

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10928

研究課題名(和文)後縦靭帯骨化症における内軟骨性骨化に関する因子とメカニカルストレスの影響の検討

研究課題名(英文)The study of the effect of mechanical stress on the enchondral ossification signals in the ossification of the posterior longitudinal ligament

研究代表者

杉田 大輔 (Sugita, Daisuke)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：90596678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：後縦靭帯骨化症の骨化した靭帯における内軟骨骨化を促進する因子の遺伝子発現、タンパク発現と実際の組織での発現を検討した。内軟骨骨化を促進するインディアンヘッジホッグのシグナリングの遺伝子はメカニカルストレスによって発現を増加させており、そのシグナリングのタンパク発現量も増加していた。後縦靭帯の骨化巣の組織の免疫染色ではインディアンヘッジホッグシグナリングの骨化前線周囲での発現増強が見られた。これらの結果から後縦靭帯の骨化巣の進展において、骨化に先行して内軟骨骨化が促進されている可能性があり、インディアンヘッジホッグシグナリングは内軟骨骨化促進に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後縦靭帯骨化症(OPLL)の骨化巣の発生や進展機序は未だ不明である。治療法としては対症的な薬物療法か、進行例では神経症状を緩和するための外科的な治療法が存在するが、骨化巣が摘出できるのは限られた一部の症例であり、また、残存した骨化巣の進展による神経症状の再増悪も起こりえる。もしもOPLLの骨化巣進展の機序が解明できれば、骨化巣の進展を制御できる内科的な治療法の開発の一端を担える可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) is similar to enchondral ossification. Indian hedgehog (Ihh) and its related signaling are key factors in normal enchondral ossification. In the microarray analysis, Ihh and its related genes showed increased expression levels compared with controls after the 24-hour mechanical strain. In the immunoblotting analysis, Ihh, Sox9, Runx2, Gli2, Gli3, and smoothened (SMO) showed significantly increased their protein expression levels after mechanical strain. In addition, OPLL samples were strongly immunopositive for Ihh, Sox9, Runx2, and Gli3 in the ossification front of OPLL. The expression levels of Ihh and its related genes are upregulated significantly by cyclic tensile strain. These results suggest that cyclic tensile strain induces abnormal activation of Ihh and its related signaling, which might be important in the ossification process in OPLL.

研究分野：脊椎外科

キーワード：後縦靭帯骨化症 インディアンヘッジホッグ マイクロアレイ 内軟骨骨化 免疫組織化学的検討

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

後縦靭帯骨化症は骨化巣が緩徐に肥大化し、脊髄を圧迫することで重篤な神経症状を呈する疾患である。本症の治療は神経症状を緩和・改善させるための投薬、リハビリテーションや外科的治療が中心であるが、リハビリテーションや投薬は既存の症状の緩和であり、また、外科的除圧に関しては特に前方除圧術による直接的な骨化巣の摘出を行えない巨大な OPLL 症例に対しては後方からの除圧が行われるが骨化巣を残すという問題が残り、術後長期の経過で再度神経症状の増悪を呈する例も存在する。本研究の目的は骨化靭帯細胞の生物学的特性や骨化の分化誘導に關する因子の特徴を見出すことであり、これにより脊柱靭帯骨化の骨化巣の伸展機序の解明、骨化靭帯の細胞分化の制御という観点からみた、骨化制御療法の開発に有用な情報をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

後靭帯骨化症 (OPLL) は多因子疾患と考えられており、全身性素因として加齢や、糖尿病などの代謝異常、局所的素因としては脊椎の可動性と関連した mechanical strain、転写因子 (Runx2, BMP2, IGF1 など) の関与などが挙げられている。特に近年では、厚生労働省の研究班を中心とした遺伝子解析では OPLL と關与している可能性の高い 6 つのゲノム領域が指摘されるに至った (Nakajima M et al. Nat Genet, 2014)。しかし、それらの遺伝子の具体的な関与は未だに不明である。

病理組織学的にみると、脊柱靭帯骨化の骨化過程は内軟骨性骨化である (Miyasaka K, et al. AJNR Am J Neuroradiol 1983)。我々はこれまで、頸椎 OPLL における骨化前線部の軟骨細胞分化や骨芽細胞誘導に關する転写因子に注目してその発現の検討を行い、採取した骨化靭帯から遊走させて得た培養靭帯細胞では、Sox9、Runx2 といった転写因子の mRNA 発現量が上昇しており、また免疫染色による局在では主に増殖期軟骨細胞にて I 型、II 型コラーゲンや転写因子が強陽性となることを観察した (図 1)。また、Western Blotting 法を使ったタンパク発現量の半定量化では Indian Hedgehog (Ihh)、Parathyroid related peptide hormone (PTHrP)、Sox9 の発現量が非 OPLL 群と比較して上昇しているのが確認できた (図 2) (Sugita D, et al. Spine, 2013)。

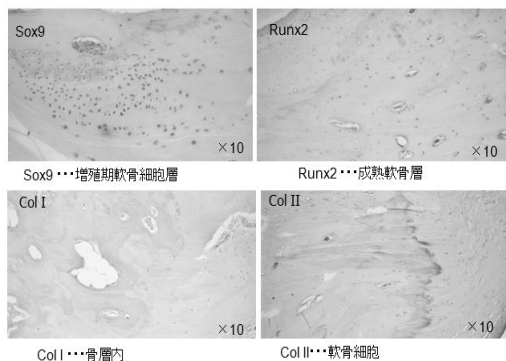


図 1、転写因子の免疫組織化学的検討では転写因子の発現量は発現に局在が見られた

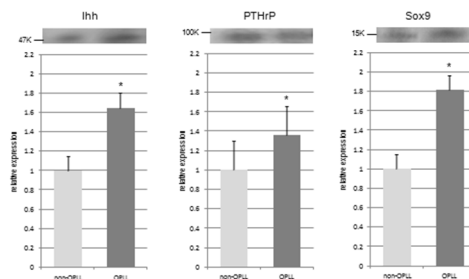


図 2、Western Blotting 法では Ihh、PTHrP、Sox9 のタンパク発現量は非 OPLL 群よりも高値であった

OPLL の骨化巣伸展は内軟骨骨化と類似した形態をとることは上で述べたが、通常四肢長管骨の成長過程においては、骨化に先立つ軟骨細胞の分化、肥大が重要である。OPLL においては骨化前線、特に石灰化前線の近傍には多数の軟骨細胞が存在し、成長因子や転写因子を発現することから、軟骨細胞の誘導、肥大化が脊柱靭帯骨化の骨化形成においても重要な過程であることが示唆される。これらを踏まえて、四肢の内軟骨骨化において軟骨細胞の成長、肥大に關与していると報告されているインディアンヘッジホッグ (Indian hedgehog: Ihh) とそのシグナリングが、OPLL における内軟骨骨化進展においても關与している可能性を考えた。さらに人体では頸椎の後縦靭帯には頸椎の前後屈による長軸歩行的伸展刺激が加わっており、それらの伸展刺激 (メカニカルストレス) が Ihh とそのシグナリングに影響を及ぼしているのかどうかということを解明することが OPLL の骨化巣進展機序を解明する上で重要な手がかりになると考えた。

3. 研究の方法

頸椎後縦靭帯骨化症の患者 (後縦靭帯骨化: n=10, 黄色靭帯骨化: n=10)、非靭帯骨化患者 (頸椎椎間板ヘルニア、頸椎症性脊髄症: n=10) の手術時に採取した靭帯組織を用いて実験を行った。手術で得られた骨化巣を含んだ靭帯組織の半分は脱灰後に薄切標本 (4μm) を作製し、組織学的検討に用いた。もう一方の組織からは無菌的に骨化巣の骨組織を除去したのち、細断した靭帯細胞から FBS 添加 DMEM 培地下に Explant 法にて細胞を遊走させた (Alex P et al, Biochemical J 2003)。得られた細胞は confluent になったところでトリプシンを用いてシャーレからはがして別の複数のシャーレへ移すという継代培養を 5 継代行って実験に用いた。

培養で得られた後縦靭帯骨化症由来の培養細胞を Flex I flexible bottomed plate (ストレス処置群)、Flex II flexible control plate (コントロール群) に播種し、メカニカルストレスを加えた。ストレス条件は Flexercell strain unit (FX3000) により、1-10 秒間伸展 (最大 20% 牽引)、1-10 秒間の弛緩を継続的に加える。伸展の数値 (20%) については脊椎後縦靭帯にかかる伸展力が約 26% であるという点 (White AA IIIrd, Panjabi MM et al. Clinical Biomechanics of the Spine, 1990)、またこれまでのメカニカルストレスを用いた報告 (Iwasa T et al. Calcif Tissue Int, 2006、Cai HX et al. Spine, 2012) から設定した。24 時間のメカニカルストレスを加えた培養細胞の遺伝子発現量の変化をマイクロアレイを用いて解析、検討を行った。また、遺伝子発現のみでなく、培養細胞におけるタンパク発現量の変化をウェスタンブロッティング法を用いて評価した。

4 . 研究成果

インディアンヘッジホッグの遺伝子発現量はメカニカルストレスの負荷によって上昇しているのが確認でき、また、パスウェイ解析でもインディアンヘッジを含んだシグナリングでの複数の遺伝子の発現量がメカニカルストレスの負荷によって上昇していることが確認できた (表 1)。

| Gene | Accession number | OPLL | | | Non-OPLL | |
|---|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | Ratio* (case 1) | Ratio* (case 2) | Ratio* (case 3) | Ratio* (case 1) | Ratio* (case 2) |
| Indian hedgehog (Ihh) | NM_002181 | 2.68 | 1.72 | 2.05 | 1.05 | 0.90 |
| Sox9 | NM_00346 | 10.81 | 1.18 | 1.28 | 1.96 | 1.35 |
| Runt-related gene2 (Runx2) | NM_004348 | 3.98 | 1.54 | 1.85 | 1.13 | 1.05 |
| Collagen type 11A2 (COL11A2) | NM_080680 | 3.91 | 1.20 | 1.75 | 0.62 | 0.75 |
| Collagen type 6a1 (COL6A1) | NM_001848 | 1.78 | 1.15 | 1.29 | 1.03 | 0.90 |
| Parathyroid hormone (PTH) | NM_000315 | 1.02 | 1.77 | 1.21 | 0.44 | 0.52 |
| Smoothed (SMO) | NM_005631 | 0.86 | 1.08 | 1.29 | 0.76 | 0.81 |
| Patched 1 (PTCH1) | NM_001083602 | 0.74 | 1.38 | 1.75 | 0.63 | 0.77 |
| Patched 2 (PTCH2) | NM_003738 | 1.16 | 0.81 | 1.31 | 0.73 | 0.90 |
| Sox5 | NM_152989 | 0.89 | 1.42 | 1.36 | 0.91 | 0.85 |
| Sox6 | NM_017508 | 10.12 | 2.52 | 3.49 | 0.89 | 0.80 |
| Gli2 | NM_005270 | 1.08 | 0.62 | 0.83 | 0.57 | 0.71 |
| Gli3 | NM_00168 | 1.20 | 1.48 | 2.24 | 0.85 | 0.80 |
| Vascular endothelial growth factor (VEGF) | NM_001025366 | 1.95 | 2.97 | 1.55 | 0.99 | 1.10 |
| Smad3 | NM_005902 | 1.06 | 0.67 | 0.51 | 0.38 | 0.49 |
| Bone morphogenetic protein2 (BMP2) | NM_001200 | 2.00 | 0.59 | 1.17 | 0.55 | 0.65 |
| Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) | NM_001202 | 0.75 | 1.31 | 0.94 | 0.21 | 0.35 |
| Fibroblast growth factor receptor3 (FGFR3) | NM_00142 | 1.22 | 1.15 | 1.51 | 0.29 | 0.43 |
| Signal transducers and activator of transcription (STAT1) | NM_139266 | 0.62 | 1.18 | 1.08 | 0.87 | 0.82 |
| Serine /threonine protein kinase 36 (STK36) | NM_015690 | 1.36 | 1.26 | 1.74 | 0.71 | 0.93 |

表 1 : メカニカルストレス負荷によって Ihh や、そのシグナリングである Sox9、Runx2、SMO、PTCH1、PTCH2 などの遺伝子発現が上昇していることが確認できた

Ihh とそのシグナリングの遺伝子発現が培養細胞内において上昇していることが確認できたため、次いで実際のタンパク発現量の変化を評価するためにウェスタンブロッティング法で検討したところ、Ihh、Sox9、Runx2、GLI2、GLI3、SMO のタンパク発現量は 24 時間のメカニカルストレスをかけることでいずれも上昇が見られた (図 3)。

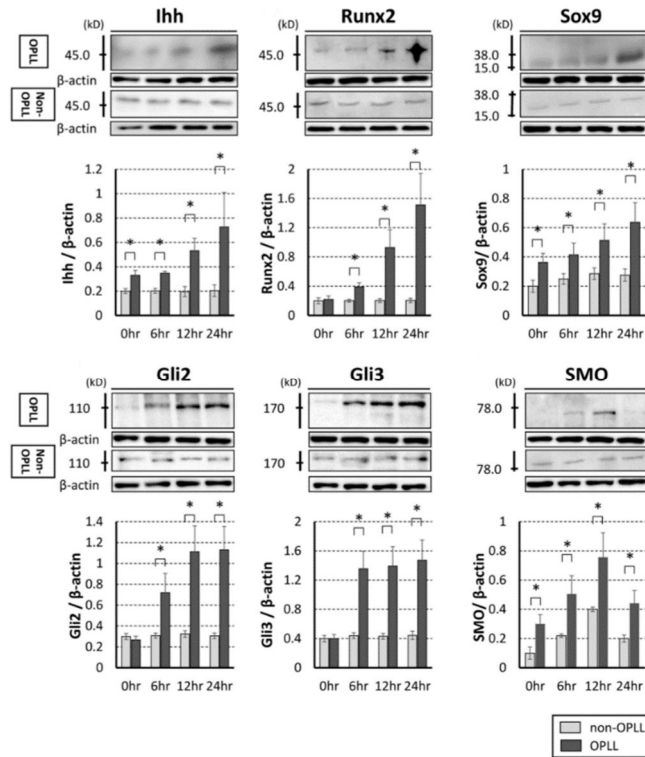


図 3: 培養細胞を用いてウェスタンブロッティング法で Ihh、Runx2、Sox9、Gli2、Gli3、SMO のタンパク発現量を検討したところ、経時的な増加を認めた。

骨化巣を含んだ後縦靭帯組織から作成した、パラフィン切片を用いた免疫組織化学的検討では、骨化巣近傍にはインディアンヘッジホッグや Gli2、Gli3 といったインディアンヘッジホッグの受容体、そして Sox 9 や Runx 2、PTHrP といった骨化に関わる因子が強く発現していることが確認できた (図 4)。

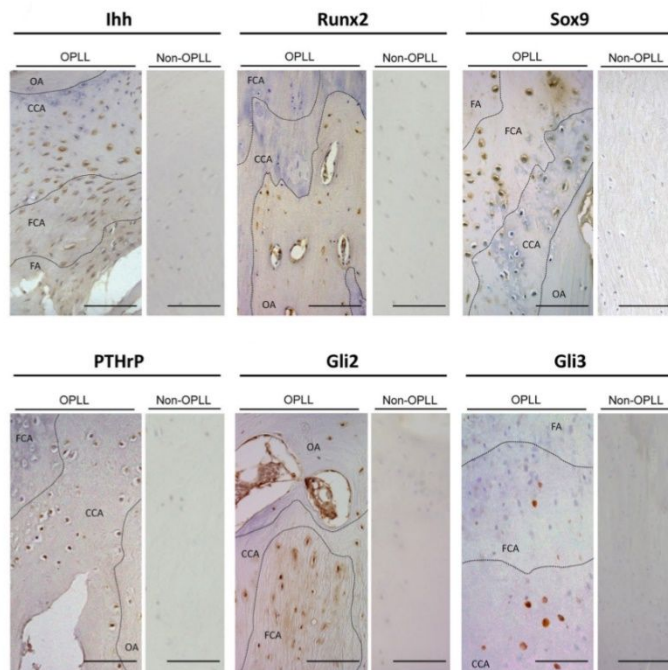


図 4: 骨化巣を含んだ後縦靭帯組織の免疫組織化学的検討
Ihh、Sox9、Gli2 は骨化前線の前肥大軟骨細胞層で強く発現しており、Runx2、PTHrP、Gli3 は肥大軟骨細胞層で強く発現していることが確認できた。

これらを踏まえると、メカニカルストレスが遺伝子レベルで骨化巣周囲のインディアンヘッジホッグとそのシグナリングの発現量を増加させ、内軟骨骨化を促進する可能性が考えられた。肥大化した軟骨細胞層が骨化していくことで OPLL の骨化巣が進展していく可能性が示唆された。これらの結果をまとめて海外も含めて情報発信すべく投稿を行い、先頃、Scientific Report に "Cyclic tensile strain facilitates ossification of the cervical posterior longitudinal ligament via increased Indian hedgehog signaling" というタイトルで受理された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 中嶋 秀明 (Nakajima Hideaki) (10397276) | 福井大学・学術研究院医学系部門・講師 (13401) | |
| 研究分担者 | 平井 貴之 (Hirai Takayuki) (30569132) | 福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員 (13401) | |