

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591895

研究課題名（和文）

RNA 干渉、マイクロビーズアレイを用いた脊柱靭帯骨化症に対する網羅的遺伝子解析

研究課題名（英文）

Whole transcriptome analysis for ossification of vertebral ligament using RNA interference and microbeads array

研究代表者

内田 研造（UCHIDA KENZO）

福井大学・医学部・准教授

研究者番号：60273009

研究成果の概要（和文）：

脊柱靭帯骨化症由来の培養靭帯細胞を用いて、骨化形成過程に作用する因子について検討した。脊柱靭帯骨化由来細胞では β -catenin、Runx2、Osterix の mRNA 発現量が上昇しており、さらに cyclic tensile strain を加えると各因子の mRNA の発現は有意に増加した。免疫組織化学的局在では Runx2、Sox-9、Osterix は肥大軟骨細胞に強く発現していた。また、組織学的検討では、骨化巣の増大に伴い骨化前線部の拡大、石灰化前線の不整化・延長が著明となり、石灰化前線の周囲には軟骨細胞が密に集簇していた。この石灰化前線近傍は細胞活性が高いことが示唆され、さらに未分化間葉系細胞と軟骨細胞における分化、脱分化の過程が転写因子を介して制御され、成熟した軟骨細胞は種々のサイトカインを発現し、基質への血管進入と石灰化の促進をもたらし、骨形成が誘導されると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Histological, immunohistochemical, and real-time RT-PCR analyses of the expression of cell signaling and transcriptional factors in human ossified vertebral ligament. We analyzed the mRNA expression levels of signaling factors known to be involved in the ossification process in cultured ossified ligament cells subjected to cyclic tensile strain. Cyclic tensile strain was produced by Flexercell® FX-3000. The localization of these factors was examined in decalcified paraffin sections by immunohistochemistry. Controlled samples were harvested from non-ossified vertebral ligament of patients. Under resting conditions (no tensile strain), the mRNA levels of β -catenin, Runx2, Sox9 and Osteopontin in cultured ossified ligament cells were significantly higher than in the control cells. Application of cyclic tensile strain to ossified cells resulted in significant increases in mRNA expression levels of β -catenin, Runx2, Sox9, and Osteopontin at 24 hours. Hypertrophic chondrocytes present around the calcification front were immunopositive for Runx2 and Osteopontin. Immunoreactivity of β -catenin and Sox9 was strongly present in premature chondrocytes in the fibrocartilage area. Our results indicated that cyclic tensile strain applied to ossified vertebral ligament cells activated their ossification through a process mediated by the β -catenin signaling pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

脊柱靭帯骨化症（後縦靭帯骨化；OPLL、黄色靭帯骨化症；OLF）は遺伝的背景に種々の因子が関与する多因子疾患と推定され、成因解明の為に、遺伝子要因あるいは病態関連遺伝子の解明が必要である。近年の鋭意的な研究として、ヒトゲノム全域連鎖解析からの感受性遺伝子解析によるコラーゲン 6A1, 11A2 遺伝子の関与や、一塩基置換 (single nucleotide polymorphisms; SNPs) を含む DNA 多型を利用したノンパラメトリック連鎖解析ならびに罹患同胞対連鎖解析などの遺伝的解析が報告されている。これらはいずれもゲノム構造の変異をターゲットにした疾患関連遺伝子解析、感受性遺伝子解析であるが、更なる靭帯骨化の成因機序の解明、その治療法の開発のためには、ヒト靭帯骨化組織、靭帯細胞を用いた骨化関連因子の解析が必要である。これまで感受性遺伝子の同定により、BMP4 を含めたいくつかの骨代謝に関連する候補遺伝子の関与も示唆されているが、それらは既知の遺伝子解析に留まっているのが現状で、ゲノム解析を用いた骨化成因機序の解明には限界があると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト靭帯骨化組織、靭帯細胞を用いて骨化関連因子の解析を行うことで、更なる靭帯骨化の成因機序の解明を行う事を目的とする。脊柱靭帯骨化機序においての特定の骨化制御因子の同定が可能と成ればその治療法の開発においても極めて有意義な情報が得られると考えられる。

3. 研究の方法

頸椎 OPLL に対して前方除圧固定術、もしくは胸椎 OLF に対して後方手術時を行った際に骨化靭帯をなるべく en bloc に採取した。採取した骨化靭帯は骨組織を切除した後に細切し、explant 法にて細胞を遊走させ、5 継代培養して実験を行った。Cyclic tensile strain は Flexercell FX-3000 を用いて行い、ストレス反応時間は 0、6、12、24 時間とした。この際の Runx2、Sox-9、Osterix の発現を免疫組織化学的染色、Real-time RT-PCR、Western blotting 法にて評価した。

また骨化靭帯の一部は脱灰固定して薄切標本作製し、上記の因子について免疫組織化学染色を行った。

比較対象には非骨化後縦靭帯、非骨化靭帯を用いた。

(倫理面での配慮)

本研究を遂行するにあたり、研究対象者の人権擁護を最大限に配慮し、研究内容が苦痛を伴うものではなく、社会的不利益を蒙るものではなく、危険性を完全に排除し、疾患の病態解析のみが目的であることを説明及び同意を得ている。

4. 研究成果

(1) 骨化靭帯由来培養細胞を用いた骨化に関わる因子に関する検討

培養靭帯細胞は細長い紡錘形を呈しており、骨化靭帯由来細胞では細胞同士で重層化する傾向にあり、また Alkaline Phosphatase 活性は高値となっていた (図 1)。

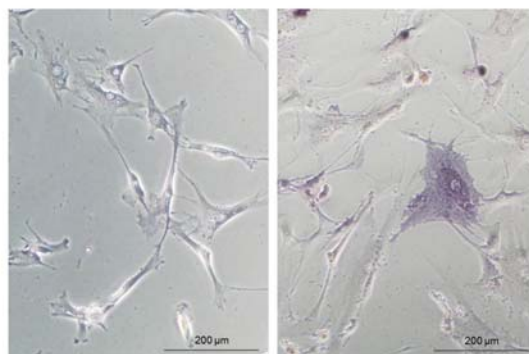


図 1：左：非骨化由来細胞、右：骨化靭帯由来細胞（骨化靭帯由来の靭帯細胞では Alkaline Phosphatase 活性が上昇している）

骨化靭帯由来細胞と非骨化靭帯由来細胞に対する real time RT-PCR による mRNA 発現の比較では、骨化靭帯由来細胞において β -catenin、Runx2、Osterix の mRNA の発現が有意に上昇しており、cyclic tensile strain を加えると β -catenin の mRNA 発現は 6 時間後から、Runx2、Osterix は 24 時間後から有意な上昇を認めた。

(2) 骨化靭帯組織の免疫組織化学的検討

非骨化靭帯の enthesis 部では線維層、線維軟骨層、石灰化軟骨層、骨層の整然とした層構造が観察でき、線維走行は規則正しく配列していた。これに対して骨化を生じた靭帯では膠原線維、弾性線維の配列構造は消失し、線維軟骨層および石灰化軟骨層が著明に拡大し、石灰化前線は不整化、線維方向への延長を認めた。

OPLL の骨化形態別にみると、限局型では硬膜方向に広がる比較的幅の薄い骨化前線の形成を認め、連続型では線維走行に沿って長軸方向に伸びる幅の広い骨化前線が観察でき、特に石灰化前線周囲を中心として細胞が密に存在していた (図 2)。

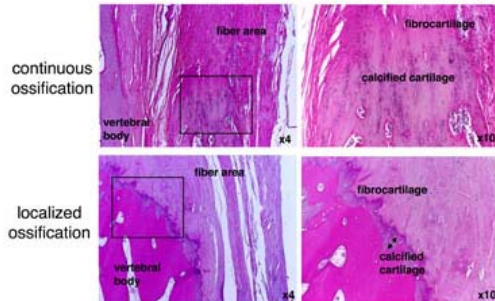


図 2: OPLL 骨化前線の HE 像

免疫染色では TGF- β 、BMP-2、VEGF の発現は線維軟骨層、石灰化前線の軟骨細胞に陽性であり、特に石灰化前線近傍の軟骨細胞で強陽性であった (図 3)。

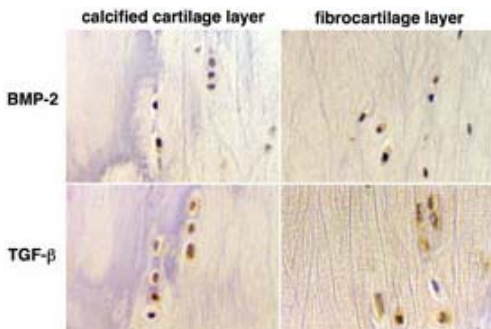


図 3: BMP-2, TGF- β の免疫染色

さらに BMP-2 は線維軟骨層外層の靭帯組織の線維芽細胞においても発現を認めた。

転写因子の発現は、Sox-9 は増殖軟骨細胞、間葉系細胞で陽性であったが、肥大軟骨細胞では陰性であった。Runx-2 は増殖軟骨細胞、肥大軟骨細胞で広範に陽性であり、Msx-2 は特に未分化な間葉系細胞で陽性であった (図 4)。

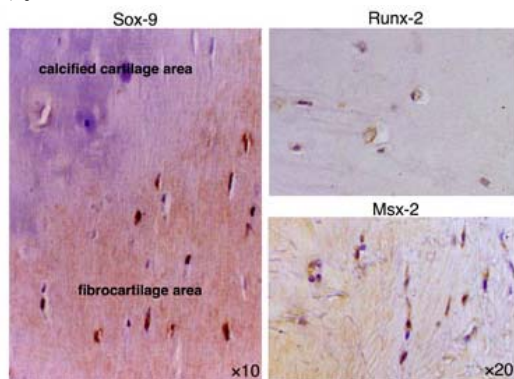


図 4: Sox-9, Runx-2, Msx-2 の発現

β -catenin は骨化前線の増殖期軟骨細胞に強く陽性であり、Runx2、Osterix は骨層近傍の成熟軟骨細胞、肥大軟骨細胞に強く発現していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Nakamura M, Johnson WE, Baba H. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation* in press (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22369693>
- ② Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H. Transplantation of Mesenchymal Stem Cells Promotes an Alternative Pathway of Macrophage Activation and Functional Recovery after Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma* in press (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22233298>
- ③ Uchida K, Yayama T, Cai CH, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, Yoshida A, Baba H. Cyclic Tensile Strain Facilitates the Ossification of Ligamentum Flavum Through β -Catenin Signaling Pathway. *In Vitro Analysis. Spine (Phila Pa 1976)* in press (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22158061>
- ④ Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Yayama T, Guerrero AR, Inukai T, Hirai T, Sugita D, Johnson WE, Baba H. Apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the spinal cord of spinal hyperostotic mouse (twy/twy): possible pathomechanism of human cervical compressive myelopathy. *Eur Spine J* 21:490-497, 2012. (査読有) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21935678>
- ⑤ Uchida K, Yayama T, Cai HX, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, Kobayashi S, Yoshida A, Chen KB, Baba H.

Ossification process involving the human thoracic ligamentum flavum: role of transcription factors. *Arthritis Res Ther* 13:R144, 2012. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21914169>

- ⑥ Uchida K, Yayama T, Sugita D, Nakajima H, Rodriguez Guerrero A, Watanabe S, Roberts S, Johnson WE, Baba H. Initiation and progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (twy/twy). *Eur Spine J* 21:149-155, 2012. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850419>
- ⑦ Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Rodriguez Guerrero A, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Zhu P, Baba H. High-mobility group box-1 and its receptors contribute to proinflammatory response in the acute phase of spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 36:2122-2129, 2011. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21343866>
- ⑧ Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Watanabe S, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Baba H. Tumor necrosis factor- α antagonist reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 36:1350-1358, 2011. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21224756>
- ⑨ Uchida K, Nakajima H, Hirai T, Yayama T, Chen KB, Kobayashi S, Roberts S, Johnson WE, Baba H. Microarray analysis of expression of cell death-associated genes in rat spinal cord cells exposed to cyclic tensile stresses in vitro. *BMC Neurosci* 11:84, 2010. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20663127>
- ⑩ Nakajima H, Uchida K, Yayama T, Kobayashi S, Guerrero AR, Furukawa S, Baba H. Targeted retrograde gene

delivery of brain-derived neurotrophic factor suppresses apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 35:497-504, 2010. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20190624>

- ⑪ Inukai T, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Kobayashi S, Mwaka ES, Guerrero AR, Baba H. Tumor necrosis factor- α and its receptors contribute to apoptosis of oligodendrocytes in the spinal cord of spinal hyperostotic mouse (twy/twy) sustaining chronic mechanical compression. *Spine (Phila Pa 1976)* 34:2848-2857, 2009. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19949368>
- ⑫ Mwaka ES, Yayama T, Uchida K, Kobayashi S, Kokubo Y, Nakajima H, Sato R, Orwotho NT, Baba H. Calcium pyrophosphate dehydrate crystal deposition in the ligamentum flavum of the cervical spine: histopathological and immunohistochemical findings. *Clin Exp Rheumatol* 27:430-438, 2009. (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19604435>

[学会発表] (計 7 件)

- ① 彌山 峰史, 内田 研造, 中嶋 秀明, 杉田 大輔, 馬場 久敏. Cyclic tensile stress upregulates the expression of β -catenin signaling in cultured cells harvested from human ossified ligamentum flavum. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2012, 2012. 2. 6-7, San Francisco
- ② 彌山 峰史, 内田 研造, 中嶋 秀明, 杉田 大輔, 馬場 久敏. Cyclic tensile stress が胸椎黄色靭帯の骨化形成に与える影響—内軟骨性骨化過程における Wnt β -catenin signaling の関与—. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 2011. 10. 20, 前橋
- ③ 彌山 峰史, 内田 研造, 杉田 大輔, 中嶋 秀明, 小久保 安朗, 渡邊 修司, 吉田 藍, 竹浦 直人, 馬場 久敏. 脊柱靭帯骨化における骨化前線部

の軟骨細胞分化の特徴. 第30回日本運動器移植・再生医学研究会, 2011. 9. 25, 福岡

- ④ 彌山 峰史, 内田 研造, 中嶋 秀明, 小久保 安朗, 杉田 大輔, Cai Hong-xin, 吉田 藍, 馬場 久敏. 培養骨化靭帯細胞における転写因子の発現と tensile stress の影響. 第40回日本脊椎脊髄病学会, 2011. 4. 22, Web 開催
- ⑤ K.Uchida, H.Nakajima, T.Hirai, T.Yayama, D.Sugita, S.Kobayashi, H.Baba. Cell death-associated genes expression patterns using microarray analysis in rat cultured spinal cord cells exposed to cyclic tensile stresses in vitro. 7th Combined Meeting of ORS, 2010, 10, 17, KYOTO
- ⑥ Yayama T, Uchida K, Cai HX, Kobayashi S, Nakajima H, Sato R, Sugita D, Alexander Guerrero, Chen KB, Baba H. Topographic expression of transcriptional factors in the human ossification of ligamentum flavum in thoracic spine. 7th Combined Meeting of ORS, 2010, 10, 17, KYOTO
- ⑦ 彌山峰史, 内田研造, Cai HX, 中嶋秀明, 小久保安朗, 小林 茂, 杉田大輔, 馬場久敏. 培養骨化靭帯細胞における機械的ストレスと骨形成誘導因子. 第29回日本運動器移植・再生医学研究会, 2010. 9. 25, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田研造 (UCHIDA KENZO)
福井大学・医学部・准教授
研究者番号：60273009

(2) 研究分担者

中嶋 秀明 (NAKAJIMA HIDEAKI)
福井大学・医学部・助教
研究者番号：10397276