

による胸髄症の術後成績・QOL-胸椎後縦
靱帯骨化症手術例についての検討-厚生省
特定疾患脊柱靱帯骨化症分科会平成10年
度研究報告書：133-142, 1999

3)Matsumoto M, Chiba K, Toyama Y, et al:
Surgical results and related factors for
ossification of posterior longitudinal
ligament of the thoracic spine -A
multi-institutional retrospective
study- Spine 33:1034-41, 2008.

4)Ohtsuka K, Terayama K, Yanagihara M, et
al. A radiological population study on
the ossification of the posterior
longitudinal ligament in the spine. Arch
Orthop Trauma Surg 1987; 106: 89-93.

VI. 分担研究-基礎研究-

脊柱靱帯骨化症患者特異的タンパク質の発見とメカニズムの解明に関する研究

研究分担者 永田 見生 久留米大学医学部整形外科

研究要旨 我々は、脊柱靱帯骨化症患者血液から疾患特異的なタンパク質を発見し、同定解析を行った。このタンパク質は、サイトカインの一種であり、脊柱靱帯骨化症の発症原因となるタンパク質であることが判明した。

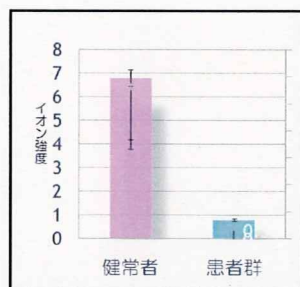
今後この成果を脊柱靱帯骨化症の治療開発研究へ展開する。

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症の治療に繋がる疾患特異的低分子量タンパク質を見つけ、靱帯骨化分子標的薬剤開発、靱帯骨化予防薬剤開発のシーズ研究として、明確なタンパク質の解明をし、最終的に靱帯骨化メカニズムの解明をすることにある。

B. 研究方法

目的疾患：後縦靱帯骨化症、研究期間：2000年から2009年、症例数：61例（男36名、女24名、不明1名）、年齢：55歳から76歳、平均70歳）、対象：血液（血清）、研究方法：プロテインチップによるプロテオミクス、質量分析方法：SELDI-TOF-MS、LC-MS-MS、対照：健常者17名、統計解析：SAS9.1、タンパク質精製：高速液体クロマトグラフィー：HPLCにておこなった。



（倫理面への配慮）

脊柱靱帯骨化症特異的タンパク質の探索研究、遺伝子解析を行うことを目的とし、ベルモント原則、①人格の尊重、②善行、③正義を守り、被験者保護のために、研究の実施の指針となる倫理原則を明確にし、平成15年12月25日、「ヒト後縦靱帯骨化症の発症に係わる遺伝子及び発現タンパク質の解析」として、研究代表者、永田見生、久留米大学生命に関する倫理委員会の承認

を得た。当委員会は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針、文部科学省・厚生労働省、疫学研究に関する倫理指針、文部科学省・生命倫理・安全に対する取組のなかの「医学研究等における個人情報の取扱いの在り方等について」この基本原則に則っている。

具体的には、被験者に対し、自由意思による同意に基づく研究への参加、インフォームド・コンセントに基づく研究への参加、対象者のプライバシーおよび秘密が保護されること、対象者には不利益な条件なしに研究の参加を取り止める権利があることを説明し、我が国のGCP第51条、ヘルシンキ宣言第22条に基づいた同意説明文書の説明、紙面上の同意を得た。対象者のプライバシー、秘密の保護に関しては、久留米大学個人識別情報管理により、患者からの試料、個人情報はすべて、FDAの連邦規則第21条第11章(21CFR Part11)の基準から、フリーザーワークス（FDAのバリデーション：2004年整備）にて、情報の匿名化を厳守した。

C. 研究結果

血清を陽イオン交換カラム（pH7.0）分画、0.1-0.2M NaCl画分を粗精製画分、この画分をSP-STATカラムによる陽イオン交換HPLCにて分離、D5画分をSupperODS逆相HPLCにて分離、そのFr. No. 19の一部をSDS-PAGEを行った。

還元剤DTT存在下と非存在下にて電気泳動を行い銀染色を行った結果、DTT存在下では約10kDaの位置に単一バンドを示し、非存在下では10kDaより高分子側に単一バンドを確認した。

この結果、ターゲットタンパク質は、1種類のポリペプチド鎖であり、分子間にS-S結合が存在することが考えられた。

切り出した10kDaのバンド (DTT非存在下) をPassive Elutionにてゲルから抽出したのちに、SELDIで分析を行ったところ、10283Daのピークが検出された。なお、2500-200000の質量範囲で他のピークは検出されず、SDS-PAGEにて単一バンドであった。

この結果、10kDaバンドはターゲットタンパク質であり、他の成分は含まれていないことが確認され、ゲルバンドのPassive Elutionの抽出液のSELDI分析で単一ピークとして検出されるとともに、ターゲットタンパク質の質量と一致したことは、トリプシン消化により、ターゲットタンパク質を高純度に精製できたことが判明した。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号：特願 2009-254357

発明者：永田見生、津留美智代

特許名称：脊柱靱帯骨化症の疾患特異的バイオマーカー

出願人：学校法人久留米大学

出願日：2009/10/22

2. 実用新案登録

なし

3. その他

**OPLL・OLFの骨化前線の免疫組織化学と transcriptional factors の
topographic observation**

研究分担者	彌山 峰史	福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域
	内田 研造	福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域
	中嶋 秀明	福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域
	平井 貴之	福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域
	Ke-Bing Chen	福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域
	Alexander Guerrero	福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域
	馬場 久敏	福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域

研究要旨

頸椎後縦靭帯骨化症（OPLL）、胸椎黄色靭帯骨化症（OLF）の骨化前線の特徴について、転写因子の発現を中心に組織学的、免疫組織化学的検討を行った。骨化巣の形態（大きさ）に応じて骨化前線の幅の拡大、石灰化前線のいびつ化、石灰化前線周囲における軟骨細胞の集族を認めた。特に石灰化前線周囲では細胞活性が高く、サイトカインや成長因子を発現することで骨化過程を調節することが示唆された。また、骨化形成に必須である軟骨細胞、骨芽細胞の誘導に関しては、石灰化前線周囲の軟骨細胞において転写因子が発現しており、未分化間葉系細胞からの分化、脱分化が調節されていることが考えられた。

A. 研究目的

後縦靭帯骨化症（OPLL）、黄色靭帯骨化症（OLF）の病態解析は種々の手法により行われ、近年では特に遺伝学的素因の解析が進んでいる。その結果、COL6A1 gene、COL11A2 gene といった遺伝子異常が報告され、こうした因子が脊椎靭帯骨化症に深く関与すると考えられる^{1,2)}。また病理学的にみると、本症は内軟骨性骨化の形態を呈し、骨化過程の調節として種々の成長因子やサイトカインが発現することが明らかとなっている^{3,4,5)}。我々のこれまで頸椎 OPLL、胸椎 OLF の骨化前線部の観察を行い、骨化形態（形態差位、増大化、進展方向）

に応じて、骨化前線部は層状構造の幅の拡大、弾性線維の断片化・消失、石灰化前線のいびつ化、石灰化前線周囲の軟骨細胞の性質などに違いを生じることを報告した^{6,7)}。しかし、骨化形成に重要な役割を有する骨化前線部の細胞の生物学的特徴については不明な点が多く存在する。今回、骨化前線における転写因子の発現の局在を中心に組織学的、免疫組織化学的に検討した。

B. 研究方法

頸椎後縦靭帯骨化症に対する前方手術時に採取した骨化後縦靭帯 33 例（男性 25 例、女性

8 例、平均 63.8 歳)、胸椎黄色靭帯骨化症に対する後方手術時に採取した骨化黄色靭帯 57 例 (男性 32 例、女性 25 例、平均 63.0 歳) を対象とした。頸椎 OPLL の骨化形態分類別では連続型 9 例、分節型 7 例、混合型 12 例、限局型 5 例であり、胸椎 OLF の骨化形態分類⁸⁾では、lateral type 10 例、extended type 8 例、enlarged type 12 例、fused type 16 例、tuberous type 11 例であった。

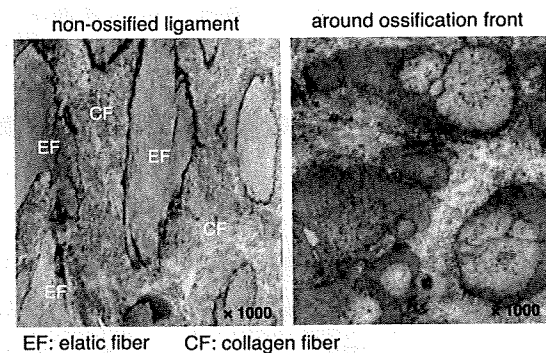
採取した組織は脱灰後、線維方向に縦割し、HE、elastica van Gieson、Toluidine blue、透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察を行った。免疫染色の 1 次抗体には、MIB-1、Sox-9、Runx-2、Msx-2、Dlx5、AP-1、Osterix を用いて各々の局在を観察した。比較対照には顕微鏡下に骨化を認めない後縦靭帯、黄色靭帯を用いた。

(倫理面への配慮)

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。

C. 研究結果

骨化靭帯の非骨化部と骨化巣との間には骨化前線が存在し、線維軟骨層、石灰化前線、石灰化軟骨層、骨層の層構造を呈していた。OPLL、OLF に共通して、骨化前線の幅の拡大と石灰化前線周囲の軟骨細胞の増生が観察された。また、靭帯の線維走行は乱れ、線維の断裂、断片化や局所的な fibrosis を生じていた (図 1)。



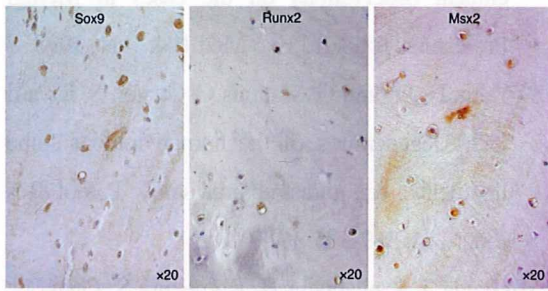
(図 1 : TEM による線維配列)

OPLL 症例では、連続型では線維走行に沿って伸長する幅の広い骨化前線が観察でき、石灰化前線はいびつ化し、石灰化前線を中心に細胞密度が高くなっていった。これに対して限局型では骨化前線は硬膜方向に広がっており、連続型と比較して幅は薄く、細胞数も少なくなっていた。

OLF 症例では、巨大な骨化巣 (fused, tuberous type) に応じて、弾性線維の走行は乱れ、断片化、消失していき、置換性に膠原線維による fibrosis を認めた。石灰化前線はいびつに伸長し、その周囲には軟骨細胞の強い集簇が観察できた。

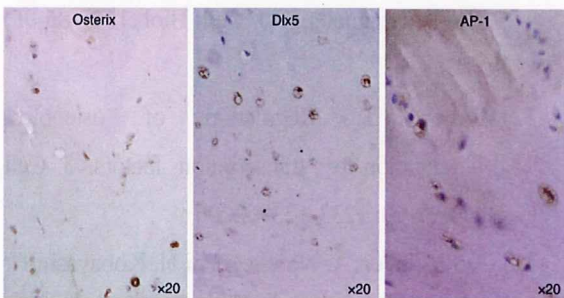
これに対して比較対象とした非骨化靭帯においては、靭帯線維は規則正しい配列構造が観察され、ligamentus enthesis 部では線維層、線維軟骨層、石灰化軟骨層、骨層の整然とした層構造を呈していた。

免疫染色では Sox-9 の発現は増殖軟骨細胞、間葉系細胞で陽性であったが、石灰化前線周囲から石灰化軟骨層に存在する肥大軟骨細胞では発現はほとんど認めなかった。Runx-2 は線維軟骨層を中心とした増殖期軟骨細胞に強く陽性であり、Msx-2 は特に未分化な間葉系細胞で陽性であった (図 2)。



(図2 : Sox9、Runx2、Msx2 の免疫染色)

Dlx5、Osterix、AP-1 の転写因子の発現は、石灰化前線近傍の肥大軟骨細胞や線維軟骨層に存在する成熟軟骨細胞に強く観察できた。さらに、これらの細胞は MIB-1 の発現も強陽性であった (図3)。



(図3 : Osterix、Dlx5、AP-1 の免疫染色)

D. 考察

脊柱靭帯骨化の線維層と骨化巣の間には骨化前線が必ず存在し、その骨化過程は内軟骨性骨化の形態を呈している。骨化前線の中でも石灰化前線近傍には軟骨細胞が集族しており、非常に細胞活性の高い場所である。この軟骨細胞はサイトカインや成長因子を発現することで、骨化形成の促進、調節に大きな役割を有していることが示唆される。

後縦靭帯、黄色靭帯は通常、ligamentus enthesis 部以外には軟骨細胞はほとんど存在しない組織である。したがって、骨化前線を含めて靭帯

内に生じた軟骨細胞は未分化間葉系細胞から誘導される、との報告が多い⁹⁾。今回の研究の結果では、Sox9、Runx2、Msx2 といった軟骨分化に関与する転写因子^{10, 11)}が軟骨細胞より発現しており、かつ骨化巣が大きい症例ほど著明に発現する傾向にあり、autocrine/paracrine にこれらの分化・脱分化が調節されていることが推測された。

石灰化軟骨層の肥大軟骨細胞の一部は核が凝集し、TUNEL 陽性であり apoptosis を生じていた。この apoptosis が何らかの物理的・化学的刺激によって誘導されたものか、program された細胞死であるかについては明らかではないが、apoptosis によって生じた基質の“場”には新生血管が導入され、間葉系細胞から Runx2、Dlx5、Osterix、AP-1 といった転写因子^{12, 13)}によって骨芽細胞が分化・誘導されることで骨形成が進んでいくと考えられた。

E. 結論

OPLL、OLF の骨化前線部では骨化巣の増大に応じて幅の拡大、石灰化前線周囲の細胞密度の上昇がみられ、細胞活性は高い部位であると考えられた。骨形成には軟骨細胞、骨芽細胞が中心的役割を果たすが、これら細胞の分化・脱分化には転写因子の発現が深く関与すると考えられた。

知的財産権の出願・登録状況

特記することなし。

論文発表、参考文献

- 1) Sakou T, Taketomi E, Matsunaga S, Yamaguchi M, Sonoda S, Yashiki S. Genetic study of ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine with human leucocyte

- antigen haplotype. *Spine* 16: 1249-1252, 1991.
- 2) Horikoshi T, Maeda K, Kawaguchi Y, Chiba K, Mori K, Koshizuka Y, et al: A large-scale genetic association study of ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Hum Genet* 119: 611-616, 2006.
 - 3) Ono K, Ota H, Tada K, Hamada H, Takaoka K: Ossified posterior longitudinal ligament. A clinicopathologic study. *Spine* 2: 126-138, 1977
 - 4) Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y, Kawahara H, Ogata E, Matsumoto T. Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor- β in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine* 17: S33-S36, 1992
 - 5) Baba H, Furusawa N, Fukuda M, Maezawa Y, Imura S, Kawahara N, et al. Potential role of streptozotocin in enhancing ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (*twy/twy*). *Eur J Histochem* 41: 191-202, 1997.
 - 6) Sato R, Uchida K, Kobayashi S, Yayama T, Kokubo Y, Nakajima H, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: histopathological findings around the calcification and ossification front. *J Neurosurg Spine* 7: 174-183, 2007.
 - 7) Yayama T, Uchida K, Kobayashi S, Kokubo Y, Sato R, Nakajima H, et al. Thoracic ossification of the human ligamentum flavum: histopathological and immunohistochemical findings around the ossified lesion. *J Neurosurg Spine* 7: 184-193, 2007.
 - 8) Sato T, Kokubun S, Tanaka Y, Ishii Y. Thoracic myelopathy in the Japanese: epidemiological and clinical observations on the cases in Miyagi Prefecture. *Tohoku J Exp Med* 184: 1-11, 1998.
 - 9) Yahia H, Drouin G, Maurais G, Garzon S, Rivard CH: Degeneration of the human lumbar spine ligaments. An ultrastructural study. *Pathol Res Pract* 184: 369-375, 1989
 - 10) Ikeda T, Kawaguchi H, Kamekura S, Ogata N, Mori Y, Nakamura K, et al: Distinct roles of Sox5, Sox6, and Sox9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J Bone Miner Metab* 23: 337-340, 2005
 - 11) Fujita T, Azuma Y, Fukuyama R, Hattori Y, Yoshida C, Koida M, et al: Runx2 induces osteoblast and chondrocyte differentiation and enhances their migration by coupling with P13K-Akt signalling. *J Cell Biol* 166: 85-95, 2004
 - 12) Komori T: Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem* 99: 1233-1239, 2006
 - 13) Gao Y, Jheon A, Nourkeyhani H, Kobayashi H, Ganss B: Molecular cloning, structure, expression, and chromosomal localization of the human Osterix (SP7) gene. *Gene* 341: 101-110, 2004

OPLL 発症機序における EP4 受容体刺激と BMP2 の相互作用

研究分担者 小坂 泰一 東京医科大学整形外科
澤地 恭昇 東京医科大学整形外科
木村 大 東京医科大学整形外科
遠藤 健司 東京医科大学整形外科
山本 謙吾 東京医科大学整形外科

研究要旨 OPLL 発症機序における EP4 受容体刺激と BMP2 の相互作用について検討を行った。頸椎 OPLL (以下 OPLL) およびの頸椎症性脊髄症 (以下 Non-OPLL) に対する手術の際に採取した黄色靭帯組織を継代培養、細胞を 0, 5, 50 または 100 ng/ml の BMP2 単独または 1 μ M の EP4 受容体刺激剤 (EP4 agonist) と同時処理し、5 日間培養した。細胞から total RNA を採取、FHG18、COL11A1、ALP、Aggrecan をパラメーターとして real time PCR を用いて mRNA レベルで検討したところ、骨軟骨化の初期段階の指標として検討した FGF18 は EP4 受容体刺激剤により明らかに上昇し、COLtype11A1 は BMP2 と EP4 受容体刺激剤の併用により上昇する傾向にあった。一方 BMP2 が ALP、Aggrecan を濃度依存性に増加させるにもかかわらず EP4 受容体刺激剤の併用がこれを抑制する傾向にあった。PGE2/EP4 経路と BMP2 の相互作用は未分化な間葉系細胞の軟骨分化の初期段階に関与する可能性があると考えた。

A. 研究目的

OPLL 発症機序における PGE2 の役割を明らかにする目的で、EP4 受容体刺激と BMP2 の相互作用について検討を行った。

B. 研究方法

real time PCR

頸椎 OPLL (以下 OPLL) およびの頸椎症性脊髄症 (以下 Non-OPLL) に対する手術の際に採取した黄色靭帯組織をプロナーゼ E およびコラゲナーゼにより酵素的に消化することにより単離し、10%ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む DMEM 培地を用い培養した。実験には、継代 4-

5 の細胞を用いた。

コンフルエントまで培養した細胞をトリプシン/EDTA で剥離し、48 well plate (BD falcon 社製) に 1 ウェル当たり 20,000 個になるように播種し、一晚培養した。

翌日、細胞を 0, 5, 50 または 100 ng/ml の BMP2 (PeproTech 社製) 単独または 1 μ M の EP4 受容体刺激剤 (EP4 agonist) と同時処理し、5 日間培養した。

total RNA を採取、FHG18、COL11A1、ALP、Aggrecan をパラメーターとして real time PCR を用いて mRNA レベルで検討した。

アルカリフォスファターゼ染色

OPLL 群、Non-OPLL 群の骨軟骨化をアルカリホスファターゼの酵素活性染色キット（和光純薬工業社製）を用いて評価した。

1. 培養液を除去.
2. 細胞を PBS で洗浄.
3. 細胞を 4℃で 10 分間, 4%フォルムアルデヒドにて固定.
4. 固定後, 細胞を PBS にて 3 回洗浄.
5. 細胞を, -20℃で 1 分間エタノール/アセトン (50:50) にて透過処理を施す.
6. 透過処理後, 細胞を PBS にて 3 回洗浄. アルカリホスファターゼ基質を加え, 陽性細胞が確認できるまで 37℃で反応

(倫理面での配慮)

人権の擁護には個人情報の保護が必要であり、検体は匿名化して用いる。また、今回は手術の際に切除した組織から検体を取り出す為、手術時に発生する手術自体の危険性以外に、新たに発生する危険性は無い旨を十分説明した。

C. 研究結果

real time PCR

○ FGF18 は Non-OPLL 群では BMP2 単独添加、BMP2+EP4 受容体刺激剤同時添加ともに明らかな変化は認められなかった。これに対し OPLL 群では EP4 受容体刺激剤単独添加例および BMP2+EP4 受容体刺激剤同時添加で明らかに上昇した。(図 1)

○ COLtype11A1 は Non-OPLL 群では BMP2 単独添加、BMP2+EP4 受容体刺激剤同時添加ともに明らかな変化は認められなかった。これに対し BMP2 単独添加および BMP2+EP4

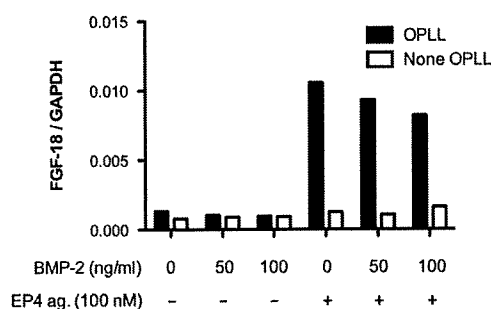
受容体刺激剤同時添加ともに濃度依存性に上昇する傾向にあった。(図 2)

○ Aggrecan は Non-OPLL 群では BMP2 単独添加で濃度依存性に若干の上昇傾向がみられたが、EP4 受容体刺激剤の併用がこれを抑制する傾向にあった。これに対し OPLL 群では BMP2 単独添加で濃度依存性に明らかな上昇がみられ、EP4 受容体刺激剤単独添加例で著明な抑制がみられ、BMP2+EP4 受容体刺激剤同時添加でも抑制傾向が認められた。(図 3)

○ ALP は Non-OPLL 群では BMP2 単独添加、BMP2+EP4 受容体刺激剤同時添加ともに明らかな変化は認められなかった。これに対し OPLL 群では BMP2 単独添加で濃度依存性に明らかな上昇がみられ、BMP2+EP4 受容体刺激剤同時添加でも抑制傾向が認められた。(図 4)

アルカリホスファターゼ染色

OPLL 群においては、BMP2 単独添加で濃度依存性にアルカリホスファターゼ陽性細胞の数を増加させた。EP4 受容体刺激剤単独添加および BMP2+EP4 受容体刺激剤同時添加ともにアルカリホスファターゼ陽性細胞数に影響を及ぼさなかった。



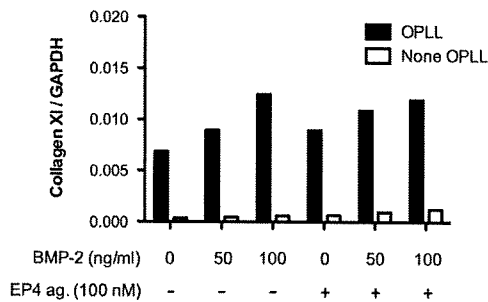


図 1

図 2

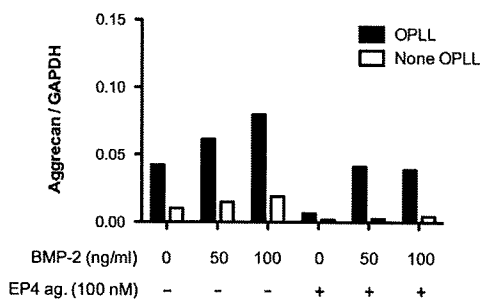


図 3

図 4

D. 考察

平成 20 年度の当研究班報告書において OPLL の局所因子の一つであるメカニカルストレスが超低濃度の PGE2 の産生を惹起し、EP4 受容体を介して OPLL 群の転写因子 Sox9 を上昇させることを報告した。現在まで Sox9 が軟骨細胞の初期発生、増殖、分化に必須であることが明らかとなっている。21 年度は OPLL 発症機序における EP4

受容体刺激と BMP2 の相互作用について検討を行った。すなわちメカニカルストレスが PGE2/EP4 経路を介して間葉系細胞の軟骨細胞への分化に関与している可能性がある」と推測し検証を行った。

骨軟骨化の初期段階の指標として検討した FGF18 は EP4 受容体刺激剤により明らかに上昇し、COLtype11A1 は BMP2 と EP4 受容体刺激剤の併用により上昇する傾向にあった。内軟骨性骨化において前駆骨芽細胞に発現する Fgfr2c を介して骨芽細胞の成熟を促進することで骨化過程を促進することが明らかとなっている。よって今回の結果は PGE2/EP4 経路が未分化な間葉系細胞の軟骨分化の初期段階に関与する可能性を示唆していると考察した。

一方 BMP2 が ALP、Aggrecan を濃度依存性に増加させるにもかかわらず EP4 受容体刺激剤の併用がこれを抑制する傾向にあり、またアルカリホスファターゼ染色においても EP4 受容体刺激剤の併用が陽性細胞の数に変化を及ぼさなかったことで、PGE2/EP4 経路は最終的な骨軟骨化には関与しないと考えられた。

しかしこれまでのところ FGF18 の、OPLL 発症機序におけるより具体的な役割については明らかになっておらず、今後も検討を継続していく予定である。

E. 結論

PGE2/EP4 経路と BMP2 の相互作用は未分化な間葉系細胞の軟骨分化の初期段階に関与する可能性がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記すべきことなし

SDF-1 による osteogenic cell の遊走

研究分担者 伊藤 宣 京都大学大学院医学研究科整形外科
北折 俊之 京都大学大学院医学研究科整形外科
根尾 昌志 京都大学大学院医学研究科整形外科
中村 孝志 京都大学大学院医学研究科整形外科

研究要旨 OPLL の骨化細胞と推定される間葉系幹細胞が、どこから、どのようなメカニズムで骨化部に遊走するのかはまったくわかっていない。今回われわれはケモカイン SDF-1 に注目し、その MSCs の遊走における働きと骨治癒における作用を調べた。SDF-1 の遺伝子発現は損傷 2 日後に有意に上昇し、蛋白発現は移植骨骨膜で認められた。骨治癒モデルに抗 SDF-1 中和抗体ないし受容体 CXCR4 の阻 止薬 TN14016 を投与することで化骨形成は抑制された。骨治癒モデルに TN14016 を投与すると、BrdU で標識した MSCs の化骨部位への遊走が抑制された。SDF-1 および CXCR4 いずれの KO マウスでも骨治癒は抑制されたが、CXCR4 の KO マウスから採取した骨を SDF-1 の KO マウスに移植すると骨治癒は回復した。SDF-1 は MSCs を骨修復部に遊走させることによって骨修復を促進すると考えられる。

A. 研究目的

OPLL は内軟骨性骨化の骨形成形式をとって骨化部が形成されることが知られている。その骨化をおこす細胞の由来として、間葉系幹細胞 (MSCs) が考えられるが、その細胞がどこから、どのようなメカニズムで骨化部に遊走するのかはまったくわかっていない。一方骨治癒において、周囲ないし血液循環内の MSCs が損傷部位に遊走し治癒に貢献していることは推測されているが、どのような因子が関わっているのか明らかでない。今回われわれはケモカイン SDF-1 に注目し、その MSCs の遊走における働きと骨治癒における作用を調べた。

B. 研究方法

6 週齢の C57Bl/6 マウス大腿骨の中 1/3(4mm 長)に、骨移植による骨治癒モデル

を作成した。この骨移植の治癒を、X 線および組織標本で調べた。また同部から RNA を抽出し、collagen I, II, X などのマーカー遺伝子と、SDF-1 の遺伝子発現を調べた。また同部から組織切片を作成し、免疫染色の手法を用いて蛋白発現を評価した。In vitro の migration assay として、C57Bl/6 マウスの骨髄から MSCs を採取し、double chamber で培養し、SDF-1 および CXCR4 の阻害薬である TN14-16 を加え、遊走する細胞の数をカウントした。また C57Bl/6 マウスの骨髄から採取し BrdU で標識した MSCs を、上記骨治癒モデルを作成したマウスの尾静脈から投与し、1 週間後に骨移植部を採取して組織切片を作成し、BrdU に対する免疫染色を行った (in vivo migration assay)。Loss of function assay として、骨治癒モデルに、抗 SDF-1 の中和

抗体ないし CXCR4 の阻害薬である TN14016 を持続的に投与し、2 週間後に組織切片を作成して骨治癒を評価した。最後に SDF-1、CXCR4 のノックアウトマウス (KO マウス) を用いて骨治癒モデルを作成し、functional assay を行った。

(倫理面での配慮) 当研究は動物実験を用いて MSCs の遊走のメカニズムを調べる実験であり、ヒトに対する診断、治療に関わるものではない。

C. 研究結果

SDF-1 の遺伝子発現は損傷 2 日後に有意に上昇し、蛋白発現は移植骨骨膜で認められた。骨治癒モデルに抗 SDF-1 中和抗体ないし受容体 CXCR4 の阻害薬 TN14016 を投与することで化骨形成は抑制された。SDF-1 は *in vitro* で MSC の遊走を誘導し、TN14016 は、その遊走を阻害した。骨治癒モデルに TN14016 を投与すると、BrdU で標識した MSCs の化骨部位への遊走が抑制された。SDF-1 および CXCR4 いずれの KO マウスでも骨治癒は抑制されたが、CXCR4 の KO マウスから採取した骨を SDF-1 の KO マウスに移植すると骨治癒は回復した。

D. 考察

OPLL は、MSCs が局所ないし循環より遊走して、内軟骨性骨化の形成で骨化巣を形成すると考えられている。しかしその MSCs が、どのようなメカニズムで骨化巣まで遊走するのか、そのメカニズムはまったくわかっていなかった。今回骨治癒モデルを用いて MSCs の遊走に SDF-1 が重要な働きを果たしていることを示した。これは OPLL の骨化においても重要な働きを果たしている可能性

が充分にある。もしそれが証明されれば、SDF-1 を阻害することなどにより、骨化を防ぐことができる可能性がある。

E. 結論

SDF-1 は MSCs を骨修復部に遊走させることにより骨修復を促進する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Toshiyuki Kitaori, Hiromu Ito, Edward M. Schwarz, Ryosuke Tsutsumi, Hiroyuki Yoshitomi, Shinya Oishi, Masakazu Nakano, Nobutaka Fujii, Takashi Nagasawa, Takashi Nakamura: SDF-1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model. *Arthritis and Rheumatism* 60:813-823, 2009

2. 学会発表

1) Hiromu Ito, Toshiyuki Kitaori, Edward M. Schwarz, Takashi Nakamura: SDF-1/CXCR4 recruits mesenchymal stem cells in bone healing. The 6th Combined Meeting of the Orthopaedic Research Societies, October 21-24, 2007, in Honolulu, Hawaii, USA

2) 北折俊之、伊藤 宣、E.M. Schwarz、中村孝志: ケモカイン SDF-1 は内軟骨骨化による骨修復に必要である 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会 2008 年 10 月 23~24 日 京都

3) Toshiyuki Kitaori, Hiromu Ito, Edward Schwarz, Takashi Nakamura: The involvement of SDF-1/CXCR4 axis in endochondral bone repair. The 55th annual meeting of the Orthopaedic Research Society. February 22-25, 2009, in Las Vegas, USA

4) 伊藤 宣、北折俊之、Edward Schwarz、藤井信孝、長澤丘司、中村孝志：間葉系幹細胞の遊走による骨治癒-SDF-1/CXCR4 の役割- 第8回日本再生医療学会総会 2009年3月5～6日 東京

5) 北折俊之、伊藤 宣、中村孝志：骨治癒における間葉系幹細胞の誘導:ケモカインSDF-1の機能的役割 第27回日本骨代謝学会学術集会 2009年7月23～25日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

頸椎および胸椎後縦靭帯骨化症例に対する顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を
用いた神経保護療法

研究分担者	山崎 正志	千葉大学大学院医学研究院整形外科学
	佐久間 毅	千葉大学大学院医学研究院整形外科学
	高橋 宏	千葉大学大学院医学研究院整形外科学
	林 浩一	千葉大学大学院医学研究院整形外科学
	国府田 正雄	千葉大学大学院医学研究院整形外科学
	大河 昭彦	千葉大学大学院医学研究院整形外科学
	高橋 和久	千葉大学大学院医学研究院整形外科学

研究要旨 圧迫性脊髄症急性増悪例に対する顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF)を用いた神経保護療法について、安全性確認を主目的とした phase I・IIa 臨床試験を開始した。直近1ヵ月間に日本整形外科学会頸髄症治療判定基準にて2点以上の悪化を認めた頸椎および胸椎後縦靭帯骨化症例5例に対して本試験を施行した。本人の自由意思による文書同意を得た後、G-CSF 5 μ g/kg/日を連続5日間点滴静注投与した。投与後に有害事象の有無を確認し、運動・感覚麻痺の推移、MRI 所見の評価を行った。神経所見については、G-CSF 投与後に、程度の差はあるものの全例で運動・感覚麻痺の改善が得られた。白血球数は投与開始の翌日には15200以上に上昇し、投与期間中は15200～43200の値が維持され、最終投与の3日後には、ほぼ投与前の値に戻った。G-CSF 投与期間中および投与後に有害事象の発生はなかった。

A. 研究目的

圧迫性脊髄症はヘルニア、骨棘、靭帯骨化などによる慢性的な脊髄圧迫により緩徐進行性の脊髄障害を来す疾患群である[1, 2]。その病態形成の詳細なメカニズムは現在のところ不明であるが、慢性的な圧迫によっても急性脊髄損傷と同様に神経細胞・グリア細胞の細胞死が惹起され、これによって

脊髄の機能障害が起こると考えられている[3-10]。

圧迫性脊髄症の患者において、時に比較的軽い外傷を契機に、または誘因無く急速な症状の増悪をみる事がある。こうした脊髄症の急性増悪は脊髄内部での神経細胞・グリア細胞の細胞死が関与していると考えられており[1, 2, 7, 11]、放置すると難治性となりうる。

顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF、一般名:フィルグラスチム)は血球系に作用する増殖因子であり、顆粒球系細胞の分化・増殖・生存促進などの作用を有する[12]。白血球減少症に対して、また末梢血幹細胞移植ドナーに対して、造血幹細胞の末梢血への動員のための投与が保険適当となっている。中枢神経系においては、骨髄細胞を脳・脊髄中へ動員する作用や[13]、脳卒中モデルに対する神経保護作用[14]などが報告されており、海外では脳梗塞に対する臨床研究が報告されている[15]。これらの報告から、脊髄損傷に対しても G-CSF が治療効果を発揮しうる可能性が想定されたため、われわれは G-CSF の脊髄損傷に対する有効性およびその作用メカニズムについて検討を進めてきた。現在までに得られたデータから、①G-CSF により動員された骨髄由来細胞が脊髄損傷部に生着する、②直接的に神経細胞死を抑制する、③Oligodendrocyte の細胞死を抑制し髄鞘を保護する、④炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β)発現を抑制する、⑤血管新生を促進する、などが G-CSF の脊髄損傷に対する作用機序として想定される[10, 16-19]。これらのデータから、G-CSF が圧迫性脊髄症の急性増悪期においても神経保護作用を持つ可能性が示唆される。

以上より、圧迫性脊髄症の急性増悪例に対する治療薬としての G-CSF の安全性・有効性を証明するため臨床研究を計画するに至った。われわれは G-CSF 神経保護療法の安全性確認を主目的とする phase I・IIa 臨床試験を計画し、2008 年 3 月に千葉大学医学部附属病院治験審査委員会の承認を得た。本試験は 2008 年 6 月に開始となったが、今回は、第 1 段階の G-CSF 5 μ g/kg/日の投与例 5

例について、その臨床経過を報告する。

B. 研究方法

対象は 20 歳から 75 歳の圧迫性脊髄症急性増悪患者(直近の 1 か月間に日本整形外科学会頸髄症治療判定基準にて 2 点以上の悪化を認めたもの)とした。但し安全性の配慮のため、①本剤の成分に過敏症の患者、②白血病などの造血系悪性疾患の既往をもつ患者、③過去 5 年以内の悪性疾患の既往をもつ患者、④心筋梗塞・狭心症の既往をもつ患者、⑤血栓・塞栓症の既往またはその傾向をもつ患者、⑥脾腫のある患者、⑦意識障害を有する患者、⑧妊婦、⑨脳梗塞などの神経症状評価に影響を及ぼしうる神経疾患を併発している・既往をもつ患者については除外した。以上の条件を満たす患者に十分な説明を行った後に、本人の自由意志による文書同意が得られた患者を試験の対象とした。

G-CSF は 5 μ g/kg/日を連続 5 日間点滴静注とした。試験デザインはオープンラベル用量漸増試験とし、コントロールは設定しなかった。有害事象の程度は副作用評価基準グレード 1-4 にて評価した。運動・感覚麻痺の推移を理学所見にて確認、American Spinal Injury Association (ASIA) score (運動:0~100 点、触覚:0~112 点、痛覚:0~112 点)[20]、ASIA impairment scale (AIS) (A: 完全麻痺、B: 感覚のみ残存、C: 運動不全麻痺 MMT3 未満、D: 運動不全麻痺 MMT3 以上、E: 正常) [20]、日本整形外科学会頸髄症治療判定基準 (JOA score) (0~17 点、胸髄症では 0~11 点) [21]で評価した。加えて、血液所見および MRI 所見の評価を行った。

C. 研究結果

5例に対してG-CSFの投与が行われた。全例が脊柱靭帯骨化症に伴う脊髄症患者であった(表1)。神経所見については、G-CSF投与後に、程度の差はあるものの全例で運動・感覚麻痺の改善が得られた(表2)。末梢血中の白血球数は投与開始後1日目(投与翌日)には15200以上に上昇し、投与期間中は15200~43200の値が維持され、投与開始後7日目(最終投与の3日後)には、ほぼ投与前の値に戻った(表3)。白血球数が最高値に達したのは、症例2および4で投与開始後1日目、症例3で2日目、症例1で3日目、症例5で4日目であった(表3)。白血球分画では顆粒球の選択的な増加であり、単核球やリンパ球の増加は認めなかった(表4)。赤血球および血小板数の増加は認めなかった。CRPは術後および創感染に伴う上昇はあったが、G-CSF投与に伴う上昇は認めなかった(表5)。その他の血液検査項目でも、明らかな異常所見は認めなかった。G-CSF投与期間中および投与後に、G-CSF投与に伴う有害事象の発生はなかった。

症例1

61歳、男、胸椎黄色靭帯骨化症。後縦靭帯骨化および黄色靭帯骨化に伴う脊柱管狭窄に対し、44歳時にT11-L5椎弓切除術、46歳時にC4-7前方除圧固定術、58歳時にC3-T1椎弓形成術およびT9-12椎弓切除術を受けていた。3回目の手術後、下肢しびれは残るも、ロフトランド2本杖で歩行可能であった。3週間前から両下肢脱力を自覚、その後、両下肢のしびれが増悪、歩行困難となり、当院緊急入院となった。入院時は重度の両下肢麻痺を呈し、起立不能であった。

入院時、T6以下の感覚鈍麻があり、筋力は下肢が両側でMMT0~2であった。深部腱反射は両下

肢で亢進し、バビンスキー反射は両側で陽性であった。膀胱直腸障害として頻尿を認めた。胸椎CTおよびMRIでは、T2/3およびT10/11高位で黄色靭帯骨化による後方からの脊髄圧迫が顕著であった。特にT10/11高位では1年前の画像所見と比較して、黄色靭帯骨化が著明に増大していた。

G-CSF投与開始後4日目に、両下肢筋力の回復を自覚した。神経症状の改善は投与開始後1ヵ月目でピークとなり、その後も改善は維持されていた。投与開始後2ヵ月の時点でT2-3椎弓切除術およびT9-11椎弓切除術を施行した。術後は位置覚の改善を認めた。投与後6ヵ月目には、つかまり歩きが可能となっていた。

症例2

68歳、男、胸椎後縦靭帯骨化症。特に誘因なく歩行障害が出現し、当院へ紹介受診となった。その後、歩行障害が急激に進行し起立歩行困難となったため、手術目的に入院となった。

入院時、T6以下の感覚鈍麻があり、筋力は下肢が両側でMMT2~4であった。深部腱反射は両下肢で亢進し、バビンスキー反射は両側で陽性であった。膀胱直腸障害として尿失禁を認めた。胸椎CTではT4/5に限局型の後縦靭帯骨化と黄色靭帯骨化を認め、骨化占拠率は83%であった。

G-CSF投与開始後7日目に、両下肢筋力の回復としびれの範囲の縮小を自覚した。投与開始後10日目にT1-7後方除圧固定術を施行した。術後は運動、感覚ともに右肩あがりに改善した。神経症状の改善は投与開始後3ヵ月目でピークとなり、その後も改善は維持されていた。投与後6ヵ月の時点で、独歩可能である。

症例 3

51 歳、男、胸椎後縦靱帯骨化症。48 歳時に頸椎後縦靱帯骨化症の診断にて C3-6 椎弓形成術を他院にて受けていた。術後経過は良好で JOA score は 16/17 であった。しかし、術後 3 年経過した時点から背部痛、歩行障害が出現し、当院へ紹介受診となった。その後、歩行障害が急激に進行したため手術目的に入院となった。

入院時、T5 以下の感覚鈍麻があり筋力は下肢が両側で MMT3-5 であった。深部腱反射は両下肢で軽度亢進し、バビンスキー反射は両側で陽性であった。膀胱直腸障害は認めなかった。胸椎 CT では T1-3 に後縦靱帯骨化と黄色靱帯骨化を認めた。T1/2 での骨化占拠率は 61%であった。

G-CSF 投与開始後 6 日目に、両下肢筋力の回復としびれの範囲の縮小を自覚した。投与開始後 10 日目に C7-T5 後方除圧固定術を施行した。術後は運動、感覚ともに右肩あがりに改善した。投与後 3 ヶ月の時点で、歩行障害は完全に回復していた。

症例 4

37 歳、男、胸椎後縦靱帯骨化症。高度肥満の体型であり、糖尿病、拡張型心筋症の治療を他科で受けていた。誘因なく両下肢しびれが出現し、半年間で急速に歩行障害が進行し起立困難となったため、手術目的に当院に紹介入院となった。

入院時、T8 以下の感覚鈍麻があり、筋力は下肢が両側で MMT1-3 であった。深部腱反射は両下肢で亢進し、バビンスキー反射は両側で陽性であった。膀胱直腸障害として残尿感を認めた。胸椎

CT では T3-6 に後縦靱帯骨化と黄色靱帯骨化、T7/8 に黄色靱帯骨化を認め、T3/4 での骨化占拠率は 80%であった

G-CSF 投与開始後 5 日目に、両下肢筋力の回復を自覚した。投与開始後 9 日目に T1-10 後方除圧固定術を施行した。術後 17 日目に創感染に対し洗浄・デブリードマンを施行し、感染は治癒した。術後は運動、感覚ともに徐々に改善した。投与後 3 ヶ月の時点で、つかまり立ちが可能であった。

症例 5

35 歳、男、頸胸椎後縦靱帯骨化症。高度肥満の体型であった。頸胸腰椎に多発する後縦靱帯骨化および黄色靱帯骨化に対し、他院で 4 度の手術を受けていた。前回の手術後は支持歩行可能であったが、急速に歩行障害が増悪し起立困難となったため当院へ紹介入院となった。

入院時、C8 以下の感覚鈍麻があり筋力は手指の筋力が両側で MMT3-4、下肢の筋力が両側で MMT1-4 であった。深部腱反射の亢進は認めなかった。膀胱直腸障害としては残尿感を認めた。頸胸椎 MRI および CT では C6/7 高位で後縦靱帯骨化による脊髄圧迫が著しかった。

G-CSF 投与開始後 3 日目に、両上下肢筋力の回復を自覚した。神経症状は徐々に改善し、投与開始後 3 ヶ月目で、つかまり歩きが可能となった。

表1. 顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)投与症例

症例 No	年齢 (歳)	性別	原疾患	脊髄最大 圧迫高位	身長 (cm)	体重 (kg)	G-CSF投与後 観察期間
1	61	男	胸椎黄色靱帯骨化症	T10/11	168	85.5	6ヵ月
2	68	男	胸椎後縦靱帯骨化症	T4/5	166	60.8	6ヵ月
3	51	男	胸椎後縦靱帯骨化症	T1/2	161	86	3ヵ月
4	37	男	胸椎後縦靱帯骨化症	T3/4	195	150	3ヵ月
5	35	男	頸胸椎後縦靱帯骨化症	C6/7	173	110	3ヵ月

表2. G-CSF投与後の神経症状の変化

症例 No	JOA score		AIS		ASIA score								
	投与前	最終 観察時	投与前	最終 観察時	運動			触覚			痛覚		
					投与前	投与終了後	最終 観察時	投与前	投与終了後	最終 観察時	投与前	投与終了後	最終 観察時
1	1/11	4/11	C	C	70	80	80	66	78	78	66	78	78
2	3/11	8/11	C	E	94	98	100	63	64	108	63	64	102
3	6/11	11/11	C	E	91	98	100	78	86	112	78	96	112
4	2/11	6.5/11	C	C	76	87	92	86	86	100	86	86	100
5	2.5/17	4.5/17	C	C	64	74	75	68	72	72	68	72	72

JOA score: 日本整形外科学会頸髄症治療判定基準

AIS: American Spinal Injury Association (ASIA) impairment scale

ASIA score: American Spinal Injury Association score

表3. G-CSF投与後の末梢血中白血球数の変化

症例 No	投与前	投与開始後								
		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	2週間	1ヵ月
1	5.8	19.4	26.5	26.9	20.6	20.9	NA	8.1	6.7	5.6
2	7.1	27.5	26.2	27.4	24.4	17.1	10.5	10.1	9.9*	6.4
3	5.7	15.2	15.5	14.5	10.5	9	6	4.2	7.4	5.4
4	8	43.2	29.3	23.6	24.6	21.6	10.3	9.1	11.5*	12.2**
5	9.5	28.1	27.7	32.2	36.5	35.4	15.1	9.7	5.7	7.1

単位: $\times 10^3/\text{mm}^2$, NA:未検, *手術に伴う上昇, **創感染に伴う上昇

表4. G-CSF投与後の顆粒球分画の変化

症例 No	投与前	投与開始後								
		1日	2日	3日	4日	5日	6日	7日	2週間	1ヵ月
1	55.7	79.2	NA	NA	82.5	81.5	NA	58.8	57.4	50.3
2	70.9	87.5	NA	NA	84.5	78	63.5	66	84.5*	69.3
3	46.4	76.9	71.7	NA	NA	57.3	43	40.9	82.9*	51.1
4	63.8	82	89.5	NA	NA	81.5	69	NA	NA	68.5
5	67.6	84.9	83.4	83	79	74.5	69.8	NA	54.1	72.4

単位: %, NA:未検, *手術に伴う上昇