

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592152

研究課題名(和文) 脊柱靭帯骨化症における脊柱靭帯および皮膚由来細胞の骨化機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of heterotopic ossification in human spinal ligament and skin tissues of patient with ossification of spinal ligaments

研究代表者

沼沢 拓也 (Numasawa, Takuya)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80396407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円、(間接経費) 450,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト脊柱靭帯を細胞培養し、骨・軟骨・脂肪への分化能を確認し、フローサイトメトリーにより細胞表面マーカーの発現を呈する細胞の単離に成功し、間葉系幹細胞の存在を証明した。また幹細胞は血管周皮細胞領域、靭帯実質部、骨化前線周囲に局在していた。皮膚についても間葉系幹細胞の存在を確認し、脊柱靭帯および皮膚の細胞について、両組織から得られた間葉系幹細胞は高い骨分化能を有していた。また骨化症患者では非骨化症患者と比較し、骨関連遺伝子発現が有意に高かった。以上より、脊柱靭帯骨化症患者では幹細胞レベルで骨形成能が高く、骨化傾向が高いことが証明され、これらが本疾患の発症に強く影響を与えていることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：We isolated and expanded MSCs from human spinal ligaments and demonstrated localization of MSCs in spinal ligaments. Immunolocalization of MSCs was observed in the perivascular area and collagenous matrix in spinal ligaments.

We also isolated and expanded MSCs from human skin tissue. We showed that the osteogenic differentiation potential was significantly higher in MSCs from OPLL patients than in those from non-OPLL patients in both spinal ligament and skin tissues. Osteogenic-related gene expressions were significantly higher in the OPLL group than in the non-OPLL group. These findings suggest an increase in the osteogenic differentiation potential of MSCs from OPLL patients and that this propensity toward the osteogenic lineage may be a causal factor in the ossification in these ligaments.

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：幹細胞 靭帯 皮膚 異所性骨化

1. 研究開始当初の背景

脊柱靭帯骨化症は脊椎靭帯の異所性骨化により脊髄が圧迫されることで、手足のしびれや麻痺を引き起こす疾患であるが、その原因は未だに解明されていない。本疾患は厚生労働省(旧厚生省)の特定疾患に認定され、今までに数多くの成因に関する研究がなされてきた。その中で本疾患は国際的に認識されている疾患ながら、日本人に多く発症するために、本邦ではゲノムレベルでの遺伝解析が世界に先駆けて行われ、特に我が弘前大学と東京大学医科学研究所が行ったゲノムワイドスクリーニングでは、COL11A2およびCOL6A1を疾患感受性遺伝子として同定することに成功し、日本から世界へ成果を発信してきた。

また患者靭帯細胞を用いた研究では、これまでは脊柱靭帯骨化症患者の靭帯細胞の免疫組織染色を用いた各種因子の発現を調べることが主であったが、我々は培養靭帯細胞を用いて骨化誘導・分化による遺伝子発現の研究を進め、異所性骨化メカニズムに迫ってきた。特に骨芽細胞分化誘導培地の添加やメカニカルストレスによる刺激により、骨化の分化・誘導に関する遺伝子マーカーの発現が脊柱靭帯骨化症患者の細胞では非骨化症患者の細胞に比較して優位に上昇していることを報告してきた。

このように過去の脊柱靭帯骨化症研究の報告および我々の今までの研究から、脊柱靭帯骨化症患者はもともと全身性に強い骨化傾向にあり、体内細胞において幹細胞レベルで異所性骨化が生じやすい変化が起きている可能性が考えられた。しかし、今までにそれを実際に証明した報告は少なく、異所性骨化が生じやすい環境がどのようなものか、あるいは靭帯組織以外においても細胞および細胞外マトリックスの変化が生じていることを証明することができれば、異所性骨化に関わる分子レベルでの病態解明に新たな道が開ける可能性がある。

後縦靭帯骨化症患者の全身の靭帯組織以外での骨化傾向を調べる目的で行われた研究に、鹿児島大学で行われた皮膚組織に関する免疫組織学的研究がある。そこでは表皮組織においてTGF- β のantagonistであるdecorinのmRNAの発現が非OPLL患者に比較し有意に上昇しており、患者の全身の細胞外マトリックスに異常が起きている可能性があることが報告されている。

2. 研究の目的

分子生物学的手法により、脊柱靭帯骨化症患者および非骨化症患者の脊柱靭帯および皮膚組織の細胞を培養し、培養細胞より間葉系幹細胞を抽出し、in vitroで間葉系幹細胞の定義である多分化能(骨分化能、脂肪分化能および軟骨分化能)を持ち、そして間葉系幹細胞

表面マーカー(CD73、CD90およびCD105)の発現を呈する細胞の単離を試み、間葉系幹細胞がヒト脊柱靭帯内に存在していることを証明する。続いて、間葉系幹細胞の脊柱靭帯内における局在を明らかにし、それぞれの間葉系幹細胞の骨化の分化・誘導に関して骨化関連遺伝子の発現を調べ、全身の細胞外マトリックスにおける異所性骨化のメカニズムを解析する。

3. 研究の方法

a. 脊柱靭帯および皮膚組織における幹細胞の同定

頸椎手術で採取した脊椎黄色靭帯をコラゲナーゼ処理して得られる有核細胞をノンコーティングのプラスチックディッシュにて培養した。培養14日後に継代を行い、コロニー形成能、細胞増殖能を検討した。多分化能の検討は、骨・脂肪・軟骨の各誘導培地で21日間培養後、Alizarin Red S(骨)、Oil Red O(脂肪)、Toluidine blue(軟骨)の染色にて検討を行った。同時に各誘導後の細胞から抽出したtotal RNAからcDNAを合成し、Real-time PCRにて骨・脂肪・軟骨関連マーカーの発現を検討した。細胞表面マーカーの発現はフローサイトメトリーにて解析した。

b. 脊柱靭帯骨化における間葉系幹細胞の局在

脊柱靭帯骨化症患者の骨化した胸椎黄色靭帯組織と非脊柱靭帯骨化症患者の胸椎黄色靭帯組織(コントロール群)を使用した。採取された靭帯組織は速やかにホルマリン固定を1週間行った。骨化部分を含んでいる靭帯組織についてはKC-X液を用いて更に1週間脱灰処理を行った。靭帯組織を矢状切断してパラフィン切片を作製した後、Hematoxylin-Eosin染色を行い、靭帯組織の組織学的評価を行った。次に、二重蛍光染色法を用いて免疫組織学的検討を行った。一次抗体は、間葉系幹細胞表面マーカー(CD73、CD90およびCD105)、血管内皮細胞表面マーカー(CD31)と血管周皮細胞表面マーカー(α -SMA)を使用した。表面マーカーCD73/CD90、CD73/CD105、CD90/CD105、CD73/CD31、CD73/ α -SMA、およびCD105/ α -SMAの組み合わせで染色した後、靭帯組織において血管領域(特に内皮細胞層と周皮細胞領域)、および靭帯実質部、そして骨化靭帯組織の骨化前線領域での表面マーカーの発現を蛍光顕微鏡を用いて検討した。

c. 脊柱靭帯および皮膚由来間葉系幹細胞の骨化分化能の評価

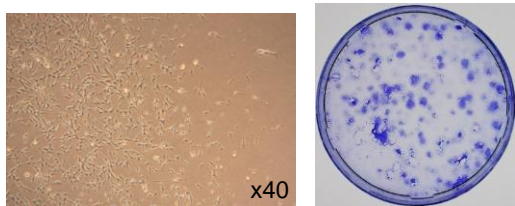
細胞培養により得られた細胞から Fluorescence-activated cell sorter(FACS) を用いて、表面マーカーである CD34 陰性、CD105 陽性を満たす細胞を選別し実験に用いた。96 ウェルディッシュ 2 枚で単細胞培養を行い、コロニー形成能を検討した。14 日間の培養後 30 細胞以上に増殖していた場合をコロニー形成有りと判断した。

得られた細胞を骨・脂肪・軟骨誘導培地で培養し、それぞれへの分化能を脊椎靭帯については骨化症群 8 例と非骨化症群 9 例で比較し、皮膚由来細胞については骨化症群 3 例と非骨化症群 3 例で比較・検討した。骨・脂肪誘導培養後、組織特異的染色である Alizarin Red S 染色（骨組織）、Oil Red O 染色（脂肪組織）を行い、それぞれの吸光度を計測することで定量的に評価を行った。骨分化能に関しては培養中の ALP 活性を評価した。軟骨誘導はペレット培養にて行い、軟骨ペレットの重量と最大径を計測した。ペレット切片の Alcian Blue 染色を行い、染色される軟骨基質面積の割合を定量的に評価した。また各誘導中の骨・脂肪・軟骨分化関連遺伝子発現を検討した。

4. 研究成果

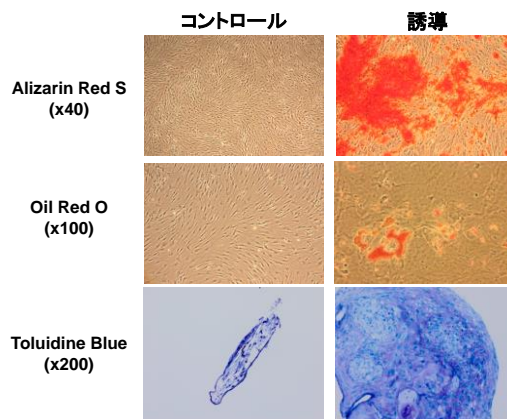
a. 脊椎靭帯および皮膚組織における幹細胞の同定

培養細胞は線維芽細胞様の形態を示した。またノンコーティングのプラスチックディッシュに付着して増殖し、コロニーを形成した。



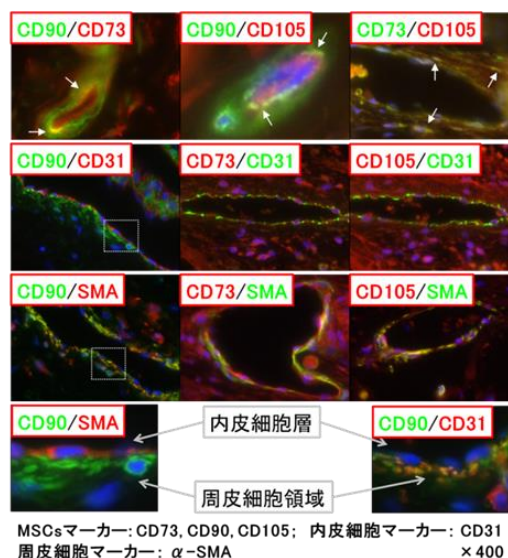
5 × 10⁵ (細胞/dish)

コロニー同士が接触しない至適培養濃度は 5 × 10⁵ cell/94 mmφdish であった。100 細胞あたりのコロニー形成数は平均 8.8 個であった。50 cell/cm² の低密度では平均 Population doubling level (PDL) が 33.5 となり、5,000 cell/cm² の高密度での平均 PDL は 10.3 であった。一方、多分化能の検討では、骨・脂肪・軟骨の各誘導群において Alizarin Red S、Oil Red O、Toluidine blue の染色に陽性を示した。また、Real-time PCR にて骨・脂肪・軟骨関連遺伝子の発現を認めた。細胞表面マーカー発現の解析では、CD11b、CD19、CD34、CD45、HLA-DR は陰性であり、CD73、CD90、CD105 は陽性であった。後縦靭帯、黄色靭帯ともに同様の結果であった。



b. 脊椎靭帯骨化における間葉系幹細胞の局在

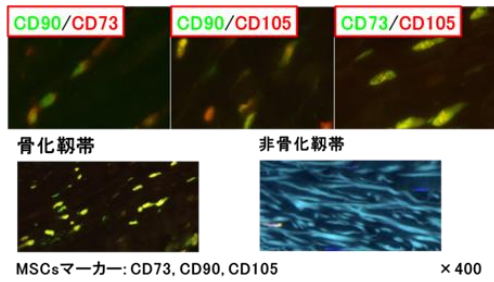
非骨化黄色靭帯組織の Hematoxylin-Eosin 染色では、波状の弾性線維の中に線維芽細胞を少数認めた。靭帯組織の周辺では多数の血管新生像を認めたが、靭帯実質部では血管新生は乏しかった。一方、骨化黄色靭帯組織では、骨化前線周辺で多数の軟骨細胞を認め、骨化前線近傍の靭帯実質部では弾性線維構造の破綻像が観察され、その周辺に多数の血管新生を認めた。二重免疫蛍光染色法による間葉系幹細胞表面マーカー発現の検討では、靭帯組織内部の血管および靭帯組織を囲む血管の周囲に表面マーカー CD73/CD90、CD73/CD105 および CD90/CD105 の全ての発現を認めた。さらに、血管組織内では、血管内皮細胞表面マーカー CD31 陽性の細胞では表面マーカーの発現を認めなかった。



MSCs マーカー: CD73, CD90, CD105; 内皮細胞マーカー: CD31
周皮細胞マーカー: α-SMA × 400

一方、血管周皮細胞領域では血管周皮細胞表面マーカー α-SMA 陽性の細胞は間葉系幹細胞表面マーカーの発現を認めた。また、靭帯実質部でも全ての表面マーカーが発現し

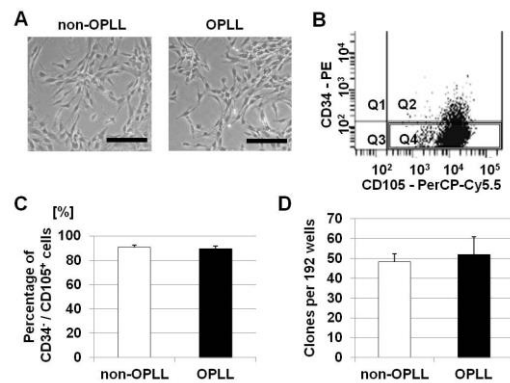
た線維芽細胞様細胞が観察された。



表面マーカー陽性細胞の出現率は、非骨化黄色靱帯より骨化黄色靱帯で高かった。多数の軟骨細胞が存在する骨化前線の周辺でも同様に、全ての表面マーカーを発現する軟骨芽細胞様細胞が観察された。

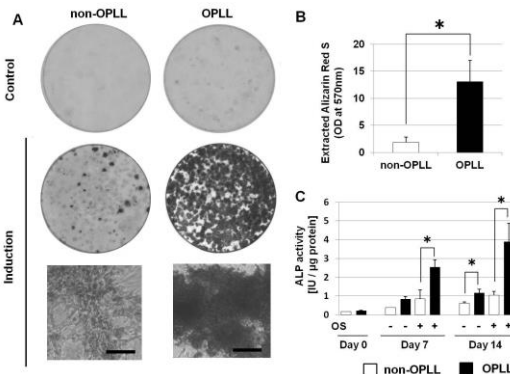
c. 脊椎靱帯および皮膚由来間葉系幹細胞の骨化分化能の評価

初代培養で得られた細胞は両群とも線維芽細胞様の形態を呈し、細胞形態にあきらかな違いを認めなかった。FACSによる細胞表面マーカーの解析では、第1継代細胞におけるCD34陰性、CD105陽性を満たす細胞の割合は対照群 90.7±4.5%、骨化症群 89.6±4.9%で両群間に有意差を認めなかった。コロニー形成能は対照群 48.3±3.9コロニー、骨化症群 52.0±8.9コロニー/192ウェルで、両群間に有意差を認めなかった。



骨分化誘導において、骨化症群では対照群と比較し Alizarin Red S 染色で赤色に染色される石灰化したコロニーを多数認めた。

Alizarin Red S 染色の吸光度を計測す



ると、対照群 1.89±0.93、骨化症群 13.1±3.95 で骨化症群は有意に骨分化能が高かった。ALP 活性は誘導開始時には両群間に差を認めないが、通常培養 14 日と誘導培養 7 日および 14 日では骨化症群で有意に高値であった。脂肪分化誘導では、Oil Red O 染色で両群とも脂肪滴の形成を認め、その吸光度は対照群 0.30±0.06、骨化症群 0.27±0.07 で有意差を認めなかった。軟骨分化誘導では、形成された軟骨ペレットの重量は対照群 0.49±0.09mg、骨化症群 0.43±0.05mg、最大径は対照群 0.97±0.07mm、骨化症群 0.99±0.06mm であり、いずれも有意差を認めなかった。各軟骨ペレット全体の面積に占める Alcian Blue で染色される面積の割合は、対照群 42.7±3.7%、骨化症群 38.6±6.2%で有意差を認めなかった。

誘導培養中の遺伝子発現の解析で、骨分化関連遺伝子である BMP2 と ALP が誘導後 7 日において骨化症群で有意に高値であり、また Runx2 が誘導後 14 日と 21 日において骨化症群で有意に高値であった(図 4)。脂肪分化関連遺伝子である PPARγ2 と LPL、軟骨分化関連遺伝子である Sox9、COL2A1、COL10A1 の発現には有意差を認めなかった。

皮膚由来細胞の骨化機序を解明するにあたり、まずは年齢を調整した対照群と骨化症群間で骨分化能の比較・検討を行った。頸椎手術時に採取された C4-5 高位の皮膚真皮から酵素処理法で細胞を単離し実験を行った。骨分化能は誘導培養後の Alizarin Red S 染色の吸光度と、誘導培養中の 0、1、3、7 日の ALP 活性を評価した。さらに誘導培養中の 1、3、7 日の時点で tRNA を回収し、骨分化関連遺伝子発現を検討した。骨分化誘導培養後の Alizarin Red S 染色の吸光度を計測すると、対照群 1.77±3.38、骨化症群 3.69±9.70 で骨化症群は有意に骨分化能が高かった。ALP 活性は両群とも経時的に増加する傾向を認めたが、群間に有意差を認めなかった。骨分化関連遺伝子発現は、BMP2、Runx2、ALP とも骨化症群で発現が高い傾向を認めたが群間に有意差を認めるには至らなかった。

[雑誌論文] (計 7 件 すべて査読あり)

1. Kudo H, Yokoyama T, Tsushima E, Ono A, Numasawa T, Wada K, Tanaka S, Toh S. Interobserver and intraobserver reliability of the classification and diagnosis for ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Eur Spine J.* 2013 Jan;22(1):205-10.
2. Karasugi T, Nakajima M, Ikari K; Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, Tsuji T,

Matsumoto M, Chiba K, Uchida K, Kawaguchi Y, Mizuta H, Ogata N, Iwasaki M, Maeda S, Numasawa T, Abumi K, Kato T, Ozawa H, Taguchi T, Kaito T, Neo M, Yamazaki M, Tadokoro N, Yoshida M, Nakahara S, Endo K, Imagama S, Demura S, Sato K, Seichi A, Ichimura S, Watanabe M, Watanabe K, Nakamura Y, Mori K, Baba H, Toyama Y, Ikegawa S. genome-wide sib-pair linkage analysis of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. J Bone Miner Metab. 2013 Mar;31(2):136-43.

3. Asari T, Furukawa K, Tanaka S, Kudo H, Mizukami H, Ono A, Numasawa T, Kumagai G, Motomura S, Yagihashi S, Toh S. Mesenchymal stem cell isolation and characterization from human spinal ligaments. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Jan 27;417(4):1193-9.

4. Numasawa T, Ono A, Wada K, Yamasaki Y, Yokoyama T, Aburakawa S, Takeuchi K, Kumagai G, Kudo H, Umeda T, Nakaji S, Toh S. Simple foot tapping test as a quantitative objective assessment of cervical myelopathy. Spine (Phila Pa 1976). 2012 Jan 15;37(2):108-13.

5. Kudo H, Furukawa K, Yokoyama T, Ono A, Numasawa T, Wada K, Tanaka S, Asari T, Ueyama K, Motomura S, Toh S. Genetic differences in the osteogenic differentiation potency according to the classification of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. Spine (Phila Pa 1976). 2011 May 20;36(12):951-7.

〔学会発表〕（計 3 件）

1. 原田義史、沼沢拓也、ほか 9 名：脊柱靱帯骨化症患者では脊柱靱帯由来間葉系幹細胞の骨分化能が高い 第 27 回日本整形外科基礎学術集会. (20121026-20121027). 名古屋市

2. 浅利亨、沼沢拓也、ほか 8 名：ヒト脊柱靱帯由来間葉系幹細胞の分離方法による違いの検討 第 27 回日本整形外科基礎学術集会. (20121026-20121027). 名古屋市

3. 沼沢拓也、ほか 8 名：Association between radiological cervical degeneration and daily living neck function and pain in the community.

Annual meeting of Eurospine
(20111019-20111021) .Milan

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

沼沢拓也 (Numasawa Takuya)

弘前大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：80396407