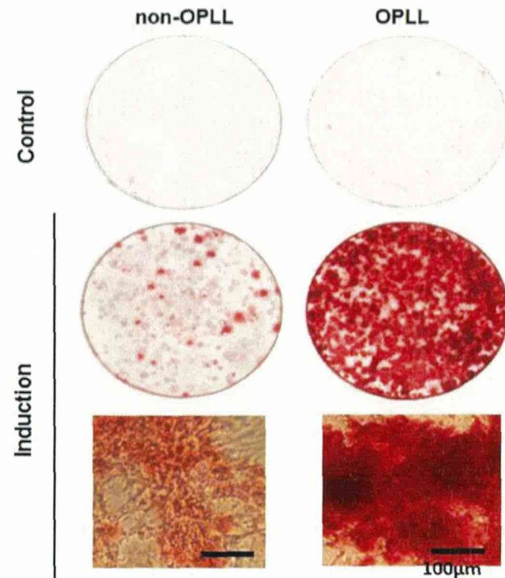
を二重染色したところ、いずれの組み合わせでも染まる細胞が、毛細血管周囲の周皮細胞と合致した。他の組織で間葉系細胞ニッチと呼ばれる局在場所の一つが血管周囲の周皮細胞であり、それと合致する結果が得られた。



3. 骨化による間葉系幹細胞の局在変化
次に間葉系幹細胞の局在を正常靭帯組織と骨化患者の靭帯組織で、同じく蛍光免疫染色法により比較した。正常組織では主に血管周囲に局在していた間葉系幹細胞が、骨化組織では、靭帯実質部全体に分布し、その細胞の数も増えていた。また骨化前線周辺では、肥大軟骨細胞に間葉系幹細胞マーカーが認められた。これは、脊柱靭帯の骨化は、軟骨を經由して起こる（内軟骨性骨化）とする説とも合致した。

4. 患者由来間葉系幹細胞の性質
間葉系幹細胞の靭帯骨化への関与を明らかにするため、その性質の違いを正常組織由来のものと患者組織由来のものとの比較した。分化能については、軟骨分化能、脂肪分化能ともに両者間で優位な差はなかったが、骨分化能、アルカリフォスファターゼ活性、そして骨化関連遺伝子の発現が、患者由来の間葉系幹細胞で著明に高い事が分

かった。



E. 結論

1. 世界で初めて OPLL の全ゲノムレベルでの相関解析を行ない、「6 つの OPLL の遺伝子座位」(6 番、8 番、12 番、20 番染色体)を発見した。発見した OPLL 遺伝子座内にある候補遺伝子のひとつは、内軟骨骨化の異常を通じて、OPLL の病態に関与することが判明した。
2. 遺伝性因子の関与が想定される家族発症例の患者より iPS 細胞を樹立し、樹立細胞株の骨・軟骨分化能を評価した。
3. 正常実験動物の脊椎構造物の遺伝子プロファイルの解析を行い、その手法を確立した。
4. 「6 つの遺伝子座位」の中で、rs927485/6p21.1、rs374810/8q23.1、rs1979679/12p11.22、rs11045000/12p12.2、rs2423294/20p12.3 の遺伝子座について異所性骨化の機能解析を行った。

5. ヒト脊柱靭帯組織から初めて間葉系幹細胞を単離し、靭帯組織内の所在を明らかにするとともに、患者由来の幹細胞の高い骨化能を明らかにした。

6. ヒト後縦靭帯骨化症の生体試料収集のプロトコールを作成した。

F. 健康危険情報

特記事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表 別紙
2. 学会発表 別紙

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

出願：特願 2014-112621；2014/5/30 脊椎靭帯骨化症検査方法及び検査用試薬

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

II 委託業務成果報告（ゲノム解析）

厚生労働科学研究委託業務
(難治性疾患等克服研究事業 (難治性疾患等実用化研究事業))
分担研究報告書
後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究

全ゲノムレベル相関解析に関する研究

研究分担者 池川志郎 理化学研究所・ゲノム医科学研究センター

研究要旨 後縦靭帯骨化症 (Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the spine: OPLL) の原因、分子病態の解明、及び画期的な治療法の創出のために、その遺伝的要因を研究した。患者サンプルを用いて、全ゲノムレベルでの相関解析を行ない、6つ OPLL の疾患感受性遺伝子座位を同定した。その中の候補遺伝子の機能を解析し、内軟骨骨化に関連している事を明らかにした。

A. 研究目的

全ゲノムレベルでの相関解析 (genome-wide association analysis: GWAS) をはじめとするゲノム解析により、OPLL の遺伝的要因 (疾患感受性遺伝子)、及びその分子病態を明らかにすること。

B. 研究方法

脊椎外科の専門医との連携のもとに収集した患者サンプル (血液検体等) から genomic DNA を抽出する。これを用いて GWAS を行い、疾患感受性遺伝子を同定する。同定した疾患感受性遺伝子の機能を *in vitro* の解析により明らかにし OPLL の分子病態を解明する。

(倫理面での配慮)

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

サンプルを収集した患者の臨床情報、疾患情報を検討し、診断が確実な OPLL 症例、計1,112例を選んだ。この OPLL 患者サンプルと6,810例の対照サンプルのゲノム DNA を用いて GWAS を行った。その結果、Genome-wide の有意水準の閾値 ($P=5 \times 10^{-8}$) を超える、もしくはその閾値に近い、極めて強い相関を示す 8つの遺伝子座位を発見した。

次いで、GWASとは独立の、OPLL症例、548例と6,469例の対照サンプルのゲノム DNA を用いて、8つの遺伝子座位の相関の追試を行なった。その結果、6つの遺伝子座位について、相関が再現された。いずれも、過去に報告のない新規の遺伝子座位であった。

更に、これらの遺伝子座位の中に存在する候補遺伝子について、ATDC5細胞等を用いた機能解析を行なった。その結果、うちひとつの遺伝子で、内軟骨骨化の初期の過程

で、骨化を抑制する働きがある事が明らかになった。

D. 考察

今回発見した遺伝子座のうちの一つは、先に罹患同胞対を用いたゲノムレベルでのノンパラメトリック連鎖解析 (sib-pair linkage analysis) (Karasugi *et al.* 2013) により我々が同定した遺伝子座位と重複しており、遺伝学的には非常に確実な OPLL 座位と考えられる。

過去の病理学的研究から、OPLL の異所性骨化は、内軟骨骨化により起こるとされている。8 番染色体長腕にある遺伝子座内にある候補遺伝子は、内軟骨骨化に関連し、この遺伝子の機能の破綻が、OPLL の病態に関与することがわかった。

E. 結論

世界で初めての、OPLL の全ゲノムレベルでの相関解析を行ない、世界で初めて OPLL の遺伝子座位を発見した。発見した OPLL 遺伝子座内にある候補遺伝子のひとつは、内軟骨骨化の異常を通じて、OPLL の病態に関与することがわかった。

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) Nakajima M, Takahashi A, Tsuji T, Karasugi T, Baba H, Uchida K, Kawabata S, Okawa A, Shindo S, Takeuchi K, Taniguchi Y, Maeda S, Kashii M, Seichi A, Nakajima H, Kawaguchi Y, Fujibayashi S, Takahata M, Tanaka T,

Watanabe K, Kida K, Kanchiku T, Ito Z, Mori K, Kaito T, Kobayashi S, Yamada K, Takahashi M, Chiba K, Matsumoto M, Furukawa KI, Kubo M, Toyama Y; Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, Ikegawa S. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nat Genet.* 2014; 46(9):1012-1016

- 2) Ikegawa S. Genomic study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2014; 90(10):405-412
- 3) Ikegawa S. Genetics of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine: a mini review. *J Bone Metab.* 2014; 21(2):127-132
- 4) 池川志郎. 骨関節疾患におけるゲノム医学研究の現状と展望-骨・関節疾患におけるゲノム医学の進歩. *整形・災害外科* 2014;57(1);69-76.

2. 学会発表

- 1) 池川志郎. ゲノム解析による疾患の原因と病態の解明: パーソナルゲノム時代の疾患研究の現状と問題点、愛媛大学大学院医学系研究科セミナー. 東温、2012. 4. 21
- 2) 池川志郎. 骨・関節疾患のゲノム解析 - パーソナルゲノム時代の疾患研究、第 32 回日本骨代謝学会学術集会. 大阪、2014. 7. 24
- 3) 池川志郎. ゲノム研究の進歩と臨床へ