

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18449

研究課題名(和文) 脊柱靭帯骨化症モデルマウスにおける静脈血栓塞栓症発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of venous thromboembolism in spinal ligament ossification model mouse

研究代表者

市川 奈菜 (Ichikawa, Nana)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70837434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：脊柱靭帯骨化症モデルマウス(ttwマウス)を用いて脊柱靭帯骨化症における静脈血栓塞栓症の発生に関わる因子を調査した。ttwマウスではコントロールに比べて血液凝固が亢進しており、血管壁が薄く、径が小さい血管が多かった。また、ttwの血管内皮細胞は管腔形成能が高く、血管周囲により多くの間葉系幹細胞(MSCs)が多く存在していた。これらのことは血栓形成に寄与する結果であり、ttwマウスでは血栓ができやすい状態であることが示唆された。また、血管内皮細胞の高い管腔形成能が骨化の増大に関与している可能性が示された。

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では脊髄損傷後の静脈血栓塞栓症の発生頻度が高く、死亡率へ影響している。本研究は脊柱靭帯骨化症における血栓形成に関わる因子を調査し、血栓が生じやすい環境である可能性を見出した。また、骨化症モデルマウスの血管内皮細胞は高い管腔形成能を有し、これが骨化の増大に関与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：We researched risk factors for venous thromboembolism in ossification of spinal ligament with its model mice (ttw mice). In ttw mice, blood coagulation was extended, vascular wall was thin and much more small blood vessels was seen than control mice. Endothelial cells from ttw had high vasculogenesis capability, and there were much more mesenchymal stem cells around blood vessels in ttw than control. These results contribute to thrombus formation, and suggest that ttw has environment to become thrombosis. Furthermore, this research revealed that high capability of vasculogenesis may contribute to growth of spinal ligament ossification.

研究分野：整形外科

キーワード：脊柱靭帯骨化症 後縦靭帯骨化症 静脈血栓塞栓症 ttwマウス

1. 研究開始当初の背景

脊柱靭帯骨化症(後縦靭帯骨化症、黄色靭帯骨化症など)は脊柱靭帯に生じた骨化により脊髄が圧迫されることで頸部痛、上下肢の運動障害など様々な症状を引き起こし、患者の Quality of Life を著しく低下させる。厚生労働省の難治性疾患にも指定されているが、その機序は明らかでなく、根本的な治療法も確立していないのが現状である。我々は、厚生労働省の後縦靭帯骨化症研究班に所属し、脊柱靭帯骨化症について以下の研究成果を報告してきた。

- ・脊柱靭帯骨化の本体は間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSCs) であること (Asari T., Furukawa K. and Kumagai G., BBRC.2012)
- ・脊柱靭帯骨化症組織内では MSCs の局在性が変化すること (Chin S. and Furukawa K., BBRC.2013)
- ・MSCs が易骨化性の細胞に形質転換すること (Harada Y. and Furukawa K., BBRC.2014)
- ・形質転換のメカニズム一つはエピジェネティクス (DNA メチル化) であること (Chiba N., Furukawa K. and Kumagai G. JPS.2015)
- ・脊柱靭帯骨化モデルマウス (tip-toe walking マウス) 由来の MSCs は骨分化能が高いこと (Liu X., Furukawa K. and Kumagai G., Spine 2017)
- ・ヒスタミン H2 受容体拮抗薬であるファモチジンは後縦靭帯骨化症由来の MSCs の骨分化を抑制すること (Liu X., Furukawa K. and Kumagai G., Eur J Pharmacol. 2017)

上記のように、骨化症の病態には MSCs が関与することを明らかにしてきた。一方で、脊柱靭帯骨化症患者では、転倒など軽微な外傷により SCI を引き起こすことが知られている。SCI における合併症の一つに VTE があるが、その発生率は 12-64% と高く、死因の 9.7% を占めるため、その予防は死亡率の低下につながる (Kumagai G and Ichikawa N. JSCM 2018)。VTE の病態として Virchow の三徴 (血流の停滞、血液凝固能の異常、血管壁障害) が知られており (Virchow R. Meidinger Sohn 1856)、過去に我々は脊髄損傷を受傷した脊柱靭帯骨化症患者では、麻痺症状の重症度に関わらず、VTE の発生率が高いことを報告した (市川、熊谷ら。東北整災誌 2017) (Ichikawa N. JSCM 2020)。SCI 患者では麻痺や神経障害により血流の停滞が生じる。また、申請者は過去に後縦靭帯骨化症患者では血液凝固能に異常を認めなかったことを報告している (Kishiya M. J Spinal Disord Tech 2008)。以上のことから、Virchow の三徴のうちの一つである血管壁障害に原因解明の鍵がある可能性が示唆された。しかし、これまでに脊柱靭帯骨化症における血管壁障害に着目した研究は少なく、周術期の出血や血栓症が多い原因については不明な点が多いのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は脊柱靭帯骨化症モデルマウス (ttw マウス) を用いて、血栓形成に関する因子として血液凝固能、血管内皮細胞の管腔形成能および組織における血管形態の病理学的な評価および血管周囲の間葉系幹細胞 (MSCs) の分布を評価し、脊柱靭帯骨化症患者における血栓形成に関連する因子を同定することである。

3. 研究の方法

8-24 週齢の雄 TWY/Jic マウス (ttw) と C57BL/6J マウス (WT) を対象とした。脊柱靭帯骨化の評価として 8、16、24 週齢の ttw の頸椎マイクロ CT を撮影し、骨化巣の体積を測定した。また、脊柱靭帯骨化症における静脈血栓塞栓症の発生に関わる因子を調査するため、脊柱靭帯骨化症モデルマウス (以下、ttw マウス) を用いて血液凝固能、血管形態、管腔形成能、血管周囲の MSCs の分布を評価した。

(1) 血液検査による凝固能の評価

8-24 週齢までの ttw マウスと C57BL/6J マウス (WT マウス) で、8 週ごとに心臓血を採取した。血液凝固に関する項目として血小板数 (Plt)、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン、D-dimer を測定した。

(2) 組織 (筋、腱) の組織学的評価

8-24 週齢までの ttw マウスと WT マウスで、8 週ごとに下腿の筋と腱を一塊に採取した。凍結切片を作成、観察し、単位面積あたりの血管面積 (VA)、血管内腔面積 (IVA)、血管壁面積 (VWA)、血管壁が血管面積に占める割合 (%VWA) を計測した。

(3) 血管内皮細胞の管腔形成能の評価

8~12 週齢の ttw マウスと WT マウスから大動脈を採取し、血管内皮細胞を単離培養した。培養した血管内皮細胞を用いて、ttw マウスと WT マウスの血管内皮細胞の管腔形成能 (total tube length (TTL)、total branching points (BP)、total loops (TL)) を調査した。

(4) MSCs の分布

ttw マウスにおける MSCs の局在を評価するため、下腿の筋・腱を用いて凍結切片を作成した。血管内皮細胞マーカー (CD31) と MSCs マーカー (CD90) で二重免疫染色を行い、また MSCs マ

ーカー(CD90)陽性細胞を DAB 染色で定量化した。

4. 研究成果

ttw における脊柱靭帯の骨化は、8 週齢の時点で軸椎歯突起後方に認められた。骨化巣は徐々に増大し、24 週では脊髄が高度に圧迫されていた。血液凝固能は 8、16 週齢で WT に比べて ttw で PT が有意に短縮していた(それぞれ $p=0.046$ 、 0.046)。また、全ての週齢で WT に比べて ttw でフィブリノゲンが高値だったが、有意差は認めなかった。組織学的評価では、全ての週齢で WT に比べて ttw で VA が有意に小さかったが、%VWA は 24 週のみで有意差を認めた($p=0.007$)。管腔形成能は、WT に比べて ttw で有意に TTL, BP, TL の全てが多い結果だった($p=0.008$)。MSCs の免疫染色では、ttw と WT の両方で血管周囲に MSCs が存在し、特に 8 週齢で WT に比べて ttw で有意に MSCs が多く存在していた($p=0.001$)。

ttw マウスにおける血液凝固能と血管形態、血管内皮細胞の管腔形成能を評価した。ttw では WT に比べて血液凝固が亢進しており、小さくて壁の薄い血管が多く、血管内皮細胞の管腔形成能が高かった。

PT、APTT は血液凝固能の指標として広く使用されており、PT、APTT の短縮とフィブリノゲンの上昇は凝固過剰状態を示し、VTE 発生と関係することが過去に報告されている。一般に、径の小さい毛細血管は一層の内皮細胞と周皮細胞からなるため脆弱である。本研究では、WT に比較して ttw で壁が薄く径の小さい小血管が多く、ttw の血管内皮細胞は WT に比べて有意に管腔形成能が高かった。これらの結果から ttw では血管新生により生じた微小血管が多く存在する可能性が示唆された。過去には血管新生がヒトの血管、心臓の弁、骨格筋などの石灰化に寄与していること、ttw の脊柱靭帯骨化にも血管新生が先行していることが報告されており、血管新生と骨化は関連している可能性が示されている。また、OPLL 患者では脊柱靭帯組織の血管周囲に MSCs が多く存在し、その MSCs は骨分化能が高いことが報告されている。本研究でも ttw の組織において血管周囲に MSCs が多く存在しており、これらのことから、靭帯の骨化には MSCs と血管新生が関与している可能性が考えられた。今後、ttw における脊髄損傷モデルにおいて、VTE の発生との関係を明らかにする必要がある。

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 Nana Ichikawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Coagulation, Vascular Morphology, and Vasculogenesis in Spinal Ligament Ossification Model Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/BRS.0000000000003891	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nana Ichikawa
2. 発表標題 Blood coagulability, vascular morphology and vasculogenesis capability of spinal ligament ossification model mice
3. 学会等名 Orthopaedic Research Association Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nana Ichikawa
2. 発表標題 Blood coagulability, vascular morphology and vasculogenesis capability of spinal ligament ossification model mice.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2020（国際学会）
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
---------	---------