

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462235

研究課題名(和文) ヒト後縦靭帯骨化症における伸展ストレスと遺伝子タンパク発現量変化に関する検討

研究課題名(英文) The evaluation of protein expression and cyclic tensile strain of human OPLL

研究代表者

杉田 大輔 (Sugita, Daisuke)

福井大学・学術研究院医学系部門・助教

研究者番号：90596678

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト頸椎OPLLから得られた骨化組織を含んだ後縦靭帯から得た培養細胞に24時間の伸展ストレスをかけた後の遺伝子発現量の変化をマイクロアレイで検討したところ、Ihhとそのシグナリングに関連した遺伝子の発現量上昇が確認できました。また、Ihhとその受容体であるGli2、Gli3や軟骨分化に関与するSox9、Runx2の伸展ストレスによるタンパク発現量をウエスタンブロットティングで検討したところ、経時的にタンパク発現量増加が見られました。これらのことからOPLLの骨化巣伸展では、内軟骨骨化でも重要な役割を持つIhhが関与している可能性が考えられ、さらにその発現は伸展ストレスで増加すると予想されます。

研究成果の概要(英文)：The genes related to chondrogenesis, including Ihh, Sox9, and Runx2, were upregulated after a 24-hour strain exposure. Furthermore, the protein expression levels of Gli2 and Gli3 were upregulated after a 6-hour cyclic tensile strain exposure, the protein expression levels of Ihh, Sox9, and Runx2 were upregulated after a 12-hour strain exposure. In addition, the Ihh, Sox9, Gli2, and Gli3 proteins were expressed in the proliferating chondrocyte layer, Runx2 was expressed in the hypertrophic chondrocyte layer, and PTHrP was expressed in both layers at the ossification front of OPLL. Our results suggest that cyclic tensile strain might enhance the expressions of some genes and proteins related to differentiation or maturation of chondrocytes, and Ihh and its related signaling might play a key role in human OPLL.

研究分野：脊椎後縦靭帯骨化症

キーワード：OPLL インディアンヘッジホッグ 内軟骨骨化 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

後靭帯骨化症 (OPLL) は多因子疾患と考えられており、全身性素因として加齢や、糖尿病などの代謝異常、局所的素因としては脊椎の可動性と関連した mechanical strain、転写因子 (Runx2, BMP2, IGF1 など) の関与などが挙げられている。

本症はアジア人に多く発症するという点から遺伝的素因の究明が進められており、COL6A1 gene、COL11A2 gene、chromosome 6 などの関与が指摘されており、(Sakou T, et al. Spine 1991, Tanaka T, et al. Am J Hum Genet 2003, Karasugi T et al. J Bone Miner Metab, 2012)、厚生労働省の研究班を中心とした遺伝子解析では OPLL と関与している可能性の高い6つのゲノム領域が指摘されるに至った (Nakajima M et al. Nat Genet, 2014)。しかし、それらの遺伝子の具体的な関与は未だに不明であり、また、

靭帯骨化が脊椎領域 (前縦靭帯、後縦靭帯、黄色靭帯、棘間靭帯など) に限局する

限局型、分節型、連続型、混合型など骨化巣の形態、進展方向に個人差が存在する

骨化領域の縮小や消退はほとんど観察されず、外科的除圧術後に残存した骨化巣が肥大化する

例が見られるなど、本症の病態には不明な点も多く残されている。

病理組織学的にみると、脊柱靭帯骨化の骨化過程は内軟骨性骨化である (Miyasaka K, et al. AJNR Am J Neuroradiol 1983)。我々はこれまでの研究で、ヒト後縦靭帯骨化症およびヒト黄色靭帯骨化症の手術で得られた骨化層を含む靭帯組織について組織学的・免疫組織化学的解析を行い、骨化形態に応じて骨化前線部は層状構造の幅の拡大、特に連続型では肥大化した軟骨細胞層を伴った、幅の広い骨化前線が見られること、弾性線維の断片化・消失と周囲の小血管の増生などを確認し報告した。(Yayama T et al, J Neurosurg Spine, 2007, Sato R et al, J Neurosurg Spine, 2007)。

OPLL の骨化伸展は内軟骨骨化の形態をとることは上で述べたが、通常の四肢長管骨の成長過程においては骨化に先立つ軟骨細胞の分化、肥大が重要である。OPLL においては

骨化前線、特に石灰化前線の近傍には多数の軟骨細胞が存在し、成長因子や転写因子を発現することから、軟骨細胞の誘導、肥大化が脊柱靭帯骨化の骨化形成においても重要な過程であることが示唆される。軟骨細胞は未分化間葉系細胞 (mesenchymal cells) より分化すると考えられるが、この分化過程においてどのような生物学的変化を生じるかについては明らかではない。さらに、人体の中でも脊柱靭帯においてのみ骨化を形成するという事実は、この部位の細胞が骨化形成を誘導する何らかの特異性を有することが示唆されるが、この点についても不明のままである。また、後縦靭帯で起こっていると考えられている内軟骨骨化には幹細胞が重要な役割を持つことが考えられるが、幹細胞の由来についても不明な点が残されている。tip toe walking Yoshimura マウス (*twy/twy* マウス) は、成長に伴って後環軸間膜に骨化を生じ、脊髄を圧迫する慢性脊髄圧迫モデルマウスとして知られている (Hosoda Y, Yoshimura Y et al. リウマチ.1981)。このマウスは後環軸間膜の他にも成長に伴って四肢の筋肉・腱や、大血管に石灰化・骨化をきたすことが知られており、これを用いて骨化巣伸展において骨芽細胞や軟骨芽細胞に分化する幹細胞の由来についての検討も行う予定である。

2. 研究の目的

後縦靭帯骨化症は骨化巣が緩徐に肥大化し、脊髄を圧迫することで重篤な神経症状を呈する疾患である。本症の治療は神経症状を緩和・改善させるための投薬、リハビリテーションや外科的治療が中心であるが、リハビリテーションや投薬は既存の症状の緩和であり、また、外科的除圧に関しては特に前方除圧術による直接的な骨化巣の摘出を行えない巨大な OPLL 症例に対しては後方からの除圧が行われるが骨化巣を残すという問題が残り、術後長期の経過で再度神経症状の増悪を呈する例も存在する。本研究の目的は骨化靭帯細胞の生物学的特性や骨化の分化誘導に関与する因子の特徴を見出すことであり、これにより脊柱靭帯骨化の骨化巣の伸展機序の解明、骨化靭帯の細胞分化の制御という観点からみた、骨化制御療法の開発に有用な情報をもたらすと考えられる。

3. 研究の方法

脊柱靭帯骨化患者（後縦靭帯骨化：n=10、黄色靭帯骨化：n=10）、非靭帯骨化患者（頸椎椎間板ヘルニア、頸椎症性脊髄症：n=10）の手術時に採取した靭帯組織を対象とする。線維方向に縦切した組織の半分は脱灰後に薄切標本（4 μ m）を作製し、組織学的検討に用いる。一方の組織から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る（Alex P et al, Biochemical J 2003）。得られた細胞は confluent になったところでトリプシンを用いてシャーレからはがして別の複数のシャーレへ移すという継代培養を5継代行って実験に用いる。我々はこれまで薄切切片を用いた免疫組織化学的染色を用いて、骨化前線周囲の I 型、II 型コラーゲンや TGF- β 、Runx2、Sox9 といった転写因子の発現と局在について報告してきた（Sato R et al. J Neurosurg Spine, 2007、Sugita D et al. Spine, 2013）が培養した靭帯細胞を直接免疫組織化学的に染色して培養細胞の持つ生物学的特性について検討を行う予定である。検討する転写因子としてはこれまで薄切切片で評価してきた Ihh、Runx2、Sox9、PTHrP などのほかに以前から OPLL との関連を指摘されている骨性 ALP、BMP2 や Osterix、Cbfa1、CEBP β などについても検討を考えている。

Cyclic tensile strain の添加

培養靭帯細胞を Flex I flexible bottomed plate（ストレス処置群）、Flex II flexible control plate（コントロール群）に播種し、mechanical strain を加える。ストレス条件は Flexercell strain unit (FX3000) により、1-10 秒間伸展（最大 20% 牽引）、1-10 秒間の弛緩を継続的に加える。伸展の数値（20%）については脊椎後縦靭帯にかかる伸展力が約 26% であるという点（White AA IIIrd, Panjabi MM et al. Clinical Biomechanics of the Spine, 1990）、またこれまでの mechanical strain を用いた報告（Iwasa T et al. Calcif Tissue Int, 2006、Cai HX et al. Spine, 2012）から設定した。継続時間は 0 時間、6 時間、12 時間、24 時間として行う。Mechanical strain を加えた培養細胞の転写因子の発現量の変化をウェスタンブロッティ

ング法を用いて半定量化する。培養細胞を用いた実験であるため連続反応時間を長期にすることは困難であるが、可能であれば 48-72 時間まで mechanical stress を加えることを検討している。我々はこれまで培養細胞に関して一部の転写因子の発現量は非 OPLL 群よりも亢進していることを報告してきた（Sugita D et al. Spine, 2013）が、cyclic tensile strain を加えることでその発現が経時的に発現量の変化を示すのかを検討する予定である。

DNA マイクロアレイ

Gene Chip 解析には Agilent 社の Gene Chip 1 色法 Array を用いる。得られた結果の解析には Agilent 社の Gene Spring GX 12 を用いて行う。Fold 1.5~2.5 (Fold change に関しては値の設定について絶対の数値は存在しないため遺伝子数に応じて 1.5~2.5 の間での設定を考慮している。) で発現変動のあった遺伝子の解析を行い、クラスター解析、pathway 解析によって遺伝子発現の変動について検討を行う。我々がこれまで注目してきた転写因子の遺伝子発現量についてももちろん検討するが、それらの発現パターンと似た発現波形を示す遺伝子やそれ以外の発現亢進を示す遺伝子に関して網羅的な解析を予定している。

4. 研究成果

免疫組織化学的染色では Ihh、Ihh の受容体である Gli2、Gli3 の骨化前線周囲の発現および局在について確認できた。また、軟骨細胞分化に関与する Sox9 や Runx2 の発現と局在についても確認できた。Ihh と共約する PTHrP についても骨化前線における発現と局在が確認できた。

Western Blotting 法では得られた培養細胞に cyclic tensile strain を負加することで培養細胞における Ihh、Gli2、Gli3、Sox9、Runx2 のタンパク発現の経時的な変化が確認できた。Gli2 は Ihh の抑制的な受容体であり、24 時間の cyclic tensile strain 負荷でその発現は減少しており、その他のタンパク発現はいずれも 12 - 24 時間で発現の増加が見られた。

DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析では 24 時間の cyclic tensile strain 負

荷によって Ihh と Ihh シグナリングの遺伝子発現が上昇しているのが確認できた。

5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) ヒト頸椎 OPLL 骨化巣における mechanical strain と Ihh signaling の発現に関する検討. 杉田大輔、中嶋秀明、竹浦直人、高橋 藍、本定和也、山岸淳嗣、小久保安朗. 2016 年 10 月 13 日～14 日, 第 31 回日本整形外科基礎学術集会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
- 2) ヒト頸椎 OPLL の骨化巣における軟骨細胞分化、肥大に關与する遺伝子およびタンパク発現に関する検討. 杉田大輔、中嶋秀明、本定和也、坂本拓己、竹浦直人、北出誠、内田研造. 2016 年 5 月 12 日～15 日, 第 89 回日本整形外科学会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 3) OPLL 骨化前線における Ihh とその受容体のタンパク発現量と発現の局在に関する検討. 杉田大輔、中嶋秀明、竹浦直人、吉田 藍、本定和也、内田研造. 2016 年 4 月 14 日～16 日, 第 45 回脊椎脊髄病学会, 幕張メッセ(千葉県千葉市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉田 大輔 (SUGITA Daisuke)
福井大学・学術研究院医学系部門・助教
研究者番号：90596678

(2)研究分担者

中嶋 秀明 (NAKAJIMA Hideaki)
福井大学・学術研究院医学系部門・講師
研究者番号：10397276