

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791366

研究課題名（和文）

遺伝子導入による新しい骨化抑制療法の開発に向けた脊柱靭帯細胞の生物学的解析

研究課題名（英文）

Cell biological features for the cultured cells derived from the human ossification of spinal ligament

研究代表者

彌山 峰史（YAYAMA TAKAFUMI）

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60362042

研究成果の概要（和文）：

脊柱靭帯骨化症は内軟骨性骨化過程により骨形成・進展をきたし、骨化前線部での細胞分化の調節・制御が本症の病態に深く関与すると考えられる。Wnt/ β -catenin は内軟骨性骨化に重要な signaling であり、脊柱靭帯骨化症における Wnt/ β -catenin signaling の役割について靭帯組織由来の培養細胞、および採取靭帯の脱灰薄切標本を用いて検討した。頸椎後縦靭帯骨化症、胸椎黄色靭帯骨化症の手術時に採取した骨化靭帯より得た培養細胞では、 β -catenin、Runx2、VEGF の mRNA の発現は非骨化靭帯由来細胞と比較して高値であり、さらに cyclic tensile strain を 24 時間加えることで、これら因子の mRNA 発現は有意に上昇した。また Wnt および Wnt receptor の発現は cyclic tensile strain を加えることによって亢進していた。骨化前線部における免疫組織化学的局在を観察すると、 β -catenin は石灰化前線近傍の増殖期軟骨細胞、Runx2、VEGF は石灰化軟骨層の肥大軟骨細胞、Wnt および Wnt receptors は未分化間葉系細胞に強陽性であった。これらの結果から、骨化靭帯細胞では骨芽細胞や軟骨細胞の分化・誘導に関与する因子の発現が高値であり、cyclic tensile strain を加えることでこれらの発現がさらに亢進することは、骨形成の促進に関与する 1 つの因子であると考えられた。また骨化前線の近傍には血管形成とともに未分化な間葉系細胞がみられ、Wnt/ β -catenin signaling を介して骨芽細胞へと分化誘導されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Several studies have investigated the roles of biomechanical and metabolic factors in the development and progression of ossification of spinal ligament, based on the importance of genetic and biological factors. The process of ossification includes enchondral ossification, though such pathology remains poorly defined. We analyzed the cultured cells or paraffined sections derived from ossification of the posterior longitudinal ligament or ligamentum flavum using histological and immunohistochemical staining, Western blotting, and real-time RT-PCR. Cyclic tensile strain was produced by Flexercell® FX-3000, applied for 0, 6, 12, or 24 hours. Controlled samples were harvested from non-ossified ligamentum flavum of patients who underwent thoracic posterior surgeries. Under resting conditions (no tensile strain), the mRNA levels of β -catenin, Runx2, and VEGF in cultured cells from ossified ligament were significantly higher than in the control cells. Application of cyclic tensile strain to cells from ossified ligament resulted in significant increases in mRNA expression levels of β -catenin, Runx2, and VEGF at 24 hours. Chondrocytes around the calcification front were immunopositive for β -catenin. Immunoreactivity of Wnt and Wnt receptors were strongly present in premature mesenchymal cells around blood vessel in the fibrocartilage area. Our results indicated that cyclic tensile strain applied to cells from ossified ligament activated their ossification through a process mediated by the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,200,000 | 660,000 | 2,860,000 |
| 2011年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

脊椎靭帯（後縦靭帯、黄色靭帯）骨化症における骨化進展は個々の症例により多様・多彩であり、それぞれの病期・病態に応じた適切な治療が求められる。しかし、本症に対しては脊髄圧迫による神経症状を緩和・改善させるための投薬・リハビリテーションや脊髄の圧迫を除去（除圧）する外科的治療が中心であり、いまなお骨化伸展自体を抑制する治療は存在しない。

骨化形成・伸展は病理組織学的には内軟骨性骨化であり、骨化巣と靭帯組織の移行部に存在する骨化前線部には軟骨細胞が様々な形態を呈している。我々のこれまでの研究では、頰椎後縦靭帯骨化症（OPLL）、胸椎黄色靭帯骨化症（OLF）において、骨化形態によって骨化前線部における層構造、軟骨細胞分化の性質、靭帯基質の変性程度が異なることを報告した。また、骨化靭帯細胞から得た培養細胞では、軟骨分化や骨形成に関与する転写因子の発現が増加していることを観察した。しかし、骨化形成や骨化進展を調節する因子について、未だ不明な点も残されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨化靭帯細胞が有する生物学的特性や骨化の分化誘導に関与する特定遺伝子の発現について解析することである。これにより靭帯骨化の成り立ちの解明や骨化靭帯の細胞分化という観点からみた、新しい”骨化制御療法”の開発において極めて有意義な情報をもたらすと考えられる。

3. 研究の方法

脊柱靭帯骨化症（頰椎 OPLL、胸椎 OLF）に対して手術治療を行った際に採取した骨化靭帯 10 例（ossification of the spinal ligament: OSL 群、手術時平均 69.8 歳）を対象とした。採取した黄色靭帯は骨組織を切除した後に細切し、explant 法にて細胞を遊走させ、5 継代培養して実験を行った（図 1）。

Cyclic tensile strain は Flexercell FX-3000 を用いて行い、ストレス反応時間は 0、6、12、24 時間とした。この際の Wnt (Wnt 5a、Wnt 7a)、Wnt receptors (Frizzled 1、3)、 β -catenin、Runx2、VEGF の発現を免疫組織化学的染色、Real-time RT-PCR、Western blotting 法にて評価した。

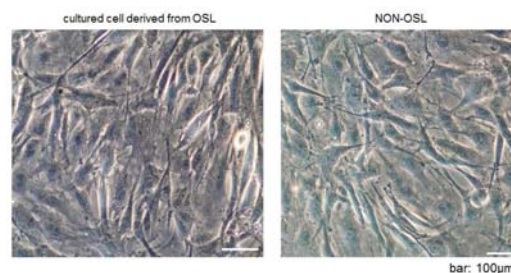


図 1: 培養靭帯細胞の morphology

また骨化靭帯の一部は脱灰固定して薄切標本作製し、上記の因子について免疫組織化学染色を行った。比較対象には非骨化黄色靭帯 5 例（NON-OSL 群：男性 3 例、女性 2 例、手術時平均 69.1 歳）を用いた。

（倫理面での配慮）

本研究を遂行するにあたり、研究対象者の人権擁護を最大限に配慮し、研究内容が苦痛を伴うものではなく、社会的不利益を蒙るものではなく、危険性を完全に排除し、疾患の病態解析のみが目的であることを説明及び同意を得ている。

4. 研究成果

Real time RT-PCR による mRNA 発現の比較では、OSL 由来細胞において β -catenin、Runx2、VEGF の mRNA の発現が有意に上昇しており、cyclic tensile strain を加えると β -catenin、Runx2、VEGF の発現は有意な上昇を認めた（図 2）。

培養細胞に対する免疫組織化学染色では、

Wnt 5a、Wnt 7a の発現は細胞質を中心に陽性であり、また Western blotting では Wnt 5a の発現は有意に上昇しており、Wnt 7a の発現も高値となる傾向にあった。

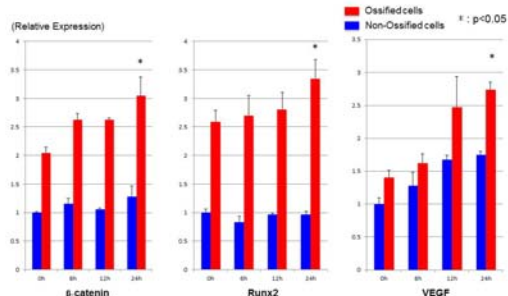


図 2: Real-time RT-PCR (β -catenin、Runx2、VEGF)

培養細胞に対する免疫組織化学染色では、Wnt 5a、Wnt 7a の発現は細胞質を中心に陽性であり、また Western blotting では Wnt 5a の発現は有意に上昇しており、Frizzles 1、3 の発現も高値となる傾向にあった。

骨化前線部における免疫組織化学的局在では、 β -catenin は石灰化前線近傍の増殖期軟骨細胞、Runx2、VEGF は石灰化軟骨層の肥大軟骨細胞 (図 3)、Wnt および Wnt receptors は未分化間葉系細胞に (図 4) 強く発現していた。

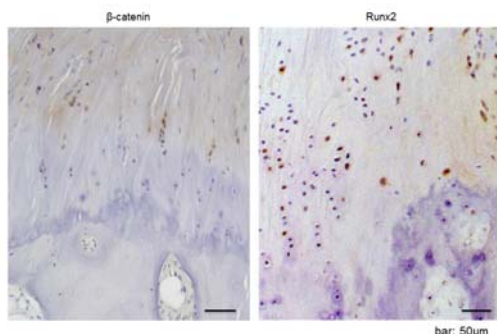


図 3: β -catenin、Runx2 の発現

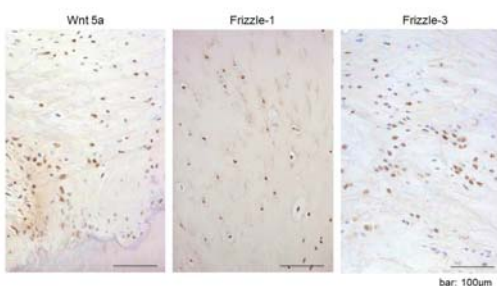


図 4: Wnt 5a、Frizzles 1、3 の発現

Wnt/ β -catenin signaling は内軟骨性骨化における軟骨細胞と骨芽細胞の分化に関

連しており、この signaling の異常活性により骨端線閉鎖に異常をもたらすことが指摘されている。今回の結果から、Wnt/ β -catenin signaling が骨化前線部の細胞分化に関連しており、特にストレス条件下では β -catenin の発現が異常上昇し、それに伴い骨芽細胞の分化を促進させる転写因子の発現が亢進することが推測された。

骨化前線部では、成長因子や転写因子を介して autocrine/paracrine に細胞が分化・成熟して層構造を形成するが、Wnt/ β -catenin signaling の持続的かつ過剰発現はこれらを異常促進させ、骨化形成・伸展に関与する 1 つの要因であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Cai HX, Yayama T, Uchida K, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, Yoshida A, Baba H. Cyclic Tensile Strain Facilitates the Ossification of Ligamentum Flavum Through β -Catenin Signaling Pathway: In Vitro Analysis. Spine (Phila Pa 1976) in press. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158061>
- ② Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Yayama T, Guerrero AR, Inukai T, Hirai T, Sugita D, Johnson WE, Baba H. Apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the spinal cord of spinal hyperostotic mouse (twy/twy): possible pathomechanism of human cervical compressive myelopathy. Eur Spine J 21:490-497, 2012. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21935678>
- ③ Uchida K, Yayama T, Cai HX, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, Kobayashi S, Yoshida A, Chen KB, Baba H. Ossification process involving the human thoracic ligamentum flavum: role of transcription factors. Arthritis Res Ther 13:R144, 2012. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914169>
- ④ Uchida K, Yayama T, Sugita D, Nakajima H, Rodriguez Guerrero A, Watanabe S, Roberts S, Johnson WE, Baba H. Initiation and progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical

spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (twy/twy). *Eur Spine J* 21:149-155, 2012. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850419>

- ⑤ Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Rodriguez Guerrero A, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Zhu P, Baba H. High-mobility group box-1 and its receptors contribute to proinflammatory response in the acute phase of spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 36:2122-2129, 2011. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343866>
- ⑥ Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Watanabe S, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Baba H. Tumor necrosis factor- α antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 36:1350-1358, 2011. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224756>
- ⑦ Uchida K, Nakajima H, Hirai T, Yayama T, Chen KB, Kobayashi S, Roberts S, Johnson WE, Baba H. Microarray analysis of expression of cell death-associated genes in rat spinal cord cells exposed to cyclic tensile stresses in vitro. *BMC Neurosci* 11:84, 2010. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663127>
- ⑧ Nakajima H, Uchida K, Yayama T, Kobayashi S, Guerrero AR, Furukawa S, Baba H. Targeted retrograde gene delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 35:497-504, 2010. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190624>

[学会発表] (計7件)

- ① 彌山峰史, 内田研造, 中嶋秀明, 杉田大輔, 馬場久敏. Cyclic tensile stress upregulates the expression of β -catenin signaling in cultured

cells harvested from human ossified ligamentum flavum. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2012, 2012.2.6-7, San Francisco

- ② 彌山峰史, 内田研造, 中嶋秀明, 杉田大輔, 馬場久敏. Cyclic tensile stressが胸椎黄色靭帯の骨化形成に与える影響—内軟骨性骨化過程における Wnt β -catenin signaling の関与—. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011.10.20, 前橋
- ③ 彌山峰史, 内田研造, 杉田大輔, 中嶋秀明, 小久保安朗, 渡邊修司, 吉田 藍, 竹浦直人, 馬場久敏. 脊柱靭帯骨化における骨化前線部の軟骨細胞分化の特徴. 第30回日本運動器移植・再生医学研究会, 2011.9.25, 福岡
- ④ 彌山峰史, 内田研造, 中嶋秀明, 小久保安朗, 杉田大輔, Cai HX, 吉田 藍, 馬場久敏. 培養骨化靭帯細胞における転写因子の発現と tensile stress の影響. 第40回日本脊椎脊髄病学会, 2011.4.22, Web開催
- ⑤ K. Uchida, H. Nakajima, T. Hirai, T. Yayama, D. Sugita, S. Kobayashi, H. Baba. Cell death-associated genes expression patterns using microarray analysis in rat cultured spinal cord cells exposed to cyclic tensile stresses in vitro. 7th Combined Meeting of ORS, 2010.10.17, KYOTO
- ⑥ Yayama T, Uchida K, Cai HX, Kobayashi S, Nakajima H, Sato R, Sugita D, Alexander Guerrero, Chen KB, Baba H. Topographic expression of transcriptional factors in the human ossification of ligamentum flavum in thoracic spine. 7th Combined Meeting of ORS, 2010.10.17, KYOTO
- ⑦ 彌山峰史, 内田研造, Cai HX, 中嶋秀明, 小久保安朗, 小林 茂, 杉田大輔, 馬場久敏. 培養骨化靭帯細胞における機械的ストレスと骨形成誘導因子. 第29回日本運動器移植・再生医学研究会, 2010.9.25, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

彌山峰史 (YAYAMA TAKAFUMI)
福井大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 60362042