

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 氏名 森 幹士 所属機関 役職 滋賀医科大学整形外科 准教授
研究協力者 氏名 彌山峰史 所属機関 役職 滋賀医科大学整形外科 講師

研究要旨

頰椎後縦靱帯骨化症に対する先行研究の結果から、骨芽細胞分化の調節機構に着目し、プロテオミクスによる疾患関連タンパク質の抽出、microRNA やサイトカインによる相互作用について研究を行った。OPLL に対するプロテオミクスの結果では、glycosylation シグナル、S100 タンパクシグナルに関連するタンパク発現が有意であり、OPLL の病態に関与すると考えられる。

A. 研究目的

後縦靱帯骨化 (OPLL) の病態には加齢による退行性変化、代謝内分泌異常、生活環境素因など種々の因子の関与が報告されてきた。特に遺伝的背景についてはコラーゲン遺伝子の発現異常が報告されて以降、ゲノム・遺伝子解析が進められ、徐々に本症の病態は明らかとなってきた。しかし、骨化が脊椎領域に限局すること、骨化形態・伸展には大きな個人差が存在すること、骨化巣は緩徐に増大して縮小や消退はほとんどみられないことなど、治療を進展させるうえで重要な疑問点は未だ残されている。

これまでの我々の研究では、骨化靱帯組織から遊走させて得た培養靱帯細胞の特性を観察し、Runx2、Osterix、Indian hedgehog といった骨芽細胞分化、軟骨細胞分化に関与する転写因子、シグナル伝達の mRNA 発現が亢進しており、さらに外的負荷を加えるとその発現量は有意に上昇することを明らかにできた (Spine 2013, Spine 2012)。さらに、骨芽細胞分化の調節機構にかかわる因子の解析を目的として microRNA array 解析を行うと、OPLL 由来の培養細胞では hsa-miR-483b-3p/down regulation が有意に認められた。hsa-miR-483b-3p の標的因子の 1 つに Wnt signaling 伝達物質があげられており、

骨化巣の近接して存在する骨化前線において LRP5/6、Wnt 3a、 β -catenin の発現が陽性であった (図 1) (J Orthop Sci 2018)。

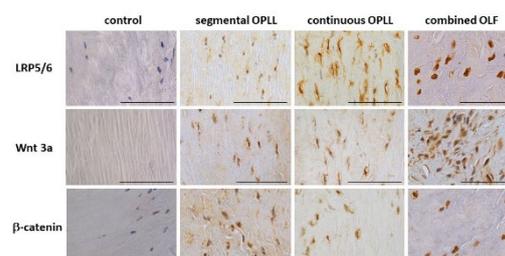


図 1 骨化前線における Wnt signaling の発現
miR-483b-3p の標的因子である Wnt signaling 伝達物質は骨化前線の間葉系細胞に陽性である。

これらの結果から骨芽細胞分化の調節機構に着目し、プロテオミクスによる疾患関連タンパク質の抽出、microRNA やサイトカインによる相互作用について研究を行っている。

B. 研究方法

研究対象は、脊柱靱帯骨化症 (OPLL: 連続型 n=10, 分節型 n=10)、非靱帯骨化疾患 (頰椎椎間板ヘルニア、頰椎症性脊髄症: n=10) の手術時に採取した靱帯組織である。採取組織から explant 法にて細胞を遊走させ、得られた培養細胞は 3 継代培養して実

験に用いる。また組織の一部は 0.05N EDTA にて脱灰後に薄切標本を作製し、組織学的検討に用いる。

(実験 1) プロテオミクス解析

OPLL 由来の培養細胞よりタンパク質を抽出し、SDS-PAGE、2次元電気泳動によりタンパク質の分離を行う。分離した各タンパク質のスポットを切り出し、ペプチド断片を作成したのち、質量分析計にてペプチド断片の分子量を測定し、ゲノムデータとの比較にてタンパク質を同定する。連続型 OPLL、分節型 OPLL のそれぞれに有意に発現するタンパク質を同定後、薄切標本に対する免疫組織化学染色による局在性の観察、および培養靭帯細胞における発現量解析を行う。

(実験 2) 網羅的サイトカイン解析

サスペンションアレイシステムによりサイトカインの定量的観察を行う。Bio-Plex™ サスペンションアレイは、フローサイトメーターの原理に基づきサイトカイン、ケモカイン等を複数同時に定量するシステムである。培養靭帯細胞の細胞膜を破碎後、球形ビーズを作成し、抗原抗体反応を利用して生体成分の定量化を行う。

(倫理面への配慮も記入)

本研究は滋賀医科大学倫理委員会の承認をえた上で研究を行っている。脊椎手術を受ける患者及びその家族に対し、本研究の目的を十分に説明し書面での同意を得られた場合にのみサンプルとして組織を使用する。本研究は手術時に採取した組織を使用するものであり、研究協力者に身体的苦痛や不利益を生じるものではないことを含め、研究の目的、内容についてわかりやすく説明を行う。個人データは全て暗号、匿名化し、個人情報の保護に十分配慮する。

C. 研究結果

培養細胞に対するプロテオミクス解析の結果、発現した総蛋白数は 4353 種であった。Cut line を abundance ratio > 2 とすると、CSM

群に対して連続群では 37 種、分節群では 18 種のタンパク質が抽出できた。さらに連続群と分節群に共通して CSM 群より高値となった 13 種を pick-up し、これらタンパク種よりシグナル解析を行うと細胞のグリコシル化に関与する因子が有意となった。同様に、OPLL 群の中で連続群と分節群の比較を行うと 76 種のタンパク質が抽出でき、シグナル解析では S-100 タンパク質の関連因子が有意となった。

サイトカイン網羅解析の結果では、OPLL 群では IL-6、basic fibroblast growth factor (FGF)、normal T cell expressed and secreted (RANTES) の発現に有意差があり、特に IL-6 は分節群よりも連続群で有意に高値であった。しかし、IL-6、basic FGF、RANTES の発現量は年齢、性別、合併症の有無（高血圧、糖尿病）、血清学的検査 (c-reactive protein) との相関性は認めなかった。免疫組織化学的に観察すると、IL-6 は骨化前線の軟骨細胞、未熟な間葉系細胞に陽性であった (図 2)。

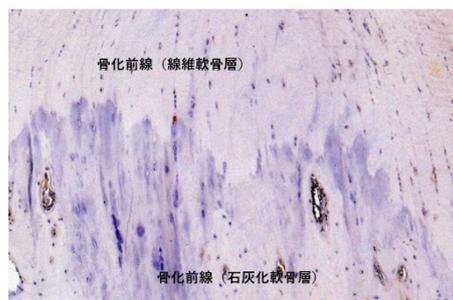


図 2 骨化前線における Wnt signaling の発現
miR-483b-3p の標的因子である Wnt signaling 伝達物質は骨化前線の間葉系細胞に陽性である。

D. 考察、

プロテオミクスにより有意となった細胞内 glycosylation はタンパク質翻訳後修飾の過程であり、糖鎖が付加する反応の 1 つである。糖鎖化された代表的なタンパクはムチン、プロテオグリカンであり、OPLL における骨化前線の靭帯基質に発現することが示唆された。また、S100 タンパクシグナルは、細胞内カルシウム濃度の恒常性、細胞

成長、細胞周期の調整に関与することが指摘されている。免疫染色を行うと、S100 タンパクは骨化前線の軟骨細胞に強陽性であり、骨化形成の細胞分化に影響すると考えられた。

IL-6 は proinflammatory cytokine の 1 つであり、組織における炎症の存在が示唆される。しかし、OPLL の骨化前線に好中球を中心とした炎症細胞浸潤は認めておらず、組織変性に伴う微小炎症の可能性が考えられる。また、IL-6 と BMP の相互作用として骨芽細胞分化が促進されることや、IL-6 の発現によって組織のコラーゲン発現が変化することも報告されており、OPLL の骨化過程を促進させる 1 つの因子であることを推測している。今後、これらサイトカインがプロテオミクスに与える影響について研究を進めていく予定である。

E. 結論

OPLL に対するプロテオミクスの結果では、glycosylation シグナル、S100 タンパクシグナルに関連するタンパク発現が有意であり、OPLL の病態に関与すると考えられる。

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 Takamura H, Terashima T, Mori K, Katagi M, Okano J, Suzuki Y, Imai S, Kojima H. Bone-Marrow-Derived Mononuclear Cells Relieve Neuropathic Pain after Spinal Nerve Injury in Mice. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2020 Mar 30;17:657-665.
- ② 森 幹士、吉井俊貴、平井高志、名越慈人、西村空也、竹内一裕、中村雅也、松本守雄、大川 淳、川口善治. 全脊椎 CT 大規模多施設研究による重度頸椎 OPLL 症例の特徴—厚労科研脊

椎靭帯骨化症研究班・JOSL study— J. *Spine Res.* 11: 805-810, 2020.

2. 学会発表

- ① 森 幹士 吉井俊貴 平井高志 橋本淳 名越慈人 竹内一裕 勝見敬一 牧聡 中村雅也 松本守雄 大川淳 川口善治 厚労科研脊椎靭帯骨化症研究班. 多施設前向き調査による若年頸椎 OPLL 患者の特徴 —厚労科研脊椎靭帯骨化症研究班・JOSL study— 多施設前向き調査による若年頸椎 OPLL 患者の特徴 —厚労科研脊椎靭帯骨化症研究班・JOSL study— 第 93 回日本整形外科学会学術総会 福岡 (オンライン開催) 2020, 5, 21-24
- ② 彌山峰史, 森 幹士, 齋藤英貴, 北川誠大, 西澤和也, 中村 陽, 今井晋二. 胸椎黄色靭帯骨化症の術後成績に関与する因子と病理組織像の特徴. 第 93 回日本整形外科学会, 2020/5/21-24, 福岡市 (オンライン).
- ③ 彌山峰史, 森 幹士, 齋藤英貴, 熊谷康佑, 西澤和也, 中村 陽, 北川誠大. 今井晋二. プロテオミクスによる頸椎後縦靭帯骨化における骨化関連因子の解析. 第 49 回日本脊椎脊髄病学会, 2020/9/7-9, 神戸市 (オンライン).
- ④ 齋藤英貴, 彌山峰史, 森 幹士, 藤川ひとみ, 北川誠大, 熊谷康佑, 西澤和也, 中村 陽, 今井晋二. 頸椎後縦靭帯骨化における骨化形態とサイトカイン発現の相関性. 第 49 回日本脊椎脊髄病学会, 2020/9/7-9, 神戸市 (オンライン).
- ⑤ 齋藤英貴, 彌山峰史, 森 幹士, 北川誠大, 西澤和也, 熊谷康佑, 今井晋二. 頸椎後縦靭帯骨化における骨化形態と IL-6 の相関性. 第 57 回日本リハビリテーション医学会学術集会, 2020/8/19-22, 京都 (オンライン).
- ⑥ 彌山峰史, 森 幹士, 齋藤英貴, 熊谷康佑, 藤川ひとみ, 北川誠大. 今井晋二. 頸椎後縦靭帯骨化に由来する培養細胞に対するプロテオミクス解析. 第 35 回

日本整形外科学会基礎学術集会,
2020/10/15-16, 東京都(オンライン)。

- ⑦ 齋藤英貴, 彌山峰史, 森 幹士, 北川誠大, 藤川ひとみ, 熊谷康佑, 西澤和也, 今井晋二. 頰椎後縦靱帯骨化におけるサイトカインプロファイルと転写因子の相関. 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2020/10/15-16, 東京都(オンライン)。

- ⑧ 彌山峰史, 森 幹士, 北川誠大, 西澤和也, 中村 陽, 齋藤英貴, 今井晋二. 胸椎黄色靱帯骨化症の手術成績に關与する因子. 第 27 回日本脊椎脊髄神経手術手技学会, 2020/10/2-3, 千葉市(オンライン)。

(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

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。