

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05681

研究課題名(和文) 靭帯骨化発生・進展の分子基盤の解明と治療法の研究開発

研究課題名(英文) An Investigation of molecular mechanisms of initiation and progression of ossification of the spinal ligaments

研究代表者

猪瀬 弘之 (INOSE, HIROYUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：30615711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は靭帯骨化症組織検体の網羅的な遺伝子発現解析により細胞周期遺伝子である cyclin dependent kinase 1 (以下Cdk1) が靭帯骨化の過程において発現が増加していることを見出した。これまで、Cdkの骨・軟骨代謝における役割は殆ど不明であった。そこで、Cdk1の骨・軟骨代謝における役割について分子生物学的アプローチを用いて解析した。軟骨代謝においては、Cdk1が骨格形成において必須であり、Cdk1が増殖と分化の分子スイッチであることを明らかにした。骨代謝においては、Cdk1を骨芽細胞において欠損すると骨芽細胞の増殖障害による骨量減少の表現型を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

靭帯骨化症については、現段階で薬物的治療が困難であり、巧緻機能障害や歩行障害が出現した場合には手術治療を行うしかない。しかしながら、手術には一定のリスクが存在する。そこで、我々は網羅的な遺伝子発現の解析において靭帯骨化の発生・進展に関与すると推測されるCdk1に注目した。そして、Cdk1による骨・軟骨代謝の調節機構を本研究により明らかにした。また、薬理的なCdk1の抑制により靭帯細胞の増殖を抑制することが出来ることを見出した。従って、本研究の結果は靭帯骨化症に対する薬理的な治療の基盤となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Through comprehensive analysis of gene expression in ligament samples from ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) patients, we identified that Cyclin dependent kinase 1 (Cdk1) was involved in the initiation and progression of OPLL. The role of Cdks in this process have not been extensively studied. In this study, we demonstrated that Cdk1 regulates skeletal development based on chondrocyte-specific loss-of-function experiments performed in a mouse model. Cdk1 functions as a molecular switch from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes. Furthermore, using an osteoblast-specific loss-of-function mouse model, we demonstrated that Cdk1 regulates osteoblast proliferation and differentiation.

研究分野：整形外科

キーワード：骨代謝 軟骨代謝 靭帯骨化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国の超高齢化に伴い、介護保険における特定疾病、すなわち後縦靭帯骨化症(以下 OPLL) 骨折を伴う骨粗鬆症、変形性関節症といった運動器疾患に罹患する患者が昨今急増している。近年の分子生物学の進歩は、骨芽細胞、破骨細胞及び軟骨細胞に関する研究を飛躍的に進展させ、骨・軟骨代謝調節の理解に多大な貢献をもたらした。特に破骨細胞分化に関しては、骨芽細胞の発現する RANKL、M-CSF が必須であること、シグナル伝達因子 TRAF や転写因子 NFATc1、NF- κ B などにより調節を受けることなど画期的な知見が相次いで報告されている。しかしながら、骨形成に関しては、転写因子 Runx2, Osterix が骨芽細胞の分化に必須であること、軟骨細胞の発生・分化及び機能に転写因子 Sox9 が必須であることが示されているが、Runx2 は未熟骨芽細胞から成熟骨芽細胞に移行する際にはむしろ抑制的に働くなど未だ不明な点が多い。

今回、我々は全く新たな視点から骨形成の分子機構を研究すべく、OPLL に注目した。OPLL とは、脊椎椎体の後縁を上下に連結し、脊柱を縦走する後縦靭帯が骨化し増大、進展した結果、脊柱管が狭窄し、脊髄や脊髄から分枝する神経根が圧迫されて知覚障害や運動障害等の神経障害を引き起こす疾患であり、日本人に多く、また、OPLL 患者において骨密度が高いことが報告されている (Sohn et al. *Calcif Tissue Int* 2012)。このような高骨量を示す遺伝子変異として、機能獲得型の LRP5 遺伝子の変異があるが、この遺伝子は興味深いことに機能喪失型変異を生じると骨粗鬆症・偽性神経膠腫症候群となる。しかし、OPLL の骨化発生及び進展の機序及び高骨量の機序については、未だ全く不明である。OPLL 進展のメカニズムについては、主として内軟骨性骨化によるものであることが組織学的に示されており、遺伝的要因、メカニカルストレス、外傷、内分泌的要因など様々な因子の関与が示唆されている。特に遺伝的要因については、Runx2、VDR、BMP2 などの SNP が報告されるなどこれまでに研究がなされてはいるが、実際にどのように遺伝的因子が骨化の発生及び進展に関与するのかといった分子生物学的な観点からの検討は殆どなされてこなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分子生物学的アプローチを利用して、靭帯骨化及びその進展機序を明らかにし、世界に先駆けて骨・軟骨代謝調節の新たな視点からの解明を目指す。さらに、未だ治療法が確立しない靭帯骨化症の発症メカニズムの解明によって、靭帯骨化症の治療薬の臨床応用に展開するための基盤研究とすることを目的とする。

3. 研究の方法

OPLL は内軟骨性骨化と膜性骨化の混在した病態であるが、主としては内軟骨性骨化によるものと考えられている。申請者らは OPLL 患者の靭帯骨化部位において、サイクリン依存型キナーゼ 1 (以下 Cdk1) の発現が増加していること、そして、これまで細胞周期に関与する酵素であると考えられてきた Cdk1 が骨芽細胞分化及び軟骨細胞の分化・増殖に重要であることを見出した。尚、これまでに骨・軟骨代謝における Cdk1 の意義については不明である。

(1) 骨・軟骨代謝における Cdk1 の生理学的意義の検討 (in vitro)

予備実験において軟骨特異的 Cdk1 欠損マウスは著明な低身長を示し、また、Cdk1 の発現調節により骨芽細胞分化に影響を与えた。従って、Cdk1 が骨芽細胞及び軟骨細胞の分化・増殖に対して重要な役割を果たしていることが推測される。そこで、in vitro にて骨芽細胞株及び軟骨細胞株である MC3T3-E1、ATDC5 細胞を各々用いて Cdk1 を過剰発現及びノックダウンを行い、

骨芽細胞・軟骨細胞の分化・増殖に対する影響について CCK8 を用いた細胞増殖アッセイや定量的 RT-PCR にて詳細に解析する。更に Cdk1 の下流のシグナリングについても western blotting にて解析する。

(2)骨・軟骨代謝における Cdk1 の生理学的意義の検討 (in vivo)

Cdk1 欠損マウスは胎生致死であるため、軟骨細胞・骨芽細胞・破骨細胞特異的 Cdk1 欠損マウスを作成し、その骨量を組織学的に詳細に検討し、Cdk1 の骨芽細胞・破骨細胞における in vivo での役割を明らかにする。まず、骨形態計測により骨構造に関するパラメータ、骨形成に関するパラメータ、骨吸収に関するパラメータを計測することにより Cdk1 の骨代謝動態に対する影響を評価する。そして、マイクロ CT を用いて骨の内部構造を観察し、海綿骨骨密度を調査する。軟骨細胞特異的 Cdk1 欠損マウスは出生後早期に死亡する為、胎児の段階における切片を作成して組織学的検討を行う。

(3)Cdk1 の骨折治癒過程における意義についての検討

骨折も OPLL と同様に内軟骨性骨化と膜性骨化の混在する病態である。そこで、軟骨及び骨芽細胞の分化、増殖に関与すると考えられる Cdk1 の骨折における重要性について検討するために、Cdk1 欠損マウスを用いて骨折モデルを作成し、X線、マイクロ CT を用いて Cdk1 の骨折における仮骨形成、骨癒合に対する影響について検討する。

(4)OPLL の予防に向けた薬理的な Cdk1 の抑制による OPLL の発症予防についての検討

OPLL のモデルマウスとされる ttw マウスに対して cdk1 阻害剤を投与し、Cdk1 の薬理的な抑制により OPLL の発生・進展が抑制されるかどうかについてマイクロ CT を用いて検討を行う。

以上の研究により、OPLL の骨化及びその進展機序を解明し、新規骨・軟骨代謝調節因子を同定し、更には OPLL 発症予防への基盤を構築することを目指す。

4 . 研究成果

(1)軟骨代謝における Cdk1 の生理学的意義

軟骨分化における細胞周期関連タンパクの発現を経時的に観察したところ、CDK1 タンパクは軟骨細胞の分化に伴い発現は低下した。また、RNA レベルにおいても、Cdk1 の発現は分化に伴って減少した。軟骨細胞株である ATDC5 細胞に対して、Cdk1 の発現をノックダウンしたところ細胞増殖能は低下し、Cdk1 を過剰発現したところ細胞増殖能は上昇した。また、ATDC5 細胞の Cdk1 の発現をノックダウンしたところ、軟骨細胞分化マーカー(1type collagen, 1type collagen, Sox9)の発現はノックダウン群で上昇した。

In vivo モデルとして解析を行った軟骨特異的 Cdk1 ノックアウトマウス (以下 cK0 マウス) は、メンデルの法則に従って出生するが、出生直後に呼吸困難と思われる原因で死亡した。また、cK0 マウスは体長および四肢の短縮を認めた。次に大腿骨の組織標本の解析を行った。HE 染色では、cK0 マウスにおいては柱状増殖軟骨細胞層が消失しており、またそれぞれの軟骨細胞のサイズは拡大し、細胞数および細胞密度は低下していた。マウス大腿骨における Cdk1 の発現を in situ hybridization (ISH 法) を用いて解析したところ、コントロールマウスでは円形軟骨増殖層で中等度、柱状増殖層で強く発現しており、肥大軟骨細胞層では発現を認めなかった。一方、cK0 マウスにおいては、軟骨増殖層で弱い発現を認めたのみであった。増殖中の細胞を示す BrdU 染色を行ったところ、cK0 マウスでは増殖細胞層における陽性細胞数が明らかに低下していた。軟骨細胞分化について、ISH 法を用いて検討したところ、1 () collagen 染色域は cK0 マウスで短縮していた。また Ihh は前肥大軟骨層で陽性となるが、cK0 マウスではその陽性域の幅が拡大しており、前肥大軟骨層の拡大が示唆された。

通常、ATDC5 細胞に PTHrP を投与すると、その細胞増殖能は促進されるが、Cdk1 の活性阻害

薬である R03306 を同時に投与することにより、PTHrP の働きは阻害され、増殖能に変化を認めなかった。また、軟骨細胞の分化については、PTHrP の投与によって Ihh の発現は抑制され、肥大軟骨への分化は抑制される。しかしながら、PTHrP と R03306 の同時投与によって ATDC5 細胞において Ihh の発現は変化を認めず、PTHrP の分化に対する作用は抑制された。Ex vivo モデルにおいて、マウス大腿骨の培養液に PTHrP を投与すると、野生型マウスではその軟骨増殖層における軟骨細胞増殖が促進され、BrdU 陽性細胞数が上昇するが、cKO マウスの下肢骨においては BrdU 陽性細胞数に変化を認めなかった。また、同様に培養した下肢関節軟骨においても、野生型マウスでは PTHrP 投与によりその軟骨分化は抑制されたが、cKO マウスにおいては分化は抑制されなかった。以上より、Cdk1 は PTHrP の下流に位置しており、軟骨細胞の増殖・分化に必須であることが判明した。

(2)骨代謝における Cdk1 の生理学的意義

マウス骨組織及び骨芽細胞において各 Cdks の発現を調べたところ、Cdk1 が多く発現していた。全身での Cdk1 ノックアウトは胎生致死となるため、骨芽細胞特異的 Cdk1 ノックアウトマウス（以下 CK0 マウス）を作製し解析を行った。CK0 マウスでは野生型マウスに比べて骨量、骨芽細胞数、骨形成速度、骨石灰化速度が有意に低下するものの破骨細胞数や破骨細胞面には両群で差を認めなかった。これらの結果から、Cdk1 が骨形成、骨量維持に必須であることが示唆された。さらに、マウスの大腿骨を用いた免疫染色からは CK0 マウスでは骨芽細胞の増殖能が低下しているが、アポトーシスに変化は認めないことが分かった。以上の結果から CK0 では骨形成は低下し、骨吸収には変化を認めず、結果として骨粗鬆症になることから、加齢性骨粗鬆症のモデルとなると考えられる。

次に、臨床にて骨形成促進薬として広く使用されている副甲状腺ホルモン（以下 PTH）と骨芽細胞の増殖との関連を調べるために、野生型マウスと CK0 マウスそれぞれに Vehicle と PTH を投与して解析を行うと、野生型マウスと同様に CK0 マウスにおいても PTH 投与によって骨芽細胞数、骨形成速度、骨量の全てが有意に増加する結果が得られた。このことから、PTH 投与による骨同化作用において Cdk1、すなわち骨芽細胞の増殖は必須ではないことが明らかとなった。

(3)Cdk1 の骨折治癒過程における意義

大腿骨骨折モデルを作製し、マイクロ CT を用いた実験では CK0 において骨折部の遷延癒合が認められたことから、Cdk1 が正常な骨折治癒過程に必須であることが示唆された。さらに、CK0 マウスの骨折後に PTH を投与すると遷延癒合率が改善したことから、PTH が低骨形成状態における骨折後の遷延癒合を改善させる可能性が示唆された。

(4)OPLL の予防に向けた薬理的な Cdk1 の抑制による OPLL の発症予防についての検討

Cdk1 の活性阻害薬である Ro-3306 を投与したところ、初代培養後縦靭帯細胞の増殖は有意に抑制された。そこで、ttw マウスに対して小分子化合物の投与による cdk1 活性の抑制実験を現在施行中であり、本研究課題終了後も引き続き検討していく。

以上の事柄より、本研究課題により、靭帯骨化症の発症・進展に関与すると考えられる細胞周期制御因子である Cdk1 の骨・軟骨代謝における役割を明らかとした（Saito and Inose et al, Sci Rep 2016, Takahashi and Inose et al, J Biol Chem 2018）。臨床的な観点からは、靭帯細胞の増殖が Cdk1 の活性阻害により抑制されることが確認されたため、本研究の成果は靭帯骨化症の治療薬の臨床応用に展開するための基盤となりうると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1)Takahashi A, Mulati M, Saito M, Numata H, Kobayashi Y, Ochi H, Sato S, Kaldis P, Okawa A, Inose H. Loss of cyclin-dependent kinase 1 impairs bone formation, but does not affect the bone-anabolic effects of parathyroid hormone. J Biol Chem. 2018 Dec 14;293(50):19387-19399. doi: 10.1074/jbc.RA118.004834.(査読あり)

(2)Inose H, Yamada T, Mulati M, Hirai T, Ushio S, Yoshii T, Kato T, Kawabata S, Okawa A. Bone Turnover Markers as a New Predicting Factor for Nonunion After Spinal Fusion Surgery. Spine (Phila Pa 1976). 2018 Jan 1;43(1):E29-E34. doi: 10.1097/BRS.0000000000001995. (査読あり)

(3)猪瀬 弘之, 斎藤 正徳, ミラディリ・ムラテ , 高橋 晃, 大川 淳. 【脊柱靱帯骨化症研究の進歩】基礎研究 靱帯骨化発生・進展に注目した骨・軟骨代謝調節機構の解明 整形外科. 2018.05; 69 (6): 525-531. (査読無し)

(4)Saito M, Mulati M, Talib SZ, Kaldis P, Takeda S, Okawa A, Inose H. The Indispensable Role of Cyclin-Dependent Kinase 1 in Skeletal Development. Sci Rep. 2016 Feb 10;6:20622. doi: 10.1038/srep20622.(査読あり)

〔学会発表〕(計 18 件)

- (1) 高橋 晃, 猪瀬 弘之, 大川 淳. 骨芽細胞増殖は骨形成には必須であるが、PTH 投与による骨同化作用においては必須でない. 第 36 回 日本骨代謝学会学術集会 2018.07.26 長崎
- (2) 高橋 晃, Mulati Mieradili, 猪瀬 弘之, 大川 淳. 骨芽細胞増殖は PTH 投与による骨同化作用において必須ではない. 第 38 回 日本骨形態計測学会 2018.06.21 大阪
- (3) 猪瀬 弘之, 高橋 晃, 大川 淳. 骨芽細胞増殖に注目した骨代謝調節機構の解明. 第 91 回 日本整形外科学会学術総会 2018.05.24 神戸
- (4) 高橋 晃, 猪瀬 弘之, 大川 淳. 細胞周期制御因子 Cdk1 は骨量維持および骨癒合に必須である. 第 32 回 日本整形外科学会基礎学術総会 2017.10.26 沖縄
- (5) Akira Takahashi, Hiroyuki Inose, Atsushi Okawa. Cdk1 is essential for bone formation and fracture repair. ASBMR 2017 Annual Meeting 2017.09.08 Denver, USA
- (6) 高橋 晃, 猪瀬 弘之, 大川 淳 . Cdk1 は骨量維持及び骨癒合に必須である. 第 35 回 日本骨代謝学会学術集会 2017.07.27 福岡
- (7) 猪瀬 弘之, 高橋 晃, Mieradili Mulati, 大川 淳. 細胞周期制御因子 Cbk1 は骨量維持及び骨癒合に必須である. 第 3 回 日本骨免疫学会 2017.06.27 石垣
- (8) 高橋 晃, 猪瀬 弘之, 大川 淳. CDK1 は骨芽細胞の増殖、骨量維持及び骨折治癒に必須である. 第 37 回 日本骨形態計測学会 2017.06.22 大阪
- (9) 齊藤 正徳, 猪瀬 弘之, 大川 淳. Cdk1 は骨格形成に必須である. 第 31 回 日本整形外科学会基礎学術集会 2016.10.13 福岡
- (10)猪瀬 弘之. 骨格形成において Cdk1 は必須である . 第 34 回 日本骨代謝学会学術集会

2016.07.20 大阪

- (11) 猪瀬 弘之, 高橋 晃, 大川 淳. Cdk1 は内軟骨性骨化において必須である. 第 36 回 日本骨形態計測学会 2016.06.23 新潟
- (12) 猪瀬 弘之, 齊藤 正徳, 大川 淳. 細胞周期制御因子による軟骨細胞増殖・分化の調節機構. 第 89 回日本整形外科学会学術総会 2016.05.12 横浜
- (13) 猪瀬 弘之, 齋藤 正徳, 山田 剛史, 平井 高志, 吉井 俊貴, 加藤 剛, 川端 茂徳, 大川 淳. 後縦靭帯骨化症の進展・発生に關与する遺伝子の検索. 第 45 回 日本脊椎脊髄病学会学術集会 2016.04.14 幕張 千葉
- (14) 猪瀬 弘之, 齋藤 正徳, 大川 淳. 細胞周期制御因子による骨格形成の調節機構. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 2015.12.01 神戸
- (15) 齊藤 正徳, 猪瀬 弘之, 川端 茂徳, 榎本 光裕, 加藤 剛, 吉井 俊貴, 山田 剛史, 請川 大, 早乙女 進一, 大川 淳. 脊髄靭帯骨化の発症機序の解明 OPLL の進展・発生に關与する遺伝子の検索. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 2015.10.22 富山
- (16) Hiroyuki Inose, Masanori Saito, Philipp Kaldis, Atsushi Okawa. The cell cycle regulation of chondrocyte development. ASBMR 2015 Annual Meeting 2015.10.09 Seattle
- (17) 齊藤 正徳, 猪瀬 弘之, 川端 茂徳, 加藤 剛, 吉井 俊貴, 山田 剛史, 角谷 智, 大川 淳. 後縦靭帯骨化症の進展・発生に關与する遺伝子の検索. 第 35 回日本骨形態計測学会 2015.06.04 倉敷
- (18) 猪瀬 弘之, 齊藤 正徳, 早乙女 進一, 大川 淳. 細胞周期制御因子による軟骨代謝の調節. 第 88 回日本整形外科学会学術総会 2015.05.21 神戸

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。