

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年8月27日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659720

研究課題名（和文） 後縦靭帯骨化症の発症に関与する疾患関連遺伝子の検索、異所性骨化機序の解明

研究課題名（英文） Evaluation of mechanism of ossification of the posterior longitudinal ligament and identification of candidate disease gene associated with ossification of the posterior longitudinal ligament

研究代表者

岡本 健 (OKAMOTO TAKESHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30414113

研究成果の概要（和文）：

後縦靭帯骨化症患者由来の皮膚組織また血液から人工多能性幹細胞(iPS)を作成した。作成したiPS細胞から骨芽細胞を誘導し、正常人由来のiPS細胞と骨芽細胞分化能を比較した結果、両細胞間で分化能に差は認められなかった。次に作成したiPSから靭帯前駆細胞を誘導した。正常人由来iPSから誘導した靭帯前駆細胞との間で網羅的遺伝子解析を行い、異所性骨化機序に関与する可能性のある候補遺伝子を抽出した。

研究成果の概要（英文）：

Human induced pluripotent stem cells were established from the patients with OPLL. We performed osteogenic induction and ligamentocyte induction from the OPLL-iPS. No difference was observed in osteoblastic induction potential between the OPLL-iPS and iPS from healthy control patients. Gene expression profiling in ligamentocyte-precursor cells induced from OPLL-iPS was evaluated. Comparing gene expression profile with that of the iPS from healthy control patients, candidate genes which may be associated with mechanism of ectopic ossification of the posterior longitudinal ligament in OPLL patients were selected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：脊椎脊髄病学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、整形外科

キーワード：マイクロアレイ、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

OPLLは、椎体背側に位置するPLLが肥大骨化し、その結果圧迫性脊髄障害が

発生し、進行すれば四肢麻痺に至る疾患である。40歳以上に好発し、約2対1で男性に多い。本邦では成人外来患者の頸椎疾患のなかで1.5～4.9%に発見され

ている。特定疾患治療研究事業対象に指定されている難病であり、治療法は外科的治療が主体であるが、病巣再発もあり、病因病態は明らかにされていない。多因子疾患と考えられており、遺伝的素因、性ホルモンの異常、カルシウム・ビタミンDの代謝異常、糖尿病、肥満傾向、老化現象、全身的な骨化傾向、骨化部位における局所ストレスなどの関与が疑われるが、発症機構は未だ不明である。

遺伝的素因に関しては、これまでに連鎖解析により、第11型コラーゲンA2遺伝子、NPPS遺伝子、第6型コラーゲンA1遺伝子、TGF β 3遺伝子等のSNPとの相関が報告されているが、個々のSNPと病態との関連は明らかにされていない。

一方、近年、難治性疾患に対する新しい解析ツールとして二つの革新的技術が開発されている。一つは、2006年にマウスで、2007年にヒトで創成されたiPS細胞作製技術である。皮膚線維芽細胞などの成熟分化した体細胞に、多能性誘導因子であるOct3/4, Sox2, Klf4, cMycをウイルスで導入し、強制発現することにより、様々な組織や臓器の細胞に分化する能力を獲得した細胞を作成することができる。疾患罹患者の体細胞からiPS(induced pluripotent stem)細胞を樹立し、さらにそこから病態の原因となっている細胞を誘導し、in vitroで病態を再現することで、病因の解明及び創薬につながることを期待される。もう一つが、次世代シーケンサーの開発であり、全ゲノム解析を含む大量の塩基配列情報を迅速に入手することが可能となった。そこで申請者は両者の技術を応用してOPLLの遺伝的素因の解明を計画するに至った。

解析対象を遺伝的素因の関与が強く疑われる症例に限定することで、その集団における疾患関連遺伝子を同定し、異所性骨化発生の解明のための基盤となる知見を得ることを目標とした。

本研究により、一部の患者集団ではあるが、OPLLの発症に関与する遺伝的素因が明らかになれば、遺伝的素因のない患者の病態を解明する上においても、極めて貴重な手がかりとなり、最終的には、全ての病態の進行を阻害するような薬剤の開発へとつながることが期待され、その意義は極めて大きいと考えた。

2. 研究の目的

代謝性疾患の合併がなく、胸椎部に高度の連続型骨化巣を有する後縦靭帯骨化症(Ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine, 以下OPLL)の患者を対象として、OPLLの発症に関与する疾患関連遺伝子を探索し、その発症の分子機構を解明することを目的とした。

特に解析対象を遺伝的素因の関与が強く疑われる症例に限定することで、その集団における疾患関連遺伝子を同定し、異所性骨化発生の解明のための基盤となる知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 対象患者の選定

京都大学医学部整形外科において、治療中の患者より下記の選択基準で解析対象者を選定する。

- ①胸椎に骨化巣を有する
- ②単純X線で検出可能な広範囲(3椎体以上)かつ連続型であること
- ③糖尿病など、治療対象となる明らかな疾患を合併していない

現時点のデータファイルからは、約15名程度の解析対象候補者が存在しており、そのうち10名より試料を採取することを目標とする。

(2) 体細胞の採取

京都大学大学院医学研究科・医学部医の倫理委員会に申請・承認済みの「ヒト疾患特異的iPS細胞の作成とそれを用いた疾患解析に関する研究」の内容に基づいて説明を行い、同意を取得した後、皮膚組織あるいは末梢血を採取する。

(3) iPS細胞の作製

4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4及びc-Myc)をレトロウイルスで導入する標準的方法により、iPS細胞を作製する。

(4) 靭帯マーカー遺伝子の導入

スクレラキシス遺伝子を利用した靭帯前駆細胞単離用マーカー遺伝子を、作製したiPS細胞に導入する。

(5) 靭帯細胞への分化誘導

胚様体形成法を介して間葉系細胞を単離し、種々の増殖因子を用いて導入したマーカー遺伝子の発現を指標として、靭帯前駆細胞を誘導する。

(6) 靭帯細胞の発現プロファイルの把握 誘導したOPLL由来靭帯前駆細胞と正

常人由来靭帯前駆細胞の遺伝子発現を、マイクロアレイにより比較検討し、発現の異なる遺伝子群を抽出する。

(7) 解析対象遺伝子の選定

正常人由来 iPS 細胞から樹立した靭帯細胞の遺伝子発現プロファイルとの比較から、全 10 例の OPLL 患者由来靭帯細胞で共通して発現が変化している遺伝子を同定し、その遺伝子群の中から、発現の相違の大きいものを約 100 種類選定する。

(8) 塩基配列解析

次世代シーケンサーを用いて、まず一つのサンプルで約 100 種類の遺伝子でイントロン領域を含む全領域の網羅的遺伝子配列解析を行う。これをデータベース登録の配列と比較し、相違点を同定する。

(9) 解析対象遺伝子の同定

同定した相違点に関して、残りの 9 サンプルの塩基配列を解析し、共通性を検討する。共通した変異が無い場合は、次のサンプルについて同様な解析を行う。これらの方法により、多数のサンプルで共通した変異をもつ遺伝子を、遺伝的素因関連関連遺伝子として同定する。

4. 研究成果

(1) 京都大学医学部整形外科において治療中の OPLL 患者のうち、

- ①胸椎に骨化巣を有する
- ②単純 X 線で検出可能な広範囲 (3 椎体以上) かつ連続型である
- ③糖尿病等、治療対象となる明らかな疾患を合併していない

の選択基準を満たす 7 名の日本人解析対象者より同意を取得のうえで皮膚組織を採取し、4 因子(Oct3/4、Sox2、Klf4 及び c-Myc)をレトロウィルスベクターで導入する方法により、iPS 細胞を作製した。また、このうち 1 名の解析対象者においては、同様の 4 因子を episomal vector を用いて導入する方法で、iPS 細胞を樹立することに成功した。さらに別の 1 名の解析対象者から同意を得て採取した末梢血からも、episomal vector を用いて iPS 細胞を樹立することに成功した。得られた細胞は、導入遺伝子のサイレンシング、ES 細胞マーカー遺伝子の発現、染色体以上の有無、胚葉体形成による多分化能の評価等の標準的機能評価法を用いて、至適なクローンを

複数クローン得ることに成功している。

(2) 異所性骨化の in vitro アッセイ系の確立

OPLL に罹患していない正常人由来の iPS 細胞からいったん胚葉体形成を経て、骨細胞および軟骨細胞を含む細胞集団を誘導する分化誘導法を確立した。また正常人由来 iPS 細胞から、直接単層培養を行うことにより、石灰化結節形成を誘導する分化誘導法を確立した。

この手法を OPLL-iPS 細胞に適用した。その結果、胚葉体形成を経て、骨細胞および軟骨細胞を含む細胞集団を誘導する方法、及び単層培養から石灰化結節を分化誘導する方法いずれにおいても、正常人由来 iPS 細胞と OPLL-iPS 細胞の間で骨分化能は有意な差が見られないことが判明した。

(3) 靭帯細胞マーカー遺伝子の導入

靭帯細胞のマーカー遺伝子として知られるスクラレキシス遺伝子を、作成した iPS 細胞にレトロウィルスを用いて導入した。導入した細胞でスクラレキシス遺伝子が恒常的に発現していることを確認した。

(4) 靭帯細胞への分化誘導

スクラレキシスを導入した正常人由来 iPS 細胞に骨形成タンパク質の一つである BMP-12 を添加して培養することにより、I 型コラーゲン、ラミニン、テノモジュリンの発現が増加し、すなわち iPS 細胞が靭帯前駆細胞への分化形質を持つことを確認した。この手法を OPLL-iPS 細胞に適用し、OPLL-iPS 細胞から靭帯前駆細胞への分化誘導を行った。

(5) 骨芽細胞への誘導

OPLL-iPS 細胞から誘導した靭帯前駆細胞に、前述 (2) で確立した異所性骨化の in vitro アッセイ系を導入して、骨芽細胞または骨細胞への分化誘導を行った。分化誘導によりアルカリフォスファターゼ染色性及びオステオカルシンの発現が増加し、iPS 細胞が骨芽細胞への分化能を有した。その結果、胚葉体形成を経て、骨細胞及び軟骨細胞を含む細胞集団を誘導する方法、及び単層培養から石灰化結節を分化誘導する方法いずれにおいても、野生型 iPS 細胞と OPLL-iPS 細胞の間で骨分化能は有意な差が見られないことがわかった。

(6) 靭帯前駆細胞の発現プロファイルの把握

OPLL 患者から樹立誘導した靭帯前駆細胞 3 株と健常人由来 iPS 細胞から誘導した靭帯前駆細胞 1 株の遺伝子発現を、マ

マイクロアレイにより網羅的に比較した。この結果、OPLL 患者由来靭帯前駆細胞で共通して 2 倍以上発現量が異なる遺伝子 85 種類を選択した。

現在、他の検体においても発現量の変化が共通しているかどうかを確認中である。

本研究の本来の目的は発現量の異なるこれらの遺伝子群の全領域の塩基配列を次世代シーケンサーにより決定し、相違点を同定すること、及びこれらの遺伝子によりコードされるタンパクの OPLL の異所性骨化への関与を解明することにある。しかし今回の研究結果によれば、少なくとも OPLL 患者の皮膚組織由来の線維芽細胞から樹立した iPS 細胞は、正常人由来の皮膚から樹立した iPS 細胞と比較して、in vitro での異所性骨化能あるいは骨芽細胞への分化能に有意な差がないことが判明した。また両者の iPS 細胞に靭帯細胞または靭帯前駆細胞のマーカー遺伝子とされるスクレラキシスを導入した細胞においても、in vitro での異所性骨化能あるいは骨芽細胞への分化能に有意な差が認められなかった。したがって、OPLL-iPS 由来靭帯前駆細胞と野生型 iPS 由来靭帯前駆細胞間の遺伝子発現プロファイルの差が OPLL 発症に関連する遺伝子解明につながるかどうかは不明である。

現在行なっている作業として

①末梢血由来の iPS においても同様の結果であるかどうかを検討する

②手術時に靭帯組織自体を採取し、靭帯組織由来の細胞から iPS を樹立し、分化能を解析する

③スクレラキシスは腱及び靭帯前駆細胞のマーカー遺伝子とされているが、iPS 細胞にスクレラキシスを導入した細胞が、真に脊椎の靭帯組織の細胞を近似しているというエビデンスがない。脊椎の靭帯組織由来の細胞の特異的なマーカーを検索し、これを検証する。

ことを行なっている。

以上まとめると、ヒト iPS 細胞から間葉系細胞を誘導することに成功し、特に異所性骨化能、骨細胞への分化能を比較するアッセイ系を確立した。未だ不明な OPLL の遺伝的素因解明の第一歩となる研究であると考え。脊椎の靭帯組織を構成する細胞への分化誘導系が確立できれば、本研究の目的に大きく近づけると確信する。今後引き続き計画を継続し、成果を得る予定である。

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)

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 健 (OKAMOTO TAKESHI)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：30414113

(2) 研究分担者

根尾 昌志 (NEO MASASHI)
大阪医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：80311736
戸口田 淳也 (TOGUCHIDA JUNYA)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：40273502

(3) 連携研究者

なし