

平成 30 年 6 月 3 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10403

研究課題名(和文) 脊柱靭帯骨化症の骨化抑制に向けたmicroRNA標的核酸医療の開発

研究課題名(英文) The role of microRNAs in the pathogenesis of ossification of the spinal ligament

研究代表者

彌山 峰史 (Yayama, Takafumi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：60362042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：後縦靭帯骨化(OPLL)、黄色靭帯骨化(OLF)における骨化巣形成は内軟骨性骨化に準じるが、本症では骨化前線部における細胞分化の恒常性が失われていると考えられる。骨芽細胞の分化を制御する因子としてmicroRNAに着目し、網羅的解析を行った。その結果、OPLL由来の培養細胞ではhsa-miR-487b-3p down-regulationが有意にみられ、その標的因子としてWnt/ β -catenin、Runx2が挙げられた。OPLLではmicroRNAの発現変化によりこれらの転写因子、シグナル伝達が賦活化され、骨芽細胞の分化が過剰に促進されていることが病態の1つとして考えられた。

研究成果の概要(英文)：Ossification of the spinal ligament (posterior longitudinal ligament or the ligamentum flavum) parallels endochondral ossification. Cell differentiation at the ossification front is known to be important during ossified process, although the factors regulating its initiation and progression are still unclear. In order to clarify the role of microRNAs during osteoblast differentiation, we investigated the cultured cells derived from harvested tissues during surgery. The microRNA array identified that down regulation of hsa-miR-487b-3p was significantly different in patients with ossification of the spinal ligament, and this microRNA was predicted to regulate the expression of genes involving Wnt or Runx2 signaling. These results suggested that the changes of microRNA expression induced the increment of osteoblast differentiation, and could play an important role in the pathogenesis of ossification of the spinal ligament.

研究分野：整形外科

キーワード：後縦靭帯骨化 黄色靭帯骨化 microRNA解析 Wnt signaling 内軟骨性骨化

1. 研究開始当初の背景

後縦靭帯骨化(OPLL)、黄色靭帯骨化(OLF)は重篤な脊髄症状を生じうる疾患であるが、その骨化形態は多様であり個々の病期・病態に応じた治療が必要となる。本症の病態には加齢による退行性変化、代謝内分泌異常、生活環境素因など種々の因子の関与が報告されてきた。特に遺伝的背景についてはコラーゲン遺伝子の発現異常が報告されて以降、ゲノム・遺伝子解析が進められ、徐々に本症の病態は明らかとなってきている。しかし、骨化が脊椎領域に限局すること、骨化形態・伸展には大きな個人差が存在すること、骨化巣は緩徐に増大して縮小や消退はほとんどみられないことなど、治療を進展させていくうえで重要な疑問点は未だ残されている。

病理学的にみると骨化様式は内軟骨性骨化(Miyasaka K, et al. AJNR 1983)であり、軟骨細胞の層状配列からなる骨化前線が存在する。我々の研究において、ヒト OPLL、OLF における骨化前線は骨化形態に応じて細胞密度、細胞分化過程が異なっており(図1)、これらに関与する成長因子やサイトカインの免疫組織化学的発現について観察した。

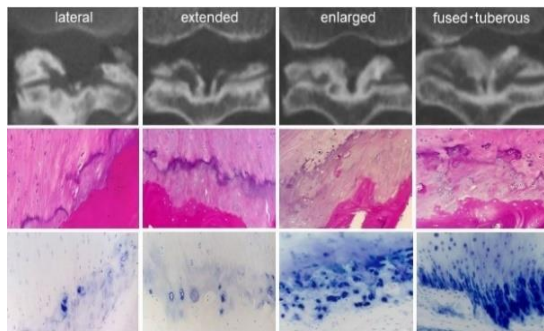


図1: 胸椎OLFの骨化前線

骨化巣の進展に伴い骨化前線は拡大し、石灰化前線に細胞が集簇する。(Yayama T et al. J Neurosurg Spine 2007)

平成 22-23 年度(若手研究 B)、平成 25-26 年度(若手研究 B)の科研費による研究では、骨化靭帯組織から遊走させて得た培養靭帯細胞の特性を観察し、Runx2、Osterix、Wnt/ β -catenin といった骨芽細胞分化を促進させる転写因子、シグナル伝達の mRNA 発現が亢進しており、さらに外的負荷(cyclic tensile strain)を加えるとこれらの発現量は有意に上昇することを明らかにできた(Sugita D, Yayama T, et al. Spine 2013; Cai HX, Yayama T, et al. Spine 2012)(図2)。さらに、これらの転写因子やシグナル伝達の発現調整を行う因子の1つとして microRNA(miRNA)に着目し、網羅的解

析を行い、OPLL/OLF に特異的な miRNA を抽出することができた。

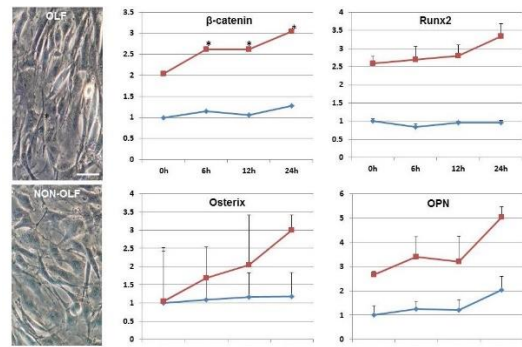


図2: Cyclic tensile strain 負荷と転写因子

OPLL 由来培養細胞において、骨芽細胞の分化を促進させる転写因子の mRNA 発現量は、力学的負荷を加えると有意に上昇する。

miRNA は 19-24 塩基からなる一本鎖 RNA であり、標的とする mRNA に結合して蛋白質の翻訳を抑制することで作用を発揮する。組織・細胞特異性のみならず時空特異性を有して、生体の様々な細胞の分化調節を精密に制御している。したがって、miRNA の発現変化は骨芽細胞分化の恒常性を失わせ、OPLL/OLF の疾患形成に関与することが推測された。

2. 研究の目的

miRNA は器官・臓器の発生や形態形成に深く関与するため、疾患関連因子として報告されており、特に悪性腫瘍や神経変性疾患などの領域では miRNA を用いた遺伝子治療の開発が進められている。本研究では先行研究の結果をうけて miRNA の有意性解析、および標的因子の発現評価を行い、OPLL/OLF の病態に関与する miRNA を同定することを目的とする。脊柱靭帯骨化における miRNA の知見は国内外ともに報告がなく、本症に特異的な miRNA の発見はこれまでにない新しい治療薬、治療法の開発に寄与することが可能と考えている。

3. 研究の方法

脊柱靭帯骨化(OPLL 群; 後縦靭帯骨化: n=28, 黄色靭帯骨化: n=11) および非靭帯骨化(CSM 群; 頰椎症性脊髄症: n=10)の手術時に採取した黄色靭帯組織を対象とした。採取した組織は、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た(Alex P

et al, Biochemical J 2003)。また、組織の一部は 0.05N EDTA にて脱灰後に薄切標本 (4μm) を作製し、病理組織学的検討に用いた。

(実験 1) miRNA array 解析

培養軟骨細胞 (OPLL, CSM 由来) から total RNA を抽出して hybridization したのち、scanning、dChip によるデータ解析を行う。miRNA の発現抑制、発現亢進が heat map にて観察でき、シグナル強度比にて定量化する。抽出した miRNA の標的遺伝子は Targetscan (<http://www.targetscan.org/cgi-bin/targetscan>) および miRTarBase、miRbase などのデータベースを参考とする。

(実験 2) miRNA 標的因子の発現解析

作成した薄切標本に対して、ABC 法による免疫組織化学染色を行い、ヒト骨化靭帯の骨化前線部における局在を観察する。使用する 1 次抗体は実験 1 にて抽出した、OPLL/OLF に特異的な miRNA が標的とする転写因子、シグナル伝達、サイトカインとした。

(実験 3) 骨化靭帯組織への脈管誘導

靭帯組織への新生血管、リンパ管形成の観察を目的に、実験 2 と同様に ABC 法による免疫組織化学染色を行う。使用する 1 次抗体は VEGF、CD34、D2-40 とした。さらに VEGF に関しては、サスペンションアレイシステムにより (Bio-Plex™Pro (BIO-RAD)) 発現量の定量化を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は滋賀医科大学倫理委員会の承認をえた上で研究を行っている。脊椎手術を受ける患者及びその家族に対し、本研究の目的を十分に説明し書面での同意を得られた場合のみサンプルとして組織を使用する。本研究は手術時に採取した組織を使用するものであり、研究協力者に身体的苦痛や不利益を生じるものではないことを含め、研究の目的、内容についてわかりやすく説明を行う。個人データは全て暗号、匿名化し、個人情報の保護に十分配慮する。

4. 研究成果

網羅的 miRNA 解析の結果では、OPLL 群に有効とされたプローブ数は 177 であり、その内訳は up-regulation 58、down-regulation 119 であった。統計解析の結果、p-value <0.05 かつ log2 ratio >1 を満たしたのは has-miR-137、has-miR-382-5p、has-miR-487b-3p であり、このうち相関性が高いと考えられる False Discovery

Rate <0.05 を満たしたのは has-miR-487b-3p/down regulation であった (Yayama T, et al. J Orthop Sci 2018)。データベースによる検索では、has-miR-487b-3p の標的遺伝子は Wnt signaling、Runx2、BMP など、骨芽細胞分化に関連する因子が挙げられ、これらタンパク質の発現亢進が示唆された。

Wnt signaling に関与する因子として LRP5、LRP6、Wnt 3a、β-catenin に着目し、骨化前線部における免疫組織化学的局在を観察すると、β-catenin は石灰化前線近傍の増殖期軟骨細胞、Wnt 3a および LRP5/6 は未分化間葉系細胞に強く発現していた (図 3)。また、骨化形態別には分節型 OPLL と比較して連続型 OPLL の靭帯組織では Wnt receptor である LRP5/6 の発現が強くなっていた。

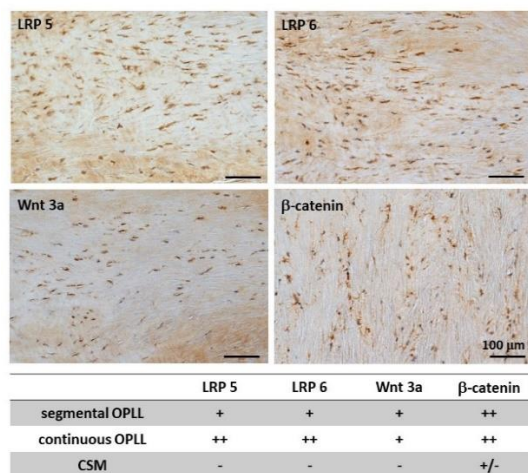


図 3：免疫染色 (Wnt signaling)

Wnt signaling に関連する因子の発現は骨化前線の軟骨細胞、およびその周囲に集簇する未分化間葉系細胞に陽性であり、特に連続型 OPLL では強い発現を認めた。

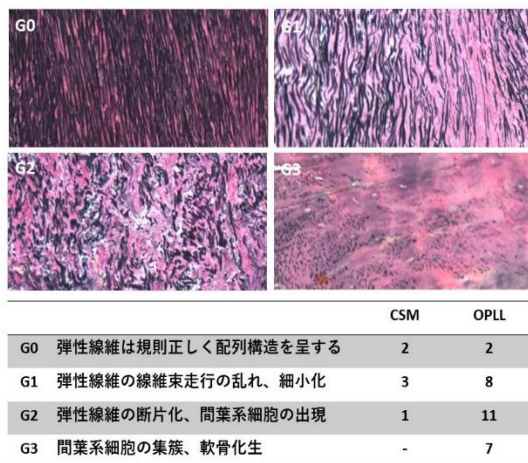


図 4：靭帯組織の変性度

OPLL 群の黄色靭帯組織は、CSM 群と比較して靭帯基質の変性が進行する傾向にあった。

脊柱靱帯組織は主に弾性線維と膠原線維により構成されており、正常構造では弾性線維の規則正しい配列構造がみられる。靱帯基質の変性の進行に伴い、弾性線維は断裂、断片化を生じ、置換性に膠原線維が増生して軟骨化生をきたしていた(図4)。CSM群、OPLL群ともに種々の程度の靱帯変性を認めたが、OPLL群では変性度がより高度となる傾向にあった。

靱帯基質の変性を生じた部位には脈管形成がみられ、CD34陽性の新生血管、D2-40陽性のリンパ管が観察された(図5)。その周囲には未分化間葉系細胞が集簇しており、脈管形成による靱帯基質への細胞流入が示唆された。

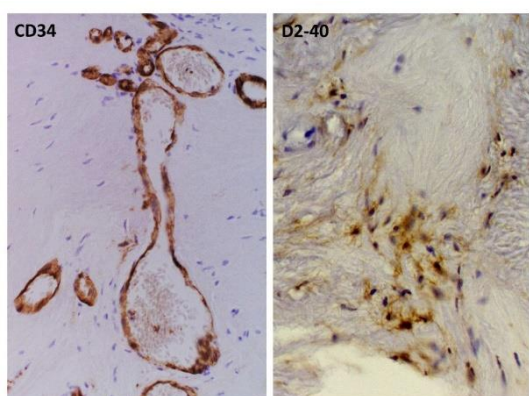


図5:免疫染色(血管、リンパ管)
骨化前線近傍の靱帯変性部には小血管叢、リンパ管形成が観察された。

これらの血管・リンパ管形成を誘導する因子として vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を観察すると、組織標本における VEGF の局在は骨化前線の肥大軟骨細胞、新生血管近傍の未分化間葉系細胞において強く観察された。これに対して、培養靱帯細胞に対するサスペンションアレイの結果では、OPLL群とCSM群の2群間で VEGF の細胞内含有量に有意差はみられなかった ($p=0.073$)。このことから、VEGF は細胞内で持続的に発現しているのではなく、変性を生じた骨化靱帯基質内に暴露されることが契機となり、autocrine/paracrine に発現量が亢進することが推測された。

今回の研究より、OPLL/OLF の骨化過程における細胞分化の調整に miRNA (has-miR-487b-3p) が関与していることが考えられた。miRNA の特徴として細胞特異性と時間特異性が指摘されているが、軟骨細胞分化、骨芽細胞分化、靱帯基質変化といった一連の骨形

成過程において、miRNA を介した調節機能による標的因子の経時的な変化が存在することが考えられた。今後の研究では、このような細胞分化の調整因子の経時的変化と、実際のタンパク質発現との相関性について検討を行う計画である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Yayama T, Mori K, Okumura N, Nishizawa K, Kumagai K, Nakamura A, Imai S. Wnt signaling pathway correlates with ossification of the spinal ligament: A microRNA array and immunohistochemical study. J Orthop Sci 23: 26-31, 2018. DOI: 10.1016/j.jos.2017.09.024. 査読有
- ② 彌山峰史, 森本 茂, 笠原俊幸, 久山陽一郎, 北川誠大 円錐上部症候群をきたした骨粗鬆症性椎体骨折の検討. 中部整災誌 60: 485-486, 2017. 査読無
- ③ 彌山峰史. 整形トピックス 脊柱靱帯骨化における内軟骨性骨化へのサイトカインの関与. 整形外科 65 (13): 1364, 2014. 査読無

[学会発表] (計11件)

- ① 彌山峰史, 森 幹士, 奥村法昭, 熊谷康佑, 前田 勉, 今井晋二. 脊柱靱帯骨化における脈管誘導因子の検討. 第1回日本リハビリテーション医学会秋季学術集会, 2017/10/28-10/29, 大阪市
- ② 彌山峰史, 森 幹士, 西澤和也, 笠原俊幸, 今井晋二. 胸腰椎移行部疾患による円錐上部症候群の神経学的特徴. 第1回日本リハビリテーション医学会秋季学術集会, 2017/10/28-10/29, 大阪市.
- ③ 彌山峰史, 今井晋二, 森 幹士, 奥村法昭, 熊谷康佑, 前田 勉, 西澤和也, 中村 陽. 脊柱靱帯骨化における免疫機構と低酸素ストレス適応. 第32回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017/10/26-10/27, 宜野湾市.
- ④ 彌山峰史, 今井晋二, 森 幹士, 奥村法昭, 熊谷康佑, 前田 勉, 西澤和也, 中村 陽. 頸椎後縦靱帯骨化症の骨化進展における microRNA の役割. 第32回日本整形外科学

会基礎学術集会, 2017/10/26-10/27, 宜野湾市.

- ⑤ 彌山峰史, 森 幹士, 西澤和也, 中村 陽, 森本 茂, 今井晋二. 胸腰椎移行部疾患の神経学的特徴. 第 129 回中部日本整形外科学会災害外科学会・学術集会, 2017/10/6-10/7, 富山市.
- ⑥ 彌山峰史, 今井晋二, 奥村法昭, 前田 勉, 森 幹士, 西澤和也, 中村 陽. 脊柱靭帯骨化細胞におけるサイトカインネットワークの変化. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016/10/13-10/14, 福岡市.
- ⑦ 彌山峰史, 今井晋二, 森 幹士, 奥村法昭, 前田 勉, 西澤和也, 中村 陽. 頸椎後縦靭帯骨化症の骨化過程における microRNA の関与. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016/10/13-10/14, 福岡市.
- ⑧ 彌山峰史, 森本 茂, 笠原俊幸, 種村雅人, 久山陽一郎, 北川誠大. 脊髄円錐症候群をきたした骨粗鬆症性椎体骨折の検討第 127 回中部日本整形外科学会災害外科学会・学術集会, 2016/9/30-10/1, 松本市.
- ⑨ 彌山峰史, 今井晋二, 奥村法昭, 前田 勉, 森 幹士. 脊柱靭帯に由来する培養靭帯細胞の網羅的サイトカイン解析. 第 60 回日本リウマチ学会総会・学術集会, 2016/4/21-24, 横浜市.
- ⑩ 彌山峰史, 今井晋二, 森 幹士, 西澤和也, 奥村法昭, 塩路 傑, 尾田和広. 頸椎後縦靭帯骨化由来の培養靭帯細胞に対する網羅的 microRNA 解析. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2015/10/22-10/23, 富山市
- ⑪ 彌山峰史, 森本 茂, 種村雅人, 笠原俊幸, 久山陽一郎, 北川誠大. 頸椎黄色靭帯骨化症の治療経験. 第 125 回中部日本整形外科学会災害外科学会・学術集会, 2015/10/2-10/3, 名古屋市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

彌山峰史 (YAYAMA TAKAFUMI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：603620421