の応用―整形外科領域の現状と課題―、第29回日本整形外科学会基礎学術集会. 鹿児島、2014. 10. 10

4) 池川志郎. ゲノムからの疾患の解明―骨関節疾患を例に―、 第4回 臨床ゲノム医療学会. 東京、2014. 11. 30
5) 池川志郎. ゲノムから骨関節疾患へ：単一遺伝子病と多因子遺伝子病の統合解析、広島大学歯学部 特別講義 病気と遺伝：疾患研究のためのひとの遺伝学の基礎知識. 広島、2014. 12. 18
6) Ikegawa S. Genomic Study of Skeletal Diseases. 2nd Asia-Pacific Bone & Mineral Research Meeting. Seoul. May 31, 2014.
7) Ikegawa S. Genomic Study of Common Diseases 常見疾病的基因組研究. 1st Chinese Osteoarthritis Annual Congress. Nanjing. Oct 12, 2014.
8) Ikegawa S. Genomic study of bone and joint diseases in East Asia. 59th Annual meeting of the Japan Society of Human Genetics. Tokyo. Nov 22, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許の取得

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

III　委託業務成果報告
（疾患特異的 iPS 細胞の樹立・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

疾患特異的 iPS 細胞の樹立・解析に関する研究

研究分担者　戸口田　淳也　京都大学再生医科学研究所教授

研究要旨　後縦靭帯骨化症の病態解明のために、遺伝性因子の関与が想定される家族発生例の患者より iPS 細胞を樹立し、それぞれの細胞の骨あるいは軟骨分化能を評価した。また GWAS によって同定された 6 つの疾患関連 SNP に近接している遺伝子の骨あるいは軟骨分化過程における発現を解析した。その中で特に Rspo2 遺伝子に関しては、1 家系 3 名の患者が全てリスクアレルであったため、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の作製を試みた。

A.　研究目的

後縦靱帯骨化症 (Ossification of posterior longitudinal ligament、OPLL) は多因子疾患であり、糖尿病、肥満等の後天性因子に加えて、同胞発生率が高いことなどから、何らかの先天性因子の関与も想定されている。共同研究者の池川らのゲノムワイド相関解析 (Genome-wide Association Study、GWAS) により OPLL の発症リスクに関与する 6 箇所の一塩基多型 (Single nucleotide polymorphism、SNP) が同定された。これらの中には骨あるいは軟骨代謝に関連した遺伝子に近接したものもあるが、個々の SNP の OPLL 発症に関する生物学的な意義の検証は困難である。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell、MSC) は骨あるいは軟骨細胞に分化可能な体性幹細胞であり、OPLL 患者由来の MSC は骨分化能が亢進しているとの報告があるが、詳細な解析は、細胞採取が困難であることなどから進められていない。iPS 細胞は、特定の個人の体細胞から、多能性幹細胞を作製」する技術であり、特に遺伝性疾患の病態解明、創薬に有効であることが報告されている。そこで本研究では遺伝性背景が強いと想定される OPLL 患者由来の iPS 細胞を作製し研究の資材とすることを試みた。

B．研究方法

1) OPLL 患者由来 iPS 細胞の樹立： OPLL 罹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 6 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 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。

（倫理面での配慮）

ヒト iPS 細胞の作製は京都大学及び提供元である慶應義塾大学の医の倫理委員会により承認された実験として行った。

C．研究結果

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。

D．考察

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。

E．結論

OPLL 患者より作製した iPS 細胞は、今後の病態解明研究の資材として有用なものであると考えられた。

F．健康危険情報

培養細胞を用いた解析であり、関連する健康危険情報は無い。

G．研究発表

1. 論文発表

1) Matsumoto Y, Ikeya M, Hino K, Horigome K, Fukuta M, Watanabe M, Nagata S, Yamamoto T, Otsuka T, Toguchida J. New protocol to optimize iPS cells for genome analysis of fibrodysplasia ossificans progressive. Stem Cells, in press.

2) Yokoyama K, Ikeya M, Umeda K, Oda H, Nodomi S, Nasu A, Matsumoto Y, Izawa K, Horigome K, Kusaka T, Tanaka T, Saito MK, Yasumi T, Nishikomori R, Ohara O, Nakayama N, Nakahata T, Heike T, Toguchida J. Enhanced chondrogenesis of iPS cells from neonatal-onset multisystem inflammatory disease occurs via the caspase-1-independent cAMP/PKA/CREB pathway. Arthritis Rheumatol. 2015;67(1):302-14.

3) Fukuta M, Nakai Y, Kirino K, Nakagawa M, Sekiguchi K, Nagata S, Matsumoto Y, Yamamoto T, Umeda K, Heike T, Okumura

N, Koizumi N, Sato T, Nakahata T, Saito M, Otsuka T, Kinoshita S, Ueno M, Ikeya M, Toguchida J. Derivation of mesenchymal stromal cells from pluripotent stem cells through a neural crest lineage using small molecule compounds with defined media. PLOS ONE, 2014 Dec 2;9(12):e112291.

4) Husain SR, Ohya Y, Toguchida J, Puri RK.Current Status of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. Tissue Eng Part B Rev. 2014;20(3):189.

2. 学会発表

1) 戸口田淳也. iPS 細胞を活用した整形外科疾患の病態解明から創薬. 第 87 回日本整形外科学会学術総会(2014.5.23 神戸)

2) Toguchida J、Aoyama T, Goto K, Kakinoki R, Kasai Y, Maekawa T, Tada H, Teramukai S, Nakamura T, Matsuda S . An exploatory clinical trial for idiopathic osteonecrosis of femoral head by cultured autologous multipotent mesenchymal stromal cells augmented with vasucularized bone grafts 第 12 回 ISSCR(2014.6.19Vancouver)

3) Matsuomoto Y、Ikeya M, Fukuta M, Hsiao E, Hayashi Y, Asaka I, Otsuka T, Conklin BR, Toguchida J 、Identification of gene sets dysregulated by mutant ACVR1 gene causing a rare intractable diseas, fibrodysplasia ossficiance progressiva 第 12 回 ISSCR (2014.6.18Vancouver)

4) 横山宏司、西小森隆太、納富誠司郎、田中孝之、斉藤潤、梅田雄嗣、池谷真、小原収、中畑龍俊、戸口田淳也、平家俊男. 患者由来 iPS 細胞を用いた CINCA 症候群における関節症病態の解析. 第 35 回日本炎症・再生学会(2014.7.1 沖縄)

5) 松本佳久、池谷真、永田早苗、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也. 疾患特異的 iPS 細胞を用いた進行性骨化性線維異形成症の病態解明. 第 29 回日本整形外科学科基礎学術集会(2014. 10. 10 鹿児島)

6) 松永一仁、金永輝、坂井田功、戸口田淳也. ヒト iPS 細胞から中胚葉細胞塊を介した側板中胚葉由来間葉系幹細胞の誘導. 第 37 回日本分子生物学会年会(2014.11.26 横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）
該当なし

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

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

研究分担者　中村　雅也　慶應義塾大学医学部整形外科　教　授
研究分担者　堀内　圭輔　　慶應義塾大学医学部整形外科 特任准教授

研究要旨　本研究では「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」の成果を基に，疾患特異的iPS細胞を活用した難病研究（京都大学iPS細胞研究所）と連携し，①脊柱靭帯骨化症患者由来のiPS細胞の確立，および，②脊柱靭帯骨化症患者由来のiPS細胞の解析を通して脊柱靭帯骨化症の病態解明，ならびに薬剤スクリーニング系の確立を目的としている．これまでの研究から，「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」において調査した同胞罹患患者より２家系，５患者から血液サンプルを採取し，京都大学再生医学研究所にてiPS細胞を樹立した．今後はこれらの細胞の遺伝子解析を行うとともに，骨芽細胞の分化系を応用し，骨化能の評価を行う予定である．

A.　研究目的

脊柱靭帯骨化症の発症に遺伝的素因のあることは広く知られているが，本疾患は多遺伝子疾患であり，また比較的高齢になってから発症すること，適切な動物モデル・細胞モデルがないこと等が，研究の大きな妨げとなっている．本研究では「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」の成果を基に，疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究（京都大学 iPS 細胞研究所）と連携し，①脊柱靭帯骨化症患者由来の iPS 細胞の確立，および，②脊柱靭帯骨化症患者由来の iPS 細胞の解析を通して脊柱靭帯骨化症の病態解明，ならびに薬剤スクリーニング系の確立を目標としている．

B．研究方法

脊柱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 細胞の確立にあたり，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．これらの患者から各々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．

（倫理面での配慮）

本研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関

する倫理指針・臨床研究に関する倫理指針を遵守してプロトコールの作製，サンプル採取を行った・

C．研究結果

今回，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．現在これらの iPS 細胞株の品質を確認し，分化誘導法により、骨分化能の評価を施行中である．また，ゲノムワイド相関解析(genome-wide association study: GWAS)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) の成果(Nat Genet. 2014) に照らし合わせ，それぞれの遺伝子座を解析したところ，１家系３患者は第８染色体の伝子座に危険アリルを共通して有することが明らかとなった．

D．考察

脊柱靭帯骨化症患者５名全てから疾患特異的 iPS 細胞が樹立された．これの細胞株は，脊柱靭帯骨化症の病態解明並びに，薬剤スクリーニング系を確立する上で極めて有用な資源となることが期待される．

今後は，これらの細胞株の遺伝子情報を解析するとともに，iPS 細胞から間葉系幹細胞を経た骨分化誘導法により，各々の細胞株の骨分化能を詳細に評価する予定である．

E．結論

発症に遺伝的素因を強く有すると考えられる２家系,合計５患者より疾患特異的 iPS 細胞を樹立した．

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

無し

2. 学会発表

無し

（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

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

Ⅳ　委託業務成果報告
（疾患感受性遺伝子の発現解析）

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

遺伝子発現のプロファイル解析

研究分担者　筑田博隆　東京大学整形外科講師
齋藤琢　東京大学 TE 部特任准教授

研究要旨 後縦靭帯骨化症の病態解明の基盤情報として、まず正常実験動物の脊椎周辺の構造物における遺伝子発現プロファイルの解析を試みた。ラット、ミニブタからサンプルを回収して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、各組織のマーカー組織の発現量を確認するとともに、疾患感受性候補遺伝子の発現量も定量した。

A．研究目的
後縦靭帯骨化症の病態解明の基盤情報として、まず正常実験動物の脊椎周辺の構造物における遺伝子発現プロファイルの解析を試みた。

B．研究方法
ラット、ミニブタからサンプルを回収して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。

（倫理面での配慮）
東京大学の定める動物実験の規定に従って実施した。

C．研究結果
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。

D．考察
疾患感受性候補遺伝子の中には、後縦靭帯に高発現するものから、ほとんど発現しないものまで存在した。今後はヒト疾患サンプルの解析結果との照合が必要と考えられる。

E．結論
脊椎の構成要素ごとの発現遺伝子の基礎情報が得られた。

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) Kanke K, Masaki H, Saito T, Komiyama Y, Hojo H, Nakauchi H, Lichtler AC, Takato T, Chung UI, Ohba S. Stepwise Differentiation of Pluripotent Stem Cells into Osteoblasts Using Four Small Molecules under Serum-free and Feeder-free Conditions. Stem Cell Reports. 2:751-60, 2014

2) Yano F, Ohba S, Hosaka Y, Saito T, Chung UI. Disease-modifying effects of

TD-198946 on progressed osteoarthritis in a mouse model. Ann Rheum Dis. 73:2062-4, 2014

3) Mori Y, Chung UI, Tanaka S, Saito T. Determination of differential gene expression profiles in superficial and deeper zones of mature rat articular cartilage using RNA sequencing of laser microdissected tissue specimens. Biomed Res. 35:263-70, 2014.

4) Sugita S, Chikuda H, Takeshita K, Seichi A, Tanaka S. Progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the thoracic spine following posterior decompression and stabilization. J Neurosurg Spine. 21:773-7, 2014.

2. 学会発表

なし

（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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅴ　委託業務成果報告
（候補遺伝子の機能解析・治療開発）

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

候補遺伝子の機能解析

研究分担者　宮本　健史　　慶應義塾大学医学部整形外科講師

研究要旨　後縦靭帯骨化症（ossification of posterior longitudinal ligament of the spine: OPLL）は原因不明の難治性疾患であり、現時点で確立された骨化の発生や増悪を防止する治療法は存在しない。かねてより遺伝的素因が OPLL の発症に関与することが示唆されていたが、どの遺伝子が関与するかは不明であった。今回、OPLL 発症と相関する遺伝子の特定を試みた。

A.　研究目的

本研究では、OPLL 発症に寄与する遺伝子を特定することを目的とする。

B．研究方法

本研究では、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、Rsp2、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。

（倫理面での配慮）

本研究の実験は、本学の動物実験委員会の承認を得て実施されている。

C．研究結果

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、Hao1 に比較してその程度は小さかった。

D．考察

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。

E．結論

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、Hao1 が BMP2 刺激後早期に発現が有意に低下した。

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
*corresponding author
Fujie A, Funayama A, Miyauchi Y, Sato Y, Kobayashi T, Kanagawa H, Katsuyama E, Hao W, Tando T, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Kanaji A, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y and *Miyamoto T. Bcl6 promotes osteoblastogenesis through Stat1 inhibition. Biochem Biophys Res Commun. In press.
Kanagawa H, Niki Y, Kobayashi T, Sato Y, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Miyamoto K, Tando T, Watanabe R, Morita M, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, *Miyamoto T. Mycobacterium tuberculosis promotes arthritis development through toll-like receptor 2. J Bone Miner Metab. in press
Katsuyama E, Miyamoto H, Kobayashi T, Sato Y, Hao W, Kanagawa H, Fujie A, Tando T, Watanabe R, Morita M, Miyamoto K, Niki Y, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, *Miyamoto T. Interleukin-1 receptor-associated kinase-4 (IRAK4) promotes inflammatory osteolysis by activating osteoclasts and inhibiting formation of foreign body giant cells. J Biol Chem. 2015 Jan 9;290(2):716-26.
Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, Mukouyama YS, Sato TN, Suda T, Ema M, Kubota Y. Cell. Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina. 2014 Oct 23;159(3):584-96.
Sato Y, Miyauchi Y, Yoshida S, Morita M, Kobayashi T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Watanabe R, Miyamoto K, Morioka H, Matsumoto M, Toyama Y, *Miyamoto T. The Vitamin D Analogue ED71 but Not 1,25(OH)2D3 Targets HIF1α Protein in Osteoclasts. PLoS One. 2014 Nov 6;9(11):e111845.
Fujita N, Hirose Y, Tran CM, Chiba K, Miyamoto T, Toyama Y, Shapiro IM, Risbud MV. HIF-1-PHD2 axis controls expression of syndecan 4 in nucleus pulposus cells. FASEB J. 2014 Jun;28(6):2455-65.
Mori T, Sato Y, Miyamoto K, Kobayashi T, Shimizu T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Iwasaki R, Kawana H, Morioka H, Matsumoto M, Saya H, Toyama Y, *Miyamoto T. TNFα promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. Oncogene. 2014 Aug 14;33(33):4236-41.

2. 学会発表
第４２回日本関節病学会　平成２６年１１月６−７日　虎ノ門ヒルズフォーラム　シンポジウム関節リウマチの病因病態　破骨細胞と関節破壊　宮本健史
Cold Spring Harbor, Asia Bone and Cartilage: from Development to Human Diseases, November 3-7 2014, Suzhou, China, TNFα and IL-1 promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state, Takeshi Miyamoto
第１６回日本骨粗鬆症学会　平成２６年１０月２３−２５日　京王プラザ　イ

ブニングセミナー２　骨代謝の理解と骨粗鬆症治療　宮本健史
第２９回日本整形外科学会基礎学術総会　平成２６年１０月８−１０日　城山観光ホテル　パネルディスカッション６骨代謝研究維新−臨床への架け橋−臨床応用を見据えた骨代謝研究　宮本健史
11th Bone Biology Forum, August 22-23 2014, Mishima, Japan, Osteo-Oncology: A Mechanism of Bone Tumor Development, Takeshi Miyamoto
第４２回日本口腔外科学会教育研修会ランチョンセミナー　平成２６年７月２７日　大阪歯科大学楠葉学舎講堂　骨粗鬆症の基礎から最新の治療まで　宮本健史
第１回日本骨免疫会議　平成２６年７月４−６日　ブセナテラス　破骨細胞によるHSC制御　宮本健史
5th International Conference on Osteoimmunology, June 15-18 2014, Kos, Greece, Transcriptional Regulation of Osteoclastogenesis, Takeshi Miyamoto
第８７回日本整形外科学会学術集会　平成２６年５月２２−２５日　神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場　ランチョンセミナー　RANKLを標的とした新しい骨粗鬆症治療〜骨代謝の理解に基づく骨粗鬆症治療〜　宮本健史
第８７回日本整形外科学会学術集会　平成２６年５月２２−２５日　神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場　ポスター　血中25(OH)D低値とintact PTH高値は比較的若年女性にもみられる　Low serum vitamin D and high intact PTH status in younger women　宮本健史、戸山芳昭
第５８回日本リウマチ学会総会・学術集会　平成２６年４月２４−２６日　グランドプリンスホテル新高輪　Symposium 15: 骨粗鬆症の新しい治療戦略　骨粗鬆症をめぐる最新の基礎研究　宮本健史

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む）
1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

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

候補遺伝子の機能解析

研究分担者　江面　陽一　　東京医科歯科大学難治疾患研究所准教授

研究要旨　後縦靭帯骨化症の病態解明のために実施されたＧＷＡＳ成果に基づき第６染色体６ｐ21.１領域に同定された遺伝子多型の連鎖不平衡領域が異所性骨化をもたらす分子機構の基盤として、近傍遺伝子座 *SLC29A1* に注目した。マウス骨髄間質細胞にこの遺伝子は発現し、炎症性サイトカイン IL-1b によって発現抑制された。異なる細胞種による検討と、連鎖不平衡領域を介した発現制御を検討するため、準備が進められた。

Ａ．　研究目的

後縦靭帯骨化症（ＯＰＬＬ）の病態解明のため、これまでに研究班が積み上げてきたゲノムワイドな遺伝子多型のアソシエーションスタディ（ＧＷＡＳ）の成果を基盤として、病態発生に関わる分子機構を具体的な遺伝子レベルで解明し、治療法開発の基盤となる知見を獲得することが本計画研究の目標である。

異所性骨化病巣を伴う様々な遺伝性疾患からの洞察として、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。この意味において、研究班が昨年報告した、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（Nature Genetics, 2014 年）、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 年）。

本分担研究の本年度における研究目的は、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、ヒトおよびマウス靭帯骨化に寄与することの推定される、組織潜在性の間葉系幹細胞と、それに準ずる間質細胞培養系において検討することであった。

Ｂ．研究方法

まず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。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-1b の影響を検討した。様々な細胞の外部刺激に対する応答は、類縁の細胞種においても異なることが想定されるため、マウス靭帯および腱組織由来の組織潜在性間質細胞についても同様に検討

した。ヒト骨髄由来間葉系幹細胞についても、石灰化誘導の培養系における石灰化進行に伴う *SLC29A1* 遺伝子の発現変動の解析を開始した。

ＧＷＡＳで同定された６p21.1 の連鎖不平衡領域は、ヒト *SLC29A1* 遺伝子座の下流約 300ｋｂ遠隔に位置する。そこで、この領域が遠隔エンハンサーとして機能する可能性を追求するため、*SLC29A1* 遺伝子のプロモーター領域の配列を組み込んだルシフェラーゼ・レポータープラスミド作成し、連鎖不平衡領域に推定される遠隔エンハンサーとしての機能を検証する実験準備を進めた。ヒト６p21.1 領域における遠隔エンハンサー機能が証明されない場合には、同領域の遺伝子機能として、未知の遺伝子座の存在を考慮する必要もある。ゲノムデータベースの探索からは、ごく近傍に仮想的な遺伝子座 LOC100505862 が想定されていたため、ヒト骨芽細胞や間葉系幹細胞に本転写産物が存在する可能性を追求した。すなわち、幾つかの種類の細胞株 cDNA を用いてデーターベースに基づく配列の RT-PCR を行い、その存在の有無を検証した。

（倫理面での配慮）

OPLL 患者由来のヒト細胞および組織における検討を来年度以降に進めるため、学内倫理審査委員会に研究計画の申請を行った。

Ｃ．研究結果

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ホ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（*Ocn*）や骨シアロ蛋白質遺伝子（*Bsp*）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 *Ocn* や *Bsp*、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とは異なっていた。

この培養系に IL-1b 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の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-1b 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。

同様の時系列解析を、靭帯および腱由来細胞について検討するため、マウス尾部腱および膝内側側副靭帯から得られた間質細胞で検討した。これらの細胞培養系における石灰化に対する IL-1b の影響は骨髄由来細胞と同等かそれ以上と見なされたが、十分な検体数による検証には至らなかった。

ヒト由来の細胞株を用いた LOC100505862 の転写物の有無についての検証として、骨芽細胞株 U2OS, Saos-2 に加えて骨髄由来間葉系の cDNA を用いた RT-PCR を試みた。公的データーベースに基づき設計された３組の特異的プライマーを用いて、様々な条件

でPCRによる増幅を試みたが、目的とするLOC100505862の転写物を証明できる結果は得られなかった。ヒト6p21.1の遺伝子多型領域が*SLC29A1*遺伝子の発現制御に影響する可能性を検証するため、*SLC29A1*遺伝子のプロモーター領域の配列を組み込んだルシフェラーゼコンストラクトを作成した。今後ＧＷＡＳで同定された連鎖不平衡領域の配列を組み込んだコンストラクトによる比較検討を進める準備が整えられた。

Ｄ．考察

マウス骨髄由来間質細胞に対するIL-1bの骨芽細胞分化の抑制は、石灰化抑制に働く細胞外ピロリン酸と細胞内へのアデノシン輸送を担う分子機構を複数の遺伝子の発現を抑制することで対抗されて、総合的な石灰化レベルが保たれる機構が理解された。炎症性サイトカインによる*SLC29A1*制御の程度は、異なる細胞種において異なることが推定されるため、靭帯由来細胞におけるこの機構解明を目指す意義が示された。ＧＷＡＳで示された遺伝子多型の連鎖不平衡領域を介した*SLC29A1*遺伝子の発現制御の検証とあわせて、ヒト患者および健常者の靭帯由来間質細胞を用いた検討を、今後進めたい。

Ｅ．結論

組織潜在性細胞の培養系における石灰化誘導における*SLC29A1*および関連分子の遺伝子発現が炎症性サイトカインの存在によって、石灰化促進性の変化を示すことが示唆された。またヒト6p21.1の遺伝子多型領域が*SLC29A1*遺伝子の発現制御に影響する可能性を検証するとともに、炎症性サイトカインが異なる種類の間葉系細胞において骨化病巣形成に影響する分子機構を解明するための準備が進められた。

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

該当なし

2. 学会発表

江面陽一、八田愛理奈、野田政樹：骨髄間質細胞を用いた石灰化誘導培養におけるIL-1bの作用について. 第32回日本骨代謝学会学術集会　2014年7月26日、大阪.

八田愛理奈：培養マウス骨髄間質細胞における石灰化結節形成に対するIL-1bおよびデキサメタゾンの影響. 第130回日本薬理学会関東部会、2014年7月5日、東京.

Ｈ．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む）

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

特記事項なし

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

候補遺伝子の機能解析

研究分担者　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

研究要旨～後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子 STK38L の間葉系細胞分化への影響～
当研究班のゲノムワイド関連解析(GWAS)の結果、後縦靭帯骨化症(OPLL)感受性領域が６つ同定されたが、我々はその一つ 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。その結果 STK38L が、線維芽細胞から直接の軟骨細胞あるいは骨芽細胞への transdifferentiation には抑制的に、間葉系前駆細胞への脱分化には促進的に働く事、そしてそこから軟骨様細胞や骨芽細胞様細胞への分化には促進的、そしてさらなる分化成熟には抑制的に働くという、多段階における作用がある事が分かった。中でも骨芽細胞分化成熟に抑制的である結果は注目に値し、“骨化”という観点から見れば抑制的な役割を担う遺伝子であると推察された。

A.　研究目的
GWAS の結果は OPLL 感受性領域を同定したが、その領域には多数の遺伝子が含まれており、当然その全てが疾患に関連している訳ではなく、かつ遺伝子内に有意な関連を示す一塩基多型(SNP)を有する遺伝子も同定できていない。原因責任遺伝を同定するには、候補遺伝を列挙してその一つ一つについて機能解析を試み、その内軟骨性骨化や膜性骨化過程における役割を推察していく他ない。我々は候補遺伝子の一つ STK38L の機能解析を分担した。

B．研究方法
靭帯細胞のモデルとして線維芽細胞 NIH3T3、軟骨細胞系のモデルとして未分化な C3H/10T1/2、より軟骨細胞に commit した ATDC5、骨芽細胞系のモデルとして未分化な ST-2、骨芽細胞に commit した MC3T3-E1 を用いた。いずれもマウスの細胞である。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。

（倫理面での配慮）
本研究にはあてはまらない。

C．研究結果
OPLL 形成過程として、我々は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 cell line 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、Osx、bone sialoprotein (Bsp)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 (Ocn)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 Osx は抑制したが、ALP、Bsp、Ocn 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。

D．考察

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である。

E．結論

間葉系の各種細胞における Stk38l のノックダウン実験から、この遺伝子産物が靭帯細胞からの軟骨様細胞や骨芽細胞様細胞への転換を抑制し、脱分化やそこからの軟骨様細胞や骨芽細胞様細胞への分化は促進するものの、最終的に骨化に必要な骨芽細胞の成熟分化には抑制的に働く事が示唆された。OPLL 変化全体でみると、その進展を制御する役割が強いと考えられた。

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

なし

2.学会発表

なし

（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

なし

2.実用新案登録

なし

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

候補遺伝子の機能解析

研究分担者　茶野　徳宏　　滋賀医科大学臨床検査医学講座准教授

研究要旨　日本人後縦靭帯骨化症関連候補遺伝子としてのLOC10050693の機能解析を行うとともに遺伝子型rs11045000との関連を明らかにする目的で本研究を進め、LOC10050693の発現が骨分化と関連する証拠を得た。今後、更にLOC10050693と骨分化に於ける機能を明らかにするとともに、rs11045000遺伝子型とLOC10050693発現との関連、骨分化に於ける意義を明らかにする。

A.　研究目的

日本人後縦靭帯骨化症関連候補遺伝子としてのLOC10050693の機能解析を行うとともに遺伝子型rs11045000との関連を明らかにする。

B. 研究方法

市販ベースのヒト間葉系幹細胞、骨肉腫細胞を用いて、骨分化誘導の上、LOC10050693の発現変化を解析する。また、発現阻害による骨分化への影響を検討する。

（倫理面での配慮）

市販商用ベースのヒト細胞を用いたものであり、倫理的な配慮は生じていない。

C. 研究結果

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った。

D. 考察

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詳細にする必要がある。

E. 結論

LOC10050693より発現するnon-coding RNAは骨分化と関連する可能性が高い。

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

なし。

2. 学会発表

なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

LOC10050693より発現するnon-coding RNAが骨分化に影響を与える証拠がより確実となれば、本遺伝子産物は核酸医薬の一つとして、新規骨分化制御薬として特許出願する予定である。