

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09027

研究課題名(和文) ゲノミクス、プロテオミクス解析による脊柱靭帯骨化の骨化抑制療法の開発

研究課題名(英文) A proteomic analysis for osteogenic factors concerning with ossification of the posterior longitudinal ligament in cervical spine

研究代表者

彌山 峰史 (Yayama, Takafumi)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：60362042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：後縦靭帯骨化症(OPLL)の病態解明を目的としてプロテオミクス解析を行った。OPLLおよび比較対照である頸髄症に由来する培養細胞を実験対象とし、合計4353種のタンパク質が抽出できた。さらにabundance ratio>2をcut lineとすると、連続型OPLLでは37種、分節型OPLLでは18種が挙げられた。このタンパク質発現分布からシグナル解析を行うとdisorder of glycosylation、S100 protein signalingが有意となった。これらのシグナルは骨化過程における細胞分化や骨化形態に関与することが推測され、OPLLの病態の重要な要因の1つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後縦靭帯骨化症は進行性かつ重篤な脊髄症状を生じうる疾患であるが、現在有効な治療法は神経症状を緩和・改善させる投薬、四肢機能の維持を目的としたリハビリテーション、脊髄の圧迫を除去する外科的治療に限られており、骨化の進行を抑制する治療は未だ確立されていない。本研究の目的は病態解明を目的としてプロテオミクスによる疾患関連タンパク質を抽出することである。遺伝子発現に対し、組織学的、環境的、時間的な修飾によりタンパク質発現は変化することが指摘されており、本研究によって得られる情報は、脊柱靭帯骨化における細胞分化の制御という観点からみた、新しい“骨化抑制療法”の開発に極めて有用と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) can cause serious complications in the spinal cord. Therefore, a new approach is required for preventing ossification because the available treatments are limited. To clarify the pathogenesis of OPLL, we examined the expression pattern of proteins in cultured cells derived from harvested tissues during surgery. Proteomics revealed 4353 protein expression patterns. In the continuous OPLL group, 37 proteins had a significantly high expression. In the segmental OPLL group, 18 proteins had a significantly high expression. Signaling analysis using database of protein expression patterns revealed disorder of glycosylation, oxidation-reduction process, and S100 protein signaling. There were associated with the progression of the ossified plaque or variation of ossified formation. These results suggest that changes in protein patterns impact the diversity of ossification and play an important role in cell differentiation in the OPLL.

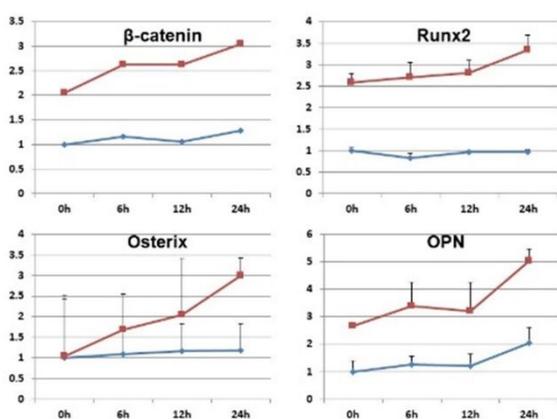
研究分野：整形外科

キーワード：後縦靭帯骨化症 黄色靭帯骨化症 プロテオミクス マイクロRNA 内軟骨性骨化

1. 研究開始当初の背景

脊柱靭帯骨化（後縦靭帯骨化: OPLL、黄色靭帯骨化: OLF）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（Tanaka T, et al. Am J Hum Genet 2003）や OPLL の発症に関連するゲノム領域の SNP（Nakajima T, et al. Nature Genetics 2014）などが報告され、徐々に本症の病態は明らかとなってきている。しかし、骨化は全身性ではなく、脊椎領域に限局するのはなぜか、骨化が開始する時期、あるいは骨化の initiation に関与する因子は何か、骨化形態、罹患高位数には大きな個人差が存在するのはなぜか、など本症の治療を進展させていくうえで重要な疑問点、学術的「問い」は残されている。

病理学的には脊柱靭帯の骨化様式は内軟骨性骨化であり、層状配列からなる骨化前線が存在する。我々のこれまでの研究において、ヒト OPLL/OLF の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、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局在について報告した（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）の科研費では、骨化靭帯組織から遊走させた培養細胞の特性を観察し、OPLL/OLF では Runx signaling、Wnt signaling、Indian hedgehog signaling などの骨化前線における骨形成過程に必要な軟骨細胞分化、骨芽細胞分化を誘導・促進するシグナルの mRNA 発現が亢進し、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（Spine 2013, Spine 2012, Arthritis Res Ther 2011）（図 1）。

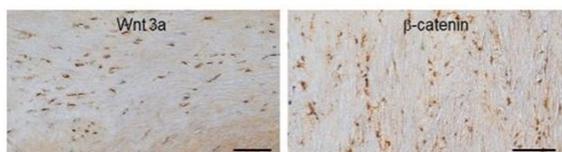


（図 1：力学的負荷と転写因子の発現）

脊柱靭帯骨化由来の培養細胞では、骨芽細胞の誘導を促進させる転写因子の mRNA の発現が高く、さらに力学的負荷を加えると有意に上昇する。

さらに、これらの骨化前線における細胞分化に関与する転写因子、シグナル伝達を制御する因子として microRNA に着目し、平成 27-29 年の科研費（基盤研究 C）にて網羅的 miRNA array を行った。その結果、OPLL に特異的な miRNA として hsa-miR-483b-3p/down regulation の存在、およびその標的因子の発現について報告することができた（J Orthop Sci 2017）（図 2）。

microRNA/down regulation	p-value
(p-value < 0.05, log2 ratio > 1)	
hsa-miR-137	0.048
hsa-miR-382-5p	0.028
(p-value < 0.05, log2 ratio > 1, false discovery rate < 0.05)	
hsa-miR-487b-3p	0.000000096



（図 2：microRNA array と標的因子の発現）

OPLL 由来培養細胞では miR487b-3p の down regulation が有意となり、その標的因子である Wnt signaling の発現は組織の間葉系性細胞で陽性であった。

2. 研究の目的

microRNAの結果は、OPLLに特異的な遺伝子発現の調節機構が存在することを示しているが、他方としてmicroRNAの標的因子の多様性、実際に発現するタンパク質との相関性について不明な点が多く存在した。特にタンパク質の発現は同一生物でも細胞組織、時間経過、細胞外環境によって変化することが特徴である。本研究では、ゲノミクス、プロテオミクスを行うことで、OPLL/OLFに特異的な遺伝子および標的因子の発現について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

頰椎後縦靭帯骨化症（OPLL群: n=35）および頰椎症性脊髄症（CSM群: n=10）に対する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、切断した靭帯細胞からFBS添加DMEM培地中に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）サスペンションアレイ

Bio-Plex™ サスペンションアレイシステムは、フローサイトメーターの原理に基づきサイトカイン、ケモカイン等を複数同時に定量するシステムである。

培養靭帯細胞の細胞膜を破砕して（Bio-Plex cell lysis Kit）細胞内タンパク質を抽出後、サンプル調整を行う。次いで、直径5.6μmの球形ビーズを作成し、抗原抗体反応を利用して生体成分の定量化を行う。得られた結果について、マネージャーソフトウェアにてデータ解析を行い、実測値を算出する。今回は、profiling panelとしてBio-Plex™ Pro（BIO-RAD）を使用したため、合計27種類のサイトカイン、ケモカイン、成長因子の定量化を行った。

（実験2）プロテオミクス解析

プロテオミクスでは、細胞内タンパク質を抽出し、SDS-PAGE、2次元電気泳動によりタンパク質を分離する。分離した各タンパク質のスポットを切り出し、ペプチド断片を作成する。質量分析計にてペプチド断片の分子量を測定し、ゲノムデータとの比較にてタンパク質を同定する。

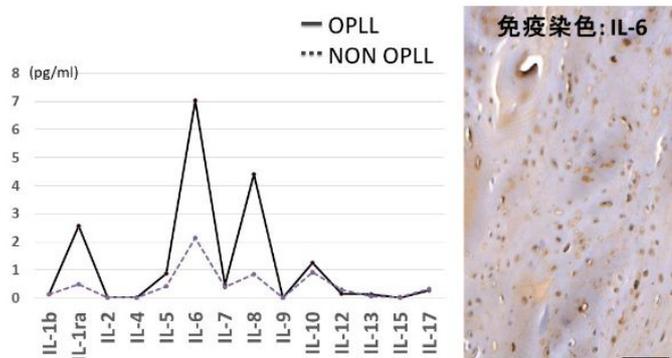
今回の研究では、連続型OPLL、分節型OPLL、CSMの各群から代表的な4症例の靭帯組織由来培養細胞を対象とした。それぞれの細胞内タンパク質を抽出後、iTRAQによるタンパク質定量解析を行った。LC-MS/MS解析によるタンパク質同定によって得られた結果から、DAVID database（<http://David.abcc.ncifcrf.gov/>）を用いてそれぞれのシグナル解析を行った。

（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に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

サスペンションアレイによるサイトカイン解析の結果、OPLL群の培養細胞ではIL-6、basic FGF、RANTESの発現が有意に高値（ $p < 0.05$ ）となった。さらに、IL-6は分節型OPLLと連続型OPLLの比較においても連続型OPLLで有意に高値であった。これらの各因子の発現について、組織標本に対する免疫組織化学染色にて観察すると、IL-6の発現は靭帯基質の変性を生じた部位に出現したfibroblast-like cells、mesenchymal cellsに陽性であった（図3）。またbasic FGFは変性部位のfibroblast-like cellsに強陽性であり、またRANTESはmesenchymal cellsに陽性細胞が多くなっていた。



(図 3 : cytokine array)

Cytokine 解析では、OPLL 由来の培養細胞にて細胞内の IL-6 の発現が高値であった。組織における IL-6 の発現局在は、骨化前線における間葉系細胞に強陽性であった。

これらの結果から、脊柱靭帯骨化症由来の培養細胞は炎症を誘起する作用が高く、実際の組織においては靭帯基質の変性に伴い局所的な炎症を生じていることが示唆された。これまでの報告において OPLL 患者は微小な炎症反応が上昇することが指摘されており、特に骨化形成の初期段階において重要な反応の 1 つと推測している。また、IL-6 および IL-1 α には骨芽細胞の分化を促進させる機能も存在することが指摘されており、過剰な IL-6 の発現によって mesenchymal cell からの細胞分化が骨形成優位となることが、OPLL の病態に関与することが考えられた。これらの研究成果は、日本整形外科学会、日本脊椎脊髄病学会にて発表を行い、英文雑誌 (Spine, in press) に掲載を予定している。

プロテオミクスでは 4353 種のタンパク質が抽出され、abundance ratio >2 と設定すると、CSM 群に対して連続型 OPLL は 37 種、分節型は 18 種となり、また連続型と分節型の比較では 76 種のタンパク質が挙げられた (図 4)。さらに CSM 群に対して連続型 OPLL、分節型 OPLL に共通して高発現していたタンパク質を抽出して、DAVID database からシグナル解析を行うと、Golgi membrane、Glycosylation に関連するシグナルが有意となった。このうち Glycosylation はタンパク質翻訳後修飾の過程の 1 つであり、糖鎖が付加する反応である。糖鎖化された代表的なタンパク質はムチン、プロテオグリカンであり、過去の我々の結果では、アグリカン、デコリンといったプロテオグリカンは骨化靭帯の骨化前線の基質に発現していた。

OPLL連続型/CSM	OPLL分節型/CSM
Heat shock 70 kDa protein 1-like	Heat shock 70 kDa protein 1-like
BET1-like protein	RNA demethylase ALKBH5
RNA demethylase ALKBH5	E3 ubiquitin-protein ligase RNF167
Beta-1,4-galactosyltransferase 1	Beta-1,4-galactosyltransferase 1
Microfibrillar-associated protein 1	Microfibrillar-associated protein 1
Arachidonate 15-lipoxygenase B	Arachidonate 15-lipoxygenase B
Phosphatidate phosphatase LPIN1	Bromodomain adjacent to zinc finger domain protein 2A
Serine/threonine-protein kinase WNK3	
Protein unc-79 homolog	

(図 4 : proteomics 解析)

対照群である CSM に比較して発現比が 100 倍以上となったタンパク質は、OPLL 連続型で 9 種、OPLL 分節型で 7 種であった。

また、CSM 群に対して連続型 OPLL で高発現かつ分節型 OPLL に対して連続型 OPLL で高発現していたタンパク質は骨化形態に関与することが推測される (図 4)。タンパク質分布を解析すると、S100 protein に関するシグナルが有意であった。S100 protein は、細胞内カルシウム濃度の恒常性、細胞分化の調整に関与することが指摘されている。免疫染色の結果では骨化前線の軟骨細胞に強陽性であり、同部位の細胞分化に影響していることが示唆された。

本研究では、OPLL 由来の培養細胞においてサイトカインの発現分布が対照群とは異なっており、特に炎症性サイトカインである IL-6 が高値であることを示すことができた。局所的な炎症反応は、基質変性の誘導やシグナルを介した骨芽細胞分化に影響し、骨化の初期段階に重要な役割を果たすことが考えられる。またプロテオミクスでは、骨化進展および骨化形態に関与するタンパク質を示すことができた。これらのタンパク質の多くは OPLL に特異的な microRNA の標的因子となっていたが、他方では microRNA とタンパク質発現の相関性が不明なものも存在していた。この点についてはエピジェネティクス修飾の関与を推測しており、今後の研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kumagai K, Okumura N, Amano Y, Yayama T, Mimura T, Maeda T, Kubo M, Mori K, Barrett-Jolley R, Imai S.	4. 巻 31
2. 論文標題 Consideration of differences in drug usage between young-onset and elderly-onset rheumatoid arthritis with target of low disease activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol	6. 最初と最後の頁 1094-1099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2021.1883251.	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 Kumagai K, Takemira Y, Okumura N, Amano Y, Yayama T, Mimura T, Mori K, Barrett-Jolley R, Imai S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Surgical Treatment of Wrist Joint Dysfunction in Rheumatoid Arthritis: A Report of Two Cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mod Rheumatol Case Rep	6. 最初と最後の頁 rxab044
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/mrcr/rxab044	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 Mori K, Yayama T, Nishizawa K, Nakamura A, Saito H, Kitagawa M, Imai S	4. 巻 5
2. 論文標題 Incidence of Cranial Adjacent Segment Disease after Posterior Lumbar Interbody Fusion Using the Cortical Bone Trajectory Technique for the Treatment of Single-Level Degenerative Lumbar Spondylolisthesis; More than a 2-Year Follow-Up.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Spine Surg Relat Res	6. 最初と最後の頁 98-103
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22603/ssrr.2020-0103	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 Sugita D, Nakajima H, Kokubo Y, Takeura N, Yayama T, Matsumine A	4. 巻 10
2. 論文標題 Cyclic tensile strain facilitates ossification of the cervical posterior longitudinal ligament via increased Indian hedgehog signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 7231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-64304-w.	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 Yayama T, Mori K, Nakamura A, Mimura T, Imai S	4. 巻 10
2. 論文標題 Denosumab therapy for giant-cell tumor of the lumbar spine: a case report and immunohistochemical examination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Orthop Case Rep	6. 最初と最後の頁 76-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.13107/jocr.2020.v10.i02.1706.	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 Mori K, Yayama T, Nishizawa K, Nakamura A, Mimura T, Imai S	4. 巻 24
2. 論文標題 Aortic pulsation prevents the development of ossification of anterior longitudinal ligament toward the aorta in patients with diffuse idiopathic skeletal hyperostosis (DISH) in Japanese: results of chest CT-based cross-sectional study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 30-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2018.08.010.	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 Mimura T, Mori K, Okumura N, Kumagai K, Maeda T, Yayama T, Imai S	4. 巻 6
2. 論文標題 Is the ischiofemoral space value of Japanese hip joints equal to that of Western populations?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Hip Preserv Surg	6. 最初と最後の頁 390-397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jhps/hnz044	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 Yayama T, Mori K, Okumura N, Nishizawa K, Kumagai K, Nakamura A, Imai S	4. 巻 23
2. 論文標題 Wnt signaling pathway correlates with ossification of the spinal ligament: A microRNA array and immunohistochemical study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Sci	6. 最初と最後の頁 26-31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2017.09.024.	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 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、斎藤英貴、西澤和也、中村 陽、北川誠大、今井晋二
2. 発表標題 プロテオミクス解析による頸椎後縦靭帯骨化の疾患関連タンパクとシグナル解析
3. 学会等名 第50回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、中村 陽、北川誠大、森本 茂、今井晋二
2. 発表標題 胸椎椎間板ヘルニアの治療経験
3. 学会等名 第137回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、斎藤英貴、藤川ひとみ、熊谷康佑、北川誠大、今井晋二
2. 発表標題 頸椎後縦靭帯骨化における疾患関連タンパクとシグナル伝達の発現
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、斎藤英貴、北川誠大、西澤和也、中村 陽、今井晋二
2. 発表標題 胸椎黄色靭帯骨化症の術後成績に關与する因子と病理組織像の特徴
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 彌山峰史, 森 幹士, 齋藤英貴, 熊谷康佑, 西澤和也, 中村 陽, 北川誠大, 今井晋二
2. 発表標題 プロテオミクスによる頸椎後縦靱帯骨化における骨化関連因子の解析
3. 学会等名 第49回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 彌山峰史, 森 幹士, 齋藤英貴, 熊谷康佑, 藤川ひとみ, 北川誠大, 今井晋二
2. 発表標題 頸椎後縦靱帯骨化に由来する培養細胞に対するプロテオミクス解析
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 彌山峰史, 森 幹士, 北川誠大, 西澤和也, 中村 陽, 齋藤英貴, 今井晋二
2. 発表標題 胸椎黄色靱帯骨化症の手術成績に關与する因子
3. 学会等名 第27回日本脊椎脊髄神経手術手技学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 彌山峰史, 森 幹士, 西澤和也, 中村 陽, 森本 茂, 今井晋二
2. 発表標題 胸椎黄色靱帯骨化症における臨床症状および病理組織学的特徴
3. 学会等名 第132回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、西澤和也、中村 陽、斎藤英喜、北川誠大、今井晋二
2. 発表標題 脊柱靱帯骨化の骨化過程における脈管形成と免疫応答
3. 学会等名 第48回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、西澤和也、熊谷康佑、奥村法昭、今井晋二
2. 発表標題 胸椎黄色靱帯骨化症における骨化形態が硬膜骨化および病理組織像に及ぼす影響
3. 学会等名 第56回リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、斎藤英貴、奥村法昭、熊谷康佑、北川誠大、今井晋二
2. 発表標題 頸椎後縦靱帯骨化におけるmicroRNAsの標的因子とプロテオミクス解析
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yayama T, Mori K, Saito H, Okumura N, Nishizawa K, Kumagai K, Kitagawa M, Imai S
2. 発表標題 Regulation of Wnt signaling expression by microRNAs in patients with cervical ossification of the posterior longitudinal ligament.
3. 学会等名 40th SICOT Orthopaedic World Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、西澤和也、 中村 陽、奥村法昭、熊谷康佑、 今井晋二
2. 発表標題 頸椎後縦靭帯骨化におけるmicroRNAsを介したWnt signalingの発現制御
3. 学会等名 第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 彌山峰史、森 幹士、奥村法昭、 熊谷康佑、西澤和也、中村 陽、 今井晋二
2. 発表標題 頸椎後縦靭帯骨化における細胞内サイトカインネットワークの発現変化
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018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	森 幹士 (Mori Kanji) (30467386)	滋賀医科大学・医学部・准教授 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------