

201024032B

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

脊 柱 靱 帯 骨 化 症 に 関 す る 調 査 研 究

平成20-22年度 総合研究報告書

研究代表者 戸山 芳昭

平成23年(2011年) 3月

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

脊 柱 靱 帯 骨 化 症 に 関 す る 調 査 研 究

平成 20-22 年度 総合研究報告書

研究代表者 戸山 芳昭

平成 23 年 (2011 年) 3 月

目 次

I. 総合研究報告

脊柱靱帯骨化症に関する調査研究
戸山 芳昭

慶應義塾大学医学部整形外科教授

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I . 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
総合研究報告書
脊柱靭帯骨化症に関する調査研究
研究代表者 戸山 芳昭 慶應義塾大学医学部整形外科 教授

研究要旨

本研究班では疫学調査、遺伝子解析、基礎研究、多施設共同臨床研究およびガイドライン策定などを行うことで、脊柱靭帯骨化症に対する診断・治療体制を確立し、広く国民にその研究成果を還元し、厚生労働行政に貢献することを目的としている。

疫学調査では、大規模住民コホート研究から後縦靭帯骨化症 (OPLL) の X 線写真における有病率が 2.0% (男性 3.2%、女性 1.3%) であり、胸部 CT 検査を用いた調査から黄色靭帯骨化症の有病率が 19% (男性 21%、女性 17%) であることを明らかにした。また、OPLL の有無と関連のある因子は、骨密度高値、血漿ペントシジン高値であった。

遺伝子解析では、罹患同胞対 200pair の採取を終了し、マイクロサテライトマーカーを用いた、全ゲノムのマッピングを開始した。

基礎研究では、疾患特異的タンパク質の同定に成功し、知的財産権の申請を行った。さらに疾患特異的タンパク質の 3 次元構造の解析を行い、分子標的治療薬の開発および疾患マーカーへの応用を目指した研究に着手した。

多施設臨床研究では、1) 神経症状発現に関する横断的・縦断的調査から、無症状の OPLL が 5 年間の経過で新たに神経症状を生じる可能性は 25% であり、骨化占拠率 60% 以上、脊椎可動域 50 度以上、骨化形態 (外側偏倚型)、外傷の存在が神経症状発現の危険因子であること、2) 重度頸髄損傷例の 23%、非骨傷性脊髄損傷の 34% の症例が OPLL であること、3) QOL 調査から通院時に 42.7% の患者が身体的苦痛を感じていること、4) 脊髄障害を予防する術中モニタリングにおける新規アラームポイントが MEP の振幅のコントロール比 25% であること、5) 術後神経合併症の調査から、前方固定術後の上肢麻痺と下肢麻痺の頻度は各々 13.3%、2% であること、椎弓形成術後の上肢麻痺と下肢麻痺の頻度は、各々 4%、3.1% であること、6) 胸椎 OPLL の治療成績など、臨床に直接還元可能な研究結果を明らかにした。さらに新規治療法として、G-CSF を用いた Phase I/IIa 臨床試験を行い、その有効性を明らかにした。

ガイドライン改訂作業は、本研究班の研究成果も踏まえ、日本整形外科学会と日本脊椎脊髄病学会との共同作業で改訂版が完成し、H23 年中の発刊予定である。

進行性骨化性線維異形成 (FOP) に関する基礎研究では、FOP の治療法への応用を目指して、ALK2 シグナルを抑制する、PPMA1, DRAGON, SCP1 の作用機序を明らかにし、1040 種類の既存の薬剤から 2 種類のカルシウムチャンネルブロッカーが病的骨化シグナルを抑制することを明らかにした。

一方、臨床研究では、患者の ADL, QOL 調査を行いその臨床的特徴を明らかにした。FOP 症例の 93% の症例で何らかの母趾変形が認められ、母趾変形と頸椎の可動域制限が早期診断の有用なツールとなることを示した。さらに、口腔ケアハンドブックを作成し一般に公開した (<http://fop.umin.jp/>)。

研究分担者

中村 耕三・東京大学整形外科教授
吉川 秀樹・大阪大学整形外科教授
中村 孝志・京都大学整形外科教授
鏡 邦芳・北海道大学保健管理センター教授
藤 哲・弘前大学整形外科教授
井樋 栄二・東北大学整形外科教授
木村 友厚・富山大学整形外科教授
星野 雄一・自治医科大学整形外科教授
野原 裕・獨協医科大学整形外科教授
里見 和彦・杏林大学整形外科教授
持田 讓治・東海大学整形外科教授
山本 謙吾・東京医大整形外科教授
遠藤 直人・新潟大学整形外科教授
土屋 弘行・金沢大学整形外科教授
松山 幸弘・浜松医科大学整形外科教授
藤原奈佳子・愛知県立大学看護学部教授
吉田 宗人・和歌山県立医大教授
田口 敏彦・山口大学整形外科教授
谷 俊一・高知大学整形外科教授
永田 見生・久留米大学整形外科教授
小宮 節郎・鹿児島大学整形外科教授
池川 志郎・理化学研究所チームリーダー
内田 研造・福井大学整形外科准教授
大川 淳・東京医科歯科大整形外科准教授
千葉 一裕・慶應大学整形外科准教授
松本 守雄・慶應大学整形外科准教授
山崎 正志・千葉大学整形外科准教授
吉村 典子・東大 22 世紀医療センター准教授
米延 策雄・大阪南医療センター院長
中原進之介・岡山医療センター整形外科部長
今釜 史郎・名古屋大学整形外科助教
森 幹士・滋賀大学整形外科助教
江藤 智生・実験動物中央研究所室長

芳賀 信彦・東京大学リハビリテーション科教授
片桐 岳信・埼玉医大ゲノム研究センター教授
鬼頭 浩史・名古屋大学整形外科講師
中島 康晴・九州大学整形外科講師
神菌 淳司・八幡病院小児科部長
須佐美隆史・東京大学顎口腔外科准教授
(以上敬称略)

A. 研究目的

脊柱靱帯骨化症(後縦靱帯骨化症; OPLL、黄色靱帯骨化症; OLF および進行性骨化性線維異形成; FOP) は異所性骨化を特徴とし、骨化巣増大に伴い多彩な神経症状や ADL 制限をもたらし、患者 QOL の低下、家族負担の増大に加えて、医療費など医療経済の面からも早急な対策が望まれている。本研究班は疫学・遺伝子解析・基礎研究・多施設共同臨床研究さらに診療ガイドラインの策定による啓蒙などを通じて、未だに治療の困難な面が多い本症に対する有効な診断と治療体制を確立し、国民に質の高い医療環境を整備し、厚生労働行政に貢献することを目的としている。

B. 研究方法

OPLL および OLF

1. 疫学調査

OPLL の疫学調査は我々が設立した一般住民コホートのデータベース(和歌山県の山村、漁村住民総数 1,690 人)の頸椎 X 線写真、血液検査結果、骨密度調査の結果からレコードリンクージュを行った。コホートのベースライン調査として脊椎、股関節、膝の X 線撮影および、生活習慣に関する問診票調査、運動機能調査、骨密度測定、整形外科医師による診察を行った。

OLF の疫学調査は胸部 CT 検査を受けた 15

歳以上の 1418 例のデータを用いてその有病率を調査した。

2. 遺伝子解析

研究分担施設で OPLL 患者の兄弟姉妹を調査し、200 pair の OPLL 罹患同胞対を収集し、患者サンプル(血液検体)から genomic DNA を抽出して罹患同胞対法により限局化したゲノム上の領域の候補遺伝子、及びモデル疾患、モデル動物などの既存の知識を元に決定した候補遺伝子について、相関解析 (case-control association study) を行う。相関の得られた遺伝子について、高密度遺伝子多型地図を作成し、連鎖不平衡マッピング (linkage disequilibrium mapping) を行い、疾患感受性多型を同定する。

3. 基礎研究

(1) 疾患特異的タンパク質の同定

OPLL 患者の血清を用いて、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 を用いた質量分析および高速液体クロマトグラフィー: HPLC にてタンパク質精製をおこない、疾患特異的タンパク質の同定を行った。さらに、同定した疾患特異的欠損タンパク質をターゲットとして iPS 由来薬物代謝実験から患者個別化に適応する 3D 分子構造決定を試みた。

(2) 慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy mice)を用いた基礎的研究

慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy mice) を用いて圧迫程度に応じた、白質・灰白質の免疫組織学的評価、さらに、

microglia/macrophage の動態およびその役割に注目し、免疫組織化学的検討を行った。

また、逆行性に神経栄養因子遺伝子導入を行い、その導入範囲や神経賦活化効果に関する検討をおこなった。

4. 多施設共同臨床研究

(1) 症状発現に関する横断的・縦断的調査

神経症状発現に関与する因子を同定する為に、研究班の 17 施設から集められた OPLL 患者 156 例に関する横断的研究、および初診時に脊髄症状を認めなかった OPLL 患者 121 例を 5 年間追跡する縦断的前向きコホート研究を実施した。

(2) OPLL に合併した重度頸髄損傷に関する後ろ向き調査

本研究班34施設において 2000年1月から2006年6月までに、受傷後48時間以内に当該施設に搬送され、外傷性急性頸髄損傷と診断された453例を対象とした。調査項目は、年齢、性別、骨傷の有無、初診時Frankel分類、追跡期間、最終追跡時のFrankel分類とし、OPLL合併例については、受傷前のOPLLの診断の有無、受診状況、受傷機転、骨化型、最大脊柱管狭窄率、治療等についても調査を行った。

(3) 神経障害性疼痛と QOL の評価

OPLL 患者の日常生活支援のあり方を多面的に探るための研究の一課題として、通院状況の実態を把握するために、全国脊柱靱帯骨化症患者家族連絡協議会所属の患者会員 1574 人を対象として郵送法質問紙調査を行った。質問内容は、①患者背景、②受診行動、③HLCS(Health Locus of Control

堀毛版)、④MPI-SCI (Multidimensional Pain Inventory- Spinal Cord Injury version)、⑤神経障害性疼痛評価質問票 (PainDETECT)、⑥Pain Catastrophizing Scale (PCS)、⑦HADS (Hospital Anxiety and Depression Scale)、⑧JOACMEQ (上肢・下肢機能のみ)、⑨健康関連 QOL 尺度 SF-8、⑩自由記載欄で構成した。

(4) 術中脊髄モニタリング調査

脊椎脊髄病学会モニタリング委員会による多施設調査を全国的に施行し、各施設における過去5年間のモニタリング症例7158例を集計し、術中脊髄モニタリング(CMAP)における波形変化とMMT低下の関係を検討した。

(5) 合併症調査(前方固定術)

頸椎 OPLL 前方手術の合併症発生率に関する術前インフォームド・コンセントの基盤となる情報を構築するために、本研究班所属施設にアンケート調査を行った。選択基準は、2005年4月から2008年3月の期間に頸椎前方手術を受けた頸椎 OPLL 全症例とし、手術高位は第一胸椎までの症例とした。除外基準は、手術日の3週間以内に明らかな外傷性頸髄損傷を発症した症例とした。

(6) 合併症調査(椎弓形成術)

頸椎 OPLL 椎弓形成術の合併症発生率に関する術前インフォームド・コンセントの基盤となる情報を構築するために、本研究班所属施設にアンケート調査を行った。選択基準は、2005年4月から2008年3月の期間に頸椎椎弓形成手術を受けた頸椎 OPLL

全症例とし、手術高位は第一胸椎までの症例とした。除外基準は、手術日の3週間以内に明らかな外傷性頸髄損傷を発症した症例とした。

(7) 胸椎 OPLL に対する手術成績

胸椎 OPLL にともなう胸髄症は通常進行性のため、保存的治療が無効のため手術療法が唯一有効な治療法と考えられている。しかしながらその手術成績は必ずしも良好とは言えず、特に胸椎 OPLL に対する手術療法は難度の高い手術である。今回分担施設で、特に症例数が多い8施設を対象に、手術成績に関与する因子および周術期合併症に関して後ろ向き調査を行った。

5. ガイドライン改訂

日本整形外科学会および脊椎脊髄病学会と共同でガイドラインの改訂作業を実施した。医学中央雑誌(採録年2003-2009年)、MEDLINE(出版年2002-2009年)、Cochrane(全年代)を対象データベースとして、選定されたキーワードをもとに文献を網羅的に検索した。

6. 臨床研究

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、Phase I/IIa 臨床試験を行った。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12例に対して、本人の自由意思による文書同意を得た後、G-CSF 10 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

痺の推移の評価を行った。

FOP

1. 基礎研究

(1)補助受容体 DRAGON と Smad のホスファターゼ PPM1A の作用機序の解析

BMP の補助受容体と考えられている DRAGON をマウス筋芽細胞からクローニングし、発現ベクターを構築した。また、BMP シグナルの中で転写因子 Smad のホスファターゼと報告されている PPM1A も、同様にクローニングして発現ベクターを構築した。これらを、BMP シグナルで刺激した C2C12 にトランスフェクションし、骨芽細胞分化マーカーとして ALP 活性、BMP シグナルの指標として、BMP 初期応答遺伝子 *Id1* のプロモーター・エンハンサーを含むルシフェラーゼレポーター活性を測定した。目的タンパク質は、ウエスタンブロット法、及び免疫染色法で検出した。

(2)Smad の脱リン酸化反応に関する検討

FOP の治療法への応用を目指して、BMP 活性を阻害するシグナルとして、ALK2 がリン酸化する転写因子の脱リン酸化反応を触媒することが報告されているホスファターゼ SCP1 の作用機序を解析した。

(3)FOP異所性骨化の予防薬に関する検討

マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて変異型 *ALK2* ベクター、*Id1* の promoter を結合したルシフェラーゼレポーターベクター、転写調節ベクターを co-transfection した後、1040 種類の米国食品医薬品局 (FDA) 認可薬を添加して *Id1* promoter に対するルシフェラーゼアッセイを行い、*Id1*

promoter 活性を低下させる薬剤の同定を試みた。

2. 臨床研究

臨床データの蓄積および患者 ADL 調査 (Barthel Index) および QOL 調査 (SF-36)、早期診断に有効な身体的特徴および臨床像の検討、抜歯および口腔ケアに関する研究を実施した。

(倫理面への配慮)

遺伝子研究に関しては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 16 年 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)」に従う。検体の提供に関しては、「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方について(平成 10 年厚生科学審議会答申)」に従い、臨床研究に関しては、「臨床研究に関する倫理指針(平成 20 年厚生労働省告示第 415 号)」および「疫学研究に関する倫理指針(平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号)」に従い、かつ個別に倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果およびD. 考察

OPLL および OLF

1. 疫学調査

ベースライン調査総参加者 1,690 人のうち、頸椎 X 線検査に参加し読影し得た 50 歳以上の男女 1,482 人（男性 531 人、女性 951 人）について、OPLL の有病率を推定したところ、2.0%（男性 3.2%、女性 1.3%）であり、男性に有意に多かった（ $p < 0.05$ ）。次に OPLL の有無との関連を、性、年齢、体格指数（Body mass index, kg/m^2 ）を調整して解析したところ、骨密度が高い（ $+1\text{g}/\text{cm}^2$ ；腰椎骨密度、オッズ比 1.76、95% 信頼区間 1.24-2.49、 p 値 0.001、大腿骨頸部骨密度、1.65、1.12-2.44、0.011、total hip 骨密度、1.85、1.19-2.87、0.006）、血漿ペントシジン値が高値（ $+1\text{SD}$ 、1.24、1.01-1.51、0.035）がそのリスクを有意にあげていた。一方膝の medial mJWS が広いことはリスクを下けていることがわかった（ $+1\text{mm}$ 、0.58、0.42-0.82、0.002）。

CT を用いた OLF の有病率は 19%（男性 21%、女性 17%）で単椎間の症例が 56%、多椎間の症例が 35%であった。OLF は下位胸椎に好発し、全体の 75%以上が下位胸椎に認められた。多椎間罹患は OYL の約 35%にみられ、そのうち約 30%は非連続の病変であり注意を要することが判明した。

2. 遺伝子解析

連鎖解析の基盤となるゲノム全域をカバーする多型マーカーについては、新たに日本人特異的な多型マーカーのセットを整備した。この多型マーカーのセットの有用性は、家族性の変形性関節症に対する連鎖解析でこれを用いて、遺伝子座位を同定でき

たことで検証済みである。サンプルの収集には 36 施設が登録されている。サンプルは 210 サンプルに到達し、各サンプルについての、診断、臨床情報に関するデータシートを吟味し、診断（OPLL の同胞であること）が確定し、付随する臨床情報（年齢、性別、BMI など）が完備している 200 同胞対を選んだ。これに対して、約 400 個のマイクロサテライト・マーカー（マーカー密度、約 10 cM）で、全ゲノムをスクリーニングする。目下、マーカーのタイピング中である。

3. 基礎研究

(1) 疾患特異的タンパク質の同定

血清を SP-STAT カラムによる陽イオン交換 HPLC にて分離後、D5 画分を SuperODS 逆相 HPLC にて分離し、その Fr. No. 19 の一部に対して 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。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。従って、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(図1)。

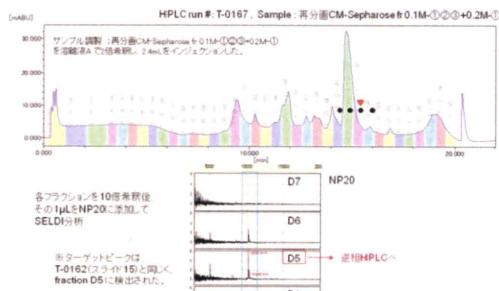


図1 ; OPLL 疾患特異的タンパク質 SP-STAT 分析

この疾患特異的タンパク質に関しては、知的財産権の取得をおこなった。(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: 脊柱靭帯骨化症の疾患特異的バイオマーカー、出願日: 2009/10/22)

さらに、スーパーコンピューターによるアミノ酸ホモロジー・モデリング後、タンパク質立体構造精密化を行い、疾患特異的欠損タンパク質の立体構造を決定した。さらに iPS 細胞による In Silico スクリーニングを行い、複合体解析、リード最適化を行った(図2)。

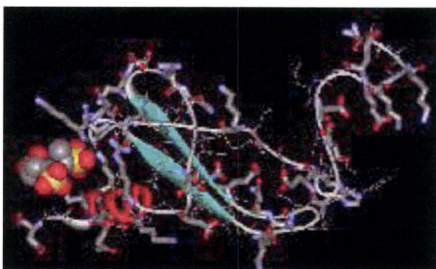


図2 ; OPLL疾患特異的欠損タンパク質

(2)慢性脊髄圧迫モデル(twy/twy mice)を用いた基礎的研究

圧迫部位を中心にTUNEL陽性細胞が認められたが、灰白質と白質ではその発現様式が異なり、灰白質のneuronでは中等度の圧迫でTUNEL陽性細胞数がピークとなったのに対して、白質のoligodendrocyteではより高度の圧迫でTUNEL陽性細胞数が増加した。

炎症性サイトカインと神経栄養因子の発現は、中等度圧迫群ではTNF- α 、IL-6などの炎症性サイトカインの発現は極めて少なく、NGF、NT-3、BDNFなどの神経栄養因子の発現は少数認められた。一方、圧迫が高度になると、これらの炎症性サイトカインおよび神経栄養因子の発現はともに上昇した(図3)。

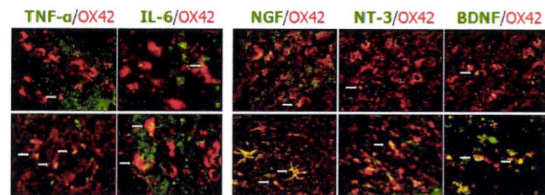


図3 炎症性サイトカインおよび神経栄養因子発現の変化

(上段; 中等度圧迫群、下段; 高度圧迫群)

さらに macrophage の役割別にその発現を調べると、neurotoxic に働く M1 type macrophage (一次抗体に iNOS) および組織修復に働く M2 type macrophage (一次抗体に arginase-1)の発現は、中等度圧迫群と比較して高度圧迫群でその発現が上昇していたが、M2 type の増加が M1 type よりも有意であり(図4)、高度圧迫群において M2 type 優位となる macrophage サブタイプの変化が神経細胞の生存・維持に関与している可能性が考えられた。

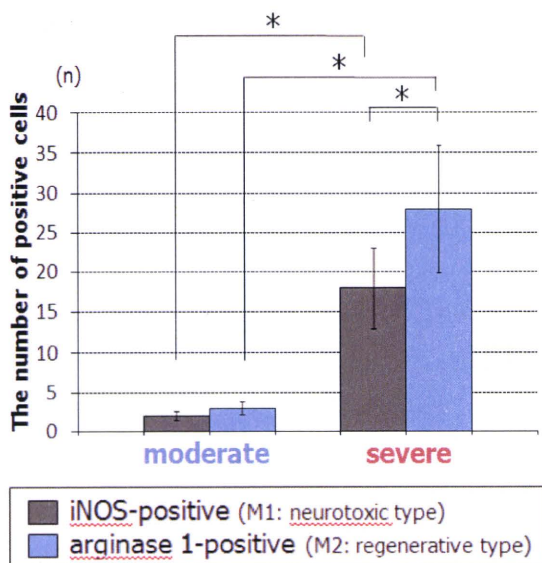


図 4; iNOS および arginase-1 陽性細胞数の変化

逆行性に導入された遺伝子は、ニューロンだけでなく、オリゴデンドロサイト、アストロサイト、マイクログリアにも発現しており、BDNF 遺伝子導入群で GAP-43 や NF-H で評価した神経樹状突起、軸索の残存が有意に多く、最大圧迫部とその頭尾側で positive area に有意差がみられた(図 5)。

Expression of GAP-43 and NF-H

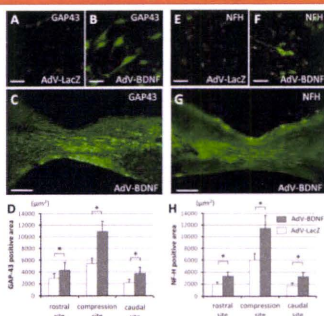


図 5; BDNF 遺伝子導入に伴う GAP43&NF-H の発現

4. 多施設臨床研究

(1) 症状発現に関する横断的・縦断的調査

経過観察中に新たに脊髄症状が出現した患者が 30 名 (24.8%) であり、残りの 91 名は脊髄症状を発現しなかった。Kaplan-Meier 法による累積脊髄症状非発現率は 10 年で 82%、20 年で 62%、25 年で 50%であった。脊髄症状発現群と非発現群で初診時年齢、追跡期間、最終調査時年齢、骨化型には有意差がなかった。最大脊柱管狭窄率は脊髄症状発現群が平均 45.2%、脊髄症状非発現群が平均 39.2%と脊髄症状発現群の狭窄率が大きかったが統計学的に有意なものではなかった。しかし、最大狭窄率 60%以上の症例では 7 例中 6 例 (86%) で追跡期間中に脊髄症状が発現していた。最大狭窄率 60%未満の症例に限って解析すると外傷誘因以外で脊髄症状が発現した症例は 108 例あったが全頸椎可動域が脊髄症状発現群では有意に大きかった。また CT における骨化型が外側偏倚型は感度 91%、特異度 62%で脊髄症状発現の予測因子であった。以上の結果から、神経症状発現の危険因子は、1) 骨化の脊柱管占拠率 60%以上、2) 全頸椎可動域 50 度以上、3) CT における骨化形態; 外側偏倚型、4) 外傷の存在であることが判明した。

(2) OPLL に合併した重度頸髄損傷に関する後ろ向き調査

453 名 (男性 367 名、女性 86 名、平均年齢 59 歳) が選択規準をみたした。初診時の Frankel 分類は、A が 146 名、B が 105 名、C が 202 名であった。453 名のうち 274 名 (60%) が頸椎の骨折・脱臼などを伴わない非骨傷性頸髄損傷であった。OPLL は頸髄損傷

例の 23%にあたる 106 名にみられた。OPLL 合併例 106 名中、96 名は非骨傷性頸髄損傷だった。非骨傷性頸髄損傷の中に OPLL 合併例の占める割合は 34%にのぼった。OPLL 合併例のうち、受傷前に OPLL の診断のついていたものは 26 名 (25%)で、49 名 (46%)は受傷前から歩行障害をきたしていた。OPLL を合併した非骨傷性頸髄損傷 94 名のうち、46 名が保存治療、48 名が手術治療を受けていた。94 名中、6 ヶ月以上のフォローが可能であった 64 名について麻痺の回復に関して検討したところ、全体では手術群と保存群との間で麻痺の回復に有意な差はなかったが、受傷前から歩行障害がみられた症例 (n = 31)では、手術群が保存群に比べ麻痺の改善が良好であった (手術群 82%、保存群 44%、 $p=0.04$)。また最大脊柱管狭窄率が 57%以上の高度狭窄例 (n = 11)でも、手術群において麻痺の改善が良い傾向がみられた ($p=0.06$)。

(3) 神経障害性疼痛と QOL の評価

平成 22 年 6 月末の調査票の回収は、906 名 (回収率 57.6%)であった。本年度は調査項目のうち、通院に関する部分についての分析を終了した。

1. 医療機関への通院に際しての苦痛、負担

全年齢では 42.7%が身体的苦痛、17.9%が精神的苦痛を感じていた。年齢群別にみると 65 歳以上では身体的負担、64 歳以下では経済的負担、時間的負担を感じている者が多かった。

受診にかかる時間は、家から医療機関まで片道で平均 (±標準偏差)52.7 (±48.6)分 (n=834)、診察待ち時間は 74.0 (±55.5)

分 (n=825)、最近一年間の受診回数は 17.3 (±40.5)回 (n=829)であった。

経費負担は、交通費 (受診 1 回、往復)が 2,325 (±4,184)円 (n=648)、受診 1 回の自己負担金は特別の検査がない場合には 1,401 (±1,887)円 (n=618)、特別の検査がある場合には 4,945 (±5,391)円 (n=575)であった。

2. 通院時交通手段、付き添いなど

車で通院する者 (自分で運転 39.9%、他者が運転 21.4%、タクシー 16.1%)が多かった。自宅から医療機関まで車いすを使用する者は自力使用が 2.6%、介助使用 5.9%であった。受診時に付き添いがなく本人のみのは 68.4%、家族の付き添いが 29.7%であった。

3. 受診の際の状況など

診察待ち時間に体がいつもつらいと感じる者は 22.3%、横になることがある者は 5.0%であった。特に 65 歳以上では待合い椅子に手摺りがなく立ち上がりが困難と感じる者 (52.2%)、病院の広い空間で転倒の危険を感じる者 (45.2%)が多かった。

(4) 術中脊髄モニタリング調査

総麻痺筋数は 32 症例/103 筋であった。最終波形率が 25%以下の症例は 78 筋中 42 筋 (54%)で MMT 低下度が 2 以上であり、最終波形率が 25%以上の症例 (25 筋中 1 筋 (4%))に比べ有意に MMT 低下度 2 以上の割合が高かった ($p<.005$)。最終波形率と MMT 低下度の相関を検討すると、低い相関が認められた。 ($r=-0.32$, $p<.001$)。

MMT 低下度を 1 と 2 以上で分けると、MMT1 低下群では永続的麻痺率が 60 筋中 16 筋 (27%)であったのに対し、MMT2 以上低下群

では 43 筋中 32 筋 (74%) と有意に高かった ($p < .005$)。MMT5 低下群では 12 筋全例で 3 ヶ月以上の永続的麻痺を来していた。さらに、MMT1 低下群では術中波形消失は 60 筋中 36 筋 (60%) であったのに対し、MMT2 以上低下群では 43 筋中 39 筋 (91%) と高かったが有意差はなかった。またそれぞれの術中波形消失例が術後最終波形で少しでも amplitude が回復していた割合は MMT1 低下群では 36 筋中 11 筋 (31%: 平均 amplitude 回復度 78.6%) に対し、MMT2 以上低下群では 39 筋中 3 筋 (7.7%: 平均 amplitude 回復度 21.7%) と有意に低かった。(波形回復率: $p < .05$ 、平均 amplitude 回復度: $p < .001$)。

以上の結果から、CMAP の波形変化と MMT 低下の関係は低い相関を示し、術中に amplitude がコントロール波形の約 25% 以下になると MMT2 が以上低下している可能性が示唆された。

(5) 合併症調査(前方固定術)

27 施設より回答を得た。症例数は 150 名 (男 113 名、女 37 名) であった。術後の下肢麻痺悪化が 3 名 (2.0%)、上肢麻痺悪化が 20 名 (13.3%) に発生した。1 名の下肢麻痺、4 名の上肢麻痺が術前レベルまで回復しなかった。術前画像所見における上肢麻痺悪化の危険因子は、占拠率が高いことであった。

(6) 合併症調査(椎弓形成術)

27 施設より回答を得た。症例数は 580 名 (男 458 名、女 122 名) であった。術後に下肢麻痺が悪化した症例は 18 名 (3.1%) あり 8 名で術前レベルまで回復しなかった。下肢麻痺悪化発見の時期は、術当日 13 名

(うち血腫 3 名)、翌日、2 日目、3 日目、5 日目、12 日目で 1 名ずつあった。血腫 3 名、術中椎骨動脈損傷 (側溝掘削による) のための手術断念、硬膜損傷に伴う頸髄後方嵌頓、術後 12 日目の頸椎弯曲進行以外の 12 名では下肢麻痺悪化の原因を特定することができなかった。術前画像所見における下肢麻痺悪化の危険因子は占拠率 (51.3 ± 13.7 vs 42.3 ± 13.0) が高いことであった。一方、術後上肢運動麻痺悪化 23 名 (4%) であり近位型 (狭義の C5 麻痺) は 16 名、遠位型 7 名となっていた。

(7) 胸椎 OPLL に対する手術成績

1 年以上経過観察が可能であった 76 例 (男性 34 例、女性 42 例、平均年齢 56 歳) がエントリーされた。JOA score は術前平均 4.6 ± 2.1 、術後 1 年 7.4 ± 2.4 、同 3 年、 7.5 ± 2.4 、最終調査時 7.7 ± 2.5 、改善率は 45.4 ± 39.1 (%) であった。術式別改善率は後方除圧固定術 39.4 ± 37.7 (%)、前方進入前方除圧固定術 65.0 ± 35.6 、後方進入前方除圧固定術 28.8 ± 41.2 、全周囲除圧固定術 57.5 ± 41.1 であった。骨化形態別には嘴状 46.2 ± 53.6 (%)、連続波状 49.7 ± 23.6 、連続棒状 41.3 ± 41.7 、混合型 41.1 ± 43.3 であった。Logistic regression analysis による解析では分析した諸因子と改善率との間に有意な関連は認めなかった。合併症は髄液漏 7 例、硬膜外血腫 5 例、深部感染 1 例、呼吸器合併症 4 例であった。また術後脊髄症状の悪化を 20 例 (25%) に認めた。このうち 15 例では平均 8.2 日で自然改善を認めた。有意差は認めないものの、後方除圧固定に比べ前方進入前方固定、全周囲除圧固定は手術成績が良好な傾向にあった。すなわち習熟

した手技で行えば直接的な脊髄除圧となる前方からの除圧法は良好な成績が得られることが示唆された。しかしもっとも広く行われた後方除圧固定術でも39.4%の改善度が得られており、技術的な難易度や神経合併症のリスクが低く、術後管理が容易な本法も胸椎OPLLに対する有用な手術法と言えた。

5. ガイドライン改訂

2009年までの文献検索で収集した文献の一次選択の結果、和文論文627篇と英文論文329篇を得た。そのうち和文論文173篇と英文論文103篇の計276篇を査読し、さらにその経過にて追加した英文論文6篇を加え、各文献に批判的吟味を行い最終的には200篇に対して構造化抄録を作成した。クリニカルクエスションは初版のものを原則利用して改訂文を作成し、本委員会承認されたエビデンスレベルおよび推奨グレードをもとに修正作業を行った。改訂文を作成した後、日本整形外科学会理事・監事・代議員、日本脊椎脊髄病学会指導医にパブリックコメントを募集 (<http://www.joa.or.jp>) した結果、若干の修正を加えて最終案を出版社(南江堂)に入稿し、H23年度中に改訂版の出版を予定している。

6. 臨床研究

神経所見は、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。American Spinal Injury Association scoreは投与直前の平均が運動91.0±6.5点、触覚91.6±17.4点、痛覚86.5±15.9点であったのに対し、投与

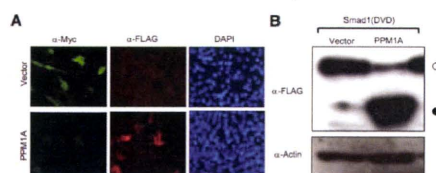
後1ヵ月後は運動98.0±3.2点、触覚99.1±15.3点、痛覚99.8±11.0点に改善した。G-CSF投与期間中および投与後に有害事象の発生はなかった。

FOP

1. 基礎研究

(1) 補助受容体 DRAGON と Smad のホスファターゼ PPM1A の作用機序の解析

DRAGONは、BMPの構成的活性型受容体であるALK2(Q207D)と共に筋芽細胞で発現させると、ALK2によって誘導されるALP活性を抑制した。DRAGONによるBMP活性の抑制ドメインを解析したところ、シグナルペプチドを含む分泌型DRAGONに抑制活性が認められ、他の分泌タンパク質のシグナルペプチドと置換しても、強い抑制活性が認められた。また、SmadのホスファターゼPPM1Aは、抑制に必要と考えられるC末端のBMP受容体によるリン酸化部位に変異を導入したSmad1変異体の活性も抑制し、Smad1とPPM1Aを共発現させると、Smad1の発現量が低下することが、免疫染色法とウエスタンブロット法で確認された。



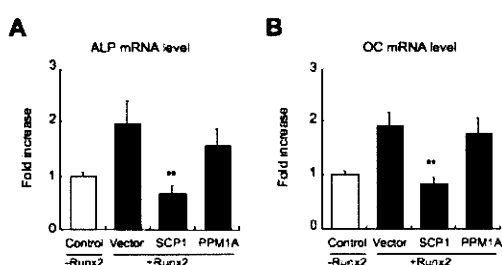
以上より、DRAGONとPPM1Aは、構成的活性型BMP受容体を抑制したことから、これらの発現亢進を促すことにより、FOPにおけるBMPシグナルを阻害できる可能性が示唆された。

(2) Smadの脱リン酸化反応に関する検討

SCP1 mRNAの発現量は、検討した臓器の

中で特に骨格筋が高く、C2C12 における SCP1 タンパク質は、細胞質内の核周囲に局在した。

SCP1 の作用機序を明らかにするため、BMP シグナルによる骨芽細胞分化の中で、Smad のさらに下流で働く転写因子 Runx2 に対する SCP1 の作用を検討すると、SCP1 は Runx2 が誘導する ALP やオステオカルシンの発現も抑制することが判明した。



以上のことから、ホスファターゼの 1 種である SCP1 は、BMP 受容体の活性化による骨芽細胞分化を抑制した。しかし、この作用機序は、受容体によってリン酸化される Smad の脱リン酸化を促すのではなく、Runx2 またはさらに下流で骨芽細胞分化に働く転写因子を標的とすることが判明した。

(3) FOP の異所性骨化に対する予防薬に関する検討

2 種類のカルシウムチャンネルブロッカー (Fendiline と Perhexilene) が *Id1* のプロモーターを抑制しうる薬剤であることを確認した。両薬剤ともに、濃度依存性に *Id1* のプロモーター活性および mRNA の発現を抑制した。また ALP 活性も同様に、これらの薬剤により濃度依存性に低下した。

従って、臨床応用されている既存の薬剤の持つ未知の薬効に期待するスクリーニン

グを行うことで、心血管疾患で使用実績のある 2 週類のカルシウムチャンネルブロッカーが細胞レベルで FOP における病的骨化シグナルを抑制しうることを示され、これらの薬剤は安全性が担保されているため、早期の臨床応用が期待されている。

2. 臨床研究

FOP 患者の ADL は Barthel Index が平均 44 点と低く、年齢が高いほど顕著であることが判明した。SF-36 を用いた QOL 調査では、身体機能と身体の痛みは年齢が高いと得点が低い傾向があったが、その他の下位尺度では同様の傾向がなかった。

診断に有用な身体的特徴として母趾変形が高頻度 (31 足中 29 足 93.5%) に認められ、X 線学的検討では、母趾の短縮または外反が主な変形であった。その変形は基節骨の変形と末節骨との癒合、中足骨の変形によって形成されていた。その他の臨床的特徴として、頸部の可動域制限、第一中手骨の短縮や変形、頸椎椎弓および棘突起の肥厚、長管骨骨幹端部の骨軟骨腫様所見などが早期に認められるレントゲン所見であった。

FOP 患者の顎顔面骨格形態、咬合を調査したところ、顎関節・筋突起の形態異常、小下顎、上顎前突がみられ、FOP の二次的症候である可能性が明らかとなった。さらに、これまでの臨床経験をもとに、本疾患患者に対する口腔ケアの注意点をハンドブックにまとめた。

電子書籍

田村和美, 須佐美隆史, 森良之: FOP 口腔ケアハンドブック. 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) に関する調査研究班ホームページ (<http://fop.umin.jp/>).

E. 結論

本研究班では、疫学調査、遺伝子解析、基礎研究、多施設共同臨床研究等を推進し、多くの知見を得ることが出来た。

OPLLおよびOLFに関しては、疫学研究で、近年国内の詳細なデータが存在しなかったOPLLおよびOLFの有病率の調査を行い、その発生頻度を示した。またOPLLの有無と関連のある因子として、高い骨密度、血漿ペントシジン高値であることが明らかとなった。

遺伝子解析では、懸案であった200 pairのOPLL罹患者同胞対の収集が終了し、解析を開始した。

基礎研究では疾患特異的タンパク質の同定に成功し、その知的財産の申請をおこなった。さらにこのOPLL疾患特異的タンパク質の3次元構造を決定し、疾患のマーカーおよび分子標的創薬への応用を目指した研究に着手した。また、twyマウスを用いた実験から慢性圧迫がもたらす脊髄障害の分子生物学的メカニズムを解明した。

多施設共同臨床研究ではそのスケールメリットを生かし、1)自然経過における脊髄症発症の割合およびその危険因子、2)頸髄損傷におけるOPLL合併の頻度とその治療成績、3)患者QOLの実態、4)術中モニタリングにおける新たなアラームポイントの提唱、5)前方固定術および椎弓形成術後の神経合併症の頻度、6)胸椎OPLLの手術成績などの新たな知見を示すことが出来た。

また、近い将来臨床応用可能な新規治療法として、G-CSFを用いたPhase I/IIaの臨床試験を行い、新規治療法の可能性を示

すことが出来た。これらの新たな知見は、治療成績の向上へ繋がる研究成果といえる。

さらに、ガイドライン改訂作業は研究班の研究成果を踏まえた改訂版が完成し、出版社への入稿が終了し、H23年の発刊を予定している。

FOPの基礎研究では、DRAGONとSmadのホスファターゼPPM1Aの作用機序の解析やホスファターゼSCP1の作用機序を解析することで、BMPシグナルの抑制メカニズムの解明し、治療戦略の一助となりうる基礎的新知見を得ることが出来た。

また、すでに臨床応用されている2種類のカルシウムチャンネルブロッカー(FendilineとPerhexilene)が細胞レベルでFOPにおける病的骨化シグナルを抑制しうることを示すことが出来た。

また臨床研究では患者数の非常に少ない本疾患患者のアンケート調査および臨床データの集積を行うことで、FOP患者の自然経過(ADLおよびQOL)が明らかとなり、臨床データの蓄積から、早期診断に有用な母趾変形の頻度と特徴、頸部可動域制限の存在など新たな知見を得た。

口腔ケアに関してはこれまでの臨床経験をもとに、口腔ケアハンドブックを作成した。

今後も、基礎的アプローチによる病態解明と臨床的アプローチによる臨床データの集積を行いながら、OPLL、OLF、FOPに対する診断・治療体制の構築を目指していく。

F. 研究発表

1. 論文発表 別紙
2. 学会発表 別紙

G. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得

名称：脊柱靱帯骨化症のマーカーペプチド

発明者：永田見生、津留美智代

出願者：学校法人久留米大学

出願番号：特願 2009-254357

出願年月日：2009/11/5

名称：脊椎疾患診断支援装置、及び脊椎疾患診断支援プログラム

発明者：岡敬之、吉村典子、阿久根徹、川口浩、中村耕三

出願者：国立大学法人 東京大学

出願番号：特願 2010-096330

出願年月日：2010/4/9

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

【H20～H23】

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
川端茂徳, 富澤將司, 友利正樹, 四宮謙一	【脊髄・末梢神経疾患】脊髄誘発磁界測定による脊髄障害部位診断の臨床応用	臨床脳波	50(5)	271-277	2008
富澤將司、川端茂徳、友利正樹、四宮謙一	【脊髄機能モニタリングの最近の進歩】術中脊髄モニタリングの有用性と限界	整形・災害外科	51(3)	289-297	2008
川端茂徳、富澤將司、友利正樹、四宮謙一	【脊髄機能モニタリングの最近の進歩】脊髄誘発磁界測定による脊髄機能診断の臨床応用	整形・災害外科	51(3)	319-325	2008
友利正樹、川端茂徳、新井嘉容、加藤剛、富澤將司、坂井顕一郎、石井宣一、四宮謙一	3次元脊髄誘発磁界による脊髄不完全損傷の診断	脊椎機能診断学	30(1)	90-99	2008
Fujiyoshi T, Yamazaki M, Kawabe J, Endo T, Furuya T, Kodama M, Okawa A, Takahashi K, Konishi H	A new concept for making decisions regarding the surgical approach for cervical ossification of the posterior longitudinal ligament: the K-line	Spine	33	E990-E993	2008
Hosono N, Sakaura H, Mukai Y, Kaito T, Makino T, Yoshikawa H	A simple performance test for quantifying the severity of cervical myelopathy.	J Bone Joint Surg Br	90-B (9)	1210-1213	2008
Fukuda T, Kanomata K, Nojima J, Kokabu S, Akita M, Ikebuchi K, Jimi E, Komori T, Maruki Y, Matsuo M, Miyazono K, Nakayama K, Nanba A, Tomoda H, Okazaki Y, Ohtake A, Oda H, Owan I, Yoda T, Haga N, Furuya H, and Katagiri T.	A unique mutation of ALK2, G356D, found in a patient with fibrodysplasia ossificans progressiva is a moderately activated BMP type I receptor.	Biochem Biophys Res Commun	377	905-909	2008
Uchida K, Nakajima H, Inukai T, Takamura T, Kobayashi S, Furukawa S, Baba H.	Adenovirus-mediated retrograde transfer of neurotrophin-3 gene enhances survival of anterior horn neurons of twy/twy mice with chronic mechanical compression of the spinal cord.	J Neurosci Res	86 (8)	1789-1800	2008