

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09205

研究課題名(和文) HA01とビタミンDシグナルを介した後縦靭帯骨化症の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Pathophysiology and treatment of ossification of posterior longitudinal ligament mediated by HA01 and vitamin D signaling

研究代表者

谷脇 琢也 (Taniwaki, Takuya)

熊本大学・病院・助教

研究者番号：90448530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：後縦靭帯骨化症(OPLL)は、椎体後縁の後縦靭帯が骨化する原因不明の疾患である。我々は、GWASで同定されたOPLL発症と相関する遺伝子座に存在する遺伝子Hydroxyacid oxidase 1 (HA01)に着目し、HA01の発現が骨化の過程で有意に低下することを見出した。そこで、HA01の全身ノックアウト(HA01 KO)を新規に樹立し、その作出に成功したが、残念ながらOPLLの発症を認めなかった。しかし、尿サンプルを用いたメタボローム解析によって、HA01がtricarboxylic acid (TCA) cycleの制御に関わっていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

後縦靭帯骨化症(OPLL)は原因が特定されておらず、異所性骨化の発症を予防する方法が確立されていない難病である。OPLLが進行し、神経症状などで日常生活動作に支障をきたすようになった場合は、骨化により狭窄した脊柱管や椎間孔を拡大する手術的な治療も選択されるが、骨化の機序を解決するわけではないため、術後再狭窄が課題である。OPLLは明らかな遺伝性を示すため、GWASにより同定された疾患関連候補遺伝子へのアプローチは有用であり、候補遺伝子の中でもHA01は骨化誘導に伴い、最も変動の大きい遺伝子であった。骨化制御に直結する成果は得られていないが、病態解明の取り組みとして重要であると考えている。

研究成果の概要(英文)：Ossification of posterior longitudinal ligament (OPLL) is a disease of unknown cause in which the posterior longitudinal ligament, which connects the posterior border of the vertebral body, ossifies, resulting in spinal canal stenosis. We focused on Hydroxyacid oxidase 1 (HA01), a gene located at a locus correlated with the development of OPLL identified by a genome-wide association study (GWAS), and found that HA01 expression was significantly decreased during ossification in in vitro osteoblastic culture system. Thus, we newly established a systemic knockout mouse of HA01 gene (HA01 KO mice), but unfortunately, we did not find the development of OPLL in HA01 KO mice. Instead, metabolomic analysis of urine samples revealed, to our surprise, that HA01 plays an essential role in the regulation of the tricarboxylic acid (TCA) cycle.

研究分野：整形外科学

キーワード：整形外科 後縦靭帯骨化症

1. 研究開始当初の背景

後縦靭帯骨化症(ossification of posterior longitudinal ligament, OPLL)は、脊椎椎体の後縁を連結する後縦靭帯が骨化することにより、 脊柱管や椎間孔の狭窄が生じた結果、運動障害などのさまざまな神経症状を発症する疾患である。 遺伝的要因など、様々な原因が考えられているが、異所性骨化をきたす機序は依然不明のままであり、従って異所性骨化の発症を抑制したり予防する方法は確立されていない難病であった。 脊柱管や椎間孔の狭窄が高度となるなどして、神経症状が日常生活動作に支障をきたすまでに進行し、薬物治療などの保存療法によっても改善が得られない場合は、脊柱管や椎間孔を拡大する外科的治療が選択される場合もあるが、異所性骨化の機序そのものを解決するものではないため、術後も異所性骨化による再狭窄などにより症状が再発することが課題であった。そのため、OPLL の疾患発症機構を解明し、病態の解明に基づく、異所性骨化の抑制や予防法の開発が求められていた。

OPLL の疾患発症機構を解明するため、疫学的な研究や組織学的アプローチなど、さまざまな方法が試みられていたが、疾患発症機構の解明には至っていなかった。OPLL はそれまでの疫学的な研究から、明らかな遺伝性を示す疾患であることがわかっていたことから、ゲノム解析により疾患感受性遺伝子を同定し、その機能の解明から、OPLL の治療法を開発することが有用と考えられた。当時、OPLL 患者1,130例、非OPLL 対照コントロール7,135例のゲノム上の single nucleotide polymorphisms (SNPs)を比較する genome-wide association study (GWAS)が実施され、OPLL 発症と有意に関連する6つ

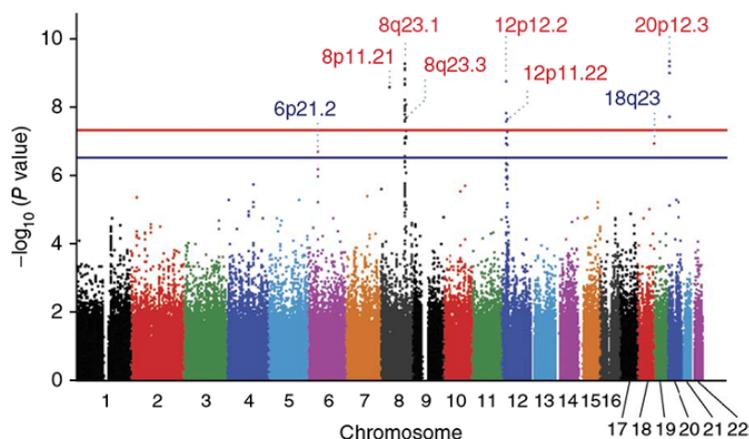
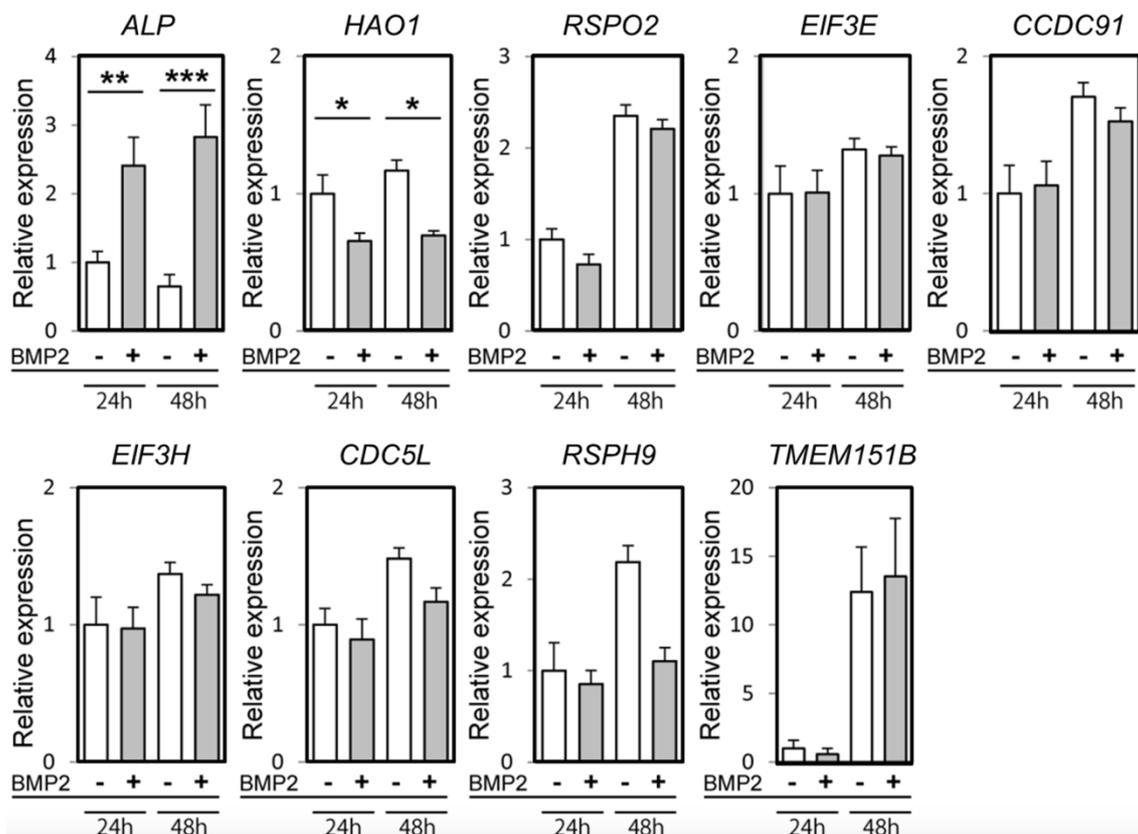


図1：GWASで同定されたOPLLの疾患発症と有意に関連する遺伝子座
OPLL患者1,130例、非OPLL対照コントロール7,135例を比較したGWASにより、OPLLの疾患発症と有意に関連する6つの遺伝子座が同定された。



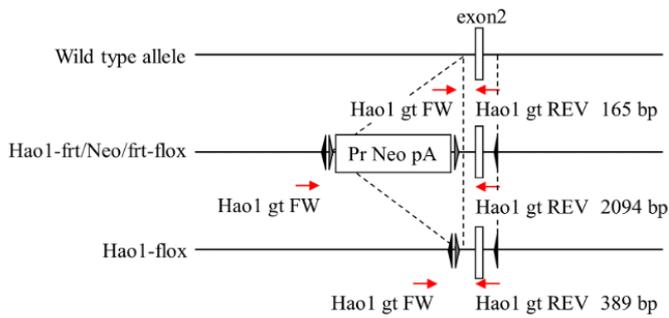


図3：Hao1-flox mouseの樹立
 マウスHao1遺伝子のexon2を挟むようにloxP sequenceを挿入し、ES細胞における相同組み換えでHao1-flox mouseを樹立した。この遺伝子座 (8p11.21, 8q23.1, 8q23.3, 12p12.2, 12p11.22, 20p12.3) が同定された (図1、Nat Genet 2014)。

2. 研究の目的

本研究の目的は OPLL の疾患発症を解明し、異所性骨化の病態の解明に基づく、異所性骨化の進行や新規発症を予防する方法を確立することである。この目的のため、当時 GWAS により同定されていた疾患発症と有意に相関する遺伝子座の情報を利用することとした。

3. 研究の方法

OPLL の症例対照研究の GWAS で同定された rs2423294 や rs374810, rs1979679, rs11045000 などの疾患発症と有意に相関する SNP が局在する遺伝子に位置し、かつ open reading frame を有する 7 つの遺伝子 (RSPO2, EIF3E, CCDC91, EIF3H, CDC5L, RSPH9, TMEM151B) を疾患関連遺伝子候補として同定した。そこで、これらの遺伝子が異所性骨化形成に寄与する可能性があるかを検証するために、マウス胎児繊維芽細胞を、骨芽細胞分化を誘導する osteogenic medium (BMP2 添加培地) あるいは control medium で培養し、各遺伝子の発現は realtime PCR で定量的に評価した。この際、骨芽細胞分化の指標の control として Alkaline phosphatase (ALP) の発現を解析した。Hydroxyacid oxidase 1 (Hao1) の in vivo での機能評価をするために、Hao1 の遺伝子欠損マウスを作出することとした。Hao1 の発現は肝臓で高いことが報告されており、コンベンショナルな Hao1 null mouse の作出では胎生致死になる可能性があるため、Cre/loxP system を用いたコンディショナルノックアウトマウスとして作出することとした。まず Hao1 flox mouse を作出し、全身的に Cre を発現する CAG Cre マウスと交配し、CAG Cre/Hao1^{flox/flox} mouse を Hao1 conditional knockout (Hao1 cKO) mouse として樹立することとした。Hao1 cKO mouse において Hao1 遺伝子が delete されていることを確認するために、Hao1 cKO mouse および control mouse の骨および肝臓を採取し、RNA 抽出から realtime PCR で定量的に Hao1 の発現を評価した。

Hao1 cKO mouse の OPLL の形成はマイクロ CT で、骨組織の評価はマイクロ CT を用いた骨形態計測で、また肝臓の組織評価は HE 染色で実施した。また血清を用いた代謝産物評価は、質量分析装置を用いた網羅的メタボローム解析にて実施した。

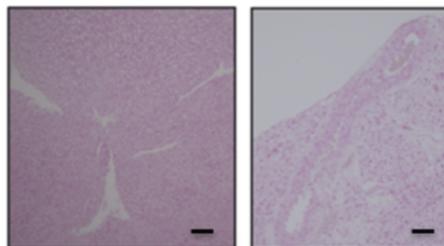


図7：Hao1 KOマウスは異所性石灰沈着を発症しない
 Hao1 KOマウスにおいて von Kossa 染色解析を腎臓 (左) および大動脈 (右) で行い、異所性の石灰化を評価したが、いずれの組織にも異所性石灰沈着がないことが確認された。

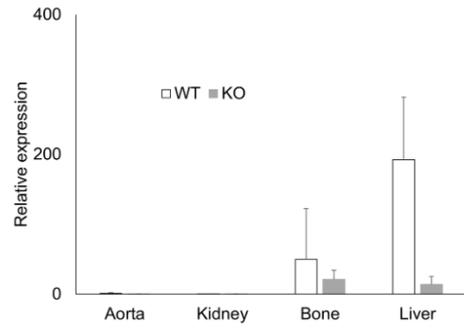


図4：Hao1 KOマウスの樹立
 CAG Cre/Hao1 flox mouse (Hao1 KOマウス) では、骨および肝臓におけるHao1の発現が野生型のコントロールマウス (WT) に比べて、有意に低いことが確認された。

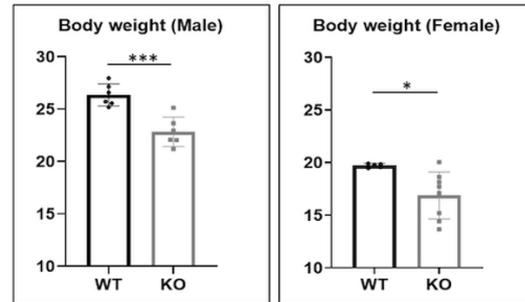


図5：Hao1 KOマウスは体重が低い
 Hao1 KOマウス (KO) は野生型のコントロールマウス (WT) に比べて、オス・メスともに体重が有意に低いことが確認された。

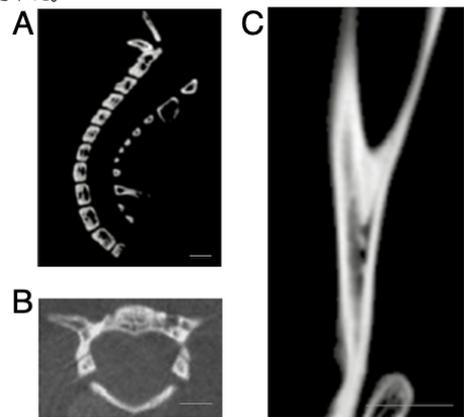


図6：Hao1 KOマウスはOPLLを発症しない
 Hao1 KOマウスにおいてマイクロCTの解析を行い、脊柱靭帯の骨化を矢状断 (A) および環状断 (B) にて評価したが、OPLLの発症は確認されなかった。またマイクロCT解析によって、アキレス腱にも異所性骨化がないことが確認された。

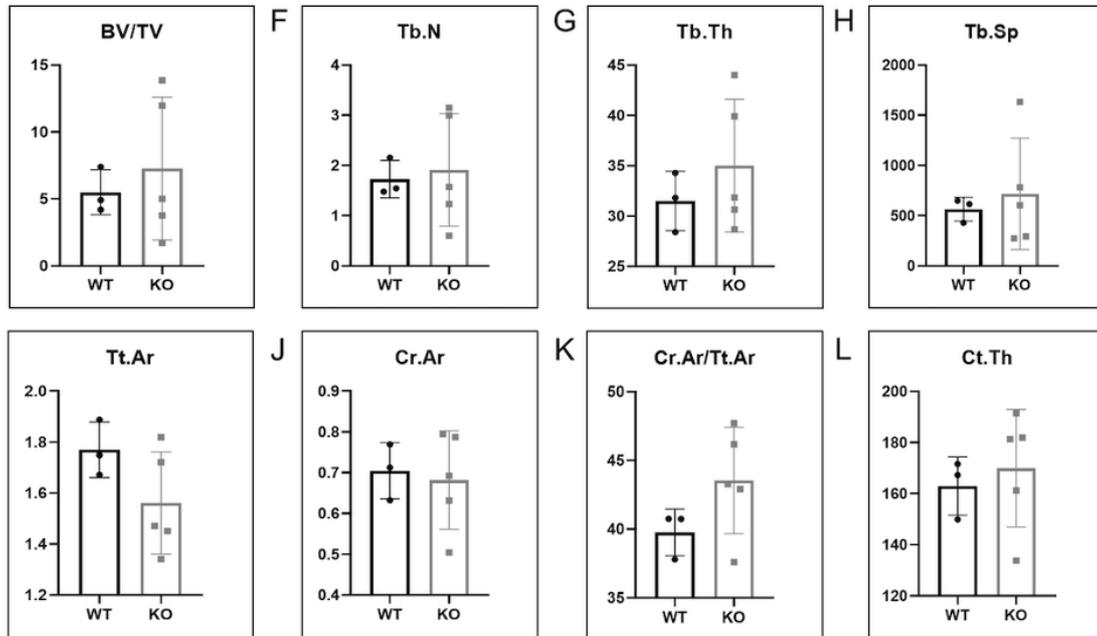


図8：Hao1 KOマウスは骨量増加傾向を示す
Hao1 KOマウス (KO) と野生型のコントロールマウス (WT) において、マイクロCTを用いた骨形態計測を実施したところ、BV/TVやTb.N、Tb.Thなど、骨量を示すパラメーターがKOの方がWTより高く、KOが骨量増加の傾向を呈することが明らかとなった。

4. 研究成果

GWAS で OPLL 発症と有意に関連する遺伝子座に存在し、open reading frameを有する7つの遺伝子 (RSP02, EIF3E, CCDC91, EIF3H, CDC5L, RSPH9, TMEM151B) について、マウス胎児繊維芽細胞を用いて骨芽細胞分化誘導する培養系にて、それぞれの遺伝子発現変化をrealtime PCRで評価したところ、コントロールにおける発現と比べて有意な発現変動を呈する遺伝子は、24時間培養および48時間培養のいずれにおいてもHao1のみであった(図2)。Positive controlとして発現変動を確認したAlpは24時間および48時間培養のいずれにおいても発現が有意に上昇していたことから(図2)、実験系は問題ないと判断した。Hao1の発現が骨芽細胞分化誘導に伴い有意に低下することから、Hao1がOPLLの発症に関与するとすると、Hao1の発現低下が局所の骨化傾向を促進すると仮説を立てた。そこで、in vivoでHao1の発現を低下させるモデルとしてHao1欠損マウスを作成することとした。それまでの既報で、Hao1は肝臓での発現が高いことが報告されており、conventionalな遺伝子欠損マウスでは胎生致死のリスクがあったことから、Hao1 flox mouseとして樹立することとした。マウスHao1遺伝子のexon2を挟むようにloxP sequenceを挿入し、ES細胞における相同組み換えにて

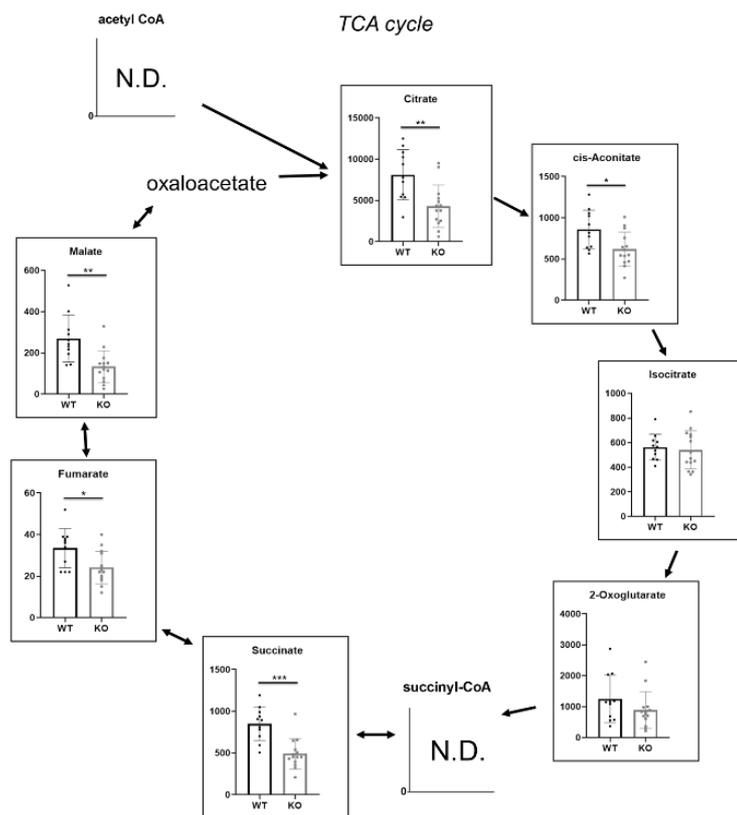


図9：Hao1 KOマウスはTCAサイクル関連の代謝産物量が有意に低い
Hao1 KOマウス (KO) と野生型のコントロールマウス (WT) の尿検体において、メタボローム解析により網羅的に代謝産物量を評価したところ、KOの方がWTより有意に低く、Hao1がTCAサイクルを制御することが明らかとなった。

Hao1 flox mouse を樹立した (図3)。胎生致死のリスクはあるが、Hao1 flox mouse が樹立できているかを確認するために、全身で Cre を発現する CAG Cre マウスと Hao1 flox mouse を交配して CAG Cre/Hao1 flox mouse (Hao1 knockout, Hao1 KO) マウスを樹立した。Hao1 KO マウスは胎生致死ではなく、骨や肝臓における Hao1 の発現はコントロールマウスに比べて有意に低下していたことから (図4)、Hao1 KO マウスの樹立に成功したことが確認された。オス・メスともにコントロールマウスに比べて Hao1 KO マウスの方が体重は有意に低かった (図5)。続いて Hao1 KO マウスにおいて OPLL が発症しているかをマイクロ CT にて評価したが、残念ながら OPLL の発症は確認されず、アキレス腱など他の組織にも異所性骨化の形成は認めなかった (図6)。組織的な解析によっても、Hao1 KO マウスの腎臓や大動脈において、異所性の石灰沈着は認めなかった (図7)。一方で、Hao1 KO マウス (KO) においてマイクロ CT にて骨形態計測を行うと、Bone volume/Tissue volume (BV/TV) や Trabecular number (Tb.N)、Trabecular thickness (Tb.Th) など、骨量増加を示す指標が野生型のコントロールマウス (WT) に比べて高い傾向を認めた (図8)。

最後に、Hao1 が glycolate と glyoxylate などの代謝を制御する酵素タンパク質であることから、尿検体を用いて代謝産物を評価する網羅的に評価するメタボローム解析を実施した。興味深いことに、Hao1 KO マウス (KO) において tricarboxylic acid (TCA) サイクル関連の代謝産物が野生型のコントロールマウス (WT) に比べて低いことが明らかとなった (図9)。今回、OPLL の疾患関連候補遺伝子として、Hao1 に着目した解析を行ったが、明らかな OPLL 発症への関与は認めなかった。一方で、Hao1 が骨量制御に関与する可能性や、TCA サイクルを制御する酵素タンパク質であることを明らかとした。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kimura A, Hirayama A, Matsumoto T, Sato Y, Kobayashi T, Ikeda S, Maruyama M, Kaneko M, Shigeta M, Ito E, Soma T, Miyamoto K, Soga T, Tomita M, Oya A, Matsumoto M, Nakamura M, Kanaji A, Miyamoto T | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Hao1 Is Not a Pathogenic Factor for Ectopic Ossifications but Functions to Regulate the TCA Cycle In Vivo | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Metabolites | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/metabo12010082 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔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 中村孝幸、杉本一樹、谷脇琢也、藤本徹、宮本健史 |
| 2. 発表標題 抗血小板薬が腰椎手術に与える影響の検討 |
| 3. 学会等名 第51回日本脊椎脊髄病学会学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中村孝幸、杉本一樹、谷脇琢也、藤本徹、宮本健史 |
| 2. 発表標題 頸椎症性筋萎縮症患者における術前針筋電図と術後麻痺改善の程度との関連についての検討 |
| 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 高木寛、中村孝幸、呉屋亮太、杉本一樹、谷脇琢也、藤本徹、宮本健史 |
| 2. 発表標題 4歳Down症児の環軸椎亜脱臼に対して環椎後弓切除を行った一例 |
| 3. 学会等名 第141回西日本整形・災害外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 富野航太、杉本一樹、中村孝幸、谷脇琢也、藤本徹、宮本健史 |
| 2. 発表標題 転移性脊椎腫瘍の治療経験 |
| 3. 学会等名 第142回西日本整形・災害外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021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 | 宮本 健史 (Miyamoto Takeshi) (70383768) | 熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401) | |

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 |
|---------|---------|