

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18494

研究課題名（和文）ヒト脊柱靭帯骨化組織および遺伝性骨軟骨異常マウスを用いた疾患関連遺伝子発現解析

研究課題名（英文）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.

研究代表者

渡邊 修司（Watanabe, Shuji）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教

研究者番号：00596679

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は主に手術時に採取したヒト後縦靭帯骨化(OPLL)・黄色靭帯骨化(OYL)標本および脊柱靭帯骨化モデル動物であるttwマウス頸椎を用いて、骨化部周囲における骨化に関連すると考えられている遺伝子、蛋白について免疫組織学的に評価を行った。これにより、骨化初期にはHA01、RSP02と呼ばれる遺伝子の発現が骨化部周囲で発現することがわかった。動物モデルを使用することで経時的な評価を行うことが可能であり、これにより遺伝子が経時的に変化していくことも結果で示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊柱靭帯骨化症はいまだに原因不明の疾患とされ、明確な治療法が確立されておらず、手術により神経麻痺の進行予防を行う他に有効な治療は報告されていない。本研究により、靭帯骨化症の初期段階に關与する遺伝子が示唆され、これらがさらに詳細に研究されることで、将来的には靭帯骨化症の治療につながる可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we mainly used human ossification of posterior longitudinal ligament(OPLL) and ossification of yellow ligament(OYL) specimens collected at surgery and the cervical spine of ttw mice, an animal model of spinal ligament ossification, to immunohistologically evaluate genes and proteins that are thought to be related to ossification around the ossified area. This revealed that genes called HA01 and RSP02 are expressed around the ossified area in the early stages of ossification. The use of an animal model allowed for evaluation over time, and this also showed in the results that the genes change over time.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：靭帯骨化症 ttwマウス 疾患関連候補遺伝子

1. 研究開始当初の背景

脊柱靭帯骨化症（後縦靭帯骨化症および黄色靭帯骨化症）は難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）に該当する疾患であり、特に日本をはじめとするアジア圏での患者数は多く、脊髄症状を発症・進行した場合には、現時点では外科的治療以外に症状の進行を抑制する手段はない。そのため、靭帯骨化の病態解明・外科的手段以外の治療法の確立が強く求められている。我々はこれまで、靭帯骨化の発生や増大に関わる因子について、手術時に採取したヒト後縦靭帯骨化標本・黄色靭帯骨化標本を用いた研究報告をしてきた。組織病理学的には、線維組織、軟骨組織、骨組織が連続しており、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。しかしながら、靭帯骨化巣の増大や形態の差異に重要とされる因子、骨化移行部の軟骨細胞や骨芽細胞の分化誘導など、いまだ多くの不明な点が存在している。難治性疾患等政策研究事業（難治性疾患政策研究事業）脊柱靭帯骨化症に関する調査研究班における多施設研究にて、後縦靭帯骨化に対する GWAS によって、疾患関連候補遺伝子 (STK38L, RSP02, HA01, CCDC91, RSPH9) が報告された (A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. Nat Genet. 2014 Sep;46(9):1012-6)。脊柱靭帯骨化症発症・伸展のメカニズム・病態解析を行うためには、これらの疾患関連候補遺伝子のいずれの因子がどの時期にどのような機能を果たしているのかを解析することが必須と考えた。

2. 研究の目的

ヒト後縦靭帯骨化標本を用いて疾患関連候補遺伝子の免疫組化学的検討を行ったところ、その発現には個体差があり、再現性に乏しいという問題が生じた。この原因として、今回調べる疾患関連候補遺伝子が骨化初期に関与する因子である可能性があり、骨化進展の活動性の差が発現に影響していると考えられた。ヒト脊柱靭帯骨化組織に関しては年齢や骨化形態などの患者背景と共にさらに標本数を重ねた検討を行うことで骨化進展に関わる分子の同定やその役割解析が期待される。一方で、Enpp1 遺伝子の自然変異マウスであり、OPLL を自然発症することで知られるモデルである *ttw* マウス頸椎を用いた検討も行うことで候補遺伝子の経時的な発現解析を行うことが出来ると期待された。

3. 研究の方法

(1) ヒト後縦靭帯骨化標本・黄色靭帯骨化標本における疾患関連候補遺伝子発現解析

手術時に採取した脊柱靭帯骨化標本を用いて免疫染色を行う。各因子の発現・局在について患者背景（年齢・骨化形態・神経症状など）を考慮して検討を行う。採取した脊柱靭帯骨化標本をパラフィン包埋し 5 μ m の薄切標本を作成する。脱パラフィン、抗原賦活化(マイクロウェーブ法)、プロテインブロッキングを行って一次抗体と 4 で一晩反応後、二次抗体と 45 分間反応させたのちに DAB 法を用いて発色させる。染色した標本を光学顕微鏡にて観察し、陽性細胞の局在、発現量を評価する。患者背景（年齢・骨化形態・神経症状など）を考慮して検討を行う。

(2) mechanical stress 後の疾患関連候補遺伝子発現変化の検討

通常の診療、手術では OPLL の標本を摘出することは困難であるため、靭帯骨化患者の黄色靭帯を用いた培養細胞の検討が行われている。靭帯骨化患者の後縦靭帯と黄色靭帯では遺伝的背景がほぼ一致していると報告もある。採取した OPLL 患者の黄色靭帯を 10%FBS 添加 DMEM 培地で培養を行い、靭帯骨化培養細胞を作成する。初代培養細胞に対して、mechanical stress をかけるデバイスである flexercell strain unit を用いた 24 時間牽引ストレス(1Hz, 20% elongation)前後での各疾患感受性候補遺伝子発現解析を行い、正常後縦靭帯組織由来細胞との発現比較を行う。DAB 法を用いた免疫染色および同細胞を用いて、real time PCR 法による遺伝子発現の定性化・定量化を行う。

(3)ttw マウス標本における経時的な疾患関連候補遺伝子発現の変化

石灰化・骨化が生じる以前の 3 週齢から経時的に行う(～20 週齢程度)。経時的にマウスを還流固定し頸椎を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて 24 時間固定後、脱灰液による脱石灰後に頸椎部の sagittal 5 μ m 薄切標本を作成する。これを上記のごとく免疫染色し、経時的な遺伝子発現変化、発現の局在について評価する。経時的に行うことでヒト標本では困難な骨化初期から骨化が完成する時期にかけての細かな遺伝子変化が観察可能となる可能性が高い。

(4)mechanical stress 後の骨化関連因子の変化についての検討

前年度に行った OPLL 患者の黄色靭帯培養細胞を用いて、疾患関連候補遺伝子のみでなく、骨芽細胞への分化に関わる因子(Ihh、Runx2 など)や軟骨細胞への分化に関わる因子(Sox9、TGF β 1 など)について、Western blotting を用いて評価を行う。対象として、非 OPLL 患者から採取した黄色靭帯培養細胞、OPLL 患者の黄色靭帯培養細胞、及び初代培養細胞に 24 時間 mechanical stress をかけた(上記参照)培養細胞を用いる。

4 . 研究成果

ヒト靭帯骨化標本では、線維軟骨細胞層において RSPO2 の発現が顕著にみられ、その他の遺伝子の発現は非特異的なものであった。また RSPO2 の発現がみられる部位では Sox9、CD90 陽性細胞の発現がみられ、Runx2 陽性細胞はみられなかった。この結果から、RSPO2 が発現する部位では骨芽細胞の分化が促進しているという結果が得られた。骨化初期の評価を行うために ttw マウスを用いたところ、主に若年の 3～6 週齢のマウス頸椎の後縦靭帯付着部において 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く、RSPO2 よりも HAO1 がより早期に発現している結果であった。これにより疾患関連候補遺伝子が骨化初期の軟骨細胞分化に主に関与する可能性が示唆された。

この結果を国内外学会にて発表報告し、2020 年に英文雑誌 SPINE に投稿、accept された。

当初予定されていた研究内容についてはほぼ終了したため、追加実験として、2021 年度はヒト黄色靭帯培養細胞を用いた研究を行った。内容としては手術で採取されたヒト黄色靭帯の培養細胞より分泌されるエクソソームの解析である。エクソソームは大部分の真核細胞において、エンドソーム区画で形成される膜結合性の細胞外小胞であり、種々の蛋白や遺伝子を含み、細胞間伝達の役割を果たすことわかっている。近年培養細胞を用いたエクソソーム解析の報告が多数あり、脊椎関連の研究の報告も数編あるが、靭帯骨化症のエクソソーム解析についての報告はまだない。preliminary に靭帯骨化症症例と対象群での比較を開

始しており、エクソソーム発現は靭帯骨化症症例において絶対数が多い結果が得られている。今後どのようなエクソソームが上昇しているか解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima H, Watanabe S, Honjoh K, Okawa A, Matsumoto M, Matsumine A	4. 巻 45
2. 論文標題 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).	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 SPINE (Phila Pa 1976)	6. 最初と最後の頁 1460-1468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000003648	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 渡邊修司、中嶋秀明、本定和也、杉田大輔、松峯昭彦
2. 発表標題 脊柱靭帯骨化症における疾患関連候補遺伝子の発現解析
3. 学会等名 第49回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊修司、中嶋秀明、本定和也、高橋藍、松峯昭彦
2. 発表標題 脊柱靭帯骨化症における骨化関連遺伝子の免疫組織学的評価
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shuji Watanabe, Hideaki Nakajima, Kazuya Honjoh, Ai Takahashi, Arisa Kubota, Akihiko Matsumine
2. 発表標題 Expression analysis of susceptibility genes for ossification of the posterior longitudinal ligament
3. 学会等名 48th CSRS Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊修司、中嶋秀明、本定和也、杉田大輔、松峯昭彦
2. 発表標題 twマウス頸椎を用いた経時的な疾患関連候補遺伝子発現解析
3. 学会等名 第48回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------