

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590310

研究課題名(和文) 脊柱靭帯骨化症の病因として間葉系幹細胞が果たす役割の解明

研究課題名(英文) Role of mesenchymal stem cells as a cause of ectopic ossification of spinal ligament

研究代表者

古川 賢一 (Furukawa, Ken-Ichi)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20165468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は『脊柱靭帯の間葉系幹細胞が、骨芽細胞様細胞へ間違っただ分化し、靭帯組織が骨化する』という仮説の検証を目標にした。

まずヒト脊柱靭帯組織に間葉系幹細胞が存在することを証明した。つぎに靭帯組織での局在と、骨化に伴う局在変化を検討した。その結果、正常時に血管周囲にのみ存在した間葉系幹細胞が、骨化で靭帯実質部全体に分布し、特に骨化移行部に集中することを明らかにした。最後に患者の間葉系幹細胞と正常のものとの多分化能を比較し、前者は正常のものに比して、骨分化能が極めて高いことを明らかにした。

いずれの結果も上記仮説を支持し、形質転換した間葉系幹細胞が重要な役割を果たすことを示している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research was to inspect our hypothesis "Mesenchymal stem cells (MSCs) existing in human spinal ligament differentiate into osteoblasts by mistake, resulting in ossification of the ligament tissues."

First, it was proved that MSCs exist in human spinal ligament. Second, it was revealed that MSCs localize around blood vessels in normal tissue, but they distribute over the whole ligament tissue and, especially, ossification front. And third, we revealed the high osteogenicity of MSCs from patient's tissue compared to normal one.

All these results support our hypothesis and indicate an important role of MSCs in ectopic ossification of human spinal ligaments.

研究分野：薬理学

キーワード：間葉系幹細胞 異所性骨化 脊柱靭帯 ニッチ

1. 研究開始当初の背景

脊柱靱帯骨化症は、脊髄が走行する椎孔内面を走る後縦靱帯・黄色靱帯に骨化・石灰化が起こり、可動性の低下だけでなく脊髄を圧迫して、四肢のしびれ、麻痺さらには脊髄損傷を起こす疾患である。治療法としては侵襲度の極めて高い外科手術しかない。また術後に骨化の再発・進展も見られるなど予後が悪く、安全な薬物治療法・進展予防法の確立が待たれている。

一方、本疾患は家族性も見られることから病因遺伝子の探索が行われたが、決定を見ていない。恐らく遺伝的背景に様々な環境因子、局所因子が加わることによって発症する多因子疾患であるためと推定された。(Furukawa K-I. Pharmacological aspect of ectopic ossification in spinal ligament tissues. *Pharmacology & Therapeutics* 2008;118:352-358.)

そこで我々は、そのような環境因子としての機械的ストレスや様々なホルモン・サイトカインなどの局所因子が骨化のトリガーとなるかどうかを検討した。患者組織および正常組織から靱帯細胞を単離し、これらの刺激を加えたところ、興味深いことに患者組織由来の細胞は種々の骨化関連遺伝子の発現を上昇させ、正常細胞に比して著明な感受性を示した。このことは、「易骨化・石灰化傾向を持つ細胞にそれらの刺激が加わると発症に向かう」ことを示唆し、多因子疾患であるとの考えとも合致した。

さらに、我々が単離培養に成功した靱帯細胞は、靱帯骨化症の研究モデルとして様々な重要な情報をもたらした。しかしその靱帯細胞は集団として易骨化・石灰化能を示すものの、個々の細胞は均一ではない。従って、靱帯骨化・石灰化の機序をより詳細に解明し、それを阻止する優れた薬物治療法確立のためには、その細胞集団の中で骨化・石灰化する細胞の性状、由来を明らかにする必要があった。そこで我々は、靱帯組織内に骨化能も含め、多分化能を有する間葉系幹細胞が存在するのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

研究プロジェクト全体の目標は、難治疾患である「脊柱靱帯骨化症」の病因解明とその薬物治療法確立である。10年にわたる我々の研究成果を踏まえ、『ヒト脊柱靱帯組織に間葉系幹細胞が存在し、それらが様々な環境因子・局所因子に晒されることで骨芽細胞様細胞へ間違っただ分化を起こし、その結果靱帯組織が骨化・石灰化する』と言う仮説を立てた。本研究ではこの仮説を

証明すると共に、治療薬のシーズとするべく、その間違っただ分化を阻止する薬物の探索研究を合わせて行うことを目的とする。

3. 研究の方法

まずヒト脊柱靱帯組織から間葉系幹細胞をセルソーターを用いて単離・精製し、その存在を証明する。次にその脊柱靱帯骨化症患者の組織由来の間葉系幹細胞が易骨化・石灰化能を有することを証明する。また疾患の組織と正常組織で幹細胞の局在やニッチに違いがないかどうかを組織細胞化学的に解析し、間違っただ分化のトリガーの可能性のひとつとして、その環境変化に求められるかどうかを検討する。

4. 研究成果

3年の研究期間において、初年度は、まずヒト脊柱靱帯組織に間葉系幹細胞が存在することを証明するため、その単離を試み、成功した(Asari et al. BBRC 2012)。

次年度は、間葉系幹細胞が骨化にどのように関与するかを明らかにするため、その靱帯組織内での局在と、骨化に伴う局在変化を検討した。その結果、正常時には血管周囲のニッチと呼ばれるところのみ存在した間葉系幹細胞が、骨化の過程で靱帯実質部全体に分布し、特に骨化移行部に集中して存在することが明らかになった。これは異所性骨化の過程に間葉系幹細胞が重要な役割を果たしていることを示す(Chinet al. BBRC 2013)。

そして最終年度は、患者由来の間葉系幹細胞と正常のものとの多分化能を比較した。その結果、患者由来の細胞は、正常のものに比して、骨分化能が極めて高いことが明らかとなった(Harada et al. BBRC 2014)。

以上3つの結果は、いずれも我々の仮説『ヒト脊柱靱帯組織に間葉系幹細胞が存在し、それらが様々な環境因子・局所因子に晒されることで骨芽細胞様細胞へ間違っただ分化を起こし、その結果靱帯組織が骨化・石灰化する』を支持するものであり、骨化の機序に形質転換した間葉系幹細胞が重要な役割を果たしていることが明らかになった。今後はなぜ患者の間葉系幹細胞が高い骨分化能を有するものに形質転換しているのか、その機序を明らかにすることを計画している。それが解明されれば、異所性骨化を抑制する薬物治療の標的が定められるものと期待される。

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11件)

Asari T, Tanaka S, Kudo H, Mizukami H, Ono A, Numasawa T, Kumagai G, Motomura S, Yagihashi S, Toh, S and Furukawa K-I.

Mesenchymal stem cell isolation and characterization from human spinal ligaments. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2012; 417:1193-1199. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.106.

Seya K, Kanemaru K, Matsuki M, Hongo K, Kitahara K, Kikuchi H, **Oshima Y**, Kubohara Y, Okumura K, Motomura S, **Furukawa K-I**. Br-DIF-1 accelerates 1% dimethyl sulfoxide-induced cardiomyocyte differentiation from P19CL6 embryonic carcinoma cells. *British Journal of Pharmacology* 2012;165: 870-879. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01541.x

Nohmi S, Yamamoto Y, Mizukami H, Ishibashi Y, Tsuda E, Maniwa K, Yagihashi S, Motomura S, Toh S, **Furukawa K-I**. Post injury changes in the properties of mesenchymal stem cells derived from human anterior cruciate ligaments. *International Orthopaedics* 2012;36:1515-1522. DOI: 10.1007/s00264-012-1484-y.

Chin S, **Furukawa K-I**, **Ono A**, Asari T, Harada Y, **Wada K**, Tanaka T, Inaba W, Mizukami H, Motomura S, Yagihashi S, Ishibashi Y. Immunohistochemical localization of mesenchymal stem cells in ossified human spinal ligaments. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2013; 436: 698-704. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.06.019.

Nomura A, Seya K, Yu Z, Daitoku K, Motomura S, Murakami M, Fukuda I, **Furukawa K-I**. CD34-negative mesenchymal stem-like cells as the cellular origin of human aortic valve calcification. *Biochemical Biophysical Research Communications*. 2013; 440:780-785. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.003

小野睦、浅利亨、陳俊輔、和田簡一郎、田中利弘、**古川賢一**。脊椎靭帯骨化における間葉系幹細胞の役割。脊椎脊髄ジャーナル 26:163-168, 2013

古川賢一

大動脈弁石灰化の分子機序と薬物治療開発。医薬品相互作用研究 37:1-6, 2013.

Furukawa K-I. Recent Advances in Research of Human Aortic Valve Calcification. *Journal of*

Pharmacological Sciences. 2014;124: 129-137.

Harada Y, **Furukawa K-I**, Asari T, Chin S, **Ono A**, Numasawa T, Mizukami H, Murakami M, Yagihashi S, Motomura S, Ishibashi Y. Osteogenic Lineage Commitment of Mesenchymal Stem Cells from Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. *Biochemical Biophysical Research Communications* 2014;443:1014-1020. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.080.

Nakajima M, Takahashi A, Tsuji T, Karasugi T, Baba H, Uchida K, Kawabata S, Okawa A, Shindo S, Takeuchi K, Taniguchi Y, Maeda S, Kashii M, Seichi A, Nakajima H, Kawaguchi Y, Fujibayashi S, Takahata M, Tanaka T, Watanabe K, Kida K, Kanchiku T, Ito Z, Mori K, Kaito T, Kobayashi S, Yamada K, Takahashi M, Chiba K, Matsumoto M, **Furukawa KI**, Kubo M, Toyama Y, Genetic Study Group of Investigation Committee on Ossification of the Spinal Ligaments, and Ikegawa S. A genome-wide association study identifies susceptibility loci for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Nature Genetics* 2014;46:1012-1016. DOI: 10.1038/ng.3045.

Chiba N, **Furukawa K-I**, Takayama S, Asari T, Chin S, Harada Y, Kumagai G, **Wada K**, Tanaka T, **Ono A**, Motomura S, Murakami M, Ishibashi Y. Decreased DNA methylation in the promoter region of the WNT5A and GDNF genes may promote the osteogenicity of mesenchymal stem cells from patients with ossified spinal ligaments. *Journal of Pharmacological Sciences* 2015;127: 467-473. DOI: 10.1016/j.jphs.2015.03.008.

[学会発表](計 5件)

陳俊輔、**古川賢一** 他、免疫組織化学染色法によるヒト脊柱靭帯における間葉系幹細胞の同定ならびにその局在の検討、第30回日本骨代謝学会、2012年7月20日、東京都

千葉紀之、**古川賢一** 他、後縦靭帯骨化症においてエピジェネティクスの果たす役割の検討、日本整形外科学会基礎学

術集会、2013年7月20日、千葉市
古川賢一 他、脊柱靭帯組織の異所性骨化における間葉系幹細胞局在変化の意義、第65回日本薬理学会北部会、2014年9月27日、福島市

古川賢一 他、脊柱靭帯の異所性骨化患者から得られた間葉系幹細胞の骨分化能の亢進、第87回日本薬理学会年会、2014年3月21日、仙台市

古川賢一 他、脊柱靭帯骨化症患者由来の間葉系幹細胞の易骨化能に関連する遺伝子のマイクロアレイによる探索、第88回日本薬理学会年会、2015年3月19日、名古屋市

〔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：
出願年月日：
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

大島 吉輝 (OSHIMA, Yoshiteru)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：00111302

小野 睦 (ONO, Atsushi)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40400155

(平成24 - 25年度)

和田 簡一郎 (WADA, Kanichiro)
弘前大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20431447
(平成26年度)

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：