

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24592215

研究課題名(和文)世界初、幹細胞由来靭帯組織作製成功による靭帯骨化ブロッカー製剤開発研究

研究課題名(英文)OPLL model mouse and mechanisms-de-ubiquitination leads to a posterior longitudinal ligament ossification breakthrough in proteomics

研究代表者

津留 美智代(Tsuru, Michiyo)

久留米大学・疾患プロテオミクス遺伝子治療・講師

研究者番号：90368887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我国には、300を超える難病があります。その中の1つに後縦靭帯骨化症という原因不明の病気があります。この病気を克服するために、患者の血液中で現代の最高感度での全てのタンパク質を調べ、健常者と比較し、後縦靭帯骨化症発症機序に並行したタンパク質を発見しました。このタンパク質の遺伝子改変マウスを作製した結果、全てのマウスに後縦靭帯骨化を発症し、発症メカニズムを解明しました。

研究成果の概要(英文)：In our nation, there are roughly 300 intractable diseases identified by the Ministry of Health, Labour and Welfare. Our study focuses on just one of these diseases; however, I am confident that it represents a breakthrough in our understanding of diseases whose causes were previously unknown. I strongly believe that our research method, proteomics, has much to offer in the fight against intractable diseases. I have devoted 15 years to demonstrating my theory through the identification and purification of disease-specific proteins, and the establishment of mouse models for such. This study has the potential to stamp out intractable diseases around the world; it is what researchers and patients alike have been hoping for.

研究分野：疾患プロテオミクス

キーワード：難病克服研究 後縦靭帯骨化症 モデルマウス プロテオミクス 医薬品開発

1. 研究開始当初の背景

我国には、300を超える難病があり、その中の1つに後縦靭帯骨化症という原因不明の病気がる。この病気を克服するために、患者の血液中の現代の最高感度での全てのタンパク質を調べ、健常者と比較し、後縦靭帯骨化症特異的タンパク質を発見した。この遺伝子操作マウスの作製により、すべてのマウスは、後縦靭帯骨化症を発症し、組織学的、分子生物学的にも患者と類似した合併症状を呈したため、後縦靭帯骨化症のモデルマウスであることが判明した。このマウスを使い、後縦靭帯骨化症原因タンパク質の合成、抗体プロテオミクスにより、発症メカニズムを解明した。

2. 研究の目的

我国の希少疾患であり、難病とされている後縦靭帯骨化症の原因タンパク質を発見し、その医薬品開発への医学的意義を検証し、産業化への橋渡しを完成する。

3. 研究の方法

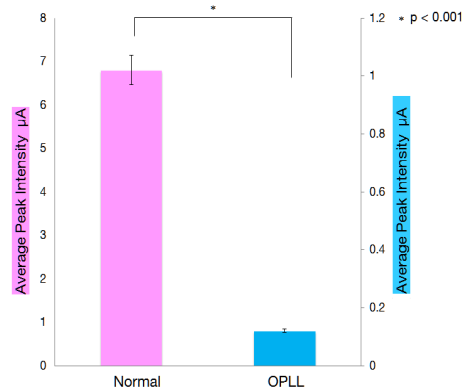
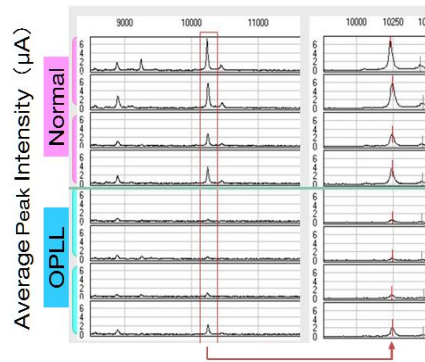
後縦靭帯骨化症の患者血清プロテオミクスを施行し、健常者と比較し、特異的タンパク質を探索した。統計学的に有意なタンパク質をHPLCにて精製し、LC-MS-MSにてアミノ酸配列を確定した。

このタンパク質の遺伝子操作により、改変マウスを作製し、3D-CT、生化学、組織学的、分子生物学的検証を行った。

4. 研究成果

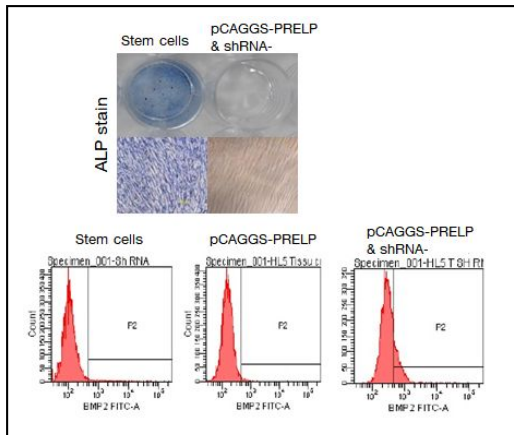
後縦靭帯骨化症患者血清プロテオミクスより発見したタンパク質の立証を行った結果、遺伝子改変マウスは、すべて、後縦靭帯骨化症を発症し、患者と同様の合併を示した。in vitroにより、靭帯組織細胞、間葉系幹細胞由来靭帯細胞からゲノム改変により、ターゲットタンパク質の発現操作を施行した結果、FACS、組織学的に靭帯骨化を示した。後縦靭帯骨化症モデルマウスに原因タンパク質のin silico合成物質を投与した結果、非投与群のマウスは、後縦靭帯骨化連続型になり、完全な四肢麻痺を呈し、介護状態となったが、投与群のマウスは、後縦靭帯骨化の進行が抑制され、健常マウスと近い生存時間を示し、自立飲食、歩行機能は損なわれることはなかった。後縦靭帯骨化症モデルマウスの細胞から原因タンパク質のメカニズムを調べ、in vitroによりその検証実験を行った。

発見したタンパク質は、後縦靭帯骨化症の原因タンパク質であり、生体内への投与や血清によるELISAにより、早期の診断が可能となり、進行を留めることが期待され、最適化医薬品開発を行っている。

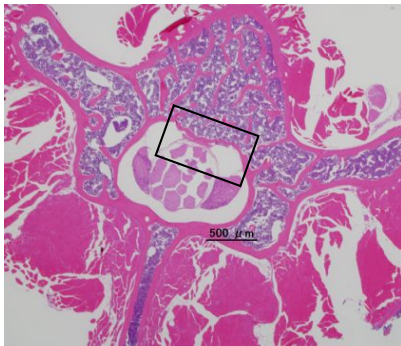


OPLL-mouse (左) wild-mouse (右) 8週令





In vitro ウマ間葉系幹細胞由来靭帯組織の shRNA による靭帯の骨化を FACS にて BMP-2 を測定した。



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 2 件)
投稿中

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 整形外科難治性疾患に対する基礎研究の成果 シンポジウム招聘 「後縦靭帯骨化症原因タンパク質の発見と創薬研究」 津留美智代 福岡国際会議場 2016.10.14.

2. 日本研究開発法人 科学技術振興機構 (JST) 主催、文部科学省、厚生労働省共催 研究成果報告実りの時、「疾患特異的タンパク質の統計学的探索方法」 津留美智代 東京大学 2016.10.06.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

名称：平行線維性結合組織の製造方法
発明者：津留美智代、永田見生
権利者：津留美智代、永田見生

種類：

番号：PCT/JP2013/056867

出願年月日：

国内外の別： 国内

名称：脊柱靭帯骨化症モデル非ヒト動物、糖尿病モデル非ヒト動物、脊柱靭帯骨化症モデル細胞、スクリーニング方法、脊柱靭帯骨化症病変細胞の検出方法、脊柱靭帯骨化症診断用キット、及び脊柱靭帯骨化症治療剤

発明者：津留美智代

権利者：津留美智代

種類：

番号：特願 2014-129306

出願年月日：

国内外の別： 国内

名称：癌転移マーカー及びそれを用いた癌転移の診断方法

発明者：津留美智代、永田見生

権利者：津留美智代、永田見生

種類：

番号：PCT / JP2013 / 056872

出願年月日：2013/3/

国内外の別： 国内

取得状況 (計 2 件)

名称：癌転移マーカー及びそれを用いた癌転移の診断方法

発明者：津留美智代、永田見生

権利者：津留美智代、永田見生

種類：

番号：特願 2014-506160

取得年月日：2014/10/3

国内外の別： 国内

名称：脊柱靭帯骨化症モデル非ヒト動物、糖尿病モデル非ヒト動物、脊柱靭帯骨化症モデル細胞、スクリーニング方法、脊柱靭帯骨化症病変細胞の検出方法、脊柱靭帯骨化症診断用キット、及び脊柱靭帯骨化症治療剤 (メカニズムの解明を含む追加取得)

発明者：津留美智代

権利者：津留美智代

種類：

番号：特願 2015-125793

取得年月日：2015/6/23

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sgc/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

津留 美智代 (TSURU, Michiyo)

久留米大学学長直屬疾患プロテオミクス

遺伝子治療研究室・特命講師

研究者番号：9 0 3 6 8 8 8 7

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし