

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 福井大学整形外科 講師

研究要旨 後縦靭帯骨化症 (OPLL) の疾患関連候補遺伝子および骨化関連因子について、ヒト脊柱靭帯骨化組織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なく、HAO1 は 3-6 週齢 ttw マウスでのみ発現を認めた。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

ヒト後縦靭帯骨化 (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、様々な転写因子の関与が報告されているが、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 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)。

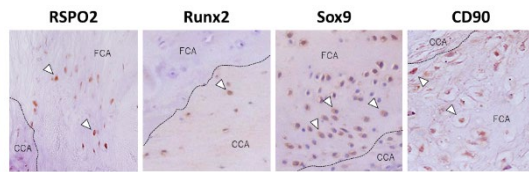


図 1. ヒト OPLL 標本 免疫染色

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)。

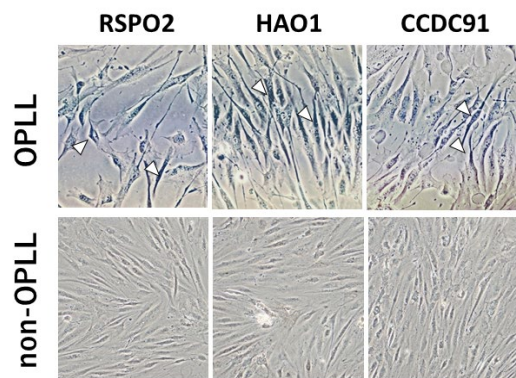


図 2. ヒト OPLL 培養細胞 (免疫染色)

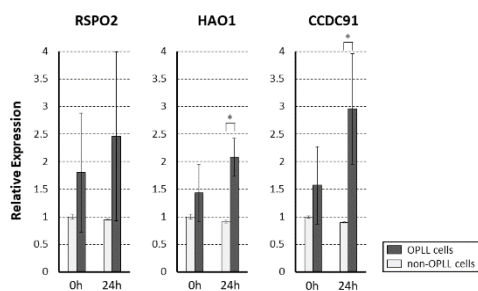


図 3. ヒト OPLL 培養細胞 (Real time RT-PCR)

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)。HAO1 は 3-6 週齢の若年 *ttw* マウスでのみ発現がみられ、以降の発現は確認されなかった。

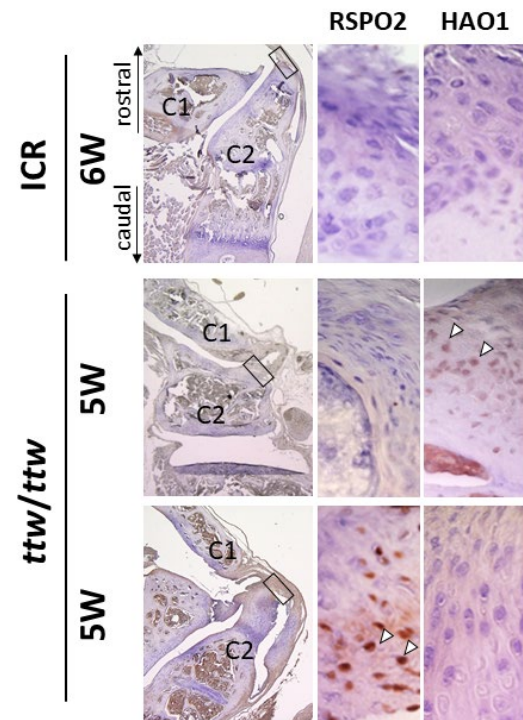


図 4. *ttw* マウス (免疫染色 1)

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)。

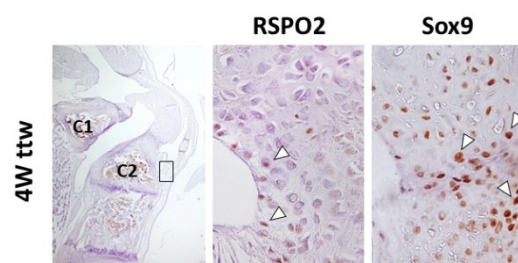


図 5. *ttw* マウス (免疫染色 2)

表 1. 結果のまとめ

Genes	OPLL samples			ttw/ttw mouse
	<i>in vivo</i> study	<i>in vitro</i> analysis		Immunohistochemical staining
	Immunohistochemical staining	Cultured cells	Cyclic tensile strain	
RSPO2	+ (fibrocartilage layer) †	+	↗	+
HAO1	-	+	↗	+
CCDC91	-	+	↗	-
STK38L	-	-	-	-
RSPH9	-	-	-	-

D. 考察

ヒト靭帯骨化標本間では、疾患関連候補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、骨化伸展の活動性の差が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/ β -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 (表 1)。

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

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakajima H, Watanabe S, Honjoh K, Okawa A, Matsumoto M, Matsumine A. expression analysis of susceptibility genes for ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in human OPLL-related tissues and a spinal hyperostotic mouse (ttw/ttw). Spine (Phila Pa 1976). 45 (2): E1460-E1468, 2020
2. Sugita D, Nakajima H, Kokubo Y, Takeura N, Yayama T, Matsumine A. Cyclic tensile strain facilitates ossification of the cervical posterior longitudinal ligament via increased Indian hedgehog signaling. Sci Rep. 2020 Apr 29;10(1):7231
3. Nakajima H, Honjoh K, Watanabe S, Kubota A, Matsumine A. Distribution and polarization of microglia and macrophages at injured sites and the lumbar enlargement after spinal cord injury. Neurosci Lett. 2020 Jun 9:135152.

2. 学会発表

1. Watanabe S, Nakajima H, Honjoh K, Takahashi A, Kubota A, Matsumine A. Expression analysis of susceptibility genes for ossification of the posterior longitudinal ligament. Cervical Spine Research Society Annual Meeting (2020.12) web 開催 【2nd Best Basic Science Award】
2. Nakajima H, Watanabe S, Honjoh K, Matsumine A. Risk factors and countermeasures for prevention of postoperative C5 palsy after cervical open-door laminoplasty. Cervical Spine Research Society Annual Meeting (2020.12) web 開催
3. 窪田 有咲、中嶋 秀明、渡邊司、本定 和也、松峯 昭彦. 脊髄損傷後の損傷部および腰膨大部における activated microglia および hematogenous macrophage の動態と極性. 第 35 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2020.10) web 開催
4. 中嶋秀明、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦片開き式頸椎椎弓形成術後の C5 麻痺の臨床的・画像的特徴と対策. 第 49 回日本脊椎脊髄病学会 (2020.9) hybrid 開催
5. 中嶋秀明、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦. 頸椎除圧手術における C5 麻痺発生の危険因子と予防策 - 椎弓形成術と前方除圧固定術での病態の類似性 - . 第 55 回日本脊髄障害医学会 (2020.9) hybrid 開催
6. 中嶋秀明、高橋藍、渡邊修司、本定和也、松峯昭彦. 非骨傷性頸髄損傷患者の体幹坐位バランス・MRI 画像所見からみた機能的予後予測と治療選択. 第 57 回日本リハビリテーション医学会 (2020.6) hybrid 開催