

2. 実用新案登録
現時点ではない。
3. その他
なし。

VI 委託業務成果報告
(病態解明・生体試料収集)

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

研究分担者 古川 賢一 弘前大学大学院・医学研究科・病態薬理学・准教授
和田 簡一郎 弘前大学大学院・医学研究科・整形外科

研究要旨 我々は病因解明の研究成果にもとづき、仮説 ” 靭帯組織内に存在する多分化能を有する間葉系幹細胞が形質転換を起こし、靭帯組織修復時に骨芽細胞へと間違った分化をすることで、骨化する ” を建てた。本研究では、以下の3つの成果で本仮説を証明した。すなわち、1) ヒト脊柱靭帯組織から初めて間葉系幹細胞を単離した (存在証明)。2) 間葉系幹細胞の靭帯組織内の局在と、骨化によるその変化を明らかにした。3) 正常靭帯のものに比べて、患者由来のそれは、著しく高い骨化能を示した。今後間葉系幹細胞の形質転換の機序を明らかにすることで、病因の解明、そして治療薬の標的を定められるものと期待される。

A. 研究目的

脊柱靭帯骨化症の薬物治療法を確立するためには、その病因、発症機序を明らかにする必要がある。しかし、これまで本疾患において、骨化する本体である細胞は明らかになっていなかった。そこで本研究ではその候補として、骨化能も含め多分化能を有する間葉系幹細胞に注目した。この細胞が、脊柱靭帯組織に存在するのか、するとすれば正常組織と患者組織で発現形質がどう違うのかという面から、間葉系幹細胞が骨化の本体であることを明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. 間葉系幹細胞

脊椎手術時に摘出廃棄するヒト脊柱靭帯組織を、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

常法に従い、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柱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。

(倫理面での配慮)

十分なインフォームドコンセントの下、靭帯組織を得た。

C. 研究結果

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。(図1)

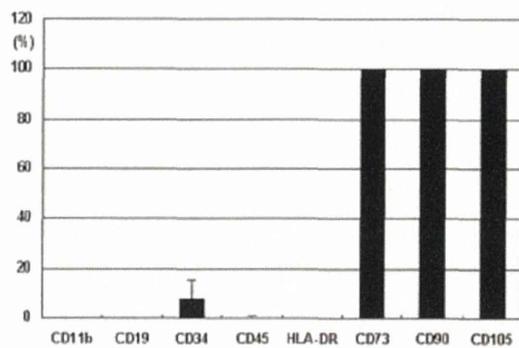


図1. ヒト脊柱靭帯組織由来間葉系幹細胞の細胞表面マーカープロファイル

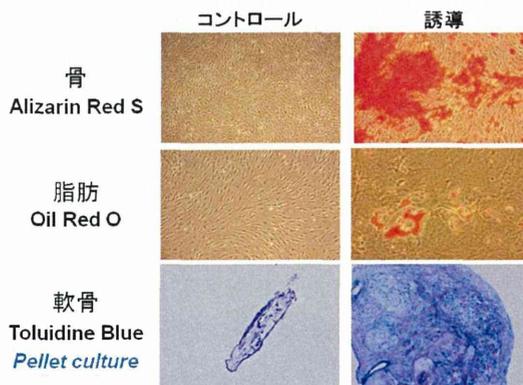


図2. 骨、脂肪、軟骨への分化誘導

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。(図2) 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。(図3)

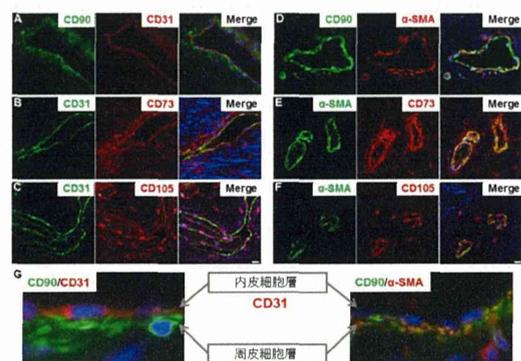


図3. 間葉系幹細胞のヒト靭帯組織における局在

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、軟骨を経由して起こる（内軟骨性骨化）とする説とも合致する。（図4）

4. 患者由来間葉系幹細胞の性質の違い
 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、

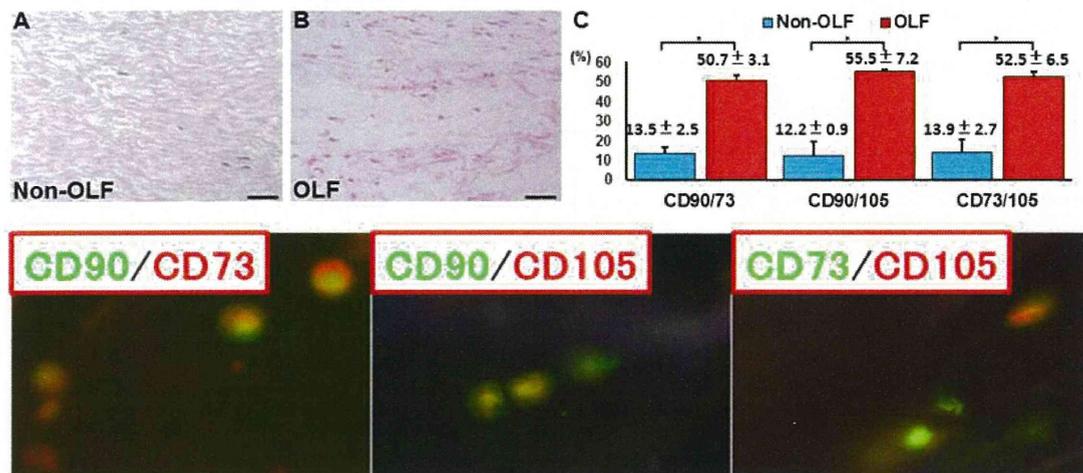


図4. 骨化患者組織における間葉系幹細胞の分布

上段：靭帯実質部における間葉系幹細胞の数の増加

下段：骨化前線における軟骨細胞上の間葉系幹細胞マーカーの発現

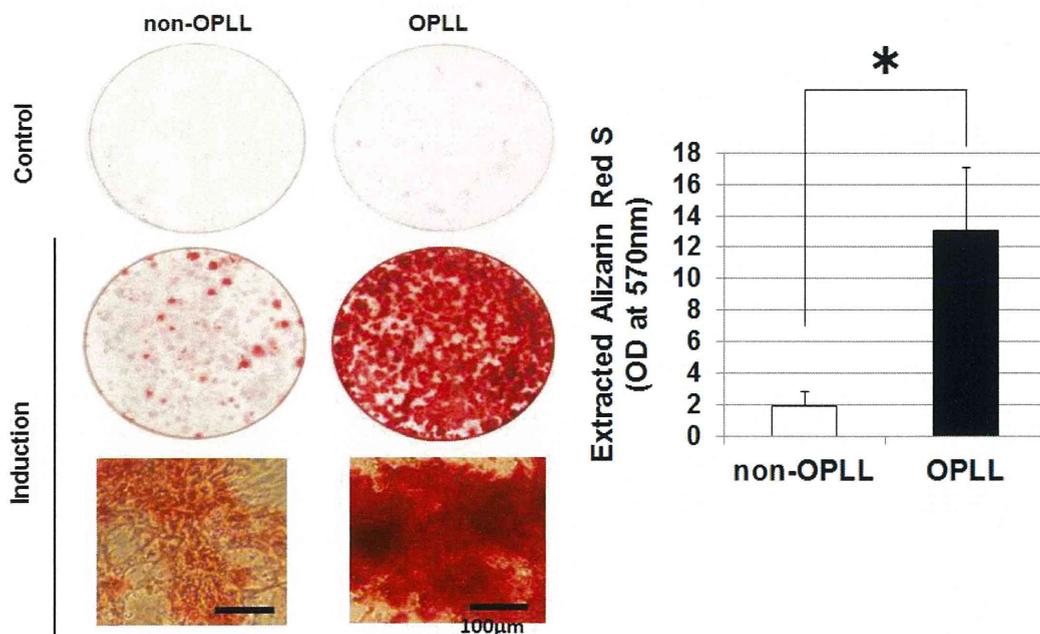


図5. 正常靭帯組織と骨化患者組織由来の間葉系幹細胞の骨化能の比較

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。(図5)

D. 考察

過去10数年に亘る病因に関する研究で用いられてきた脊柱靭帯細胞は、組織片から遊走してくる細胞を集めたものであった。それらの細胞は、骨化能が元々正常組織由来のものに比して高く、また骨化関連遺伝子の発現がメカニカルストレス負荷に応答して著明に増加するなど、推定される発症要因との関連性が示され、有用なモデルであった(Furukawa KI *Pharmacology & Therapeutics* 2008;118: 352-358)。しかし、サンプル(患者組織)毎の性質のバラ付きが大きく、またその由来が明らかではなかった。しかし、今回脊柱靭帯組織中に間葉系幹細胞が局在することが明らかになった。この細胞は、正常組織では靭帯組織中の少ない血管周囲にとどまっているが、骨化した組織では、脊柱靭帯組織の実質部、ならびに骨化前線に広く、かつ数多く存在した。これは骨化の過程に間葉系幹細胞の遊走が関わっていることを示唆する。現在その点を検討し、ケモカイン系の関与が示されつつある(未発表データ)。また間葉系幹細胞自身の発現形質に違いがあり、正常組織のものに比べて、骨化組織のものでは骨化能が著明に高かった。以上の事を踏まえると、脊柱靭帯の骨化の過程は以下のように推定される。すなわち、メカニカルストレスなどによって損傷を受けた靭帯組織を修復するため、血管周囲に局在していた間葉系細

胞が、損傷部位に遊走してきて、組織の修復を図るため、線維芽細胞様の細胞に分化する。しかし、患者組織においては骨化能が高いため、間違っ骨芽細胞へと分化して、組織を骨化させてしまうものと推定される。そうであれば、治療薬の標的のひとつとして間葉系幹細胞の遊走メカニズムが考えられる。今後その機序を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

我々の立てた仮説、”脊柱靭帯組織に局在する間葉系幹細胞に形質転換が起こり、骨分化能が高くなっていて、そのため組織修復時に間違っ骨芽細胞へと分化してしまうことで、組織の骨化が起こる”の妥当性が示された。

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) Harada Y, Furukawa K-I. et al. Osteogenic Lineage Commitment of Mesenchymal Stem Cells from Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2014;443:1014-1020
- 2) Nakajima M, Takahashi A, Furukawa K-I, Ikegawa S. et al. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nature Genetics* 2014;46:1012-1016.
- 3) Chin S, Furukawa K-I, Wada K. et al. Immunohistochemical localization of mesenchymal stem cells in ossified human spinal ligaments.

- Biochemical Biophysical Research Communications 2013; 436: 698-704.
- 4) 小野睦、陳俊輔、古川賢一他 脊柱靱帯骨化における間葉系幹細胞の役割. 脊椎脊髄ジャーナル2013;26:163-168.
- 5) Asari T, Furukawa K-I. et al. Mesenchymal stem cell isolation and characterization from human spinal ligaments. Biochemical Biophysical Research Communications 2012; 417:1193-1199.

なし
3. その他
なし

2. 学会発表

- 1) 古川賢一、原田義史他 脊柱靱帯の異所性骨化患者から得られた間葉系幹細胞の骨分化能の亢進. 2014 年日本薬理学会年会 (Journal of Pharmacological Sciences vol.124, Suppl. 1, 135P, 2014
- 2) Chin S., Furukawa KI et al. Immunohistochemical localization of mesenchymal stem cells in human spinal ligament. Orthopedic Research Society Annual Meeting 2013 Program Book p.0582
- 3) 原田義史、古川賢一 他 脊柱靱帯骨化症患者では脊柱靱帯由来間葉系幹細胞の骨分化能が高い。2012 年日本整形外科学会基礎学術集会 (日本整形外科学会雑誌 vol. 86, S1346, 2014)
- 4) 浅利亨、古川賢一 他 ヒト脊柱靱帯由来間葉系幹細胞の分離・同定 2012 年年会日本骨代謝学会 (雑誌なし)

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

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

研究分担者 大川 淳 東京医科歯科大学大学院整形外科教授

研究要旨 頷椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) の病態は主として内軟骨性骨化によるものと考えられるが、その原因については未だ不明な点が多い。本研究では、患者由来靭帯細胞を採取し、正常靭帯部と靭帯骨化部の遺伝子発現の変動について網羅的に解析を行った。そして、靭帯骨化部において強く発現していた細胞周期関連蛋白である Cdk1 は靭帯骨化に伴いその発現が増加し、また、骨・軟骨代謝において重要な役割を果たすことを明らかにした。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症 (以下 OPLL) の病態は主として内軟骨性骨化によるものと考えられ、遺伝的要因やメカニカルストレス、代謝異常など、多くの因子の関与が示唆されているが、未だ不明な点が多い。これまでに我々はマウス OPLL モデルである *twy* マウスにおいて、骨化の進展に転写因子が関与していることについて報告した (Plos One 2012)。本研究では、OPLL の靭帯骨化部位と正常靭帯における遺伝子発現の変化について網羅的に検索し、OPLL の発生・進展に関与すると考えられる遺伝子に注目し、その骨化に対する影響について検討した。

B. 研究方法

頷椎 OPLL に対して前方手術を施行した 7 例において、靭帯骨化部位及び近隣の正常靭帯を術中に採取した。続いて摘出組織より RNA を抽出し、マイクロアレイにて遺伝子発現の変化につき網羅的に検索した。そして、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (以下 MC3T3-E1) 及びマウス

初代培養骨芽細胞を用いて、マイクロアレイにおいて強い発現の変動を示した遺伝子を過剰発現及びノックダウンし、それら遺伝子の骨芽細胞分化に対する影響についてアルカリフォスファターゼ活性及びリアルタイム PCR 法を用いて検討した。また、軟骨細胞においても、それら遺伝子の生理的な意義について検討した。

C. 研究結果

マイクロアレイ解析の結果、正常靭帯より 2.5 倍以上の強い発現を見せた遺伝子が 7 種類、逆に減弱した遺伝子が 1 種類存在した。それら遺伝子を MC3T3-E1、初代培養骨芽細胞に過剰発現させると、細胞周期を制御する酵素である Cdk1 を過剰発現させた群において、骨芽細胞分化が有意に促進された。逆に siRNA を用いてノックダウンすることにより骨芽細胞分化は抑制された。さらに、骨芽細胞分化の過程において、Cdk1 の発現が分化とともに増加することも見出した。また、軟骨細胞株 ATDC5、初代培養軟骨細胞においてリアルタイム PCR 法により、Cdk1 の発現を確認した。

更に、siRNAにより Cdk1 をノックダウンすると、軟骨細胞の増殖は有意に抑制された。

D. 考察、

OPLL 患者由来後縦靭帯細胞において、Cdk1 の発現が骨化とともに増加することが明らかとなり、Cdk1 が靭帯骨化の発生・進展に関与している可能性が示唆された。そして、骨・軟骨代謝において Cdk1 が重要であることを見出した。今後は、OPLL の発生・進展における Cdk1 の具体的な意義について *in vivo* で検討していく予定である。

E. 結論

頰椎 OPLL の靭帯骨化部において、いくつかの遺伝子の発現の変動を認めた。そのうち、細胞周期を制御する酵素である Cdk1 が骨・軟骨代謝において重要であり、OPLL の発生・進展においても関与している可能性が示唆された。

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

①斎藤 正徳、猪瀬 弘之、大川 淳、後縦靭帯骨化症の進展・発生に関与する遺伝子の検索 第43回日本脊椎脊髄病学会(京都) 2014年4月

②斎藤 正徳、猪瀬 弘之、大川 淳、後縦靭帯骨化症の進展・発生に関与する遺伝子の検索 第29回日本整形外科基礎学術集会 (鹿児島) 2014年10月

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

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

研究分担者 川口善治 富山大学整形外科学准教授
浜崎 景 富山大学公衆衛生学准教授

研究要旨 106 人の頰椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者と年齢・性をマッチさせた 109 名のコントロールを用い、血清よりリン脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィー法で 20 種類の脂肪酸を測定した。その結果ミード酸は、OPLL 患者とコントロールの間に有意差は認められなかった。一方、ミリスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸は、OPLL 患者でコントロールに比較して有意に高かった。In vitro では、ミード酸には骨芽細胞の活性を抑制したり、あるいは血管新生を抑制したりすることが報告されている。本研究では血清ミード酸は OPLL 患者とコントロールの間に有意差は認められず、ミード酸が直接 OPLL の発生に関与している可能性は低いと考えられた。

A. 研究目的

脊柱靭帯骨化症の原因は不明であり、なぜ靭帯組織が骨化してゆくのか、未だに解明されていない。一方、先行研究より、ある特定の脂肪酸 (特にミード酸) には骨芽細胞の活性を抑制することが知られている。本研究では、血清中ミード酸と脊柱靭帯骨化症の関連を検討し、靭帯骨化症の原因の究明と治療法の開発を目指すことを目的とした。

B. 研究方法

106 人の頰椎後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者と年齢・性をマッチさせた 109 名のコントロールを用いた。血清よりリン脂質を抽出し、ガスクロマトグラフィー法で 20 種類の脂肪酸 (ミリスチン酸、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、 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、ドコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リグノセリン酸、ネルボン酸) を測定した。統計解析としては、OPLL 患者とコントロールの群間比較には t 検定を用い、また 4 分位のオッズ比の算出にはロジスティック回帰分析を用いた。

(倫理面での配慮)

本研究は本学の倫理委員会の承認を得ており、患者には研究の趣旨を説明しインフォームドコンセントを得た。

C. 研究結果

ミード酸は、OPLL 患者とコントロールの間に有意差は認められなかった。一方、ミリスチン酸、パルミチン酸などの飽和脂肪酸は、OPLL 患者でコントロールに比較して有意に高かった。ロジスティック回帰分析の結果では、ミード酸、ミリスチン酸で有意差は認められず、パルミチン酸にのみ傾向が認められた。

(予定を含む)

D. 考察

In vitro では、ミード酸には骨芽細胞の活性を抑制したり、あるいは血管新生を抑制したりすることが報告されている。本研究では血清ミード酸は OPLL 患者とコントロールの間に有意差は認められず、ミード酸が直接 OPLL の発生に関与している可能性は低いと考えられた。一方、一部の飽和脂肪酸に有意差を認めたことから、これらの脂肪酸と OPLL の発生には何らかの関連がある可能性が示唆された。

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

E. 結論

血清ミード酸は OPLL 患者とコントロールの間に有意差は認められず、ミード酸が直接 OPLL の発生に関与している可能性は低いと考えられた。

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

Hamazaki K, Kawaguchi Y, Nakano M, Yasuda T, Seki S, Hori T, Hamazaki T, Kimura T. Mead acid (20:3n-9) and n-3 polyunsaturated fatty acids are not associated with risk of posterior longitudinal ligament ossification: Results of a case-control study. Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids.

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

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

研究分担者 森 幹士 滋賀医科大学整形外科講師

研究要旨 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 (H23-25; 戸山班長) でのゲノム解析により、既に明らかにしている後縦靭帯骨化症に対する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) の成果を発展させ、層別化解析による遺伝子座の絞り込みや候補遺伝子選別を行い、*in vitro* においてその機能解析を行う。

A. 研究目的

脊椎後縦靭帯骨化症 (以下 OPLL) は時に脊髄麻痺を来とし、患者の QOL 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が望まれている。「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」(H23-25; 戸山班長) でのゲノム解析により、既に明らかにしている後縦靭帯骨化症に対する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) の成果を発展させ、OPLL の病態解明・治療開発につなげるためにこれらの遺伝子座近くに存在する遺伝子の機能解析を行うことを目的とする。

B. 研究方法

OPLL 患者の手術時標本から、後縦靭帯のほか、椎間板線維輪、髓核、軟骨終板、前縦靭帯、黄色靭帯、棘上靭帯などを顕微鏡視下に分離し、既に当該施設で手技が確立されているレーザーマイクロダイセクション法による組織切片からの mRNA 解析など

を行う。また、*in vitro* 研究としては、市販されているヒト未分化間葉系幹細胞を用いて、GWAS により導き出された「6 つの新規遺伝子座」の結果より候補遺伝子となるものについて、遺伝子操作により遺伝子発現による骨化分化過程に差が無いかを検討する。

(倫理面での配慮)

手術時標本採取など、個人情報を取り扱う際には背番号化などによる匿名化を行い、個人情報管理に留意する。当該施設の倫理委員会の承認を得て、研究を遂行する。

C. 研究結果

頸椎 OPLL のために、頸椎前方除圧固定術を必要とする患者を選択し、手術時に得られる標本の取り扱いについて、多施設研究で行うためのプロトコルを完成させた。*In vitro* 研究では、研究対象とする候補遺伝子の選別を行った。

D. 考察

GWAS により導き出された「6 つの新規遺伝子座」の成果を発展させ、層別化解析に

よる遺伝子座の絞り込みや、候補遺伝子の機能解析を行うことで、OPLLの病態解明・治療開発につながると考えられる。候補遺伝子の選別や機能解析には多くの課題が残されており、多施設で臨むことで、解明までの期間短縮がみこまれる。また、手術時に得られる標本は、頸椎前方手術が適応となる患者数は限られ、多施設研究を行うメリットが大きいと考えられる。

E. 結論

多施設研究におけるプロトコールが確立された。本施設での役割を全うできるように研究を進めていく。

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

- ・ Mori K, Imai S, Kasahara T, Nishizawa K, Mimura T, Matsusue Y. Prevalence, Distribution, and Morphology of Thoracic Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament in Japanese: Results of CT-Based Cross-sectional Study. *Spine* (Phila Pa 1976). 2014;39(5):394-9.
- ・ 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):1012-6.

- ・ Mori K, Imai S, Nishizawa K, Matsusue Y. Cervical myelopathy due to calcification of the posterior atlantoaxial membrane associated with general articular deposition of calcium pyrophosphate dehydrate. A case report and review of the literature. *J Orthop Sci.* (in press)
- ・ 森 幹士. 胸部CTからみた胸椎黄色靱帯骨化症の有病率、分布と形態 最新原著レビュー 整形外科 2014; 65巻 13号 1382-4.
- 2. 学会発表
- ・ 森 幹士、笠原俊幸、西澤和也、西川淳一、今井晋二、松末吉隆. 当院胸部CT受験者からみた胸椎後縦靱帯骨化症の有病率 第87回日本整形外科学会学術総会 神戸市 2104 5 22-25.
- ・ 森 幹士. 多機能幹細胞を用いた機能解析. 後縦靱帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究 Kickoff meeting (厚生労働省科学研究委託業務 難治性疾患実用化事業) 東京 2014, 7, 5
- ・ 森 幹士. 胸部CTからみた胸椎DISHの有病率. 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業【脊柱

靱帯骨化症に関する調査研究】 平成
26年度第2回班会議 東京2014, 11,
29.

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

II. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当するものなし。

2. 実用新案登録

該当するものなし。

3. その他

該当するものなし。

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生体資料収集

研究分担者 辻 崇 北里大学北里研究所病院 整形外科 副部長

研究要旨 本研究では「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」の成果を発展させ、後縦靭帯骨化症に関する調査研究、疾患特異的 iPSs 細胞を活用した難病研究 (京都大学 iPS 細胞研究所) 等と連携し、新たなシーズ探索、病態解明、医薬品開発を目指している。

疾患感受性候補遺伝子の同定、病態解明にはヒトサンプルを用いた解析が必須で有り、ヒトサンプルを取り扱う際の 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・決定した。

また、疾患特異的 iPS 細胞樹立は、「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 (兄弟姉妹例) の中より 2 家系、5 患者に対して、本研究のインフォームド・コンセントの後に同意を得ることが出来たため、血液サンプルを採取後、京都大学再生医学研究所に送付し、同胞罹患の患者 (2 家系、計 5 検体) のリンパ球より iPS 細胞を樹立した。

A. 研究目的

本研究では「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」の成果を発展させ、後縦靭帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament: OPLL) に関する調査研究、疾患特異的 iPSs 細胞を活用した難病研究 (京都大学 iPS 細胞研究所) 等と連携し、新たなシーズ探索、病態解明、医薬品開発を目指している。ゲノム解析では、既に明らかにしている後縦靭帯骨化症に対する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) を発展させ、層別化解析による遺伝子座の絞り込みや難病の次世代シーケンス拠点班

と連携した疾患感受性遺伝子の同定を行う。

上記疾患感受性候補遺伝子の同定、病態解明にはヒトサンプルを用いた解析が必須で有り、患者手術施行時に摘出されるヒト検体を正常靭帯および骨化靭帯に分けて摘出し、DNA, RNA、凍結組織、固定組織の状態 で採取保存し、レーザーマイクロダイセクション法を用いた発現解析、DNA, RNA 解析等の *in vitro* 解析を行うことで、遺伝子座の絞り込み、石灰化誘導や異所性骨化誘導能における機能を解析する。

また、疾患特異的 iPS 細胞を活用した難病研究班と連携し、京都大学再生医学研究所にて疾患特異的 iPS 細胞を樹立する細胞株の発現プロファイル解析ならびにメチル化プロファイル解析を行うとともに、遺伝

子発現の網羅的解析から靭帯骨化と関連する遺伝子の同定と、同定された遺伝子の機能解析を行う。

B. 研究方法

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用プロトコル、組織用プロトコル、生組織プロトコルを作製した。

また、疾患特異的 iPS 細胞樹立のため、これまでにわれわれが「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」において調査した、同胞罹患患者（兄弟姉妹例）の中より 2 家系、合計 5 患者を選択し、本研究のインフォームドコンセントを行った後に、血液サンプルを採取し、京都大学再生医学研究所にて細胞の樹立を試みる。

（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ルの作製、サンプル採取を行った。

C. 研究結果

DNA/RNA 用プロトコル、組織用プロトコル、生組織プロトコルを作製し、決定した。

疾患特異的 iPS 細胞樹立は、「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（兄弟姉妹例）の中より、2 家系 5 患者に対して本研究のインフォームドコンセントを行い、同意を得ることが出来たため、血液サンプルを採取し、京都大学再生医学研究所に送付した。送付された同胞罹患の患者（2 家系、計 5 検体）のリンパ球より iPS 細胞が樹立された。第一家

系（3 名）では品質評価（幹細胞マーカーの発現、胚様体形成による分化能の確認、プラスミド残存の確認など）を終了し、各罹患患者より複数のクローンを樹立、iPS 細胞から間葉系幹細胞を経た骨分化誘導法により、骨分化能の評価を終了した。

D. 考察

本研究では「脊柱靭帯骨化症に関する調査研究」の成果を発展させ、後縦靭帯骨化症に関する調査研究、疾患特異的 iPSs 細胞を活用した難病研究（京都大学 iPS 細胞研究所）等と連携し、新たなシーズ探索、病態解明、医薬品開発を目指している。上記疾患感受性候補遺伝子の同定、病態解明にはヒトサンプルを用いた解析が必須で有り今後も臨床グループから適切なサンプル提供を継続することで、基礎研究から創薬を目指した研究体制の一端を担うべく研究を推進していく。

E. 結論

後縦靭帯骨化症の病態解明にむけた生体資料サンプルの体制づくりおよび疾患特異的 iPS 細胞作製のための試料採取を行った。

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

辻崇 戸山芳昭 後縦靭帯骨化症のゲノム解析 整形・災害外科 57 : 1449-1453, 2014

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

II. 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

VII 学会発表実績

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究」

機関名 学校法人慶應義塾

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
Genomic Study of Skeletal Diseases	Ikegawa S.	2nd Asia-Pacific Bone & Mineral Research Meeting. Seoul.	May 31, 2014	国外
Genomic Study of Common Diseases 常見疾病的基因组研究	Ikegawa S.	1st Chinese Osteoarthritis Annual Congress. Nanjing.	Oct 12, 2014	国外
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	池川志郎	愛媛大学大学院医学系研究科セミナー. 東温	2012. 4. 21	国内
骨・関節疾患のゲノム解析ーパーソナルゲノム時代の疾患研究	池川志郎	第32回日本骨代謝学会学術集会. 大阪	2014. 7. 24	国内
ゲノム研究の進歩と臨床への応用ー整形外科領域の現状と課題ー	池川志郎	第29回日本整形外科学会基礎学術集会. 鹿児島	2014. 10. 10	国内
Genomic study of bone and joint diseases in East Asia	Ikegawa S.	59th Annual meeting of the Japan Society of Human Genetics. Tokyo.	2014. 11. 22	国内
ゲノムからの疾患の解明ー骨関節疾患を例にー	池川志郎	第4回 臨床ゲノム医療学会. 東京	2014. 11. 30	国内
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	池川志郎	疾患研究のためのひとの遺伝学の基礎知識. 広島	2014. 12. 18	国内
Identification of gene sets dysregulated by mutant ACVR1 gene causing a rare intractable disease, fibrodysplasia ossificans progressiva	Matsuomoto Y, Ikeya M, Fukuta M, Hsiao E, Hayashi Y, Asaka I, Otsuka T, Conklin BR, Toguchida J	第12回 ISSCR. Vancouver	2014. 6. 18	国外
iPS細胞を活用した整形外科疾患の病態解明から創薬.	戸口田淳也	第87回日本整形外科学会学術総会. 神戸	2014. 5. 23	国内

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	松本佳久、池谷真、永田早苗、浅香勲、大塚隆信、戸口田淳也	第29回日本整形外科学科基礎学術集会. 鹿児島	2014. 10. 10	国内
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	松永一仁、金永輝、坂井田功、戸口田淳也	第37回日本分子生物学会年会. 横浜	2014. 11. 26	国内
脊柱靭帯の異所性骨化患者から得られた間葉系幹細胞の骨分化能の亢進	古川賢一、原田義史他	日本薬理学会年会 (Journal of Pharmacological Sciences vol.124, Suppl. 1, 135P)	2014年	国内
TNF α and IL-1 promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state	Takeshi Miyamoto	Cold Spring Harbor, Asia Bone and Cartilage: from Development to Human Diseases. China	November 3-7, 2014	国外
Transcriptional Regulation of Osteoclastogenesis	Takeshi Miyamoto	5th International Conference on Osteoimmunology. Greece	June 15-18, 2014	国外
プセナテラス 破骨細胞によるHSC制御	宮本健史	第1回日本骨免疫会議	2014. 7. 4-6	国内
Osteo-Oncology: A Mechanism of Bone Tumor Development,	Takeshi Miyamoto	11th Bone Biology Forum, Mishima, Japan,	August 22-23, 2014	国内
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16回日本骨粗鬆症学会	2014. 10. 23-25	国内
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	第29回日本整形外科学会基礎学術総会. 城山観光ホテル	2014. 10. 8-10	国内
当院胸部CT受験者からみた胸椎後縦靭帯骨化症の有病率	森 幹士、笠原俊幸、西澤和也、西川淳一、今井晋二、松末吉隆	第87回日本整形外科学会学術総会. 神戸	2014. 5	国内
多機能幹細胞を用いた機能解析. 後縦靭帯骨化症の病態解明・治療法開発に関する研究	森 幹士	東京	2014. 7. 5	国内
胸部CTからみた胸椎DISHの有病率. 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患等克服研究事業【脊柱靭帯骨化症に関する調査研究】	森 幹士	東京	2014. 11. 29	国内
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.	江面陽一、八田愛理奈、野田政樹	第32回日本骨代謝学会学術集会. 大阪	2014. 7. 26	国内