

令和 6 年 5 月 25 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18413

研究課題名（和文）生物学的製剤は脊柱靭帯骨化症の治療薬となり得るか？

研究課題名（英文）Can Biologics be a Treatment for Spinal Ligament Ossification？

研究代表者

浅利 享（Asari, Toru）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40529674

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では脊柱靭帯骨化症患者の手術中に採取した脊柱靭帯を用いて、靭帯組織内の間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cells: MSC）を単離培養し、培養MSCの骨分化能に炎症性サイトカインがどのように関与するかを解明し、炎症性サイトカイン阻害薬が治療薬になり得るかを検討した。培養MSCへのテリパラチド投与効果は、患者由来MSC、非患者由来MSCにおいても骨分化の程度に差を認めなかった。患者由来培養MSCへの生物学的製剤投与は、有意な骨分化抑制効果は認めなかった。脊柱靭帯骨化症患者に対する治療としての生物学的製剤に関しては、今後薬剤の変更や追加が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊柱靭帯骨化症患者から由来する間葉系幹細胞へ骨粗鬆症治療薬で使用している骨形成促進薬を投与した所、患者由来細胞と非患者由来細胞では骨分化能に差はなかった。また、自己免疫性疾患で使用している生物学的製剤を投与した所、患者由来培養細胞においても骨化抑制効果は認めなかった。これらから、脊柱靭帯骨化症患者において骨形成促進薬の投与は骨化を悪化させない可能性があり、また、生物学的製剤は骨化促進を抑制しない可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we isolated and cultured mesenchymal stem cells (MSCs) from spinal ligaments harvested during surgery from patients with ossification of spinal ligaments to elucidate how inflammatory cytokines are involved in the osteogenic potential of cultured MSCs and whether inhibitors of inflammatory cytokines can be used as therapeutic agents. We investigated the involvement of inflammatory cytokines in the osteogenesis of cultured MSC. The effect of teriparatide administration to cultured MSCs showed no difference in the degree of osteo-differentiation in patient-derived and non-patient-derived MSCs. Administration of biologics to patient-derived cultured MSCs did not have a significant inhibitory effect on osteo-differentiation. Future changes or additions to biologics as a treatment for patients with spinal ligament ossification are warranted.

研究分野：整形外科

キーワード：脊柱靭帯骨化症

## 1. 研究開始当初の背景

脊柱靱帯は、椎体間を連絡して脊椎の可動性を保持しつつ、その脊柱管内に存在する脊髄を保護する組織であり、それが骨化・石灰化を起こす疾患が脊柱靱帯骨化症（後縦靱帯骨化症、黄色靱帯骨化症など）である。脊髄が存在する脊柱管を連結する後縦靱帯・黄色靱帯に骨化・石灰化が起こると、可動性の低下だけでなく脊髄を圧迫し、四肢のしびれ、麻痺さらには脊髄損傷を起こす。脊柱靱帯骨化症は厚生労働省の難治性疾患に指定され、患者の Quality of Life を著しく低下させるが、その機序は明らかとなっておらず、現時点での治療法としては侵襲度の極めて高い外科手術しかない。また術後に骨化の再発・進展も見られるなど予後が悪く、安全な薬物治療法・進展予防法の確立が待たれている。当施設では本疾患の厚生労働省調査研究班に長年所属し、研究成果を報告してきた。

これまで我々はヒト脊柱靱帯に存在する MSC が本来分化すべき靱帯ではなく、骨に間違って分化することが脊柱靱帯骨化の原因であると仮説を立て、以下の研究成果を報告してきた。

1) ヒト脊柱靱帯から MSC の単離に成功 (Asari T., and Furukawa K, BBRC. 2012)。

2) 脊柱靱帯骨化症組織内では MSC の同在性が変化すること (Chin S., Asari T., and Furukawa K., BBRC. 2013)。

3) 脊柱靱帯骨化症患者由来 MSC では易骨化性の細胞に形質転換すること (Harada Y., Asari T., and Furukawa K., BBRC. 2014)。

4) 形質転換の一つのメカニズムがエピジェネティクス (DNA メチル化) であること (Chiba N., Furukawa K., and Asari T. JPS. 2015)。

5) 骨化モデルマウスから単離した MSC はコントロールマウス由来 MSC と比較し、高い骨化能を有すること (Liu X., Asari T., and Furukawa K. Spine. 2017)。

以上の研究成果から脊柱靱帯骨化症患者の骨化進行予防には、脊柱靱帯内 MSC の骨分化をコントロールすることが治療につながると考え、患者靱帯由来の MSC を用いて実験を行ってきた。

【実験】過去に脊柱靱帯骨化の病態に炎症性サイトカインが関与していると報告されているが (Park JO. J Spinal Disord Tech. 2013) 炎症性サイトカインを阻害することで、脊柱靱帯の骨化が抑制されるかの検討はなされていない。現在、臨床現場では関節リウマチなどの炎症性疾患の治療に生物学的製剤が導入されており、良好な治療成績が報告されている。我々は脊柱靱帯骨化症患者の脊柱靱帯から単離した MSC を用いて、炎症性サイトカインを阻害することで骨分化を抑制することができれば、既存の生物学的製剤 (炎症性サイトカイン阻害薬) が脊柱靱帯骨化症の治療薬になる可能性があると考えた。しかしこれまでに炎症性サイトカインを阻害することで、靱帯骨化が抑制されるかどうかの検討はなされていない。

【実験】骨粗鬆症治療薬として使用されているテリパラチド (TPD) は間欠的投与で骨同化作用を有する骨形成促進薬であり、MSC への関与も報告されている。脊柱靱帯骨化症において脊柱靱帯内の MSC が異所性骨化へ関与すると報告されているが、患者に対する TPD 投与の安全性は十分に検証されていない。

## 2. 研究の目的

【実験】本研究の目的は、脊柱靱帯骨化症患者の脊柱靱帯由来 MSC に抗 tumor necrosis factor- (TNF-) 抗体であるアダリムマブを投与し、骨分化抑制効果があるかどうかを検討することである。

【実験】本研究の目的は患者脊柱靱帯由来 MSC の骨分化に対する TPD 投与の影響を検討することである。

## 3. 研究の方法

【実験】手術中に切除された 3 例の後縦靱帯骨化症 (OPLL) 患者の頸椎黄色靱帯から MSC を抽出し培養し、5 継代目を実験に用いた。培養細胞がコンフルエントに達した後、骨分化誘導培地で培養し、2 種類の濃度のアダリムマブ (1 µg/l, 10 µg/l) を投与し、3 週間培養した。その間に週 1 回、培地交換の際にアダリムマブを再投与した。Total RNA を抽出し RT-PCR を行った。非骨分化誘導培地のアダリムマブ非投与下で

培養した OPLL 患者由来 MSC をコントロールとして、CT 法を用いて骨化関連遺伝子(OCN、OSX、OCN、RUNX2、BMP2)の相対的発現量を測定した。さらに Alizarin Red S 染色を行い、吸光度を測定した。

【実験】手術中に切除された頸椎 OPLL 患者の黄色靭帯から MSC を抽出して培養し 5 継代目を実験に用いた。培養細胞がコンフルエントに達した後、骨分化誘導培地で培養し、各濃度の TPD(3nM、10nM、30nM)を投与し、3 週間培養した。週 1 回、培地交換の際に TPD を投与し持続的に TPD に曝露した群を持続投与群、週 3 回、培地交換前の 6 時間のみ TPD に曝露した群を間欠投与群とした。Alizarin Red 染色を行い、吸光度を測定した。Total RNA を抽出し RT-PCR を行った。非骨分化誘導培地の TPD 非投与下で培養した CSM 患者由来 MSCs をコントロールとして、CT 法を用いて TPD 各濃度における骨化関連遺伝子(OCN、OSX、OCN、RUNX2、BMP2)の相対的発現量を測定した。TPD の各濃度間での比較には Friedman 検定を用いた。

#### 4. 研究成果

【実験】RUNX2 を除き各骨化関連遺伝子の発現は、アダリムマブの投与により非投与群の 2/3 程度に抑制され、その抑制効果はアダリムマブの濃度依存性に上昇していた。一方で Alizarin Red S 染色の吸光度測定値はアダリムマブ非投与群で 1.71、アダリムマブ投与群(1 µg/l、10 µg/l)でそれぞれ 1.74、1.97 であった。染色結果からはアダリムマブによる骨分化抑制効果に有意差は認めなかった。MSCs の骨分化には様々な転写因子、サイトカインが関与し、複数のシグナル伝達経路の存在が明らかにされている。本研究の結果からアダリムマブはそれらのシグナル伝達を担う一部の骨化関連遺伝子の発現を抑制する傾向にあったが、最終的な石灰化を抑制するには至らなかった。

#### 【実験】

Alizarin Red 染色の吸光度測定値は持続投与群において TPD 非投与で 1.63、TPD 投与(3nM、10nM、30nM)でそれぞれ 1.45、1.24、1.34 であった。間欠投与群では TPD 非投与で 2.06、各濃度でそれぞれ 1.80、1.87、1.90 であった。いずれの投与方法においても TPD 濃度間で有意差は認めなかった。各遺伝子発現量についても持続投与群、間欠投与群いずれも TPD 各濃度間の有意差はなく、TPD による骨分化促進効果は認めなかった。本研究の Alizarin Red 染色および遺伝子発現の結果からは OPLL 患者由来 MSCs への TPD 投与による骨分化促進効果は明らかではなかった。これらの結果から OPLL 患者への TPD 投与は脊柱靭帯の異所性骨化を促進しない可能性が示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Araki R, Asari T, Kudo H, Sasaki E, Yamauchi R, Liu X, Wada K, Kumagai G, Sasaki A, Furukawa KI, Ishibashi Y.	4. 巻 145
2. 論文標題 Effect of teriparatide on ligamentum flavum mesenchymal stem cells isolated from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 23-28
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2020.10.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅利 享、和田魁郎、和田簡一郎、熊谷玄太郎、佐々木英嗣、猿田賢也、新戸部陽士郎、石橋恭之
2. 発表標題 靱帯骨化モデルマウスに対するAMD3100投与の骨化抑制効果の検討
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒木 亮、浅利 享、和田簡一郎、熊谷玄太郎、田中 直、石橋恭之
2. 発表標題 アグリムマブによる脊柱靱帯骨化症患者由来間葉系幹細胞の骨分化抑制効果
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 亮、浅利 享、工藤 整、和田簡一郎、熊谷玄太郎、佐々木綾子、古川賢一、石橋恭之
2. 発表標題 テリパラチドによる脊柱靱帯骨化症患者由来間葉系幹細胞の骨分化促進に関する検討
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------