

原 著

脊柱靱帯におけるMGP (Matrix Gla Protein) の発現
— 年齢及び石灰化・骨化との関連について —宮崎規行
(指導: 河合伸也教授)

長門総合病院整形外科 長門市東深川85 (〒759-4194)

Key words : Matrix Gla Protein, 脊柱靱帯, 骨化

緒 言

Matrix γ -carboxyglutamic acid (Gla) Protein (以下MGP) は1983年にPriceらにより脱灰骨抽出物の1成分として初めて報告された細胞外マトリックスの非コラーゲン性構造タンパク質である^{1, 2)}。ヒトMGPの構造は, 84のアミノ酸から成る10.6-kDの蛋白質で, 5個の γ -carboxyglutamic acid (Gla) 基と1個のジスルフィド結合を持つ³⁾。Gla基の形成にはビタミンKが関与しており⁴⁾、このGla基がCaイオンとの結合能を持つことにより過剰な石灰化を抑制する働きがあるといわれている^{5, 6)}。MGPは, 骨及び軟骨の細胞外マトリックスに高濃度に見られるが⁷⁾、肺, 心臓, 腎, 動脈壁などの多様な軟部組織にも分布しており^{8, 10)}、その産生は培養細胞において, 骨芽細胞, 軟骨細胞, 血管平滑筋細胞, 肺細胞, 腎臓細胞, 線維芽細胞で見られると報告されている¹¹⁻¹⁶⁾。関節軟骨におけるMGPの局在に関する報告では, 新生児では関節軟骨の間質全体にMGPの存在が確認されているが, 成人では軟骨細胞とその周囲の間質のみに存在している。また, 新生児の骨端軟骨では, その肥大細胞層と石灰化層の軟骨細胞のみに分布していると報告されている¹⁷⁾。血管壁においては, その中膜にMGPの沈着が見られ, 動脈硬化のある症例では, 重症度の高いものほどMGPの発現量が増加し, 石灰化部との接点で最も高い集積が見られると報告されている¹⁸⁾。最近の研究により, 生体内

におけるMGPの役割は, 軟骨や動脈壁の石灰化の強力な抑制物質と考えられており注目を浴びている。In vitro においてMGPやビタミンKは培養軟骨細胞によるカルシウムの析出を抑制した¹⁹⁾。また, MGPノックアウトマウスでは, 生後2週間以降に大動脈壁の中膜の弾性層板の著明な石灰化と軟骨細胞の出現, 骨端軟骨の増殖細胞層の石灰化による短体長が見られたと報告されている²⁰⁾。またヒトにおいても, 軟骨組織の異常石灰化をきたすKeutel症候群の原因がMGP遺伝子の変異であることが確認されている²¹⁾。さらにMGPが高齢者の動脈硬化症と関連していることも最近注目されている。ビタミンKの阻害剤であるワーファリンにより動脈壁の石灰化が促進されることが指摘されている²²⁾が, ビタミンKが欠乏すると, MGPのグルタミン酸のGla化が不完全になり, Caイオンとの結合能が低下するため石灰化抑制能を失い, 動脈壁などの軟部組織の異常な石灰化を引き起こすと考えられている。

一方, 軟部組織である脊柱靱帯にも石灰化や骨化が生ずることがある。黄色靱帯石灰化症は, 変性や肥厚した黄色靱帯に石灰が沈着する病態で, 脊髄圧迫をきたすこともある。脊柱靱帯骨化症は, 脊柱の後縦靱帯や黄色靱帯が異所性に骨化することにより, 脊髄や馬尾神経を圧迫し, しばしば重篤な脊髄や馬尾神経の麻痺を生じる疾患であるが, 靱帯石灰化症は靱帯骨化の前駆段階とする考え方もある。脊柱靱帯石灰化症および骨化症の原因のひとつとして, 他の結合組織における異所性石灰化(腱板や半

平成15年12月25日受理

月板など)と同様に, 脊柱靭帯の加齢的变化を基盤としていることが考えられている. その病態は不明であるが, 脊柱靭帯に存在する石灰化抑制因子の作用不全により石灰化が生ずる可能性が考えられる.

そこで, 石灰化抑制因子のひとつであるMGPに注目し, 靭帯石灰化の素因としての靭帯の加齢的变化におけるMGPの関与について検討することを研究目的とした. 本研究では, 手術時に採取した各年齢層の脊柱靭帯を用い, MGPの発現様式について免疫組織学および生化学的に解析し, 加齢による影響について比較検討した.

方 法

1. 抗ヒトMGPモノクローナル抗体を用いた腰椎黄色靭帯の免疫染色

脊椎疾患の脊椎手術時に腰椎黄色靭帯を採取した. 対象症例のプロフィールを表1に示す. 標本の採取は通常の手術術式で切除する黄色靭帯を使用したもので, かつ患者に術前に本実験の内容, 意義について十分に説明し, 切除する腰椎黄色靭帯の提供に同意を得た. 採取した腰椎黄色靭帯をパラフィン包埋した後4 μm に薄切し, プレパラート標本を作製した. 連続した切片に対しヘマトキシリン・エオジン染色及び免疫組織化学染色を行った. 免疫染色は, プロトコールに従いENVISION+キット/HRP (DAB) (K4006) (DAKO社, アメリカ)を用いて行った. 脱パラフィン処理の後, 抗体希釈液 (S2022) で100倍希釈したマウスの抗ヒトMGPモノクローナル抗体 (mAb³⁻¹⁵, ヒトMGPの3番から15番のアミノ酸と相同な合成ポリペプチドに対するモノクローナル抗体) (VitaK Inc., オランダ)¹⁸⁾を室温で2時間反応させ, さらにペルオキシダーゼ標

標本番号	年齢	性別	疾患	石灰化, 骨化
1	56	M	LCS	-
2	70	M	LCS	-
3	68	M	OLF	+
4	65	F	LCS	-
5	75	M	OLF	+
6	74	F	OLF	+
7	17	M	LDH	-
8	37	M	LDH	-
9	28	F	ST	-

LCS: 腰部脊柱管狭窄症 LDH: 腰椎椎間板ヘルニア
OLF: 黄色靭帯骨化症 ST: 脊椎腫瘍

表1 対象症例 (免疫染色) のプロフィール

識デキストラン結合抗マウスイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体を室温にて30分間反応させた後, 3, 3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライド (DAB) を用い発色させた. 非特異的発色を防ぐために一次抗体希釈液にBSAを添加し, 内因性ペルオキシダーゼ阻害には0.03%過酸化水素水をブロッカーとして使用した. 細胞の局在を確認するため, ヘマトキシリンで二重染色を行った後, 封入して光学顕微鏡で観察した. また, ネガティブコントロールとして, 上述の染色方法のうちから, マウスの抗ヒトMGPモノクローナル抗体の反応を行わず, 抗体希釈液のみを加え2時間反応させたものを作成した.

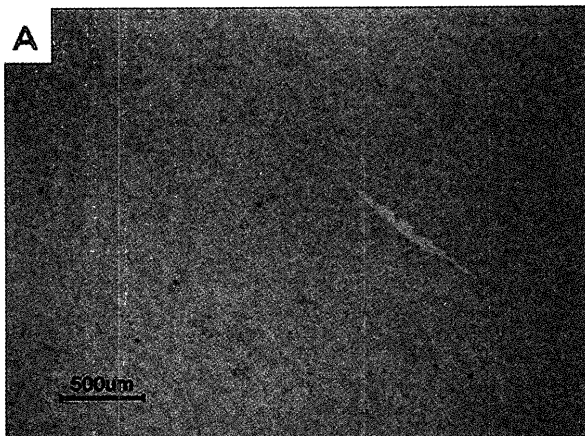
2. RT-PCR法を用いた腰椎黄色靭帯におけるMGP遺伝子の半定量

対象は腰部脊柱管狭窄症及び腰椎椎間板ヘルニアの手術症例であり, 術前のエックス線骨化を生じていないものとした. 対象疾患のプロフィールを表2に示す. 術中採取した黄色靭帯を液体窒素中に凍結保存し使用した. 標本内には黄色靭帯の骨化や石灰化巣がないことを肉眼的に確認し, また椎弓への附着部を取り除いた靭帯実質部のみを使用した. 前述の方法で採取した腰椎黄色靭帯よりmRNAを抽出し, RT-PCRによる解析を行った. 具体的には, 標本を液体窒素にて急速冷凍した後, Trizol (Gibco社, アメリカ)を加え, ホモジナイザーでホモジナイズした. これに, クロロホルムを加え12000rpmで15分遠心後, 上清にイソプロパノールを加え転倒混和後, さらに10000rpmで5分間遠心した. 沈殿を70%エタノールにて洗浄し, 蒸留水で溶解した. totalRNA1 μg を出発物質とし, Ready-

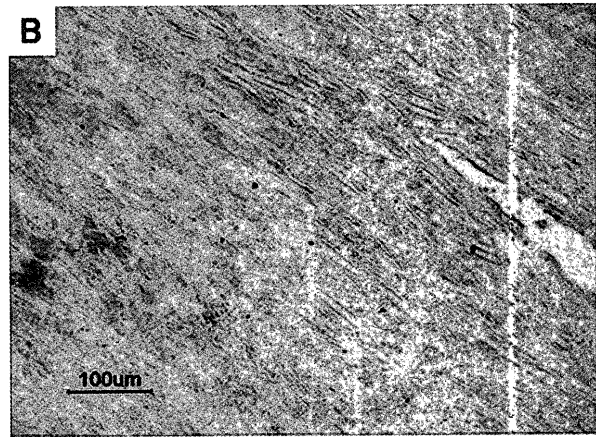
標本番号	年齢	性別	疾患
1	19	M	LDH
2	35	F	LDH
3	28	M	LDH
4	24	F	LDH
5	20	M	LDH
6	32	M	LDH
7	74	M	LCS
8	83	F	LCS
9	70	M	LCS
10	74	F	LCS
11	82	M	LCS
12	81	M	LCS
13	69	F	LCS

LCS: 腰部脊柱管狭窄症 LDH: 腰椎椎間板ヘルニア

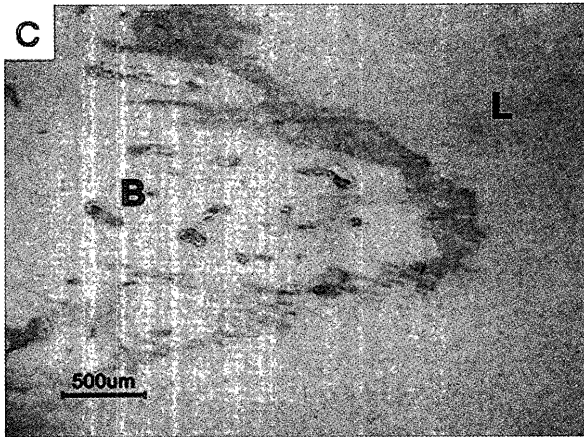
表2 対象症例 (RT-PCR法) のプロフィール



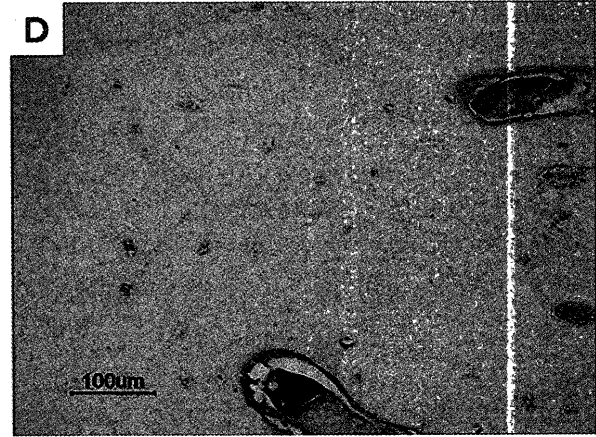
A: 腰椎黄色靱帯はその線維がほぼ均一に染色された。



B: Aで示した部位の強拡大像。靱帯線維はその表面は若干染色されるが、内部は染色されていない。線維間に強く染色される部位が多く見られる。



C: 骨靱帯付着部。骨組織 (B) と靱帯組織 (L) の境界部には帯状の陽性部位が見られた。



D: 黄色靱帯とともに採取された椎弓。骨基質はほとんど陰性であったが、骨内の血管壁に陽性の部分が見られた。

図1 抗ヒトMGPモノクローナル抗体を用いた免疫染色 (標本7)

To-Go T-Primed First-Strand Kit (Amersham Pharmacia Biotech, イギリス) を用いてプロトコールに従いcDNA合成を行った。この反応後のcDNAを鋳型にしてpuRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech, イギリス) を用いてプロトコールに従いPCRを行った。MGP及びコントロールとして用いたGlyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のプライマーは、過去の報告 (MGP:5'-atgaagagcctgatccttctt-3'5'-tcatttggtcctcggcgctt-3'; GAPDH:5'-ggtgaagtcggagtcaacgg-3'5'-ggtcatgagtccttccacag-3')³³⁾ に従い合成した。サーマルサイクラー (Progrm Temp Control System PC808, ASTEC) の条件は、PCRは95°C 45秒, 60°C 45秒, 72°C 90秒を30サイクル (MGP) または25サイクル (GAPDH)

試行し、最後に、74°C 5分の追加伸長反応を行った。得られたPCR産物を1.5%アガロースゲルにて電気泳動した後、エチジウムブロマイドで染色して解析を行った。ゲルをCCDカメラで撮影し、NIH image1.59にて各bandのdensityを計測した。MGPの発現量は、GAPDHのbandのdensityに対するMGPのbandのdensityの比率で表した。

3. 統計学的方法

相関係数の算出には、Pearsonの相関分析を用いた。なお、統計処理の有意性は、Fisherのrのz変換にて行い、危険率5%水準で判定した。データ解析はStatView4.11を用いて算出した。

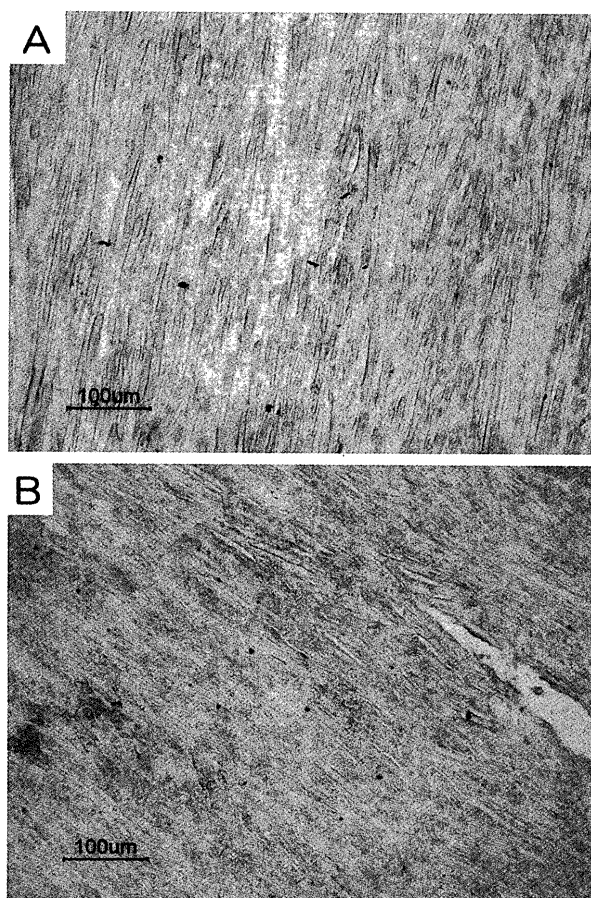


図2 若年例と高齢例におけるMGPの染色性の比較
A: 標本2 (高齢例) B: 標本7 (若年例)

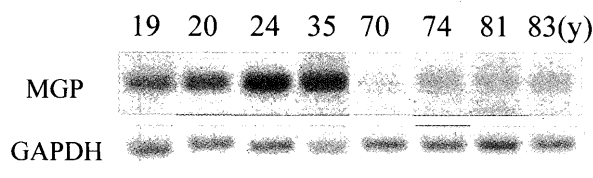


図3 RT-PCR法によるMGP遺伝子の増幅
腰椎黄色靱帯よりRNAを抽出した後cDNAを作成し、MGP及びGAPDH遺伝子に特異的なプライマーを用いてPCRを行った。上方の数字は年齢を示す。

結 果

1) 抗ヒトMGPモノクローナル抗体を用いた腰椎黄色靱帯の免疫染色

上述の方法で抗ヒトMGPモノクローナル抗体を用いて腰椎黄色靱帯の免疫染色を行った後、光学顕微鏡 (40~200倍) で観察した (図1)。靱帯部分の観察では、弱拡大では、全般にほぼ均一な染色が見られた (図1 A)。強拡大では、靱帯線維はその表面が染色され、線維の内部は染色されていなかった

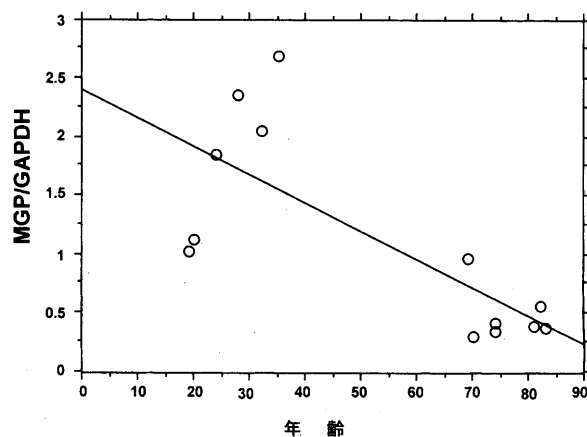


図4 腰椎黄色靱帯におけるMGP遺伝子の相対的発現量と年齢との相関

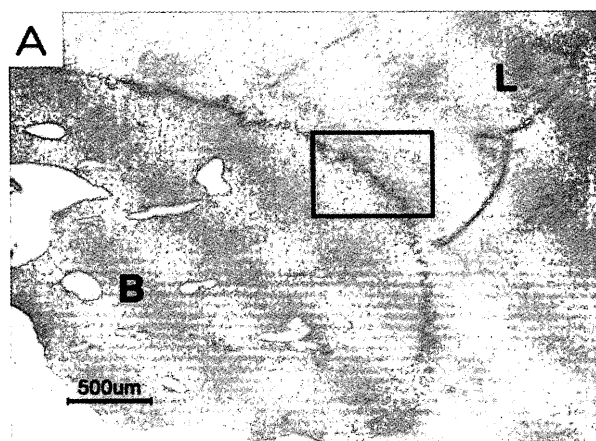
13症例 (若年群6例, 高齢群7例) の年齢と、半定量的RT-PCRで得られたGAPDH補正後の相対的MGP遺伝子の発現量との相関について解析した。Pearsonの相関係数は-0.755, Fisherのrのz変換では $p=0.018$ と、有意な相関を認めた。

が、線維間には濃染される部分も散見された (図1 B)。靱帯の骨への付着部は、带状に染色されていた (図1 C)。骨組織は、基質はほとんど陰性で、骨内の血管壁に陽性所見が見られた (図1 D)。

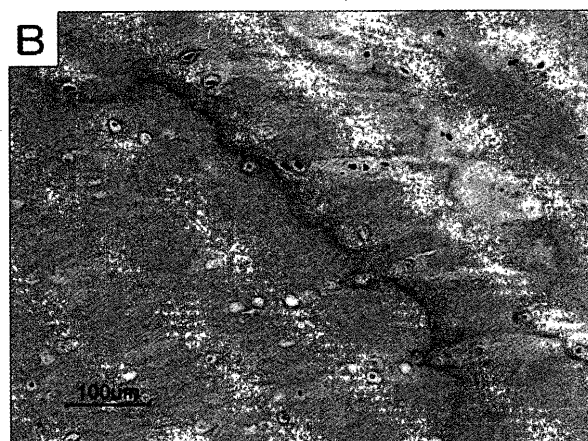
次に、この腰椎黄色靱帯におけるMGPの染色性に対する加齢による影響について検討した。若年群では、靱帯は全般的に染色性が良好で、靱帯線維間に濃染される部位が多く見られたのに対し、高齢群では全般に染色性が弱く、濃染された部位も少ない傾向が見られた (表1)。靱帯の骨への付着部の濃染帯は若年群、高齢群いずれにも見られ、特にその染色性に差異は見られなかった。図2に若年及び高齢者由来の黄色靱帯を用いた免疫染色の代表例を示す。

2) RT-PCR法による腰椎黄色靱帯のMGP遺伝子発現の検討

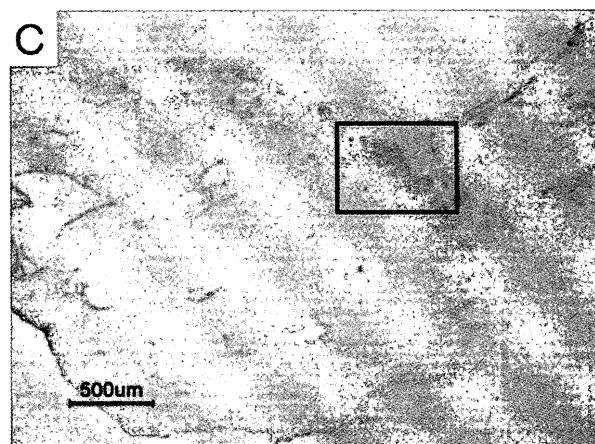
腰椎黄色靱帯におけるMGP遺伝子発現の加齢による影響について検討するために、RT-PCR法によりMGP遺伝子の半定量を行った。今回用いたすべての組織において、想定されるサイズのbandが確認された (MGP: 312bp; GAPDH: 500bp) (図3)。また、RT-PCR法の定量性について調べるために、加えるテンプレートを段階的に希釈した後PCRを行い、bandのdensityがほぼ直線的に低下することを



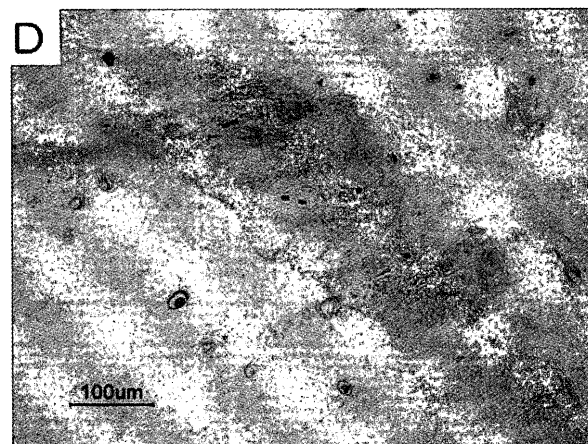
A: HE染色の弱拡大像。エオジンで濃染される骨化組織 (B) と靱帯組織 (L) の境界部に線状にエオジンで濃染される石灰化前線が見られる。



B: Aで示した部位の強拡大像。石灰化前線は軟骨組織の中にあり、石灰化前線より骨化側の軟骨組織は靱帯側の軟骨組織より強く染色されている。



C: 免疫染色の弱拡大像。石灰化前線に接した靱帯側に陽性部位が見られた。



D: 同部の免疫染色の強拡大像。石灰化前線より右側 (靱帯側) の軟骨組織内に強い染色性が見られるが、左側 (骨化、石灰化部) には見られない。

図5 黄色靱帯骨化症の免疫染色 (標本5)

確認した。すべての標本においてGAPDHのbandのdensityがほぼ同程度であることを確認した後、GAPDHのbandのdensityに対するMGPのbandのdensityの比率を算出しMGPの発現量とした。年齢と腰椎黄色靱帯におけるMGPの発現量との相関について検討すると、Pearsonの相関係数 -0.755 、Fisherの r の z 変換では $p=0.018$ と、有意性のある強い相関を認めた。直線回帰分析でも回帰関数 $Y=2.401-0.024X$ 、相関係数 -0.755 、 $p=0.0028$ と有意性を認めた (図4)。

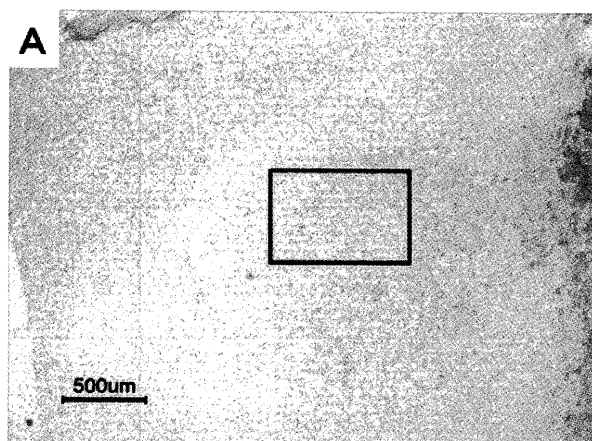
3) 黄色靱帯骨化症におけるMGPの免疫染色

黄色靱帯石灰化症の靱帯では、HE標本にて、エオジンで濃染される骨化巣と靱帯組織の境界部に線状で明瞭な石灰化前線が見られた (図5A)。強拡大

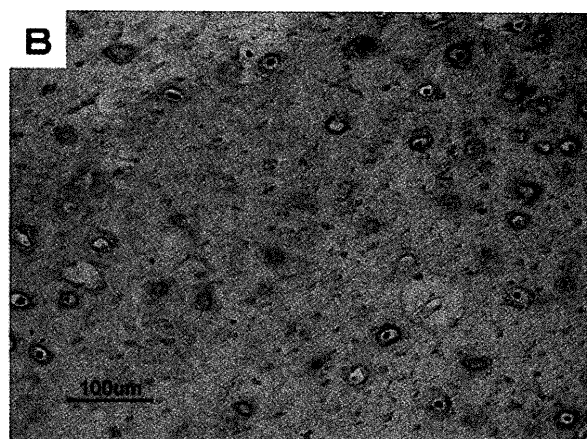
大にて石灰化前線の周辺には軟骨様細胞がみられた (図5B)。MGPの免疫染色では、全体的に靱帯の染色性は低下していたが、石灰化前線靱帯側の線維軟骨層に強い染色性がみられた (図5C, D)。また、同じ標本内で靱帯内に異所性に発生した軟骨組織がみられ、この部位もMGP抗体による免疫染色にて陽性であった (図6)。

考 察

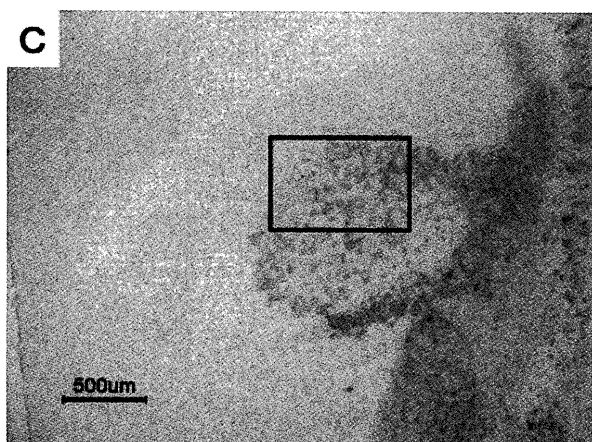
MGPは細胞外マトリックスを構成するタンパク質であるが、その局在に関しては多数の報告が見られる。MGP遺伝子の発現は、肺、軟骨、心臓、腎臓などに分布し、細胞レベルでは骨芽細胞、軟骨細胞、血管平滑筋細胞、肺細胞、腎細胞、線維芽細胞



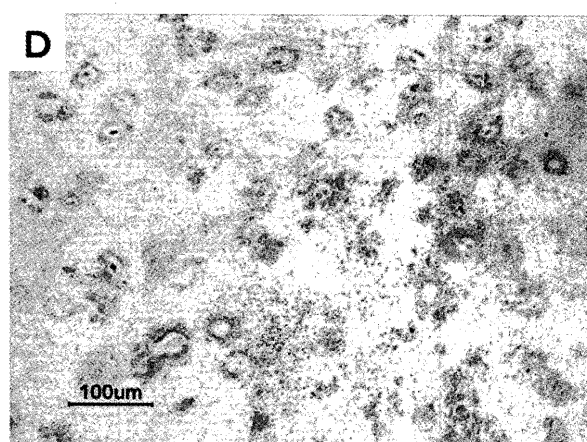
A: HE染色の弱拡大像。細胞成分に富む異所性軟骨組織が見られる。



B: Aで示した部位の強拡大像。



C: 免疫染色の弱拡大像。軟骨部にほぼ一致して強い染色性が見られる。



D: 同部の免疫染色の強拡大像。異所性軟骨組織の間質部に濃染部位が見られる。

図6 異所性軟骨組織の免疫染色(標本5)

などの培養細胞にて確認されている^{7, 12)}。また、蛋白レベルでは免疫組織化学的検討により、骨、軟骨、血管壁においてその存在が報告されており¹⁸⁾、血清中のMGP値の測定も可能である²³⁾。靭帯組織におけるMGPの局在を検討した報告は我々が渉猟し得た限りでは見られなかったが、本研究において黄色靭帯にもMGPの存在が確認された。靭帯線維にはほぼ均一に抗MGP抗体による染色が見られたことは、MGPが脊柱靭帯の細胞外マトリックスの構成成分の一つであることを示している。また、靭帯内の線維芽細胞の核の周辺にMGPが集積しているのは、靭帯内のMGPが線維芽細胞によって産生されていることを示唆する所見と考えられる。さらに黄色靭帯の骨付着部に帯状の濃染域が見られ、これはEnthesis部の線維軟骨層に一致し、他の軟骨組織と同様、ここに存在する軟骨細胞もMGPを発現していると考えられる。

次に黄色靭帯におけるMGPの発現の加齢による影響について検討したが、免疫組織化学的検討により高齢者由来の黄色靭帯でMGPの発現が低下する傾向がみられた。また、RT-PCR法により年齢と黄色靭帯におけるMGP遺伝子の発現量との間に有意な負の相関がみられた。局所におけるMGPの加齢による変化を検討した報告は我々が渉猟し得た限りでは見られなかったが、血清中のMGPの量は年齢による差はないと報告されている²³⁾。加齢により脊柱靭帯は変化しており、これまでに組織学的、生化学的に解析をおこなった報告がみられる。病理学的所見より、腰椎黄色靭帯では加齢に伴い弾性線維の減少、膠原線維の膨化、線維軟骨様細胞の出現、靭帯内石灰化等を生じると報告されている²⁴⁾。また、黄色靭帯より抽出した細胞外マトリックスの生化学的分析により、高齢者由来の脊柱靭帯ではV型コラーゲン²⁵⁾やコンドロイチン6-硫酸²⁶⁾が増加している

ことが確認されている。さらに免疫組織化学による分析にて、テネシンの増加や $\alpha 2$ インテグリンの低下が加齢による変化として報告されている²⁷⁾。高齢者群で靱帯内のMGPの量が低下する原因は明らかではないが、これまでの報告と同様、脊柱靱帯の加齢変化の一つと考える。

MGPの生理的意義は、基本的には石灰化の抑制因子であり、内軟骨性骨化の過程においても石灰沈着の調節因子として働いていると考えられている。つまり、血管壁や他の軟部組織と同様、健全な脊柱靱帯においては、MGPは石灰化や骨化を抑制していると考えられる。黄色靱帯骨化の病態は、骨付着部を中心に過剰な軟骨細胞の増殖をきたし、最終的に内軟骨性骨化を主体とした骨形成をきたすことから²⁸⁾、靱帯の骨付着部に存在するMGPは靱帯骨化の抑制因子として機能している可能性が考えられる。最近の研究によりMGPはBMP-2の結合蛋白であることが明らかとなり、MGPの石灰化および骨化抑制効果はこのBMP-2に対する抑制作用を介するものであることが報告されている^{29, 30)}。当教室の研究にてBMP-2は靱帯骨化の発生に関与していると報告³¹⁾していることから、BMP-2の抑制因子であるMGPの低下や作用不全が靱帯骨化の発生機序に関与している可能性がある。本研究にて高齢者由来の黄色靱帯でMGPの発現の低下がみられたが、これは高齢者における脊柱靱帯の石灰化や骨化の一要因であると考えている。

黄色靱帯石灰化や骨化症例に対する免疫染色の結果では、石灰化や骨化部周辺にMGPの集積がみられ、石灰化、骨化部から離れた靱帯組織では染色性が低下していた。Spronkらの動脈壁石灰化の解析においても、初期ではMGPの発現が少ない部位で石灰化が発生しているが、石灰化が進行した例では、石灰化の周辺に発現の増強がみられており、これは石灰化や骨化を抑制するために反応性に発現が促進された結果であると考察している³¹⁾。本研究での黄色靱帯骨化症例の染色の結果とSpronkらの動脈壁石灰化例のMGPの分布のパターンはほぼ一致していることから、黄色靱帯内でもMGPは動脈壁と同様に石灰化の抑制因子として働いていることが推測された。血清中のMGPを測定した論文では、動脈

壁の石灰化の著明な例で血清MGP値が上昇すると報告している。また最近のMGPのGla化について解析した報告では、石灰化の周辺に発現しているMGPはGla化が不完全であり石灰化の抑制効果に乏しい、と結論している³²⁾。この石灰化周辺におけるMGPの発現増強に関してはその生理的意義等是不明であるが、MGPが局所のカルシウム代謝に深く関わっていることは明らかであり、今後更なる解析が必要である。

結 語

1. 腰椎黄色靱帯におけるMGPの発現を免疫組織化学及びRT-PCR法にて検討した。
2. 靱帯内のMGPの局在は、靱帯実質部には比較的少なかったが、靱帯骨付着部や石灰化巣周辺には多量に発現していた。
3. MGP遺伝子は腰椎黄色靱帯に発現しており、その発現量は加齢に伴い減少していた。
4. 黄色靱帯骨化症例のMGP染色では、全体的に靱帯の染色性は低下していたが、石灰化前線靱帯側の線維軟骨層に強い染色性がみられた。
5. MGPは動脈壁などの他の軟部組織と同様脊柱靱帯においても石灰化、内軟骨性骨化の過程の石灰沈着の調節因子として働いていると考えられ、その加齢による減少が高齢者における石灰化や骨化の一要因であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究に対し御指導、御校閲を賜った河合伸也教授に深謝いたします。また、直接の御指導、御助言を頂いた田中浩講師ならびに本研究における実験を御指導頂いた国立療養所山陽病院村上知之先生に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Price PA, Urist MR, Otawara Y. Matrix Gla protein, a new gamma-carboxyglutamic acid-containing protein which is associated with the organic matrix of bone. *Biochem Biophys Res Commun* 1983; **117** (3): 765-71.

- 2) Price PA, Williamson MK. Primary structure of bovine matrix Gla protein, a new vitamin K-dependent bone protein. *J Biol Chem* 1985 ; **260** (28) : 14971-5.
- 3) Hackeng TM, Rosing J, Spronk HM, Vermeer C. Total chemical synthesis of human matrix Gla protein. *Protein Sci* 2001 ; **10** (4) : 864-70.
- 4) Vermeer C, Braam L. Role of K vitamins in the regulation of tissue calcification. *J Bone Miner Metab* 2001 ; **19** (4) : 201-6.
- 5) Vermeer C, Thijssen HH, Hamulyak K. Vitamin K and tissue mineralization. *Bibl Nutr Dieta* 2001 ; (55) : 159-70.
- 6) Cairns JR, Price PA. Direct demonstration that the vitamin K-dependent bone Gla protein is incompletely gamma-carboxylated in humans. *J Bone Miner Res* 1994 ; **9** (12) : 1989-97.
- 7) Luo G, D'Souza R, Hogue D, Karsenty G. The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development. *J Bone Miner Res* 1995 ; **10** (2) : 325-34.
- 8) Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 ; **20** (2) : 317-27.
- 9) Wallin R, Cain D, Sane DC. Matrix Gla protein synthesis and gamma-carboxylation in the aortic vessel wall and proliferating vascular smooth muscle cells—a cell system which resembles the system in bone cells. *Thromb Haemost* 1999 ; **82** (6) : 1764-7.
- 10) Hao H, Hirota S, Tsukamoto Y, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Yutani C. Alterations of bone matrix protein mRNA expression in rat aorta in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995 ; **15** (9) : 1474-80.
- 11) Hale JE, Fraser JD, Price PA. The identification of matrix Gla protein in cartilage. *J Biol Chem* 1988 ; **263** (12) : 5820-4.
- 12) Fraser JD, Price PA. Lung, heart, and kidney express high levels of mRNA for the vitamin K-dependent matrix Gla protein. Implications for the possible functions of matrix Gla protein and for the tissue distribution of the gamma-carboxylase. *J Biol Chem* 1988 ; **263** (23) : 11033-6.
- 13) Fraser JD, Otawara Y, Price PA. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates the synthesis of matrix gamma-carboxyglutamic acid protein by osteosarcoma cells. Mutually exclusive expression of vitamin K-dependent bone proteins by clonal osteoblastic cell lines. *J Biol Chem* 1988 ; **263** (2) : 911-6.
- 14) Shanahan CM, Weissberg PL, Metcalfe JC. Isolation of gene markers of differentiated and proliferating vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1993 ; **73** (1) : 193-204.
- 15) Rannels SR, Cancela ML, Wolpert EB, Price PA. Matrix Gla protein mRNA expression in cultured type II pneumocytes. *Am J Physiol* 1993 ; **265** (3 Pt 1) : L270-8.
- 16) Cancela ML, Price PA. Retinoic acid induces matrix Gla protein gene expression in human cells. *Endocrinology* 1992 ; **130** (1) : 102-8.
- 17) Loeser R, Carlson CS, Tulli H, Jerome WG, Miller L, Wallin R. Articular-cartilage matrix gamma-carboxyglutamic acid-containing protein. Characterization and immunolocalization. *Biochem J* 1992 ; **282** (Pt 1) : 1-6.
- 18) Schurgers LJ, Dissel PE, Spronk HM, Soute BA, Dhore CR, Cleutjens JP, Vermeer C. Role of vitamin K and vitamin K-dependent proteins in vascular calcification. *Z Kardiol* 2001 ; **90** : 57-63.
- 19) Yagami K, Suh JY, Enomoto-Iwamoto M, Koyama E, Abrams WR, Shapiro IM, Pacifici M, Iwamoto M. Matrix GLA protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *J Cell Biol* 1999 ; **147** (5) : 1097-108.

- 20) Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 1997 ; **386 (6620)** : 78-81.
- 21) Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Ziereisen F, Yuksel B, Gardiner RM, Chung E. Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome. *Nat Genet* 1999 ; **21 (1)** : 142-4.
- 22) Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998 ; **18 (9)** : 1400-7.
- 23) Braam LA, Dissel P, Gijsbers BL, Spronk HM, Hamulyak K, Soute BA, Debie W, Vermeer C. Assay for human matrix gla protein in serum : potential applications in the cardiovascular field. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 ; **20 (5)** : 1257-61.
- 24) Yoshihiko Hotta. Anatomical study of the yellow ligament of spine with special reference to its ossification. *J.Jpn. Orthop. Ass.* 1985 ; **59** : 311-325.
- 25) 鳥 欽也, 玉置哲也, 吉田宗人, 大島 章. 脊柱黄色靱帯の加齢的变化と肥厚のコラーゲン分析による研究. 厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成4年度研究報告書 68-71.
- 26) 岡田晶博, 原田征行, 植山和正, 岡村良久, 市川司朗, 伊藤淳二, 岡本佳隆, 新戸部泰輔, 武田祐介. 年代別黄色靱帯の生化学的分析—加齢に伴うプロテオグリカンの変化—厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成2年度研究報告書 : 124-132.
- 27) 酒匂 崇, 藤井康成, 武富栄二, 増田明敏, 今村健志, 吉田浩巳. 黄色靱帯軟骨靱帯移行部の加齢に伴う変化—テネイシン免疫染色による染色性の検討—厚生省特定疾患脊柱靱帯骨化症調査研究班平成3年度研究報告書 149-153.
- 28) 山本謙吾, 今給黎篤弘, 根本敏成, 町田英明. Zucker fatty ratにおける脊柱靱帯骨化. *THE BONE* 2002 ; **16 (3)** : 225-233.
- 29) Zebboudj AF, Imura M, Bostrom K. Matrix GLA protein, a regulatory protein for bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* 2002 ; **277 (6)** : 4388-94. Epub 2001 Dec 06.
- 30) Bostrom K, Tsao D, Shen S, Wang Y, Demer LL. Matrix GLA protein modulates differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 in C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* 2001 ; **276 (17)** : 14044-52. Epub 2001 Jan 26.
- 31) Spronk HM, Soute BA, Schurgers LJ, Cleutjens JP, Thijssen HH, De Mey JG, Vermeer C. Matrix Gla protein accumulates at the border of regions of calcification and normal tissue in the media of the arterial vessel wall. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 ; **289 (2)** : 485-90.
- 32) Sweatt A, Sane DC, Hutson SM, Wallin R. Matrix Gla protein (MGP) and bone morphogenetic protein-2 in aortic calcified lesions of aging rats. *J Thromb Haemost* 2003 ; **1 (1)** : 178-85.
- 33) Bilbe G, Roberts E, Birch M, Evans DB. PCR phenotyping of cytokines, growth factors and their receptors and bone matrix proteins in human osteoblast-like cell lines. *Bone* 1996 ; **19 (5)** : 437-45.
- 34) Tanaka H, Nagai E, Murata H, Tsubone T, Shirakura Y, Sugiyama T, Taguchi T, Kawai S. Involvement of bone morphogenic protein-2 (BMP-2) in the pathological ossification process of the spinal ligament. *Rheumatology (Oxford)* 2001 ; **40 (10)** : 1163-8.

Expressions of Matrix Gla Protein (MGP) in the Spinal Ligaments – Effects of Age and Calcification/Ossification –

Noriyuki MIYAZAKI
(Director : Prof. Shinya KAWAI)

*Department of Orthopedic Surgery, Nagato Sogo Hospital,
85 Higashi-Fukawa, Nagato-city, Yamaguchi 759-4194, Japan*

SUMMARY

Matrix γ -carboxyglutamic acid (Gla) Protein (MGP), a mineral binding vitamin K-dependant protein exists in the matrix of cartilage and in the media of the aortic wall and is considered as a regulator of physiological or pathological calcification. Calcification or ossification of the spinal ligaments have received attention in a number of reports, as in some cases the spinal cord is compressed and myelopathy occurs. In the present study, to investigate the role of MGP in the calcification or the ossification of the spinal ligaments, we examined expression of MGP in the lumbar spinal yellow ligaments of human. In immunohistochemical study we found the diffuse staining of MGP in the matrix of yellow ligaments and MGP was accumulated at the enthesis of the ligament and the circumference of the site of pathological calcification. There was a tendency in staining of MGP that they were better stained in young patients than old ones. Semiquantitative RT-PCR to amplify MGPM-RNA was performed to measure the quantity of MGP mRNA in the yellow ligaments, showing that the quantity of MGP mRNA was decreased in proportion to aging. These results suggest that expression of MGP in spinal ligament could be a potential clue for elucidating how heterotopic calcification or ossification develops in ligament tissue.