

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590245

研究課題名 (和文) 脊柱靭帯骨化症の薬物治療戦略を構築するための分子標的の探索

研究課題名 (英文) Exploring molecular targets for the establishment of drug therapy for the ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine

研究代表者

古川 賢一 (FURUKAWA KENICHI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20165468

研究成果の概要 (和文)：

脊柱後縦靭帯骨化症(OPLL)発症への P2Y1 受容体の関与を明らかにするため、P2Y1 遺伝子を脊柱靭帯 OPLL 細胞に導入した。その結果 BMP-2 と Sox9 の遺伝子発現及び蛋白発現は著明に増強したが、正常靭帯細胞では変化がなかった。またその増加は P2Y1 受容体阻害薬で抑制された。P2Y1 導入後 4 日で、OPLL 細胞でカルシウム沈着が認められた。これらの結果は、P2Y1 受容体が OPLL 患者の異所性骨形成で重要な役割を果たすこと、またその受容体に作用する薬物が治療薬のシーズとなる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

To verify the hypothesis that P2Y1 expression causes ossification in the spinal ligaments, we forced expression of P2Y1 in spinal ligament cells obtained from OPLL and non-OPLL patients. The expression of mRNA and protein was investigated by quantitative real-time polymerase chain reaction and immunofluorescence staining, respectively. After transfection, bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and Sox9 mRNA expression was significantly increased in spinal ligament cells derived from OPLL patients compared with cells from non-OPLL patients 2 days after P2Y1 transient transfection. Immunofluorescence analysis showed that BMP-2 and P2Y1 expression was increased in OPLL patients only, while Sox9 expression was increased in OPLL and non-OPLL patients. MRS2279, a selective P2Y1 antagonist, blocked the upregulation of Sox9 and BMP-2 after forced expression of P2Y1. Furthermore, 4 days after transient transfection of P2Y1, mineralization was observed only in spinal ligament cells from OPLL patients. These results suggest that P2Y1 expression plays an important role in ectopic bone formation in the spinal ligaments of OPLL patients and that a drug which modulates the P2Y1 function will be a potential candidate for the drug in the therapy of OPLL.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：病態薬理学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：異所性骨化、脊柱靭帯、機械的ストレス、薬物治療

1. 研究開始当初の背景

(異所性骨化、石灰化の病態生理学的意義)

・国内外ならびに我々の研究成果により、“異所性骨化（石灰化）は単なる受動的なミネラルの沈着ではなく、様々な骨化関連遺伝子が関与する能動的な過程である”ことが認められつつあった。(Shao et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1423-1430, Furukawa *Pharmacol Ther* 2008;118:352-358)。そこから、次の2つのことが示唆された。

- 1) 本疾患には、正常の骨化との間に少なくとも一部共通したメカニズムが存在する。
- 2) 骨組織以外では正常時に骨化（石灰化）を抑制する機構が機能しているが、病態時にはその破綻によって異所性に骨化（石灰化）が起きる。

・以上のことから、“正常の骨化を含めた比較研究”を行うことで、その病因、進展のメカニズムの迅速な解明が期待できた。

(OPLLの遺伝的背景)

・OPLLにはある程度の家族性があることから、遺伝的変異がそのベースにあると予想されているが、我々も、患者由来の靭帯組織ならび細胞が正常靭帯のものと同発現形質が著しく異なり、骨化しやすい形質を持つことを明らかにし、これを裏付けている(研究業績欄 24-26、厚生省特定疾患対策研究事業 “脊柱靭帯骨化症調査研究班” H15-18 年度報告書)。

(OPLLにおける薬物治療の標的)

・本領域で薬物の標的として最も重要な受容体に関する研究はこれまで十分には行われておらず、従って薬物の分子標的の探索もこれまでほとんど行われていなかった。しかし、我々は細胞外核酸受容体が正常靭帯細胞に比して、OPLLの細胞で著しく高発現し、ATPの刺激によって骨化マーカーの発現が有意に増大することを見いだした (Sawada et al. *J Pharmacol Sci* 2008;106:404-414)。

・一方、OPLLに関与する因子としてメカニカルストレスを含む様々なストレスの重要性が臨床知見 (Takatsu T et al. *J Spinal Disord* 1999;12:271-273) に基づき示唆されていた。また我々は、靭帯細胞にメカニカルストレスを加えると、種々のサイトカイン（細胞外核酸も含む）の遊離、多くの骨化関連遺伝子が発現してくること、そしてそれは正常靭帯細胞では起こらないか、低いレベルにとどまることを見出した (Tanno et al. *Bone* 2003;33:475-484, Ohishi et al. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305:818-824)。従って、OPLLに関与する可能性の高いいくつかの受容体を

我々は捉えている状況にあった。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究課題では、サイトカイン類並びに OPLL 靭帯細胞で特異的に発現する受容体の OPLL 発症、進展における役割を解析することにより、薬物治療法の開発のための分子基盤を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

a) ヒト脊柱靭帯由来細胞の調製

弘前大学医学部倫理委員会の了承の下、十分なインフォームドコンセントを取って、手術時に廃棄するヒト脊柱靭帯組織からエクспラント法により、脊柱靭帯細胞を調製した。10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地で培養した。

b) 遺伝子発現解析

骨化に伴う遺伝子発現変化をリアルタイム PCR 装置によって定量的に解析した。

特定の遺伝子の発現を視覚化するため、免疫蛍光染色を行った。

c) メカニカルストレス負荷

臨床的に、骨化の重要なトリガーの一つと考えられるメカニカルストレスを培養細胞系で再現するため、脊柱靭帯細胞を伸縮自在なシリコン製培養ディッシュに播種し、周期的伸展刺激（20%伸展、0.5Hz）を最大9時間まで加えた。その細胞から totalRNA を会趣旨、遺伝子発現解析に付した。

d) 遺伝子機能解析

注目する遺伝子の発現を抑制、あるいは高進させることで、その機能を解析するため、それぞれ、その遺伝子の siRNA、あるいは過剰発現ベクターを脊柱靭帯細胞に導入し、それによる骨化並びに骨化関連遺伝子の発現解析を行った。

d) 骨化の解析

アリザリンレッド染色（ミネラル化）、アルカリフォスファターゼ活性染色を行ない、骨化、石灰化の進展を検出し、吸着した色素 cetyl pyridinium chrolide 処理により回収して、吸光度で骨化の定量を行った。

e) ウェスタンブロット

骨化関連サイトカインである BMP2 の細胞内情報伝達を担う Smad 蛋白とその活性化であるリン酸化の定量をウェスタンブロットで行った。

4. 研究成果

OPLL の病因の1つとして、脊柱可動性に伴う機械刺激（メカニカルストレス）の関与が示唆されてきたが、その詳細なメカニズムは不明であった。我々は頸椎 OPLL 患者由来

の脊柱靭帯組織片から遊走する細胞には細胞外ヌクレオチドの受容体の1つであるP2Y1 (purinoceptor Y1) が高発現し、メカニカルストレスにより細胞外 ALP の濃度が増加することから、OPLLにおける靭帯分化過程にP2Y1 が関与している可能性を報告した (Sawada T et al, J Pharmacol Sci 2008;106: 152-161)

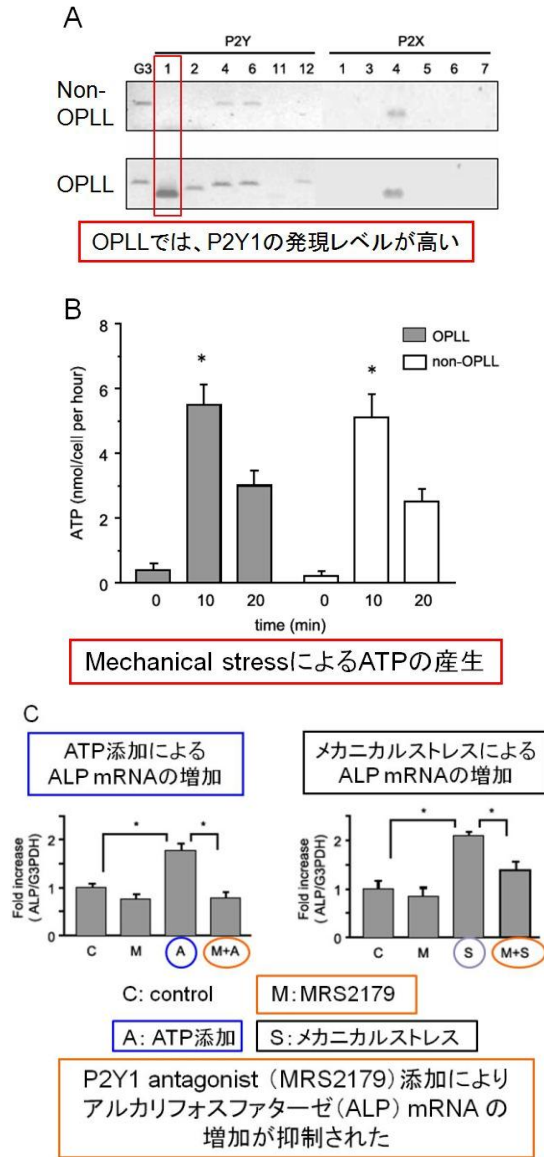


図1. 脊柱靭帯細胞における P2Y1 発現
OPLL で P2Y1 が高発現し、メカニカルストレスで ATP が遊離し、P2Y1 受容体を介して、骨化マーカー (ALP 発現) が上昇した。

そこで脊柱靭帯の骨化過程における P2Y1 が果たす役割を明らかにするため、靭帯細胞に P2Y1 を強制発現させ、骨化が促進されるかどうか検討した。

まずサイトメガロウイルスベクターに

P2Y1 遺伝子を組み込み、靭帯細胞にトランスフェクトした。図 2-A に示すように、OPLL 細胞、非 OPLL 細胞 (コントロールの正常靭帯細胞) 共に P2Y1 が過剰発現された。しかし、骨形成蛋白質 BMP-2 の発現は OPLL 細胞でのみ、また骨関連転写因子 Sox9 の著明な発現が OPLL 細胞で認められた (図 2-B)

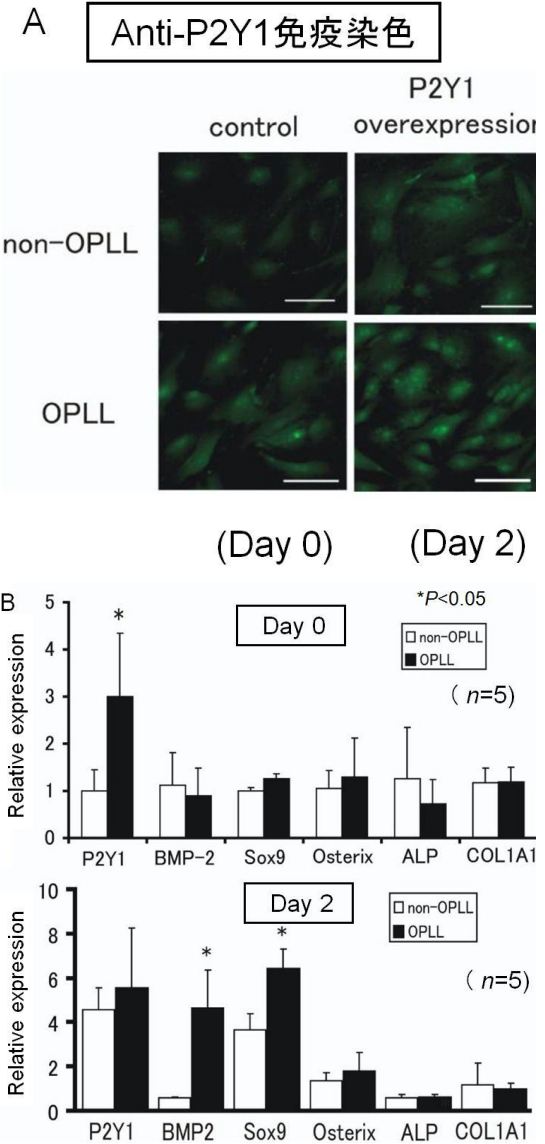


図2. P2Y1 強制発現の影響
OPLL、非 OPLL 共に P2Y1 (緑色蛍光) が過剰発現されたが、OPLL で有意に BMP2、Sox9 の発現が亢進した。

次に BMP2 の発現亢進が P2Y1 受容体を介して起こっていることを確かめるため、P2Y1 の特異的拮抗薬 MRS2279 の影響を調べた。

図 3 に示すように、P2Y1 の過剰発現に伴って BMP2 は発現亢進したが、MRS2279 の処理によって著しく、その発現を減少させた。従って OPLL の細胞環境下では、P2Y1 の過剰発現は、骨化促進因子の BMP2 の発現を亢

進させることが示された。

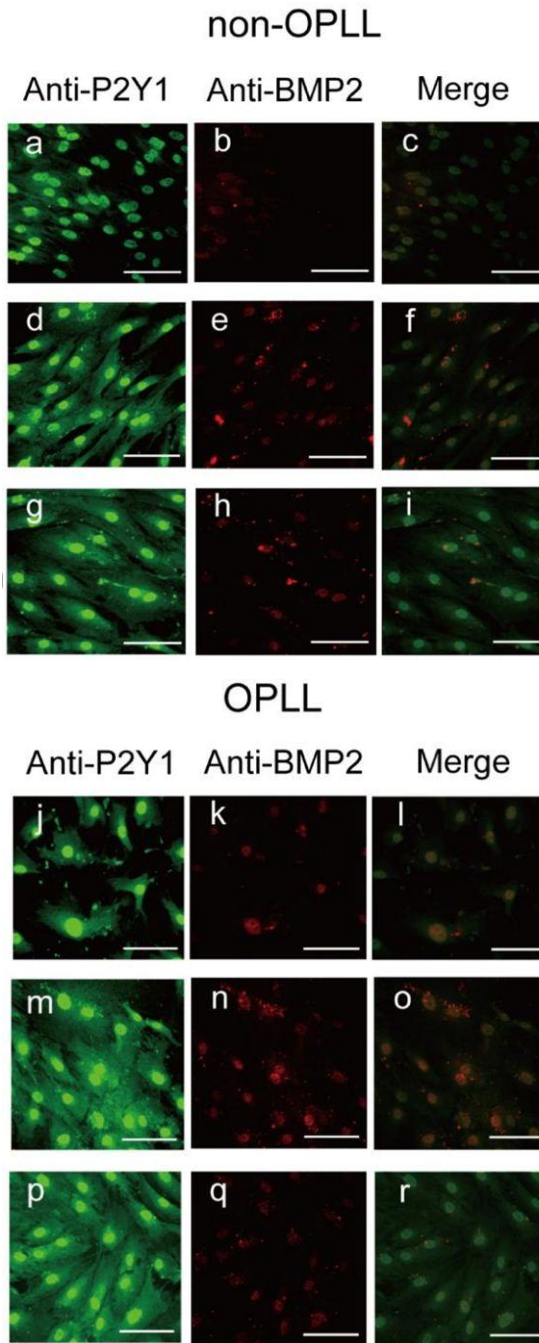


図3. P2Y1 過剰発現と P2Y1 拮抗薬投与による BMP2 発現変化
Day0: control (a-c, j-l)、Day2 P2Y1 over-expression (d-f, m-o)、Day2 P2Y1 over-expression + MRS2279 (g-i, p-r)

さらに骨成熟遺伝子（1型コラーゲン col-1A1）の発現、並びに石灰化が OPLL に P2Y1 を過剰発現させた場合のみ認められ

た（図4）。

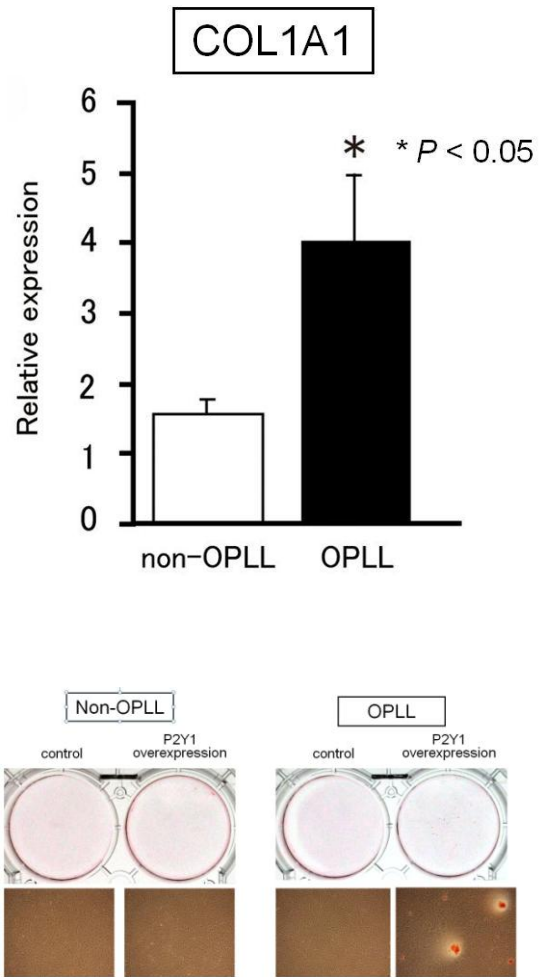


図4. P2Y1 過剰発現によるコラーゲン 1A1 の発現亢進（上図）と、石灰沈着形成（下図）

コラーゲン 1A1 はリアルタイム PCR 装置によって定量的。石灰沈着は Alizarin Red S 染色にて確認。

以上の結果より、OPLL 患者の脊柱靭帯では P2Y1 は BMP-2、Sox9 の発現誘導を介して細胞を骨・軟骨前駆細胞へ分化させるが、非 OPLL 患者では P2Y1 の発現は BMP-2 の発現を誘導せず、靭帯細胞を骨分化させないことが示された。従って、OPLL 患者において、P2Y1 の発現が脊柱靭帯骨化に重要な役割を果たすことを示唆する。

このことから、脊柱靭帯組織の P2Y1 受容体の機能を選択的に抑制する薬物が、異所性骨化の薬物治療のシーズとして有望であると考えられ、今後はそのような薬物の探索を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Tanaka S, Kudo H, Asari T, Ono A, Motomura S, Toh S, Furukawa K-I, P2Y1 Transient Overexpression Induced Mineralization in Spinal Ligament Cells Derived from Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Cervical Spine. *Calcified Tissue International* (査読有り) 2011;88:263-271.
- ② Kudo H, Yokoyama T, Ono A, Numasawa T, Wada K, Tanaka T, Asari T, Ueyama K, Motomura S, Toh S, Furukawa K-I, Genetic differences in the osteogenic differentiation potency according to the classification of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine* 2011;36:951-957
- ③ Yu Z, Seya K, Daitoku K, Motomura S, Fukuda I, and Furukawa K-I, TNF- α accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (査読有り) 2011;337:16-23.
- ④ Seya K, Yu Z, Kanemaru K, Daitoku K, Akemoto Y, Shibuya H, Fukuda I, Okumura K, Motomura S, Furukawa K-I, Contribution of bone morphogenetic protein-2 to aortic valve calcification in aged rat. *Journal of Pharmacological Sciences* (査読有り) 2011;115:8-14.
- ⑤ Kishiya M, Furukawa K-I, Yokoyama T, Kudo H, Ono A, Numasawa T, Wada K and Toh S, Comparison of cardiovascular parameters between patients with ossification of posterior longitudinal ligament and patients with cervical spondylotic myelopathy. *Journal of Spinal Disorders & Techniques* (査読有り) 2009;22:361-366
- ⑥ Furukawa K-I, Pharmacological aspect of ectopic ossification in spinal ligament tissues. *Pharmacology & Therapeutics* (査読有り) 2008;118:352-358.
- ⑦ Kishiya M, Sawada T, Kanemaru K, Kudo H, Numasawa T, Yokoyama T, Motomura S, Ueyama K, Harata S, Toh S and Furukawa K-I, A functional RNAi screen for runx2-regulated genes corresponding to ectopic bone formation in human spinal ligaments. *Journal of Pharmacological Sciences* (査読有り) 2008;106:404-414.
- ⑧ Sawada T, Kishiya M, Kanemaru K, Yokoyama T, Ueyama K, Motomura S, Toh S and Furukawa K-I, Possible role of extracellular nucleotides in ectopic ossification of human

spinal ligaments. *Journal of Pharmacological Sciences* (査読有り) 2008;106:152-161.

- ⑨ Kanemaru K, Seya K, Miki I, Motomura S and Furukawa K-I, Calcification of aortic smooth muscle cells isolated from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Pharmacological Sciences* 2008;106:280-286.

[学会発表] (計15件)

(国際学会)

- ① Tanaka S, Asari T, Harada Y, Ono A, Numasawa T, Wada K, Yamasaki Y, Motomura S, Toh S, Furukawa K-I. Expression of GREM-1, one of the BMP antagonists, is significantly suppressed in the spinal ligament cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Long Beach California, USA, 2011.1.13-16
- ② Kudo, H, Ono, A, Numasawa, T, Wada, W, Tanaka, S, Asari, T, Toh, S, Motomura, S, Furukawa, K-I. Genetic Differences in the Osteogenic Differentiation Potency according to the Classification of the Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament of the Cervical Spine. 37th European Symposium on Calcified Tissues, Glasgow, Great Britain, 2010.6.26-30
- ③ Kudo H, Furukawa K-I, Ono A, Numasawa T, Wada K, Tanaka S, Asari T, Motomura S, Toh S, Genetic differences in osteogenic differentiation potency based on the classification for the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orleans, Louisiana, USA, 2010.3.6-9 (**Symposium speaker**)
- ④ Kudo, H, Furukawa, K-I, Ono, A, Numasawa, T, Wada, K, Tanaka, S, Motomura, S, Toh, S. Genetic Association in Progression of the Ossification Area of the Posterior Longitudinal Ligament of the Cervical Spine. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Las Vegas, Nevada, USA, 2009.2.22-24

(国内学会-全国大会)

- ① 田中直, 浅利享, 小野睦, 沼沢拓也, 藤哲, 瀬谷和彦, 元村成, 古川賢二, P2Y1の一過性過剰発現は脊柱靭帯骨化症患者由来の脊柱靭帯細胞の石灰化を誘発する. 第84回日本薬理学会年会 平成23年3月22-24日 横浜
- ② 于在強, 瀬谷和彦, 大徳和之, 元村成, 福田幾夫, 古川賢二, TNF- α は石灰化動脈弁狭窄症患者から得た動脈弁間質細胞の石灰化をBMP2-Dlx5経路を介して促進する. 日本薬理学会年会 平成23年3月22-24

日 横浜

③ 田中直、小野睦、沼沢拓也、和田簡一郎、山崎義人、元村成、藤哲、古川賢一、脊柱靱帯骨化症患者の脊柱靱帯由来細胞では BMP-2 抑制遺伝子である Grem-1 の発現が有意に低下している。第 28 回 日本骨代謝学会 平成 22 年 7 月 21-23 日 東京

④ 古川賢一、高血圧によるラット大動脈平滑筋の異所性石灰化における一酸化窒素の役割。第 28 回 日本骨代謝学会 平成 22 年 7 月 21-23 日 東京

⑤ 于在強、瀬谷和彦、大徳和之、元村成、福田幾夫、古川賢一、TNF- α は NF- κ B 経路を介して石灰化大動脈弁狭窄症患者由来の大動脈弁間質細胞の石灰化を促進する。第 83 回 日本薬理学会年会 平成 22 年 3 月 16-18 日 大阪

⑥ 田中直、古川賢一、浅利享、小野睦、沼沢拓也、瀬谷和彦、藤哲、元村成、脊柱後縦靱帯骨化症患者における P2Y1 受容体の病態生理学的役割—過剰発現による解析。第 83 回 日本薬理学会年会 平成 22 年 3 月 大阪

⑦ 工藤整、小野睦、沼沢拓也、和田簡一郎、田中直、浅利享、元村成、藤哲、古川賢一、頸椎後縦靱帯骨化症分類による骨分化能の違い。第 27 回 日本骨代謝学会 平成 21 年 7 月 23-25 日 大阪

⑧ 古川賢一 高血圧によるラット大動脈平滑筋の異所性石灰化。第 27 回 日本骨代謝学会 平成 21 年 7 月 23-25 日 大阪

⑨ 工藤整、田中直、沼沢拓也、小野睦、和田簡一郎、浅利享、瀬谷和彦、三木いづみ、藤哲、元村成、古川賢一、頸椎後縦靱帯骨化症分類に基づいた遺伝子発現の検討。第 82 回 日本薬理学会年会 平成 21 年 3 月 16-18 日 横浜

⑩ 田中直、工藤整、小野睦、沼沢拓也、瀬谷和彦、三木いづみ、藤哲、元村成、古川賢一、脊椎後縦靱帯骨化症患者における P2Y1 受容体の病態生理学的役割—過剰発現による解析。第 82 回 日本薬理学会年会 横浜 平成 21 年 3 月 16-18 日 横浜

⑪ 古川賢一、高血圧自然発症ラットの動脈平滑筋細胞の易石灰化。第 26 回 日本骨代謝学会 平成 20 年 10 月 29-31 日 大阪

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 賢一 (FURUKAWA KENICHI)

弘前大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号 : 20165468

(2) 研究分担者

瀬谷 和彦 (SEYA KAZUHIKO)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 40281919

沼沢 拓也 (NUMASAWA TAKUYA)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 80396407

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :