

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

慢性圧迫モデル (*ttw/ttw*) およびヒト OPLL 標本における疾患関連候補遺伝子発現解析

脊柱靭帯骨化症に関する調査研究

研究分担者 中嶋 秀明 福井大学 講師

研究要旨 ヒト OPLL 標本および *ttw* マウスを用いたこれら疾患感受性候補遺伝子 (STK38L, RSPO2, HAO1, CCDC91, RSPH9) の発現解析を行った。ヒト OPLL 標本およびヒト OPLL 由来培養細胞では、HAO1, RSPO2, CCDC91 の発現を認めたが、個体差が大きかった。若年齢 *ttw* マウスでの検討では、3 週齢から HAO1, 8 週齢から RSPO2 の発現を認めた。本研究結果からは、HAO1 はより骨化初期、RSPO2, CCDC91 は骨化伸展に関与している可能性が示唆された。

A . 研究目的

ヒト後縦靭帯骨化 (OPLL) 標本では、*enthesis* から線維組織、軟骨組織、骨組織が連続しており、病理組織学的には、異所性骨化、内軟骨性骨化による骨化の進行が示唆される。我々はこれまで、靭帯骨化の発生や増大に関わる因子について報告してきたが、いまだ多くの不明な点が存在している。

難治性疾患等政策研究事業(難治性疾患政策研究事業) 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班における多施設研究において、OPLL に対するゲノムワイド相関解析によって、疾患関連候補遺伝子 (STK38L, RSPO2, HAO1, CCDC91, RSPH9) が報告された。

本研究では、ヒト OPLL 標本および *ttw* マウスを用いたこれら疾患感受性候補遺伝子の発現解析を行い、骨化発生に関わる因子の同定を行うことを目的とした。

B . 研究方法

標本として、頸椎前方除圧固定術時に採取したヒト頸椎 OPLL 組織、および遺伝的に石灰化・骨化が生じるようにプログラミングされた慢性脊髄圧迫モデル *ttw/ttw* マウス(3-10 週齢) 頸椎を用いた免疫組織化学的検討をおこなった。ヒト OPLL 組織については、組織由来培養細胞を作成し、*flexercell strain unit* を用いた 24 時間周期的牽引ストレス前後での上記因子に関する *microarray* 解析を行い、正常後縦靭帯組織由来細胞との発現比較を行った。

本研究は、福井大学医学部倫理委員会の承認のもと行われた。実験動物に対する処置などの際の取り扱い方法、除痛処置については、福井大学動物実験委員会にて承認済みである。

C . 研究結果

ヒト OPLL 組織 (*mixed type, continuous type*) では、骨化前線周囲で RSPO2、骨化初期の前肥大軟骨細胞層で HAO1, CCDC91 陽性細胞を認めたが、発現強度に個体差が認め

られた(図 1)。segmental OPLL 標本ではいずれの因子の発現も確認されなかった。

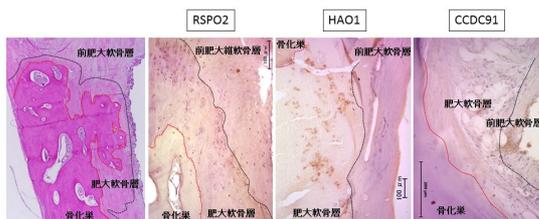


図 1. ヒト OPLL 標本における疾患関連候補遺伝子発現

ヒト OPLL 由来培養細胞では、CCDC91>HAO1>RSPO2 の発現強度で陽性培養細胞を認めた(図 2)。これら培養細胞と、24 時間牽引ストレスをかけた培養細胞を用いて行った Microarray 解析では、メカニカルストレスにより HAO1, RSPO2, CCDC91 の発現増強がみられた。正常後縦靭帯組織由来細胞ではストレスによる発現上昇は確認されなかった。しかし、これら培養細胞の結果も個体差が大きかった。

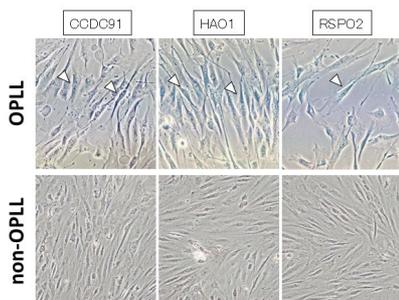


図 2. ヒト OPLL 由来培養細胞における疾患関連候補遺伝子発現

そこで遺伝的に石灰化・骨化が生じることがプログラミングされている ttw マウス頸椎を用いて検討を行った。評価は石灰化・骨化が生じる以前の 3 週齢から行った。HAO1 は 3 週齢の enthesis 部で発現がみられ、6 週齢では後縦靭帯内にも発現がみられた。8 週齢では、さらに HAO1 発現が増強すると共に(図 3)、enthesis 部に RSPO2 発現も確認さ

れた。

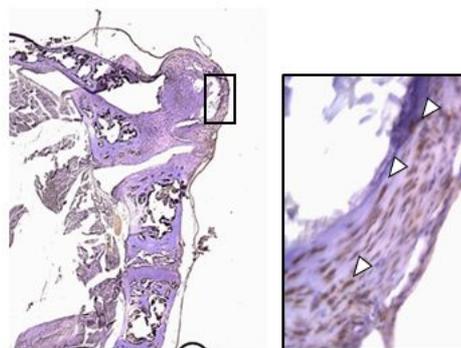


図 3. ttw マウス 8 週齢における HAO1 発現

D. 考察

ヒト OPLL 標本間では、疾患関連候補遺伝子発現に個体差がみられた。この原因として、今回調べた疾患関連候補遺伝子が骨化初期に関与する因子と考えられているため、骨化進展の活動性の差が発現に影響していると考えられた。そこで石灰化・骨化形成前の若年齢 ttw マウスを用いた検討を行い、再現性の高い結果が得られた。

	ttw/ttw mouse			ヒトOPLL骨化巣		
	3週	4, 5, 6週	8週	骨化巣組織免疫染色	骨化靭帯由来培養細胞免疫染色	stress
HAO1	±	+	++	±(一部)	+	↗
CCDC91	-	-	-	±(一部)	+	↗
RSPO2	-	-	±	+(一部)	±	↗
RSPH9	-	-	-	-	-	→
STK38L	-	-	-	-	-	-

表 1. 疾患関連候補遺伝子発現

両者の結果から(表 1)、今回調査した疾患関連候補遺伝子の中で、特に HAO1, RSPO2, CCDC91 が骨化に関与する因子である可能性が示唆された。さらに、発現時期や発現部位からは、HAO1 はより骨化初期に関与し、RSPO2, CCDC91 は成熟した骨化靭帯で発現して骨化伸展に関与している可能性が考えられた。病態解析には、ヒト OPLL 標本および ttw mouse 組織を用いた

さらなる検討を要する。

E . 結論

1. 後縦靭帯骨化症 (OPLL) の疾患関連候補遺伝子について、ヒト後縦靭帯骨化組織・骨化靭帯由来培養細胞および ttw mouse を用いた発現解析を行った
2. RSPO2, HAO1, CCDC91 が関与する因子である可能性が示唆された
3. HAO1 がより骨化初期、RSPO2, HAO1 は骨化伸展時により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

1. 中嶋 秀明, 高橋 藍, 渡邊 修司, 本定 和也, 北出 誠. 【脊椎・脊髄疾患のニューロサイエンス 神経所見の診かたから再生医療まで】 脊髄再生医療の最前線 間葉系幹細胞移植による脊髄再生. 整形・災害外科 60 巻 5 号 Page721-726 (2017.04)

2. 学会発表

1. 本定 和也, 中嶋 秀明, 高橋 藍, 山本 悠介, 出淵 雄哉, 松峯 昭彦. CCL21 欠損マウス脊髄損傷モデルにおける運動・疼痛関連評価と損傷部・腰膨大部の炎症性サイトカインによる microglia/macrophage phenotype の変化. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2017.10) 沖縄
2. 山本 悠介, 小久保 安朗, 山岸 淳嗣, 出淵 雄哉, 中嶋 秀明, 松峯 昭彦.

ラット椎間板変性の継時的、および組織学的・免疫組織化学的評価. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2017.10) 沖縄

3. 中嶋 秀明, 小久保 安朗, 平井 貴之, 杉田 大輔, 北出 誠, 松峯 昭彦. ヒト後縦靭帯骨化組織および ttw マウスを用いた疾患関連候補遺伝子の発現解析. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2017.10) 沖縄
4. 山岸 淳嗣, 小久保 安朗, 中嶋 秀明, 杉田 大輔, 山本 悠介, 松峯 昭彦. ヒト頸椎椎間板ヘルニア・頸椎症椎間板におけるマクロファージ浸潤の免疫組織化学的観察. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2017.10)
5. 北出 誠, 中嶋 秀明, 渡邊 修司, 本定 和也, 平井 貴之, 小久保 安朗, 松峯 昭彦. ラット脊髄損傷における microglia の^[11C]-PK11195 による PET イメージング. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2017.10) 沖縄
6. 高橋 藍, 中嶋 秀明, 本定 和也, 北出 誠, 山本 悠介, 小久保 安朗. 脂肪由来幹細胞と骨髄由来幹細胞の遺伝子発現解析および脊髄損傷に対する治療効果. 第 46 回日本脊椎脊髄病学会 (2017.4) 札幌
7. 中嶋 秀明, 本定 和也, 渡邊 修司, 高橋 藍, 平井 貴之, 小久保 安朗. 脊髄損傷に対する骨髄間質細胞移植の有効性とメカニズム. 第 46 回日本脊椎脊髄病学会 (2017.4) 札幌

H . 知的財産権の出願・登録状況
特になし