

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10933

研究課題名(和文)後縦帯骨化症関連遺伝子CDC5Lの機能～新たな骨芽細胞コミットメント機構解明

研究課題名(英文)Functional analysis of CDC5L as a candidate causal gene for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine

研究代表者

富永 博之(Tominaga, Hiroyuki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20750798

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)：脊椎後縦帯骨化症(OPLL)患者のゲノムワイド関連解析で得られた疾患感受性領域の候補遺伝子群から、CDC5L (cell division cycle 5-like)遺伝子に着目した。OPLL病理組織の免疫組織化学染色による検討のほか、マウス細胞分化系を用いて骨・軟骨細胞分化への影響を評価した。CDC5Lは骨化部に隣接した部位の細胞と、間質細胞や血管細胞に発現を認めた。Cdc5lをノックダウンすると初期軟骨分化が抑制され、骨芽細胞分化は亢進した。CDC5LはOPLL骨化過程においてその最初の靭帯軟骨変性、または間質細胞や血管細胞の軟骨細胞分化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎後縦帯骨化症(OPLL)患者のゲノムワイド関連解析で得られた疾患感受性領域の候補遺伝子群から、CDC5L (cell division cycle 5-like)遺伝子に着目し機能解析を行った。OPLL病理組織の免疫組織化学染色による検討のほか、マウス軟骨細胞分化系や骨芽細胞分化系、骨髄由来間葉系幹細胞を用いて骨・軟骨細胞分化への影響を評価した。CDC5Lは骨軟骨前駆細胞から軟骨細胞分化への分子スイッチとも考えられ骨化initiatorの可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) of the spine is an intractable disease of unknown origin, which causes severe myelopathy. We have performed a genome-wide association study to identify cell division cycle 5-like (CDC5L) gene in one of the six disease susceptibility regions. We studied its expression profile and function of CDC5L regarding osteochondrogenic differentiation. CDC5L protein was substantially expressed not only in osteoblastic and chondrocytic cells adjacent to PLL ossification area, but also in non-ligament cells such as the stromal fibrous cells in ossified area and the blood vessel cells in the ligament. Loss of Cdc5l by siRNA greatly enhanced the osteoblastic differentiation, whereas chondrogenesis was suppressed. These results suggest Cdc5l to be a molecular switch to prefer chondrogenesis from osteochondro-progenitors. CDC5L was expressed in OPLL tissue in vivo, while it suppressed osteogenesis or promoted early chondrogenesis, in vitro.

研究分野：骨代謝、骨粗鬆症

キーワード：後縦帯骨化症 CDC5L WNT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

後縦靭帯骨化症 (ossification of posterior longitudinal ligament of the spine: OPLL) は脊椎を縦につなぐ後縦靭帯が骨化する疾患である。骨化した後縦靭帯はその背側にある脊髄や神経を圧迫して、上肢や下肢の痺れ、痛み、運動障害を引き起こす。本邦には数百万人の患者がいるとされているが、根本的な治療法がない。近年共同研究グループは OPLL の遺伝要因を明らかにするために全ゲノムワイド関連解析 (GWAS) を行い、疾患感受性領域の候補遺伝子群から発症に関わる 6 つのゲノム領域が発見された。(Nakajima M et al, *Nature Genetics*, 2014) 我々は原因候補遺伝子の一つである CDC5L (cell division cycle 5-like) 遺伝子に着目し機能解析を行った。

2. 研究の目的

CDC5L は細胞周期 G2/M transition に関与するとの報告 (Mu R et al, *Cell Death Dis*, 2014) や、RNA splicing に関与するとの報告 (Makarova OV et al, *EMBO J*, 2004) はあるが、その機能に関して不明な点が多い。先行実験で我々は、CDC5L が臨床 OPLL サンプルに発現し、*in vitro* で内軟骨性骨化の初期軟骨細胞分化を促進し、マウス間葉系幹細胞においては腱・靭帯への分化を抑制することを確認した。また *Cdc5l* は成人マウス脛骨では関節軟骨や骨細胞に発現、胎生 17.5 日マウス前肢では静止期軟骨細胞や perichondrium に発現していた。本研究による OPLL の病因・病態の解明は、その治療法開発はもちろんのこと、早期診断や早期治療介入にもつながると期待される。一方で、間葉系幹細胞から fibrocartilage 細胞分化への CDC5L の役割は、変形性関節症の軟骨再生や、肩腱板断裂に代表される腱と骨を連結する entheses 障害に対する再生治療のヒントも、創出する可能性がある。

3. 研究の方法

(1) ヒト臨床 OPLL サンプル、マウスサンプルにおける CDC5L の発現解析

OPLL の骨化様式は内軟骨性骨化様の様式であるとの報告はあるが、不明な点が多い。

ヒト臨床 OPLL サンプルを用いてパラフィン切片を作製し、以下の免疫組織化学染色 (IHC) を行い、CDC5L の発現様式と靭帯骨化様式を評価する。また既知のシグナル系分子との共発現や排他的関係はあるのか検討する。

IHC 【CDC5L, SOX9, Type Collagen, Type Collagen, RUNX2, phospho-SMAD2/3 (TGF-シグナル・マーカー), phospho-SMAD1/5/8 (BMP シグナル・マーカー), PCNA】

また C57BL/6J マウスにおいて胎生 17.5 日の前肢、8 週齢の脛骨でパラフィン切片を作製し、マウスサンプルにおける CDC5L の発現評価を行う。

(2) *In vitro* での CDC5L の役割

我々は、マウス内軟骨性骨化モデル細胞株 (ATDC5, C3H10T1/2) や膜性骨化モデル細胞株 (ST-2) において *siCdc5l* による細胞分化への影響を評価し、*Cdc5l* が軟骨細胞分化を促進し、骨芽細胞分化を抑制することを確認している。また C57BL/6J マウス骨髄から抽出した初代間葉系幹細胞 (MSC) の micromass 培養を行い、TGF- β 3 添加により *Scx*+/*Sox9*+, すなわち entheses 様 status になることを RT-qPCR で確認している。これらの系を用いて以下の項目で解析を行う。

Cdc5l 発現レベルの経時的変化

Cdc5l siRNA ノックダウンによる軟骨細胞分化や骨芽細胞分化、腱・靭帯細胞分化マーカーの発現の変化を評価

Cdc5l 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) による軟骨細胞分化や骨芽細胞分化、腱・靭帯細胞分

化マーカーの発現の変化を評価。AAV は現在作成中である。

Cdc5l が発現影響を及ぼし、その機能を担う下流遺伝子、すなわち標的遺伝子の検索：マウス MSC に対して siCdc5l、CDC5L AAV を導入してマイクロアレイ解析

また C57BL/6J 新生マウスより初代軟骨細胞・初代骨芽細胞を採取、培養し、siCdc5l によるノックダウン、また CDC5L 発現アデノ随伴ウイルスによる overexpression による分化への影響を評価する。

(3) TGF- β /BMP シグナル、PI3K-AKT シグナルへの関連の評価

現在までの報告では、CDC5L は各種腫瘍細胞に発現し、予後や治療反応性に関与しているとの報告もある。その中で、PI3K-AKT シグナルへの関与も指摘されており、我々はマウス内軟骨性骨化モデル細胞株 ATDC5 においてウエスタンブロット法で siCdc5l により Akt のリン酸化が抑制されることを確認した。

また現在までの我々の研究で、BMP-2 投与群と TGF- β 3 投与群での siCdc5l による軟骨細胞分化への影響は異なる結果を得ている。

TGF- β /BMP シグナル、PI3K-AKT シグナルの各抗体を用いて、上記シグナルへの CDC5L の関連の評価をウエスタンブロット法も含めて評価する。

4 . 研究成果

OPLL 病理組織において、CDC5L は骨化部に隣接した部位の osteochondral bipotential な細胞に発現を認めた。(Figure1)

Figure1



Cdc5l をノックダウンすることにより ST-2, ATDC5, C3H10T1/2 いずれの細胞でも細胞増殖を抑制した。また FACS assay により Cdc5l をノックダウンすると ATDC5 では cell cycle が G2/M 期で停滞することがわかった。

次に Cdc5l ノックダウンは ST-2 骨芽細胞分化を促進し、(Figure2)

ATDC5 早期軟骨細胞分化を抑制した。(Figure3)

Figure2

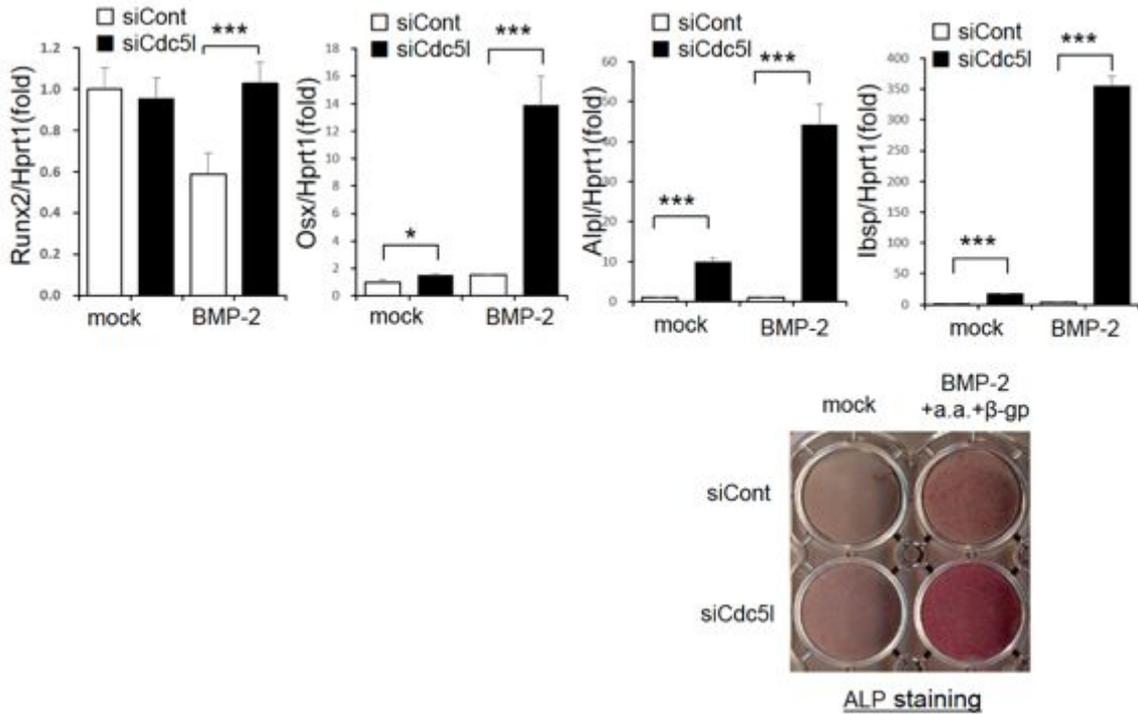
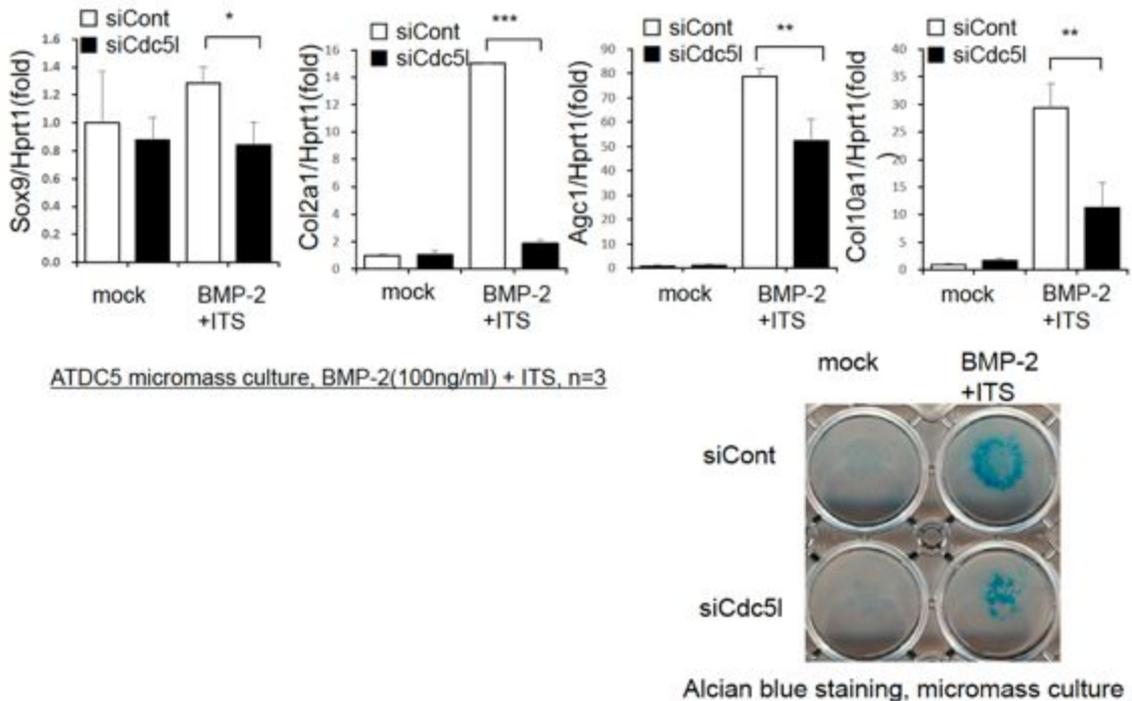
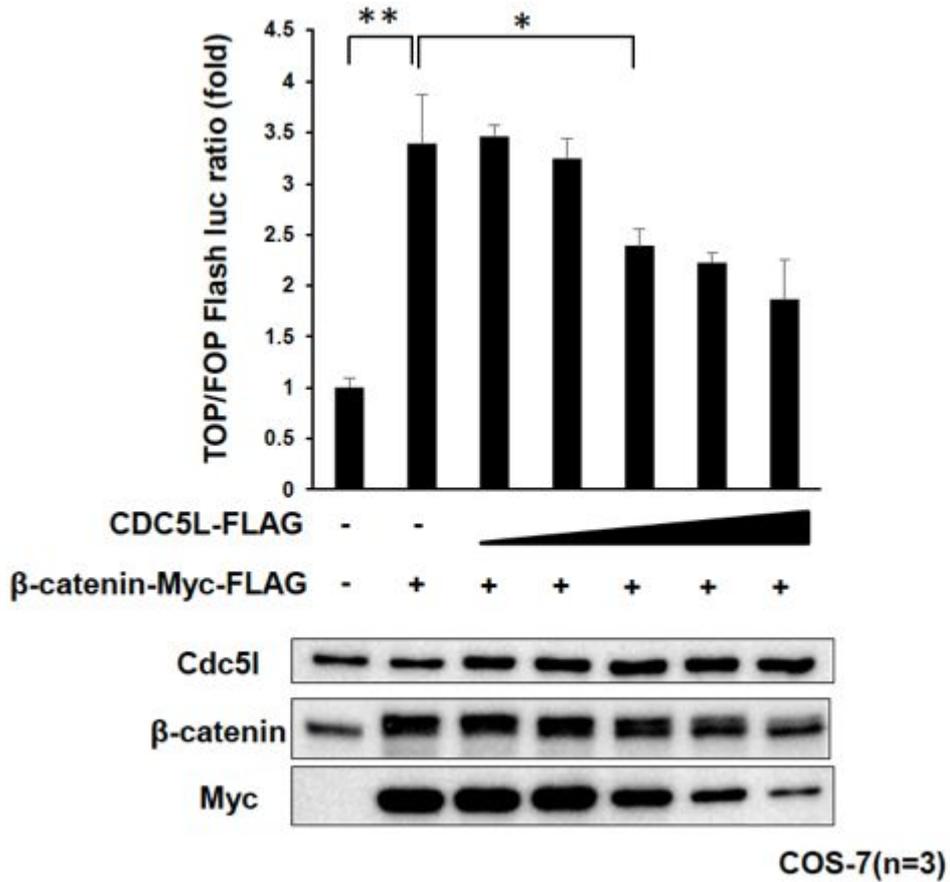


Figure3



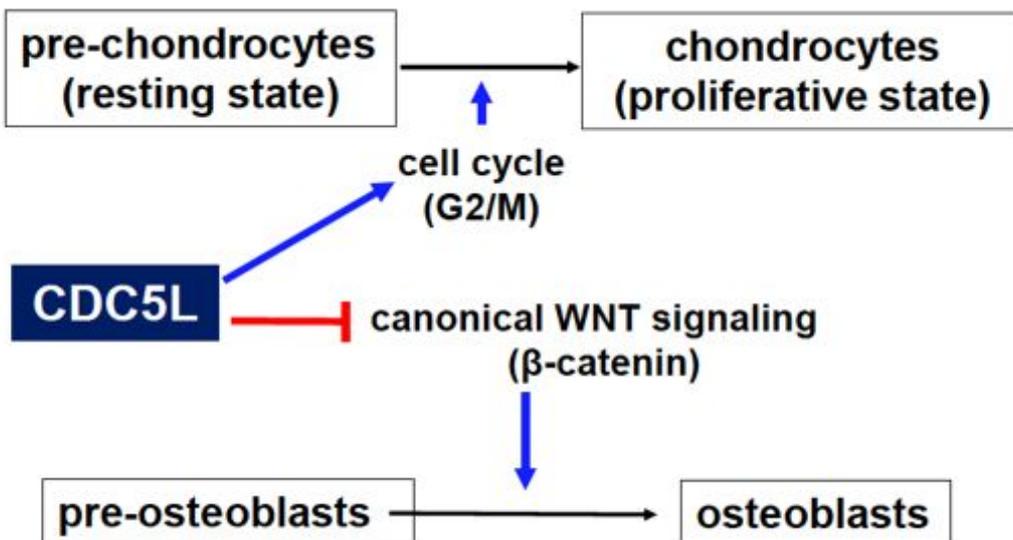
これにより CDC5L は骨芽細胞分化を抑制し早期軟骨細胞分化を促進するため WNT/ β -catenin シグナルと逆の作用であることが考えられ、CDC5L と WNT/ β -catenin シグナルの関係を検証した。ST-2 において WNT3A により骨芽細胞分化は促進されるが CDC5L を過剰発現すると骨芽細胞分化は抑制された。すなわち CDC5L が WNT シグナルを抑制した結果が考えられたためルシフェラーゼアッセイを行うことで WNT/ β -catenin シグナルを CDC5L は dose-dependent に抑制することがわかった。(Figure5)

Figure5



CDC5L は古典的 Wnt シグナルを抑制することで、骨軟骨前駆細胞から軟骨細胞分化への分子スイッチとなり得ることが示唆された。(Figure6)

Figure6



5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shingo Maeda, Ichiro Kawamura, Hiroyuki Tominaga, Noboru Taniguchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Histopathological Features of Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 OPLL	6. 最初と最後の頁 39-46
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 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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城光寺豪, 前田真吾, 中島正宏, 河村一郎, 八尋雄平, 富永博之, 武富榮二, 池川志郎, 谷口昇
2. 発表標題 脊椎後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子CDC5Lの機能解析
3. 学会等名 第19回運動器科学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城光寺豪, 前田真吾, 中島正宏, 河村一郎, 八尋雄平, 富永博之, 武富榮二, 池川志郎, 谷口昇
2. 発表標題 脊椎後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子CDC5Lの軟骨細胞分化における役割
3. 学会等名 第32回日本軟骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田真吾, 中島正宏, 河村一郎, 八尋雄平, 富永博之, 石堂康弘, 武富榮二, 池川志郎, 小宮節郎
2. 発表標題 脊柱後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子CDC5Lの機能解析
3. 学会等名 第3回日本骨免疫学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 城光寺 豪、 前田 真吾、 中島 正宏、 河村 一郎、 八尋 雄平、 富永 博之、 武富 榮二、 池川 志郎、 谷口 昇
2. 発表標題 脊椎後縦靭帯骨化症原因候補遺伝子CDC5Lは骨芽細胞分化を抑制し、初期軟骨細胞分化を促進する
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	前田 真吾 (Maeda Shingo) (60353463)	鹿児島大学・歯医学総合研究科・特任准教授 (17701)	
研究分担者	河村 一郎 (Kawamura Ichiro) (90535832)	鹿児島大学・歯医学総合研究科・客員准教授 (17701)	
研究分担者	小宮 節郎 (Komiya Setsuro) (30178371)	鹿児島大学・歯医学域医学系・教授 (17701)	