

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10916

研究課題名(和文) 脊柱靭帯骨化を起す間葉系幹細胞の異常の機序解明とそれに基づく治療薬の標的探索

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of mesenchymal stem cell abnormality causing ossification of spinal ligament and target search of therapeutic agents based on the mechanism

研究代表者

古川 賢一 (Furukawa, Kenichi)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：20165468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、脊柱靭帯骨化症の病因が、靭帯組織に散在する間葉系幹細胞(MSC)の易骨分化能獲得にあると想定した。それを実証するために、まず研究資源となるMSCのライブラリーを構築した。ついで、そのMSCの形質転換の機序がゲノムDNAのメチル化にあると考え、ゲノムワイドのDNAメチル化解析を行った。そしてGWAS研究で注目された遺伝子のメチル化レベルが、患者組織のMSCと正常MSCの間で著明に変化していることを突き止めた。一方、治療薬のシーズ探索を目的として、MSCの石灰化を抑制する物質を生理活性物質ライブラリーを用いてスクリーニングし、非常に低濃度で有効な複数の薬物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

(学術的意義)現在の治療研究におけるトレンドの多施設研究で、研究資源を共通化することは極めて重要であり、今回間葉系幹細胞ライブラリーを構築したことは、研究の進展に果たす役割は大きい。またDNAメチル化のゲノムワイドの解析は、病因解明の新しいアプローチであり、得られた情報は薬物治療の重要なターゲットとなる可能性がある。

(社会的意義)骨化抑制物質の探索は、治療薬のシーズとなる物質を見出す有力な方法である。今回非常に低濃度で間葉系幹細胞の石灰化を抑制する物質を複数個見いだせた。それを基に構造活性相関の研究を行えば、より強力で特異性の高い治療薬の開発につながる事が出来る。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that the pathogenesis of ossification of the spinal ligament is the acquisition of mesenchymal stem cells (MSCs) scattered in ligament tissue for osteogenic differentiation. In order to prove the hypothesis, we first constructed an MSC library, which is a research resource. Next, we considered that the mechanism of MSC transformation was methylation of genomic DNA, and performed genome-wide DNA methylation analysis. We found that methylation levels of the genes of interest in the GWAS study were significantly altered between MSCs in patient tissues and normal MSCs. On the other hand, for the purpose of searching for seeds of therapeutic agents, a substance that suppresses calcification of MSCs was screened using a physiologically active substance library, and a plurality of drugs effective at very low concentrations were found.

研究分野：分子病態薬理学

キーワード：間葉系幹細胞 異所性骨化 脊柱靭帯 エピジェネティクス メカニカルストレス DNAメチル化 生理活性物質 スクリーニング

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊椎の靭帯は脊柱を縦走して、椎骨を縦に繋いで脊椎の安定化を図り、かつその運動性を保証するという重要な役割を持つ。その靭帯のうち、椎孔内前面と後面の2つの靭帯(夫々後縦および黄色の各靭帯)は椎孔内を縦に走る脊髄に接している。

その脊柱靭帯が本来結合組織であるにも関わらず、骨化を起こすことがある(異所性骨化)。その骨化がある程度以上大きくなると、隣接する脊髄を圧迫し、さらに進行すると手足のしびれ、そして麻痺に至ることもある。これが脊柱靭帯骨化症である。

脊柱靭帯骨化症に対しては、侵襲性が極めて高く、患者の負担の大きい脊椎手術以外に、有効な治療法や発症進展の予防法が確立しておらず、手術後の再発の可能性もある。そのため患者の日常生活の質を向上させるためにも、安全性の高い優れた薬物治療法の確立が求められている。そのためには病因の特定が欠かせない。

発症にはある程度の家族性が認められることから、同疾患の原因には遺伝的要因が推定されて、原因遺伝子の探索が進んでいる。また疫学的には、患者の内分泌、代謝などの疾患が病因となりうると考えられている。一方、臨床的にはメカニカルストレスが掛かる靭帯部位に骨化の発症と進展が起こりやすいとも報告されている。従って、脊柱靭帯骨化症は様々な因子が組み合わさって起こる多因子疾患と考えられる。

そこで我々は、本疾患の病因を明らかにするために骨化する実体を探索した。その結果、それが組織の特に血管周囲に散在する間葉系幹細胞であることを突き止めた。脊柱靭帯は、他の体の組織と同様、組織を自己修復する機構として、多分化能を有する間葉系幹細胞を持っている。組織が損傷した時には、これらの間葉系幹細胞が靭帯組織の場合には、適切に靭帯細胞に分化・増殖して組織の修復を図ると考えられている。

一方、脊柱靭帯が異所性に骨化を起こす脊柱靭帯骨化症の患者組織に於いては、組織損傷後に石灰化、そして骨化を起こす。患者組織にも間葉系幹細胞が存在するが、その性質が正常のそれとは異なり、多分化能の内、骨分化能が著明に高いことを我々は明らかにした(引用文献)。このことから靭帯組織が異所性に骨化することに、間葉系幹細胞の何らかの異常が、重要な役割を果たしていると我々は想定した。すなわち脊柱靭帯骨化症の発症機序として”脊柱靭帯組織の血管周囲に散在する間葉系幹細胞 MSC に易骨分化能獲得という形質転換が起こっているために、組織修復時にそれが骨芽細胞に間違っただけで分化することで靭帯が骨化する”という仮説を立て、検証してきた(引用文献)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、まず患者由来の脊柱靭帯組織の間葉系幹細胞が非常に骨化し易い性質(易骨化性)をどのようにして獲得するのか、その機序を明らかにすることを目的とした。さらにその知見に基づいて、その機序を標的とした、抑制的に作用する生理活性物質をスクリーニングする。そして安全で且つ有効性の高い治療薬のシーズを見出す。そこから患者にとって安全性の高い優れた治療薬、薬物治療法が開発できると期待されるからである。

3. 研究の方法

研究を円滑にすすめるため、以下のマイルストーンを設定して、間葉系幹細胞の易骨化性獲得の機序を明らかにし、それに基づいた治療薬の標的を定めることを目指した。

マイルストーン1：骨化及び非骨化のヒト脊柱靭帯から間葉系幹細胞ライブラリーを構築する。
マイルストーン2：上記ライブラリーを用いて、間葉系幹細胞の形質転換（易骨化能獲得）の機序を解明する。また理化学研究所の池川グループによって行われた、ゲノムワイドの責任遺伝子スクリーニングで候補とされたリスクアレルとの関連を明らかにする。
マイルストーン3：上記ライブラリーを用いて、骨化抑制物質のスクリーニングを行い、骨化を抑制する薬物の探索し、更にそこからマイルストーン2で明らかにする骨化の機序に選択的に作用する薬物を絞り込むことで、治療薬のシーズを創出する。

具体的には、マイルストーン1では、脊柱靭帯の骨化患者の背景（年齢、性別、病態）および採取部位（脊椎のどの位置か）が十分にはコントロール出来ないため、個体差が大きいと予想され、結果に影響する問題点がある。そのため現在の治療研究におけるトレンドである多施設研究では、研究資源を共通化する事は、極めて重要である。そこで個体差の出やすい初代培養の間葉系幹細胞を用いる当該研究では、そのばらつきを抑えてより信頼できるデータを得るために、多数の間葉系幹細胞の培養を確立する。

次に、マイルストーン2であるが、脊柱靭帯の骨化進展において重要なトリガーとして働くメカニカルストレスなどによって、後天的に易骨化能を獲得することが示唆されたため、その機序として、エピジェネティクスが重要であると考えられた。そこでエピジェネティクスの機構のうち、今回は特にゲノムDNAのメチル化の可能性を検討した。ゲノムワイドの解析のために、弘前大学大学院医学研究科に導入された次世代シーケンサーを用いた。

更にマイルストーン3では、治療薬のシーズ探索のために、東北大学大学院薬学研究科、弘前大学理工学研究科の天然物のライブラリーの中から、脊柱靭帯組織の間葉系幹細胞の石灰化抑制を指標にスクリーニングを行い、有効性の高い薬物の探索を行った。

4．研究成果

マイルストーン1 - 骨化患者、非骨化患者由来の組織を弘前大学附属病院、整形外科講座、および関連病院の協力の下、インフォームド・コンセントを得た患者から靭帯組織の提供を受けた。そこから間葉系幹細胞を単離・培養して、間葉系幹細胞ライブラリーの構築を行った。現時点で200を超える間葉系幹細胞を調製出来て、当初目標を達成できた。今後もさらに充実させていく予定である。

マイルストーン2 - ゲノムDNAの配列変化を伴わずに発現形質が変化する、いわゆるエピジェネティクスの重要な機序の一つにゲノムDNAのメチル化修飾がある。既に我々は、骨化のトリガーの一つであるメカニカルストレスで、特定の遺伝子のメチル化レベルが変動することを明らかにしている（引用文献）。そこで今回はそれを更に推し進めるため、ゲノム全体でのDNAメチル化の変動を解析し、その全体像を明らかにすることを試みた。第1段階として良好なメチル化DNAライブラリーの調製が出来た。そして次世代シーケンサーを用いての配列解析、メチル化部位の同定、骨化患者と非骨化患者間でのDNAメチル化レベルの相違について解析を進めているところである。現時点での重要な知見としては、理化学研究所の研究グループが、脊柱靭帯骨化症感受性遺伝子（リスクアレル）として注目されている遺伝子RSP02のメチル

化において、骨化患者と非骨化患者の間で優位な差があった。

エピジェネティックな遺伝子修飾が易骨化能獲得の重要な機序であることが明らかになれば、それに介入する薬物が治療薬としても有望であるため、シーズ探索の標的として設定する。そしてそれにもとづいて、治療薬開発への道を築いてゆく。

マイルストーン3 - 東北大学大学院薬学研究科、ならびに弘前大学理工学研究科との共同研究により提供を受けている多数の天然生理活性物質とその誘導体を用いて、間葉系幹細胞の易骨化性を抑制する治療薬のシーズの探索を行なっている。

200種以上の物質を用いて、間葉系幹細胞の石灰化抑制を指標にしてスクリーニングを行なったところ、4種類の物質に、安全性の観点から大事な、細胞毒性を示さない濃度域で、著明な石灰化抑制能が認められた。またそれと同時に骨化関連遺伝子の発現を著明に抑制した(図1)。今後はその物質の官能基を変化させて、いわゆる構造-活性相関の解析を行う予定である。それによって、さらに選択性が高く、安全性の高い薬物が開発できると期待される。

また、逆に石灰化を促進する物質も2種見出した。抑制する物質と促進する物質の構造が近いことから、構造活性相関の観点から解析することで、作用点の解明がさらに進むものと期待される。

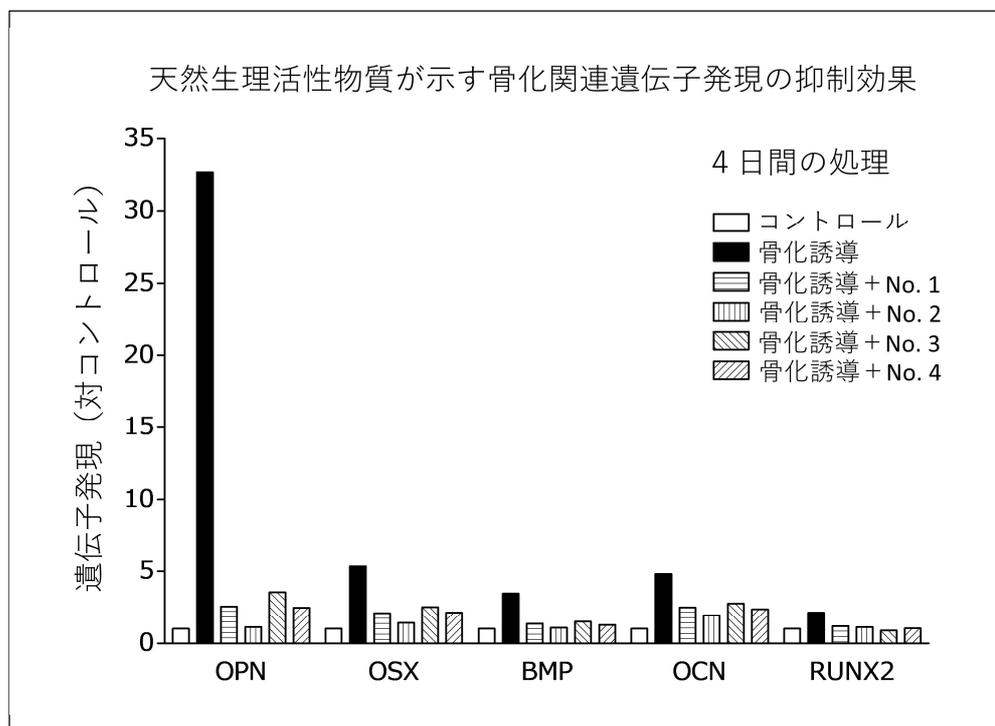


図1. 天然生理活性物質が示す、骨化関連遺伝子発現の抑制効果

患者由来の間葉系幹細胞に骨化誘導を掛けると、骨化関連遺伝子(OPN、OSX、BMP、OCN、RUNX2)はいずれも発現が著明に増加する(■)しかし、間葉系幹細胞の石灰化を抑制する効果を示した4つの天然物は、その発現を著しく抑制した。

(引用文献)

Harada Y, Furukawa KI, Asari T, et al.: Osteogenic Lineage Commitment of Mesenchymal Stem Cells from Patients with Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. *Biochem Biophys Res Commun* 443; 1014-1020, 2014.

Furukawa KI, Chin S, Asari T, Wada K, Kumagai G, Ishibashi Y.: OPLL 3rd edition, Springer Nature, 2020.

Chiba N, Furukawa KI, Takayama S, et al.: 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. *J Pharmacol Sci* 127; 467-473, 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chin Shunfu, Furukawa Ken-Ichi, Kurotaki Keigo, Nagasaki Shunpei, Wada Kanichiro, Kumagai Gentaro, Motomura Shigeru, Ishibashi Yasuyuki	4. 巻 369
2. 論文標題 Facilitation of Chemotaxis Activity of Mesenchymal Stem Cells via Stromal Cell Derived Factor-1 and Its Receptor May Promote Ectopic Ossification of Human Spinal Ligaments	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1 - 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.118.254367	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 古川賢一、和田簡一郎、熊谷玄太郎、石橋恭之	4. 巻 69
2. 論文標題 脊柱靭帯骨化症研究の進歩_脊柱靭帯骨化を起こす間葉系幹細胞の異常	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床雑誌 整形外科	6. 最初と最後の頁 513-516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu X, Kumagai G, Wada K, Tanaka T, Fujita T, Sasaki A, Furukawa KI	4. 巻 810
2. 論文標題 Suppression of osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament by a histamine-2-receptor antagonist	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 156-162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2017.07.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Liu X, Kumagai G, Wada K, Tanaka K, Asari T, Oishi K, Fujita T, Mizukami H, Furukawa KI	4. 巻 42
2. 論文標題 High Osteogenic Potential of Adipose- and Muscle-derived Mesenchymal Stem Cells in Spinal-Ossification Model Mice.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 E1342-E1349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Chin S, Furukawa KI et al.
2. 発表標題 Role of SDF-1/CXCR4 Axis in Chemotactic Behavior of Mesenchymal Stem Cell in Ossified Human Spinal Ligaments.
3. 学会等名 米国整形外科学会基礎学術集会（ORS）2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ishibashi H, Furukawa KI, Wada K, Tanaka T, Gentaro K, Shiozaki T, Liu X, Ishibashi Y
2. 発表標題 LECT-1, an intrinsic inhibitor of angiogenesis decreases in mesenchymal stem cells derived from ossification of the yellow ligament (OYL) patients
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Liu X, Kumagai G, Wada K, Tanaka T, Shiozaki T, Sasaki A, Furukawa KI
2. 発表標題 The H2 blocker famotidine suppressed osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Furukawa KI, Chin S., Asari T, Wada K, Kumagai G, Ishibashi Y	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer-Nature	5. 総ページ数 278
3. 書名 OPLL The Third Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

