

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

ヒト脊柱靭帯骨化組織および遺伝性骨軟骨異常マウス(*ttw/ttw*)を用いた
疾患関連遺伝子発現解析

脊柱靭帯骨化症に関する調査研究

研究分担者 中嶋 秀明 所属機関名 福井大学

研究要旨 後縦靭帯骨化症(OPLL)の疾患関連候補遺伝子(STK38L, RSPO2, HAO1, CCDC91, RSPH9)について、ヒト脊柱靭帯骨化組織・骨化靭帯由来培養細胞および遺伝性骨軟骨異常マウス(*ttw/ttw*)を用いた発現解析を行った。ヒト OPLL 標本では、骨化部の基質で RSPO2 陽性細胞を認める症例があった。ヒト OPLL 由来培養細胞では、CCDC91, RSPO2, HAO1 の発現がみられ、これらはいずれも牽引ストレス負荷により発現が増加した。ヒト OPLL を用いた研究結果には大きな個体差がみられた。*ttw* マウスの検討で HAO1 と RSPO2 の発現がみられたが、両者が同時発現する個体はみられなかった。本研究の結果から、骨化の前段階で HAO1 が靭帯付着部付近に発現し、その後骨化の初期の段階で骨化前線周囲で RSPO2・Wnt/ β -catenin signaling の異常活性により骨化形成が生じ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、骨組織が連続している。我々はこれまでの検討で、骨化前線付近には新生血管がみられ、その周囲には未分化細胞の集簇がみられることを示し、(1)骨化靭帯の弾性線維は変性・膨化していること、(2)周囲にアパタイトを伴った matrix vesicle が存在していること、(3)骨化巣の近傍部に apoptosis を生じている軟骨細胞が存在すること、などを報告している。これらの病理組織学的から、OPLL の骨化前線では、組織学的に異所性骨化、内軟骨性骨化による骨化の進行が示唆される。OPLL は多因子疾患であり、様々な転写因子が関与し、靭帯骨化の発生や増大に関わる因子には未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 標本および遺伝性骨軟骨異常マウス(*ttw/ttw*)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各種因子に関する microarray 解析を行い、正常後縦靱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 組織では、前肥大軟骨細胞層に Sox9, IHH、肥大軟骨細胞層に Runx2 の発現を認めた。また前肥大軟骨細胞・間質細胞に β -catenin、小血管層および周囲の間質細胞に Wnt 5a, Wnt 7a の発現を認めた。疾患関連候補遺伝子に関する免疫染色では、骨化部の基質で RSPO2 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)。

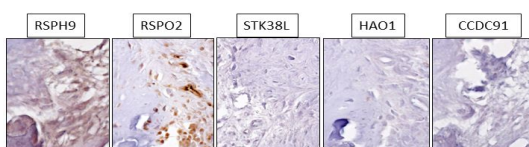


図 1. ヒト OPLL 標本免疫染色

ヒト OPLL 由来培養細胞では、CCDC91, HAO1, RSPO2 の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。正常後縦靱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。

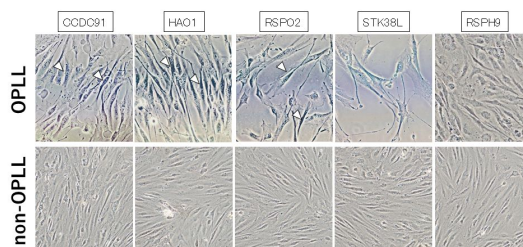


図 2. ヒト OPLL 由来培養細胞の免疫染色

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 3-8 週齢の enthesis 部で発現がみられた。5-8 週齢では RSPO2 の発現が enthesis 部にみられた。興味深いことに、HAO1 と RSPO2 を同時に発現している個体はみられなかった(図 3)。

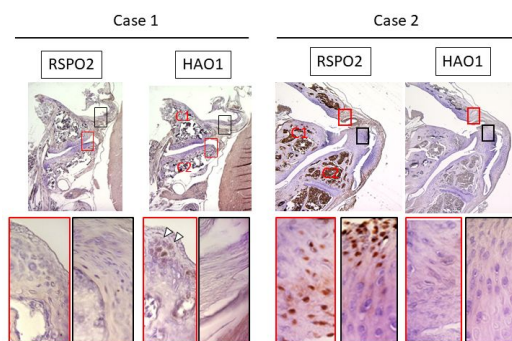


図 3. 5 週齢 *ttw* マウスの免疫染色
(HAO1 と RSPO2 の同時発現はない)

D . 考察

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 は成熟した骨化靱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。

E . 結論

骨化の前段階で HAO1 が靭帯付着部付近に発現し、その後骨化の初期の段階で骨化前線周囲で RSPO2・Wnt/ β -catenin signaling の異常活性により骨化形成が生じ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) Takahashi A, Nakajima H, Uchida K, Takeura N, Honjoh K, Watanabe S, Kitade M, Kokubo Y, Johnson WEB, Matsumine A. Comparison of Mesenchymal Stromal Cells Isolated from Murine Adipose Tissue and Bone Marrow in the Treatment of Spinal Cord Injury. Cell Transplant. 2018 Jul;27(7):1126-1139.

2. 学会発表

- (1) 中嶋秀明、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦. ヒト脊柱靭帯骨化組織および遺伝性骨軟骨異常マウス (ttw/ttw) を用いた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 第 2 回合同班会議 (2018.11) 東京
- (2) 中嶋秀明, 竹浦直人, 渡邊修司, 本定和也, 高橋藍, 松峯昭彦. 圧迫性

頸髄症における疼痛発現に

hematogenous macrophage が関与している ttw/ttw マウスを用いた検討 . 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2018.10) 奈良

- (3) 渡邊修司, 中嶋秀明, 本定和也, 山本悠介, 松峯昭彦. ヒト脊柱靭帯骨化標本および ttw マウス頸椎を用いた疾患感受性候補遺伝子発現. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2018.10) 奈良
- (4) Nakajima H, Takahashi A, Kitade I, Watanabe S, Honjoh K, Matsumine A. Clinical predictors and optimal management for patients with cervical spinal cord injury without major bone injury. Eurospine Annual Meeting (2018.9) Balcerona
- (5) 中嶋秀明、杉田大輔、渡邊修司、本定和也、山本悠介、松峯昭彦. 頸椎後縦靭帯骨化の発生・伸展にかかわる因子の検討. 脊柱靭帯骨化症に関する調査研究 第 1 回合同班会議 (2018.6) 東京
- (6) 中嶋秀明, 北出誠, 渡邊修司, 本定和也, 山本悠介, 松峯昭彦. PK11195 PET imaging を用いた脊髄内活性化ミクログリア可視化の試み. 第 47 回日本脊椎脊髄病学会学術集会 (2018.4) 神戸