

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03775

研究課題名（和文）脊柱靭帯骨化発生・進展の分子機序解明を目指した統合的研究

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

研究代表者

大川 淳 (Okawa, Atsushi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30251507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：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、近年患者数が増加している脊柱靭帯骨化症に注目した。脊柱靭帯の骨化発生及び伸展の機序については未だ不明な点が多い。間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化の過程において、変動する遺伝子として、Foxf2を見出した。そして、間葉系幹細胞特異的Foxf2ノックアウトマウスを作成し、間葉系幹細胞特異的Foxf2ノックアウトマウスは骨芽細胞の増加によって高骨量を示すことを明らかとした。また、後縦靭帯骨化症マウスモデルであるttwマウスの骨化部位において軟骨細胞の増殖が生じている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

近年、脊柱靭帯骨化発生のメカニズムとして、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が注目されている。我々は間葉系幹細胞において発現するFoxf2が骨芽細胞分化を抑制することを明らかとしたが、靭帯組織における間葉系幹細胞において、Foxf2の発現を調節することによって骨芽細胞への分化を阻害することができれば、骨化発生・進展の抑制になりうると思われた。その一方で、我々が注目した細胞周期制御因子の経口的な薬剤投与による靭帯骨化症発症の抑制については、現在のプロトコルでは困難であり、プロトコルの修正など今後の更なる検討が必要であると思われた。

研究成果の概要（英文）：In order to study the molecular mechanisms of bone formation from a new perspective, we focused our attention on ossification of spinal ligament, a disease that has been increasing in number of patients in recent years. We found Foxf2 as a gene whose expression is increased during differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts. We generated mesenchymal stem cell-specific Foxf2 knockout mice using Prx1 promoter and found that mesenchymal stem cell-specific Foxf2 knockout mice exhibit high bone mass due to increased osteoblasts. In addition, we found that chondrocyte proliferation occurred at the site of ossification in ttw mice, a mouse model of posterior longitudinal ligament ossification.

研究分野：整形外科

キーワード：骨代謝 軟骨代謝

### 1. 研究開始当初の背景

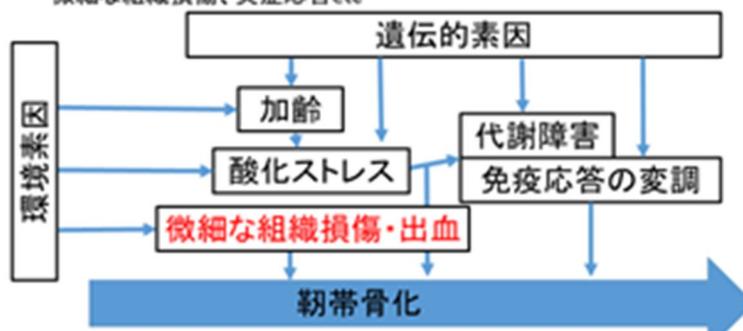
我が国の超高齢化に伴い、介護保険における特定疾病、すなわち後縦靭帯骨化症、骨折を伴う骨粗鬆症、変形性関節症といった運動器疾患に罹患する患者が昨今急増している。近年の分子生物学の進歩は、骨芽細胞、破骨細胞及び軟骨細胞に関する研究を飛躍的に進展させ、骨・軟骨代謝調節の理解に多大な貢献をもたらした。しかしながら、骨吸収に関しては多くの薬剤が実臨床で使用されるなど研究が進んでいることに比較し、骨形成に関しては未だ不明な点が多い。

これまで申請者らは主として骨リモデリング及び異所性骨化のメカニズムについて注目して検討を行ってきた (Yuasa and Okawa et al, Plos One 2018, Hashimoto and Okawa et al, PNAS 2018, Suzuki and Okawa et al, PNAS 2016, Yuasa and Okawa et al, JBMR 2016, Fukuda and Okawa et al, Nature 2013, Fujita and Okawa et al, Nat Med 2012 など)。今回、申請者らは全く新たな視点から骨リモデリングの分子機構を研究すべく、近年患者数が増加している脊柱靭帯骨化症に注目した。脊柱靭帯骨化症 (以下 OSL) とは、脊椎椎体の周囲を上下に連結し脊柱を縦走する後縦靭帯、前縦靭帯、黄色靭帯が骨化し増大、進展した結果、脊柱管、咽頭腔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や嚥下障害を引き起こす疾患である。しかし、脊柱靭帯の骨化発生及び進展の機序については、未だ不明な点が多い。

OSL 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 (右図)。

### 加齢に伴う脊椎靭帯骨化症

- ・加齢、各種代謝障害、遺伝的素因 (石灰化阻害因子欠損など)
- ・微細な組織損傷、炎症応答 etc



### 2. 研究の目的

本研究では OSL の骨化発生・進展のメカニズムについて線溶系因子の関与を検討し、その分子機序の解明を目的とする。さらに、OSL 発生・進展の予防に向けた治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

### 3. 研究の方法

- (1) in vivo における外傷性靭帯骨化マウスモデルを樹立し、その表現型について解析する。
- (2) 近年、OSL 発生のメカニズムとして、間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化が注目されている。そこで、間葉系幹細胞から骨芽細胞に分化する過程における遺伝子発現を網羅的に解析し、発現が顕著に変動した遺伝子について、in vitro、in vivo における表現型を検討する。
- (3) 我々が以前から検討している、細胞周期制御因子について、OSL 発生・進展の予防に向けた治療薬としての候補となりうるかを画像的に検討する。

### 4. 研究成果

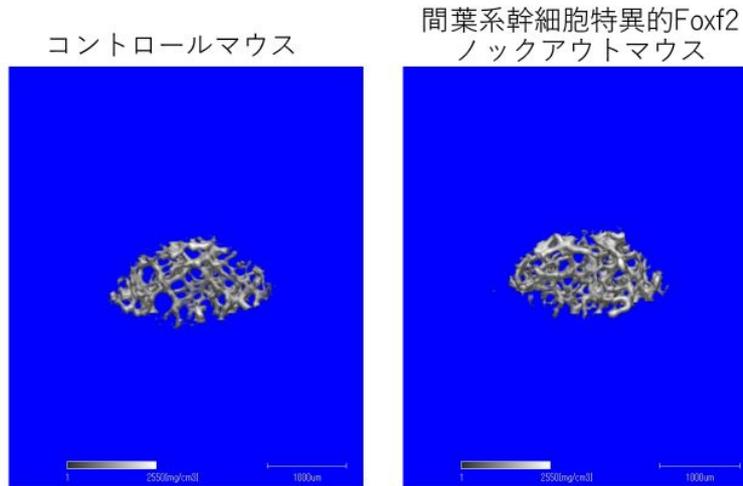
(1) 野生型マウスの脊柱靭帯に切開を置いたのち、線溶系因子のアンチセンスオリゴを投与することによって靭帯骨化を生じることを見出した。従って、線溶系因子が脊柱靭帯骨化の成因として、重要な役割を果たしていることが推測された。(これ以後の詳細な検討については、未だ論文化がなされていないため、詳細は伏せる)

(2) 間葉系幹細胞である ST2 細胞に対して、BMP2 を投与して骨芽細胞へ分化させ、その過程において変動する遺伝子について RNA シークエンスで網羅的に検討した。その結果、BMP2 投与によって Foxf2 の発現が増加することを見出した。

(3) Foxf2 を ST2 細胞において過剰発現すると、骨芽細胞への分化は抑制され、逆に SiRNA を用いてノックダウンすると骨芽細胞への分化は促進された。

(4) 間葉系幹細胞において発現する Prx1 プロモーターを用いて、Foxf2 の間葉系幹細胞特異的

ノックアウトマウスを作成した。そして、12週齢において、骨量を調査すると、骨密度は間葉系幹細胞特異的 Foxf2 ノックアウトマウスにおいて、有意に骨量が増加していた。また、骨形態計測を用



図：間葉系幹細胞特異的Foxf2ノックアウトマウスは高骨量を呈する

いて検討したところ、破骨細胞のパラメーターにはコントロールマウスと比較して有意差を認めないものの、骨芽細胞が有意に増加していた。

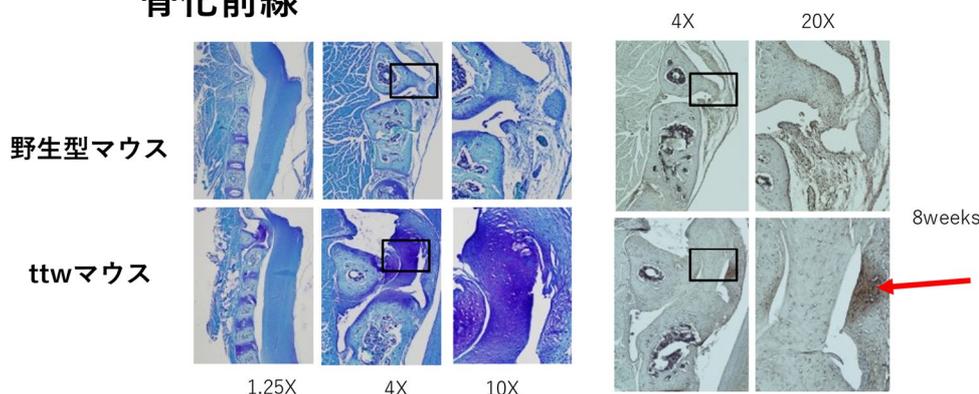
(5) 間葉系幹細胞特異的 Foxf2 ノックアウトマウスとコントロールマウスの血清を採取し、骨代謝マーカーについて検討した。その結果、骨形成マーカーであるⅠ型プロコラーゲン-N-プロペプチドの値は有意に間葉系幹細胞特異的 Foxf2 ノックアウトマウスにおいて高値であった。その一方で、骨吸収を反映するⅠ型コラーゲン架橋C末端テロペプチドの量については、間葉系幹細胞特異的 Foxf2 ノックアウトマウスとコントロールマウスとの間で有意な差を認めなかった。

(6) 間葉系幹細胞特異的 Foxf2 ノックアウトマウスとコントロールマウスの頭蓋骨より RNA を抽出し、RNA シークエンスを行い、Foxf2 の欠損によって変動する遺伝子の発現について検討した。すると、Wnt pathway に関連する遺伝子の発現が変動することが明らかとなった。特に間葉系幹細胞特異的 Foxf2 ノックアウトマウスの頭蓋骨では、Wnt2b の発現が有意に増加していた。そして、Western blotting において、間葉系幹細胞特異的 Foxf2 ノックアウトマウスの骨組織内では Wnt2b の発現が増加し、b-catenin の発現が増加していた。

(7) Foxf2 を過剰発現すると骨芽細胞の分化は抑制されるが、その際に Wnt2b を共発現することによって骨芽細胞分化の抑制は回復される。以上の事柄から、Foxf2 は間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化を Wnt2b の発現調節を介して調節していることが明らかとなった。以上より、靭帯組織における間葉系幹細胞において、Foxf2 の発現を調節することによってその骨芽細胞への分化を抑制することができれば、骨化発生・進展の抑制になりうると考えられた。

(8) 我々はこれまでに靭帯骨化の機序について、靭帯組織における軟骨細胞の増殖とその後の骨芽細胞への分化によるものが含まれると推測している。そこで、靭帯骨化マウスモデルである

### 骨化前線



Ttwマウスの骨化前線においては軟骨細胞を認めた  
BrdU染色により、骨化前線において、軟骨細胞の増殖を認めた

ttw マウスの靭帯組織において、軟骨細胞の増殖が認められるのかどうか、BrdU 染色を用いて検討した。その結果、軟骨細胞の増殖を骨化前線で認めた（下図）。

（9）初代培養ヒト黄色靭帯細胞に対して、細胞周期制御因子である Cdk1 の阻害薬（RO-3306）を投与すると、その増殖は有意に抑制された。

（10）ttw マウスに対して Cdk1/2/9 の経口阻害薬である AZD5438（50mg/kg/day）を経口投与して、骨化に対する影響を調査した。その結果、4 週から高リン負荷を与えるマウスモデルでは、明らかな靭帯骨化の抑制効果は認めなかった。従って、プロトコールの修正など今後の更なる検討が必要であると考えられた。

（11）骨形成において発現が変動する長鎖ノンコーディング RNA として、Crnde を同定した。ゲノム編集技術を用いて Crnde ノックアウトマウス作成し、骨芽細胞増殖の低下により、その骨量が減少していることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi Yutaka, Tanaka Tomoyuki, Mulati Mieradilli, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Kaldis Philipp, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi, Inose Hiroyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Cyclin-Dependent Kinase 1 Is Essential for Muscle Regeneration and Overload Muscle Fiber Hypertrophy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.564581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mulati Mieradilli, Kobayashi Yutaka, Takahashi Akira, Numata Hoashi, Saito Masanori, Hiraoka Yuichi, Ochi Hiroki, Sato Shingo, Ezura Yoichi, Yuasa Masato, Hirai Takashi, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi, Inose Hiroyuki	4. 巻 130
2. 論文標題 The long noncoding RNA Crnde regulates osteoblast proliferation through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115076 ~ 115076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115076	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Takahashi A, Kobayashi Y, Saito M, Xiaolong S, Jingquan C, Ito Y, Kato T, Ochi H, Sato S, Yoshii T, Okawa A, Carlsson P, Inose H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Foxf2 represses bone formation via Wnt2b/ $\beta$ -catenin signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Exp Mol Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s12276-022-00779-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 猪瀬 弘之
2. 発表標題 長鎖ノンコーディングRNAによる骨形成の調節機構
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 寛来, 小林 裕, 佐藤 信吾, 吉井 俊貴, 大川 淳, 猪瀬 弘之.
2. 発表標題 Foxf2はWnt経路を介して骨芽細胞分化を調節する.
3. 学会等名 第36回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoyuki Tanaka, H inose, A okawa
2. 発表標題 Foxf2 represses bone formation via canonical Wnt signaling
3. 学会等名 ESA-SRB-ANZBMS 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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	猪瀬 弘之  (Inose Hiroyuki)  (30615711)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・寄附講座准教授   (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------