

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 12 月 24 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2010～2014

課題番号：22591648

研究課題名(和文) 難病、頸椎後縦靭帯骨化症特異的タンパク質の発見とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文) Phenotypic analysis of conventional knockout mice lacking the protein responsible for ossification of the posterior longitudinal ligament

研究代表者

永田 見生 (Nagata, Kensei)

久留米大学・医学部・学長

研究者番号：50140687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、後縦靭帯骨化症の克服のきっかけとなるよう、プロテオーム解析を行ってきた。後縦靭帯骨化症は、脊柱靭帯が骨化し、神経を圧迫し、麻痺を起こす疾患で、日本で見つけられた疾患であるが、現在、アジア以外にも欧米での発症が確認され、未だ原因不明の疾患で、難病となっている。我々は、13年間、患者血液中のタンパク質の解析を行い、健常者と明らかに欠損するタンパク質を発見した。このノックアウトマウスを作製したところ、すべてのマウスに患者と等しく、中年後期に後縦靭帯骨化を発症し、糖尿病の合併を呈し、後縦靭帯骨化症の原因タンパク質であると考えた。

研究成果の概要(英文)：Ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) is an incurable disease of unknown cause, and its symptoms include spinal ligament ossification and a reduced range of motion of the limbs. After we determined the proteins that are deleted or reduced in OPLL via a proteomics analysis of the serum of patients with OPLL and healthy subjects, we created a knockout mouse model of OPLL. The knockout mice did not exhibit any special change at birth compared to wild-type mice, but we observed later increases in the weight and incidence of type 1 diabetes in the knockout mice. They also displayed hyperglycemia and after 8 months, a gait disorder (claudication) of the hind leg as well as OPLL on three-dimensional computerized tomography and through a non-decalcification bone tissue morphometric assessment.

研究分野：整形外科

キーワード：プロテオーム 難病疾患 後縦靭帯骨化症 モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

難病である後縦靭帯骨化症は、難病医療費助成制度の対象疾患で現在、全国に 33,346 人が確認されている。これまで発症原因は不明であり、徐々に四肢麻痺を呈し、QOL が著しく低下し、早期解決が必要な疾患であった。

2. 研究の目的

後縦靭帯骨化症を克服することを目的に、疾患特異的なタンパク質を探索し、分子標的製剤の開発を目指し、後縦靭帯骨化症の発症病態の解明を行う。

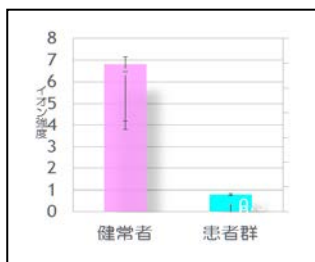
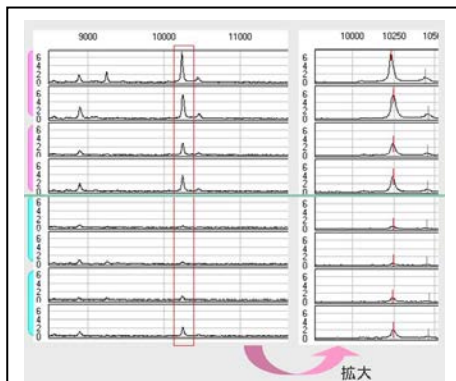
3. 研究の方法

患者血清プロテオミクスにより、後縦靭帯骨化症に特異的なタンパク質を発見した。健常者と比較し、後縦靭帯骨化症の患者には、欠損タンパク質が存在しており、精製、同定を行い、アミノ酸配列を決定した。そのタンパク質のノックアウトマウスを作製し、その表現型解析、生体内の生化学検査により原因タンパク質の検証と欠損タンパク質の後縦靭帯骨化症の分類による ELISA キッドによる定量解析を実施した。

ノックアウトマウスの後縦靭帯骨化症の発症の確認は、3D-CT と骨形態計測、Villanueva bone stain を施行した。

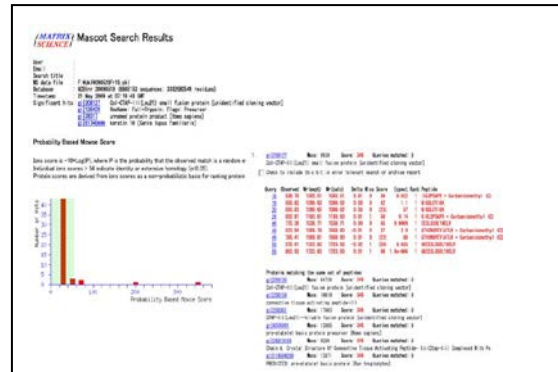
4. 研究成果

我々は、我が国の難病である後縦靭帯骨化症の患者血清疾患プロテオミクスにより、健常者と比較し欠損するタンパク質を発見した。このタンパク質のアミノ酸配列、立体構造を解明し、ELISA キッドの定量値からも LC-MS-MS 質量分析装置と同じく測定ができ、低値または欠損していることが判明した。

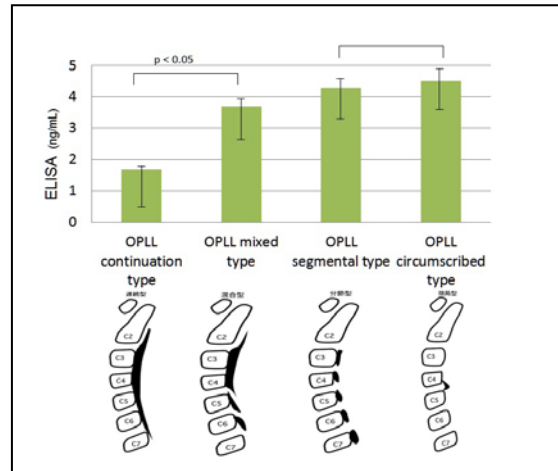


質量分析装置による欠損タンパク質のピーク
 ピンク：健常者
 ブルー：後縦靭帯骨化症の患者

後縦靭帯骨化症の患者血清には、健常者と比較し、有意に低値を示すタンパク質が存在した。

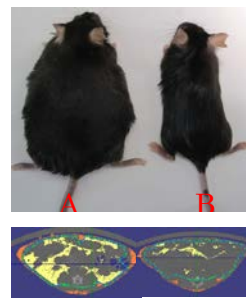


後縦靭帯骨化症減少タンパク質の同定



後縦靭帯骨化症の組織分類による欠損タンパク質の ELISA による定量解析

後縦靭帯骨化症は、脊柱靭帯の骨化形態により、連続型、混合型、分節型と限局型に分けるため、患者を各分類に分けて、血清中の欠損タンパク質を ELISA にて定量解析を施行した結果、重篤な連続型の欠損率が高かった。

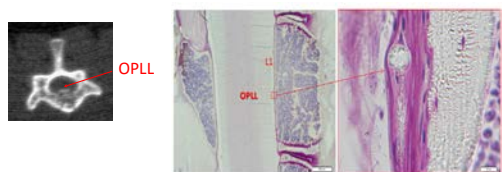


マウスの皮下脂肪、内臓脂肪の解析を 3D-CT にて行った。
 ノックアウトマウスは、同週齢、同性のマウスと比較し、体重の増加、皮下脂肪、内臓脂肪の増加が確認された。

A：後縦靭帯骨化症モデルマウス (♂)
 B：同週齢マウス (♂)

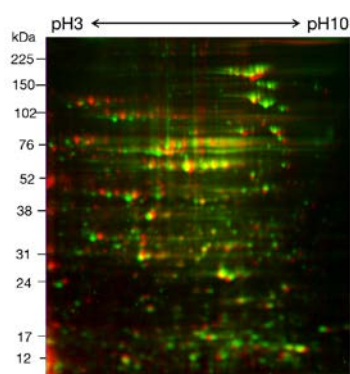
ノックアウトマウスの特徴は、誕生から 8 か月後、後ろ足の跛行が確認され、3D-CT により、後縦靭帯骨化が確認された。また、糖尿病を発症し、インスリン抵抗性があることが判明した。また、ノックアウトマウスの誕生に関して、雄が雌の 2 倍多く生まれ、骨形態計測の結果からヒトの異所性骨化と同じ計

測結果を得、後縦靭帯骨化症モデルマウスであることを立証した。



原因タンパク質の欠損、減少のメカニズムの解明を行った。

DNA エクソン、SNPs の異常はなく、なぜ、タンパク質が欠損しているのかを解明することが重要であると考え、ノックアウトマウスの後縦靭帯骨化組織のプライマリーセルのタンパク質修飾作用の解析を行った結果、欠損



タンパク質を誘導するリン酸化が確認でき、このインヒビターと欠損タンパク質を投与した動物実験では、非投与群

では、18 か月後、腰椎連続型の後縦靭帯骨化症を発症し、四肢麻痺を呈し、排尿、排便、飲水、餌を人工的に介護する状態となったが、投与群のマウスは、後縦靭帯骨化の発症が止まり、運動機能の低下は確認されなかった。

我々は、同じくプロテオミクスにより、靭帯特異的タンパク質を発見し、間葉系幹細胞由来靭帯組織の作製に成功した。In vitro により間葉系幹細胞由来靭帯組織の shRNA により後縦靭帯骨化の減少タンパク質の発現を抑制すると、靭帯組織の骨化減少を確認することができた。

今後、後縦靭帯骨化抑制剤の合成後、個別化間葉系幹細胞由来靭帯組織による安全性評価試験に活かすことで、動物愛護 3Rs での動物数の削減と臨床試験への加速化を行う。

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)

1. Tsuru M, Ono A, Uchida K, Shiwa M, Yasuda K, Itou A, Umeyama H, Matsumoto M, Toyama Y, & Nagata K. Nature Publishing Group in press. 公開 2016
2. Tsuru M, Soejima T, Kimura K, Sato K, Toyama Y, Nagata K. Proline/Arginine-Rich End

Leucine-Rich Repeat Protein Converts Stem Cells to Ligament Tissue and Zn(II) Influences Its Nuclear Expression. Stem Cells Dev. 22(14):2057-70, 2013.

[学会発表] (計 2 件)

1. 津留美智代, 小野睦、内田研造、戸山芳昭、永田見生. 後縦靭帯骨化症モデルマウスの作製による治療剤への開発研究. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. シンポジウム. 招聘, 2015. 10. 22.
2. 津留美智代, 小野睦、内田研造、戸山芳昭、永田見生. 難病、後縦靭帯骨化症モデルマウス作製による分子標的治療剤開発. 文部科学省・厚生労働省 革新的医療技術創出拠点プロジェクト 第 3 回 TR 推進合同フォーラム. 2015. 8. 31.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

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: 特許

番号: 特願 2014-129306 特願 2015-125793

出願年月日: 2015 年 6 月 24 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 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: 特許

番号: PCT/JP2013/056867

特願 2011-239140

取得年月日: 2015 年 9 月 24 日

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

永田 見生 (Nagata Kensei)

久留米大学・医学部・学長

研究者番号: 5 0 1 4 0 6 8 7

(2) 研究分担者

津留 美智代 (Tsuru Michiyo)

久留米大学・学長直属疾患プロテオミクス

遺伝子治療研究室・講師
研究者番号： 90368887

(3)連携研究者 ()

研究者番号：