

厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業
分担研究報告書

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究
研究分担者 中嶋 秀明 福井大学整形外科 講師

研究要旨 後縦靱帯骨化症(OPLL)の疾患関連候補遺伝子および骨化関連因子について、ヒト脊柱靱帯骨化組織・骨化靱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、線維軟骨細胞層で RSPO2 および Sox9、CD90 陽性細胞を認めた。石灰化軟骨層では Runx2 陽性細胞を認めた。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することを RT-PCR で確認した。*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、HAO1 は骨化初期段階、RSPO2 は内軟骨性骨化過程、CCDC91 はメカニカルストレスに応じた骨化形成に関与している可能性が示唆された。

A．研究目的

ヒト後縦靱帯骨化(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、遺伝的背景を含め、様々な転写因子が関与し、靱帯骨化の発生や増大に関わる。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や機能解析を行うことを目的とした。

B．研究方法

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(3-8 週齢)頸椎を用いた疾患関連候補遺伝子および骨化関連転写因子(Runx2、Sox9)、幹細胞マーカー(CD90)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発現について、real time RT-PCR での解析を行い、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 標本では、線維軟骨細胞層で RSPO2 の発現を認め、同部位には Sox9、CD90 発現がみられ、Runx2 は石灰化軟骨層

で陽性細胞がみられた(図1)。

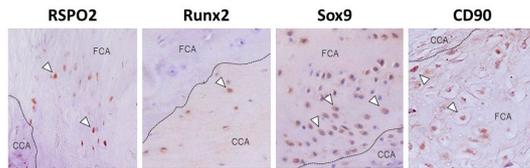


図1. ヒト OPLL 標本 免疫染色

培養細胞では、RSPO2, HAO1, CCDC91 陽性細胞を認め(図2)、これらはメカニカルストレスによって発現増強がみられたことを real time RT-PCR で確認した(図3)。

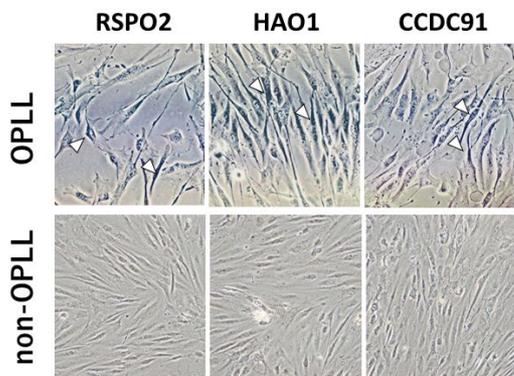


図2. ヒト OPLL 培養細胞(免疫染色)

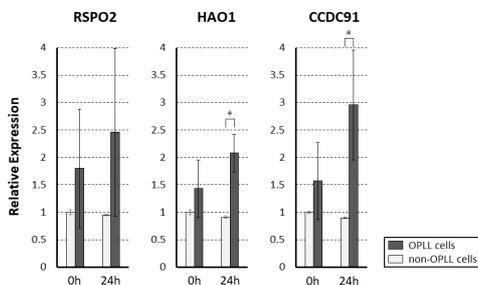


図3. ヒト OPLL 培養細胞 (Real time RT-PCR)

ttw マウス頸椎では、PLLの付着部でHAO1、RSPO2が発現する標本がみられたが、それら

2つが同一標本で陽性となることはなかった(図4)。

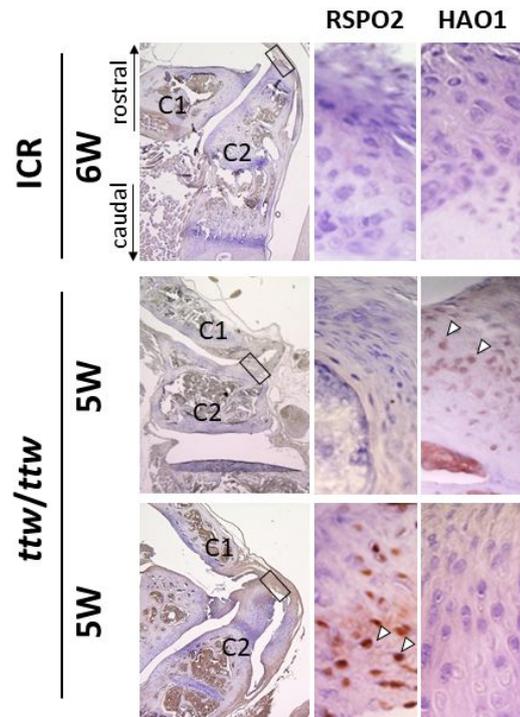


図4. *ttw* マウス(免疫染色1)

RSPO2 陽性細胞が多くみられる領域において、Sox9 陽性細胞が多数みられたが、Runx2、CD90 陽性細胞はみられなかった(図5)。

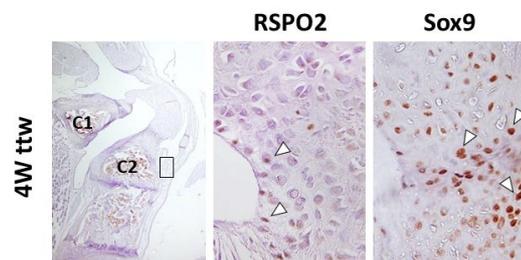


図5. *ttw* マウス(免疫染色2)

D. 考察、

ヒト靭帯骨化標本間では、疾患関連候補遺伝子発現に個体差がみられた。これらの因子は骨化初期に関与するため、骨化進展の活動

性の差が発現に影響している可能性があると考えられた。ttw マウスを用いた検討では再現性の高い結果が得られた。RSPO2 は Wnt/-catenin signaling pathway と関連して内軟骨性骨化をもたらす因子と考えられる。HAO1 は骨化前段階で発現すると考えられ、成熟したヒト OPLL での発現を確認することは困難であると考えられた。CCDC91 は Ihh や PTHrP と関連して、特にメカニカルストレスに応じた骨化に寄与していることが予想された。

E . 結論

ヒト OPLL 関連標本および ttw マウス標本の結果から、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、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。

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. Honjoh K, Nakajima H, Hirai T, Watanabe S, Matsumine A. Relationship of Inflammatory Cytokines From M1-Type Microglia/Macrophages at the Injured Site and Lumbar Enlargement With Neuropathic Pain After Spinal Cord Injury in the CCL21 Knockout (plt) Mouse. *Front Cell Neurosci.* 2019 Nov 21;13:525.
2. Takeura N, Nakajima H, Watanabe S, Honjoh K, Takahashi A, Matsumine A. Role of

macrophages and activated microglia in neuropathic pain associated with chronic progressive spinal cord compression. *Sci Rep.* 2019 Oct 30;9(1):15656.

3. Nakajima H, Watanabe S, Honjoh K, Kitade I, Sugita D, Matsumine A. Long-term Outcome of Anterior Cervical Decompression With Fusion for Cervical Ossification of Posterior Longitudinal Ligament Including Postsurgical Remnant Ossified Spinal Lesion. *Spine (Phila Pa 1976).* 2019 Dec 15;44(24):E1452-E1460.
 4. Nakajima H, Takahashi A, Kitade I, Watanabe S, Honjoh K, Matsumine A. Prognostic factors and optimal management for patients with cervical spinal cord injury without major bone injury. *J Orthop Sci.* 2019 Mar;24(2):230-236.
 5. Nakajima H, Uchida K, Takayasu M, Ushida T. A Nationwide Survey of Spinal Cord-Related Pain Syndrome in Japan: Clinical Characteristics and Treatment. *Spine Surg Relat Res.* 2019 Feb 28;3(4):319-326.
 6. Nakajima H, Uchida K, Taguchi T, Yamashita T, Tominaga T, Tanaka M, Yamagata M, Kaito T, Ushida T. Multicenter cross-sectional study of the clinical features and types of treatment of spinal cord-related pain syndrome. *J Orthop Sci.* 2019 Sep;24(5):798-804.
- ##### 2. 学会発表
1. Nakajima H, Watanabe S, Honjoh K, Kitade I, Sugita D, Matsumine A. Long-term outcome of anterior cervical

decompression with fusion for cervical
ossification of posterior longitudinal
ligament. Cervical Spine Research Society
European Section Annual Meeting
(2019.5) Roma

2. 中嶋秀明、内田研造、田口敏彦、山下敏彦、富永俊克、田中雅人、山縣正庸、海渡貴司、牛田享宏. 脊髄障害性疼痛症候群の臨床的特徴と治療に関する全国実態調査. 第 48 回日本脊椎脊髄病学会学術集会 (2019.4) 横浜
3. 中嶋秀明、高橋藍、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦. 非骨傷性頸髄損傷の機能的予後予測の解析と治療選択. 第 92 回日本整形外科学会学術集会 (2019.5) 横浜
4. 北出誠、中嶋秀明、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦. 頸髄損傷モデルにおける translocator protein (TSPO) 発現と PK11195 PET imaging による動態解析. 第 34 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2019.10) 横浜