

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10410

研究課題名(和文) 脊柱靭帯骨化症発症に重要な内軟骨性骨化変化の責任機能遺伝子同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of candidate causal genes of the ossification of posterior longitudinal ligament of the spine

研究代表者

河村 一郎 (Kawamura, Ichiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員准教授

研究者番号：90535832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの後縦靭帯と他部位の靭帯からのmRNA採取を行い、遺伝子発現比較することにしたが、マウスの後縦靭帯は小さく、ごく微量のmRNAしか採れない為に解析は困難であった。そこで、GWAS疾患感受性ゲノム領域から候補遺伝子を選んでOPLL組織における発現を、免疫組織化学染色で検討を開始した。候補遺伝子のうち、STK38L、CDC5L、CCDC91、PLCB1、RSP02について、OPLL臨床組織サンプル に対して免疫組織化学染色を行なった。その結果、いずれの蛋白もOPLL変性靭帯細胞に強い発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：We tried to isolate mRNA from posterior longitudinal ligament of cervical spine of mice, however, we could not because the tissue was too small. We selected candidate causal genes of OPLL in the sensitive genome area identified by GWAS, and performed immunohistochemistry against the coding proteins. All the selected proteins were detected in the degenerated ligament cells in the OPLL specimens.

研究分野：整形外科学、脊椎外科学

キーワード：後縦靭帯骨化症 GWAS

1. 研究開始当初の背景

脊椎後縦靭帯骨化症(OPLL)や黄色靭帯骨化症(OYL)は、特に高位脊髄レベルで発症すると深刻な日常生活障害を来し、手術以外に根本治療が無く、時期を逸すると治療効果も十分ではない場合がある事から、厚生労働省により難病に指定されている。我々の教室ではこれまで精力的に OPLL/OYL の病態と原因遺伝子の解析を行っており、骨形成蛋白(BMP)の関与(Yonemori K *et al*, *Am J Pathol*, 1997; Hayashi K *et al*, *Bone*, 1997)、そして OPLL 原因候補遺伝子として COL11A2 を同定し(Koga H *et al*, *Am J Hum Genet*, 1998)、その OPLL に有意な一塩基多型(SNP)に性差がある事(Maeda S *et al*, *J Hum Genet*, 2001)と、これが実際に COL11A2 mRNA に構造変化を与える事を明らかにした(Maeda S, *et al*, *J Bone Miner Res*, 2001)。最近、本研究代表・分担者を含む厚生労働省[脊椎靭帯骨化症に関する調査研究班]は大規模のゲノムワイド関連解析(GWAS)を行い、6つの疾患感受性ゲノム領域を特定した(Nakajima M *et al*, *Nature Genet*, 2014)。原因遺伝子解明に光明が見えたが、その特定と解析にはまだまだ時間がかかる。なぜならば多因子の common disease であり次の問題点を抱えているからである。原因候補遺伝子を見出しても、a)遺伝子変異は正常者も有しており、b)逆に正常遺伝子型でも発症する患者もいる。c)従ってその遺伝子変異単独で靭帯骨化の引き金は引かれまいと考えられ、d)その遺伝子異常のモデルマウスを作製しても表現型が得られない可能性が高い。e)同様にその遺伝子異常を細胞培養系に導入しても表現型を得られない可能性があり、f)そもそもゲノム異常が重要だとして、なぜ脊椎靭帯のみに表現型が出るのかといった疑問が解決されていない。そこで我々は遺伝子解析事業に参加を続けながら、異なる視点からも脊椎靭帯骨化の病態解明を目指す事とした。すなわち発症に関わる遺伝子型如何に関わらず、現象論として靭帯骨化が内軟骨性骨化に似た過程を経る事は病理学的知見からほぼ揺るぎないので、靭帯細胞の内軟骨性骨化メカニズムを解明すれば、これを防ぐ治療や創薬に繋がるだろうと考えた。

2. 研究の目的

我々は、靭帯細胞が骨になるまでに少なくとも4つのステップがあると仮説を立てた。靭帯骨化組織で観られる軟骨は繊維軟骨様であり、靭帯細胞は繊維芽細胞に属するが、これが ① 直接に繊維軟骨に分化(transdifferentiation)するのか、②何らかの刺激で一旦脱分化して間葉系幹細胞(MSC)様の状態になり、③これが軟骨様細胞に分化するのか、2経路考えられる。いずれの経過をたどっても、④最終的には軟骨細胞後期分化、すなわち肥大化と基質石灰化を来し、骨芽

細胞による骨の形成に置換されると考えられる。

“そもそもゲノム異常が重要だとして、なぜ脊椎靭帯のみに表現型が出るのか”との疑問に鑑みて、OPLL 変化初期に発現が動く遺伝子群を考えた時、おそらく他の靭帯にはない後縦靭帯特異的な遺伝子発現プロファイル変化があり、発症率が50歳以上の男性に有意に高い事から、このグループで顕著に変動する可能性を強く疑った。後縦靭帯と、他の脊椎靭帯や四肢の靭帯との遺伝子発現比較を、しかも若年者と中高年者の男女で行うのが理想的である。しかし現実同一患者から罹患部位でない健常靭帯サンプルを採取するのは不可能であり、かつヒトは個人毎の genetic background の違いが大きい為に、大多数の患者サンプル数を要する。そこで本研究は genetic background が均一なマウス等の動物を用いた検索実験を展開する。

①と②に関わる遺伝子(後縦靭帯特異的遺伝子発現プロファイル)検索

<第1スクリーニング>

12ヶ月齢の老齢雄マウスより各種靭帯(脊椎：前縦靭帯、後縦靭帯、黄色靭帯、棘間靭帯)、膝関節より前十字靭帯や側副靭帯を採取して mRNA を調整し、マイクロアレイ解析を行い、後縦靭帯特異的発現遺伝子を抽出する。上述の GWAS の結果とも比較する。

<第2スクリーニング>

年齢と性差による発現の違いがあるとの仮説の元に、12ヶ月齢と2ヶ月齢、それぞれ雌雄のグループから頸椎後縦靭帯を採取して mRNA を調整し、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) 法にて、第1スクリーニングで得た遺伝子群の中から、老齢雄マウス特異的な遺伝子を抽出する。

<第3スクリーニング>

抽出遺伝子について、ノックダウンと過剰発現実験を行い、図1の①と②の変化が起きる遺伝子を同定すると同時に、②の細胞が軟骨細胞分化を起こしうる事を確認する。

<第4スクリーニング>

ヒト臨床サンプル(OPLL vs. 対照)において OPLL 特異的に発現する遺伝子/蛋白を同定する。

3. 研究の方法

(1) マウス後縦靭帯特異的発現遺伝子プロファイリング解析

マウス靭帯組織採取とマイクロアレイ解析(第1スクリーニング)

12ヶ月齢雄マウスの各種靭帯(脊椎：前縦靭帯、後縦靭帯、黄色靭帯、棘間靭帯)、膝関節より前十字靭帯や側副靭帯を採取して mRNA を調整し解析した。マウス年齢性別特異的な後縦靭帯発現遺伝子の抽出(第2スクリーニング)

12ヶ月齢(老齢)と2ヶ月齢(若年齢)、それぞれ雌雄のグループから頸椎後縦靭帯を採

取して mRNA を調整し、qRT-PCR にて抽出遺伝子の発現定量を行った。

(2) 抽出遺伝子の機能解析

軟骨細胞分化と脱分化における影響(第3スクリーニング)

抽出遺伝子の siRNA によるノックダウンとウイルスによる強制発現の影響を、BMP、TGF- β 、インシュリン等の軟骨細胞分化誘導刺激の有無で比較検討した。強制発現に用いるアデノウイルスは TaKaRa 社の、レンチウイルスは、Life Technologies のシステムで構築した。qRT-PCR とウエスタンブロットや免疫染色により、上述の軟骨細胞マーカーや繊維芽細胞マーカー、MSC マーカーを検討する。内軟骨性骨化を経ずに直接膜性骨化様表現型を示す可能性も十分にあるので、骨芽細胞マーカー(*Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Bsp*, *Ocn* 等)も検討する。適宜基質染色(アルシアン・ブルー染色や ALP 染色、von Kossa 染色等)も導入し、石灰化も含めて表現型を評価した。

ヒト OPLL における発現と機能解析(第4スクリーニング)

ヒト頸椎 OPLL 組織において、候補遺伝子のコード蛋白について発現分布が、正常靭帯から変性し始める場所なのか、繊維軟骨様組織に発現するのか、あるいは骨化部に近接して局在するか、免疫染色で調べた。

4. 研究成果

本研究では靭帯細胞が軟骨細胞に変換される経路に 1) 直接の transdifferentiation、あるいは 2) 一旦間葉系前駆細胞に脱分化し、3) これが軟骨細胞へ分化、そして最終的に 4) 軟骨細胞肥大・成熟を経て骨化に至る、という 4 段階を想定し、それぞれに関わる遺伝子をマウスとヒト臨床サンプルを用いて解析した。上記 1) と 2) に関しては、後縦靭帯特異的な遺伝子発現変化をヒトのサンプルで検索するのが原因解明への straight forward な戦略であるが、第一にヒトの健常靭帯の採取は倫理的にかなり制限される事、第二にヒトは genetic background の差が激しい事から、まずは C57BL/6 マウスの後縦靭帯と他部位の靭帯からの mRNA 採取を行い、比較することにした。しかしマウスの後縦靭帯は小さく、ごく微量の mRNA しか採れない為に解析は困難であった。かつ今後 immunoblot 等の蛋白レベルの検証も考えると複数個体のサンプルの合算として解析するなどの工夫が必要で、その点で条件検討を行った。一方で、4) の候補遺伝子については、すでに我々は軟骨細胞の異常分化成熟制御因子として SnoN と Smpd3 を同定しており、まず OPLL 臨床組織におけるこ

れらコード蛋白の発現を、免疫組織化学染色で検討を施行した。OPLL 靭帯組織の軟骨様変性部位から肥大軟骨様変性部位への発現の有無を、症例を増やしながらか確認した。

マウス脊柱後縦靭帯採取の条件検討を引き続き行ったが、やはりマクロ的にマウス脊柱後縦靭帯の同定が困難で、かつ靭帯組織は基質タンパクに富み細胞成分に乏しいことから、やはり満足いくレベルの mRNA 採取には至らなかった。ここで一旦研究におけるマウス後縦靭帯の意義づけを再検討した。すなわち、直立歩行のヒトと 4 足歩行のマウスでは、脊柱にかかる力学的ストレスが根本から異なること、遺伝学的・進化論的にもヒトとマウスは大きな隔りがあること、野生型マウスの自然発症 OPLL は確認されていないことから、やはりヒトのゲノムワイド関連解析(GWAS)研究から得られた情報に立ち戻る事が責任遺伝子道程への近道と判断した。

そこで、GWAS 疾患感受性ゲノム領域から候補遺伝子を選んで OPLL 組織における発現を、免疫組織化学染色で検討を開始した。また、同時に候補遺伝子の siRNA を用いて、靭帯細胞(繊維芽細胞)における軟骨細胞分化と脱分化における影響を検討した。NIH-3T3 細胞と、マウス脊柱靭帯初代培養細胞において、候補遺伝子の siRNA によるノックダウンによる影響を、BMP、TGF- β 、インシュリン等の軟骨細胞分化誘導刺激の有無で比較検討した。qRT-PCR により、上述の軟骨細胞マーカーや繊維芽細胞マーカー、MSC マーカーを検討した。内軟骨性骨化を経ずに直接膜性骨化様表現型を示す可能性も十分にあるので、骨芽細胞マーカー(*Runx2*, *Sp7*, *Alp*, *Bsp*, *Ocn* 等)も検討した。適宜基質染色(アルシアン・ブルー染色や ALP 染色、von Kossa 染色等)も導入し、石灰化も含めて表現型を評価した。

候補遺伝子のうち、STK38L、CDC5L、CCDC91、PLCB1、RSPO2 について、OPLL 臨床組織サンプル に対して免疫組織化学染色を行なった。その結果、いずれの蛋白も OPLL 変性靭帯細胞に強い発現を認めた。STK38L と CDC5L については軟骨様変性靭帯細胞にも発現を認めた。STK38L の siRNA 実験では、10T1/2 細胞や ST-2 細胞など間葉系未分化細胞の骨芽細胞分化 commitment を抑制し、軟骨細胞分化を促進した。しかし、成熟した骨芽細胞においては STK38L siRNA は分化成熟を促進したので、骨芽細胞分化においては 2 面性を有することが分かった。したがって STK38L は軟骨変性には抑制的にはたらくが、骨化過程は促進する可能性がわかった。一方、CDC5L siRNA は、骨芽細胞分化早期を促進し、後期成熟を抑制したので、STK38L とは逆の 2 相性を示した。逆に軟骨細胞分化は siCDC5L で抑制された。したがって、CDC5L は軟骨変性を促進する一方で骨化そのものには抑制的に働く可能性が示唆

された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 前田真吾, 中島正宏, 河村一郎, 八尋雄平, 富永博之, 石堂康弘, 武富栄二, 池川志郎, 小宮節郎 : 脊柱後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子 *CDC5L* の機能解析. 第3回日本骨免疫学会, 2017, 石垣.

〔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 :
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

河村 一郎 (KAWAMURA ICHIRO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員准教授

研究者番号 : 90535832

(2)研究分担者

前田 真吾 (MAEDA SHINGO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号 : 60353463

小宮 節郎 (KOMIYA SETSURO)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号 : 30178371