様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ５ 月 １７ 日現在

機関番号：１４２０２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：２５８６１３０２

研究課題名（和文）網羅的microRNA発現プロファイリングによる脊柱靭帯骨化抑制療法の開発

研究課題名（英文）Genetic research with microRNAs for cultured cells deriving from ossification of spinal ligament

研究代表者
彌山　峰史（YAYAMA, TAKAFUMI）

滋賀医科大学・医学部・客員助教

研究者番号：６０３６２０４２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：脊柱靭帯骨化は内軟骨性骨化により骨化巣を形成するが、特に骨化前線部の細胞分化の多様性は本症に深く関与している。骨芽細胞の分化を促進させる因子の解明を目的に、網羅的microRNA解析を行った。その結果、有効なプローブが177個抽出でき、その中でも相関性が高いmicroRNAはWnt/β-catenin signalingを標的としていた。さらに免疫染色にてWnt/β-cateninは骨化靭帯の骨化前線の細胞に陽性であった。microRNAの発現変化はWnt/β-catenin signalingを賦活化させ、骨芽細胞の分化を促進させていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The process of ossification of spinal ligament includes enchondral ossification, though such pathology remains poorly defined. In order to clarify the role of microRNAs as regulator of ossification process, we examined with the cultured cells derived from ossification of the spinal ligament. Microarray analysis revealed that 177 microRNAs expressed above the threshold levels, and high relevant microRNA target to the expression of Wnt receptors. In paraffin section, chondrocytes around the calcification front were immunopositive for beta-catenin. Immunoreactivity of Wnt receptors was strongly positive in premature mesenchymal cells around blood vessels. These results suggested that the changes of microRNA expression increased Wnt/beta-catenin signaling pathway, and promote the differentiation of osteoblast in the pathogenesis of ossification of spinal ligament.

研究分野：医歯薬学

キーワード：脊椎脊髄病学　脊柱靭帯骨化　後縦靭帯　黄色靭帯　培養細胞　マイクロRNA　骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

脊柱靭帯骨化（後縦靭帯骨化: OPLL、黄色靭帯骨化: OLF）の病態には、全身性素因として加齢による退行性変性、代謝内分泌異常、生活環境因子、遺伝的因子、また局所素因として成長因子、サイトカイン、力学的負荷など種々の関与が報告されてきた。しかし骨化伸展様式の多様性や骨化領域が脊柱に限局することなど、不明な点も残されている。また、脊柱靭帯骨化に対する治療は神経症状を緩和・改善させるための投薬、脊髄の圧迫を除去する外科的治療が中心であり、骨化を消退、抑制する治療法は存在しない。

病理学的にみると脊柱靭帯の骨化様式は内軟骨性骨化（Miyasaka K, et al. AJNR 1983）であり、軟骨細胞の層状配列からなる骨化前線が存在する。我々のこれまでの研究において、ヒト OPLL、OLF における骨化前線は骨化形態に応じて細胞密度、細胞分化過程が異なっており、これらに関与する成長因子やサイトカインの免疫組織化学的発現について観察した（Yayama T et al. J Neurosurg Spine 2007）。また、骨化靭帯組織から遊走させて得た培養靭帯細胞の特性を観察し、Runx2、Osterix、Wnt/β-catenin といった骨芽細胞分化を促進させる転写因子、シグナル伝達の mRNA 発現が亢進しており、さらに外的負荷（cyclic tensile strain）を加えるとこれらの発現量は有意に上昇することを明らかにできた（Cai HX, Yayama T [CA], et al. Spine 2012; Uchida K, Yayama T [CA], et al. Arthritis Res Ther 2011）。

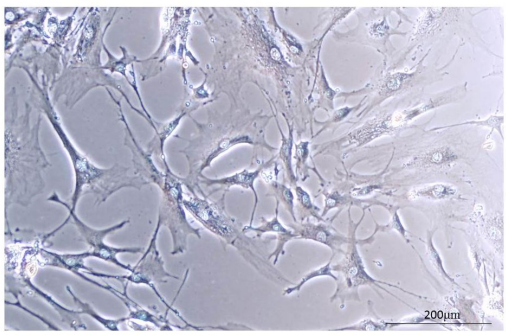
骨芽細胞の分化を誘導する転写因子、サイトカインの過剰発現は、骨代謝における恒常性を損失させ、靭帯骨化の重要な要因と考えられる。しかし、これらの発現調節に関与する因子については、不明な点が多く存在する。

2. 研究の目的

Micro RNA（miRNA）は 19-24 塩基からなる一本鎖 RNA であり、標的とする mRNA に結合して蛋白質の翻訳を抑制することで作用を発揮する。組織・細胞特異性のみならず時空特異性を有して、生体の様々な細胞の分化調節を精密に制御している。正常骨代謝においても特異的な miRNA が作用しており、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスを制御していることが報告されているが（Zhang JF, et al. Mol Biol Cell 2011）、脊柱靭帯骨化のような異所性骨化においてどのような種類の miRNA が発現し、作用しているかは明らかではない。本研究では、網羅的 miRNA 解析を行い、骨化巣形成、骨芽細胞分化に関与する標的遺伝子の発現について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

脊柱靭帯骨化症（後縦靭帯骨化: n=15, 黄色靭帯骨化: n=12）、非靭帯骨化患者（頚椎椎間板ヘルニア、頚椎症性脊髄症: n=10）の手術時に採取した靭帯組織を対象とした。採取した組織は、無菌的に骨組織を除去したのち、細断した靭帯細胞から FBS 添加 DMEM 培地下に Explant 法にて細胞を遊走させた（Alex P et al, Biochemical J 2003）（図 1）。また、組織の一部は 0.05N EDTA にて脱灰後に薄切標本（4μm）を作製し、病理組織学的検討に用いた。



（図 1: 遊走法による培養靭帯細胞）

① 網羅的 miRNA 解析

骨化靭帯および非骨化靭帯由来の培養細胞に対して、網羅的 miRNA 発現プロファイリングを行い、miRNA の発現を観察する。培養靭帯細胞から total RNA を抽出して hybridization したのち、scanning、dChip によるデータ解析を行う。miRNA の発現抑制、発現亢進が heat map にて観察でき、シグナル強度比にて定量化する。

② 転写因子、シグナル伝達解析

培養靭帯細胞、薄切した組織切片に対して、

ABC 法に準じた免疫組織化学的染色を行う。また Western blotting 法にて半定量化を行う。一次抗体には Wnt (Wnt 3a、5a、7a)、Wnt receptors (Lrp6、Frizzle 1、3)、β-catenin を使用した。

③ サスペンションアレイシステムによる成長因子、サイトカイン解析

培養靭帯細胞の細胞膜を破砕し、細胞成分の解析を行う。サスペンションアレイシステムは、1 検体あたり最大 100 種類のサイトカイン、ケモカイン等をフローサイトメーターの原理に基づき、レーザーによる蛍光強度で同時に検出・定量できるシステムである。プロファイリングパネルは Bio-Plex™Pro（BIO-RAD）を用いて行い、各因子の発現について定量化を行う。

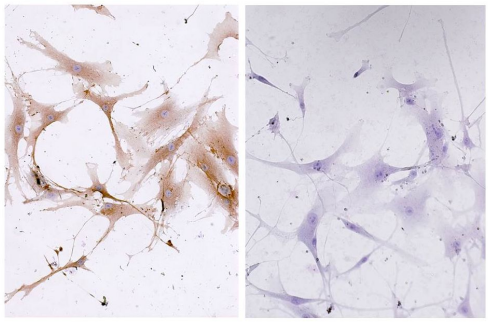
（倫理面への配慮）

脊椎手術を受ける患者及びその家族に対し、本研究の目的を十分に説明し書面での同意を得られた場合にのみサンプルとして組織を使用する。本研究は手術時に採取した組織を使用するものであり、研究協力者に身体的苦痛や不利益を生じるものではないことを含め、研究の目的、内容についてわかりやすく説明を行う。個人データは全て暗号、匿名化し、個人情報の保護に十分配慮する。

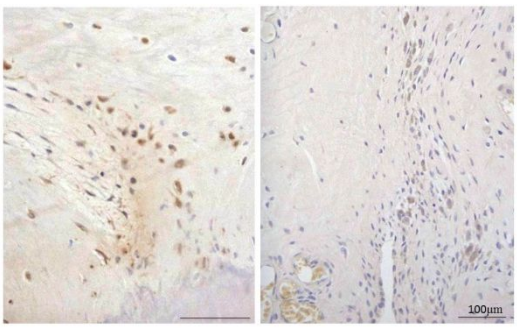
4. 研究成果

網羅的 miRNA 解析の結果では、脊柱靭帯骨化症例に有効とされたプローブ数は 177 であり、その内訳は up-regulation 58、down-regulation 119 であった。このうち False Discovery Rate 0.05 以下を満たした miRNA が標的とする遺伝子に Wnt receptor が存在した。また、炎症性サイトカインも標的遺伝子の 1 つとしてあげられた。

免疫組織化学染色では、骨化靭帯由来の培養細胞において Wnt 3a、Wnt 7a、β-catenin の発現が細胞質を中心に陽性であった（図 2）。Western blotting では β-catenin の発現量は有意に上昇しており、Lrp 6、Frizzle 3 の発現も高値となる傾向にあった。薄切切片において骨化前線部を免疫組織化学的に観察すると、β-catenin は石灰化前線近傍の増殖期軟骨細胞、Wnt および Wnt receptors は未分化間葉系細胞に強く発現していた（図 3）。



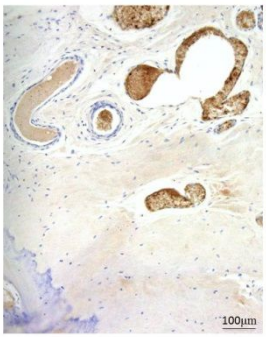
（図 2: 培養靭帯細胞のβ-catenin 免疫染色、左: 骨化靭帯由来、右: 非骨化靭帯）



（図 3: 骨化前線の免疫染色、左: Wnt3a、右: Wnt receptor（Lrp6））

以上の結果より、miRNA の down regulation によってその標的遺伝子である Wnt/β-catenin signaling の賦活化が生じていることが推測された。このような miRNA の発現変化により Wnt/β-catenin signaling の恒常性が破綻し、骨芽細胞の分化誘導がより活性化されることが示唆された。

骨化靭帯由来の培養細胞に対してサイトカイン解析を行ったところ、炎症を惹起するサイトカインである TNF-α、IL-1、IL-6、IL-17 の発現量は、比較対象である非骨化靭帯由来の培養細胞よりも高値を示していた。さらには、炎症の抑制系に作用するとされている IL-10、IL-15 などの発現も同様に高値を示していた。免疫組織染色によってサイトカインの局在を観察すると、骨化巣近傍の小血管叢、間葉系幹細胞に強く発現していた（図 4）。



	靭帯骨化群	対象群
IL-1β	28.4±10.1	16.6±4.5
IL-2	46.0±5.2	25.9±5.5
IL-6	303.4±192.8	66.0±27.7
IL-9	46.4±5.7	25.2±5.7
IL-10	81.9±26.2	43.3±11.2
IL-13	104.7±38.9	46.3±18.9
IL-15	77.9±17.5	33.4±14.8
IL-17	50.6±7.7	30.7±8.1

（図 4: 右: IL-17 免疫染色、左: 代表的なサイトカインの解析結果）

この結果よりサイトカインの発現パターンが変化することで、少なくとも骨化靭帯細胞における骨代謝バランスが失われた状態にあると推測している。

今後の研究課題として、外的負荷や細胞共存状態での miRNA **の変化、サイトカインの発現バランスを変化させたときの** miRNA **へのフィードバックなどについて検討を進め、より詳細に脊柱靭帯骨化における** miRNA **の役割を解析する計画である。**

5. **主な発表論文等**

〔雑誌論文〕（計 4 **件）**

1. Uchida K, Nakajima H, Takeura N, Yayama T, Guerrero AR, Yoshida A, Sakamoto T, Honjoh K, Baba H. Prognostic value of changes in spinal cord signal intensity on magnetic resonance imaging in patients with cervical compressive myelopathy. Spine J 14: 1601-10, 2014.
（査読有）

2. **彌山峰史. 整形トピックス 脊柱靭帯骨化における内軟骨性骨化へのサイトカインの関与. 整形外科** 38: 1364, 2014.
（査読無）

3. Sugita D, Yayama T, Uchida K, Kokubo Y, Nakajima H, Yamagishi A, Takeura N, Baba H. Indian hedgehog signaling promotes chondrocyte differentiation in enchondral ossification in human cervical ossification of the posterior longitudinal ligament. Spine (Phila Pa 1976) 38: E1388-E1396, 2013.
（査読有）

4. 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) 37: E639-E646, 2012.
（査読有）

〔学会発表〕（計 3 **件）**

1. **彌山峰史. 脊柱靭帯に生じる石灰化と骨化. 近江八幡・東近江整形外科懇談会**, 2014.

2. **彌山峰史, 内田研造, 杉田大輔, 中嶋秀明, 吉田 藍, 本定和也, 馬場久敏. 脊柱靭帯骨化巣形成過程における免疫機構の関与. 第** 42 **回日本脊椎脊髄病学会**, 2013.

3. **彌山峰史, 内田研造, 杉田大輔, 小久保安朗, 中嶋秀明, 坂本拓己, 馬場久敏. 脊柱靭帯骨化における内軟骨性骨化と免疫機構の関与. 第** 28 **回日本整形外科学会基礎学術集会**, 2013.

〔図書〕（計 0 **件）**

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 **件）**

○取得状況（計 0 **件）**

6. **研究組織**

(1) **研究代表者**

彌山 峰史（YAYAMA TAKAFUMI）
滋賀医科大学・医学部・客員助教
研究者番号：60362042