

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09468

研究課題名(和文) 後縦靭帯骨化症発症におけるビタミンK代謝の役割と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Therapeutic Effect of Vitamin K Supplementation in a Mouse Model of Cervical Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament

研究代表者

木村 敦 (Kimura, Atsushi)

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20364507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：OPLL患者ではprothrombinとprotein CといったビタミンK依存性タンパク質の活性が対照群に比較して有意に低値であった。頸椎OPLLのモデル動物であるtwyマウスにビタミンKを補充したVKS群は、通常餌の対照群およびビタミンK欠損餌を与えたVKD群よりも有意に頸椎の異所性骨化が抑制され、歩行障害も軽度であった。血漿中のGRP濃度は、VKS群がVKD群よりも有意に高値であった。靭帯骨化巣周囲に集積する骨軟骨細胞には、GRPが豊富に発現していた。これらの所見は、ビタミンK補充がGRPを介して骨化伸展を抑制する新しい治療法となる可能性を示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OPLL患者に多い肥満や2型糖尿病患者では腸内細菌叢の変化等によってビタミンKが不足した状態にある可能性がある。こうした患者にビタミンKを補充することで靭帯骨化症の伸展を抑制できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Tip-toe walking (ttw) mice were divided into three groups based on vitamin K intake. The control group received vitamin K from a normal diet; the vitamin K supplemented (VKS) group received a normal diet supplemented with an intraperitoneal injection of vitamin K2 (menaquinone; 50 mg/kg, twice a week); and the vitamin K deficient (VKD) group received a gamma-irradiated vitamin K-deficient diet. After 6 weeks of vitamin K interventions, VKS group showed significantly longer stride lengths than the other groups in the footprint analysis. The volume of ectopic calcification was significantly smaller in the VKD group than the other groups. Immunostaining for GRP revealed accumulation of GRP+ osteochondrogenic cells in the vicinity of calcification niduses in the spinal ligament. VKD group had the least number of GRP+ cells around the niduses. The current results indicate that vitamin K supplementation can be a novel therapeutic strategy for OPLL.

研究分野：整形外科

キーワード：後縦靭帯骨化症 ビタミンK 頸髄症 twyマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

後縦靭帯骨化症 (ossification of the posterior longitudinal ligament: OPLL) は、脊柱管の前壁に位置する後縦靭帯が骨化する疾患であり、緩徐に進行する脊髄圧迫による上下肢の痙性麻痺の原因となる。OPLL には、遺伝的素因、糖尿病、肥満など多因子が関与することが報告されているが、その病態には不明の点が多い。最近我々は脊椎手術時の出血のリスク因子を明らかにする目的で、頸髄症術前患者に採血を行い、血液凝固能、血小板機能に関する詳細な分析を行った (文献 1)。この研究で得られたデータの 2 次解析として、対象患者を OPLL 症例とそれ以外の頸椎症性脊髄症 (cervical spondylotic myelopathy: CSM) 症例に群分けして比較を行ったところ、OPLL 患者は CSM 患者に比較して %Prothrombin time (%PT) と Protein C 活性が有意に低いことを見出した (Fig. 1)。Prothrombin と Protein C はいずれもビタミン K 依存性に活性化するタンパク質であることから、我々は OPLL 患者においてビタミン K の代謝経路に変化が生じているとの仮説を立てた。ビタミン K と骨形成を関連付ける因子として、最近同定された新規ビタミン K 依存性タンパク質である Gla-rich Protein (GRP) (引用文献 2) に着目した。GRP は骨化の negative regulator としての作用を持ち、循環器疾患領域では動脈壁の石灰化を抑制する作用が注目されている。OPLL 患者でビタミン K 依存性タンパク質の Gla 化が障害されていると仮定すれば、GRP の活性化障害が靭帯骨化進展のメカニズムの一つである可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、後縦靭帯骨化症 (OPLL) 患者においてビタミン K 依存性タンパク質の活性化機構 (γ -カルボキシ化: Gla 化) が抑制されているとの仮説のもとに、OPLL の疾患モデル動物である twy マウスにおいて、ビタミン K の補充療法が骨化進展の抑制に有効であるか検討し、そのメカニズムに GRP が関与しているかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

twy (tiptoe walking Yoshomura) マウスを用いた検討

(1) 実験動物: twy マウス (5 週齢)

twy マウスは遺伝性骨軟骨異常マウスであり、OPLL の自然発症動物モデルとして用いられる。生後 6 週頃までに後縦靭帯および環軸椎後方の間膜に骨化巣が発生し、ゆっくりと増大することで頸髄症を発症する。頸髄症の進行によって生後 14 週頃より体重が減少し始め、20 週頃には四肢関節の骨性強直が完成する。

(2) 薬物投与

1. Control 群: 通常餌によりビタミン K を摂取。2. ビタミン K 補充群: vitamin K2 (Menatetrenone, 50 mg/kg) 週 2 回腹腔内注射; 3. ビタミン K 欠乏群: コバルト照射 (50 kGy) でビタミン K を欠損させた餌 (Oriental Yeast Co.) を投与。3 群とも 5 週齢で投与を開始し、6 週間の介入を行った。

(3) 機能評価

Foot print analysis: 6 週間の介入後、歩行障害の評価とした。水溶性の染料によって前肢を緑、後肢を赤に標識し、紙面に footprint を記録する。Footprint は電子データとして保存し、stride length の減少および stride width の増大を痙性歩行の指標とした。

(4) 血液検査

同じくエンドポイントにおいて全身麻酔下に頸静脈より血液を採取した。血漿中の GRP 濃度を ELISA キット (MyBioSource) によって定量化した。

(5) マイクロ 3D-CT

過剰量の麻酔でマウスを安楽死させた後、4% paraformaldehyde 還流固定後に頭頸移行部の頸椎を切除し、さらに 24 時間固定した。切除標本をマイクロ CT (LaTheta LCT-200, Hitachi Aloka Medical) で撮影し、付属の画像解析ソフトを用いて骨化巣の体積を定量化した。

(6) 組織学的評価

頸椎の切除検体は 10% ethylenediaminetetraacetic acid による脱灰操作後にパラフィン包埋し、4 μ の厚さで切片を作成した。切片は抗 GRP 抗体 (1:200; LSBio) およびビオチン化二次抗体で標識し、DAB で発色させた後にヘマトキシリンで対比染色を行った。蛍光二重染色では、1 次抗体として GRP の他に Sox9 (1:200; Millipore)、Runx2 (1:200; Sigma) を使用し、蛍光標識された 2 次抗体で可視化した。

(7) 統計解析

2 群間比較には unpaired t test を、3 群間比較には One-way ANOVA の後に post-hoc test として Tukey's test を用いた。

4. 研究成果

(1) 臨床検体の 2 次的解析

臨床検体の 2 次解析において、OPLL 患者では Prothrombin、および protein C といったビタミン K 依存性タンパク質の活性が有意に低値であった (Fig. 1)。これらの結果は OPLL 患者でビタミン K の濃度低下や代謝障害が生じていることを示唆している。

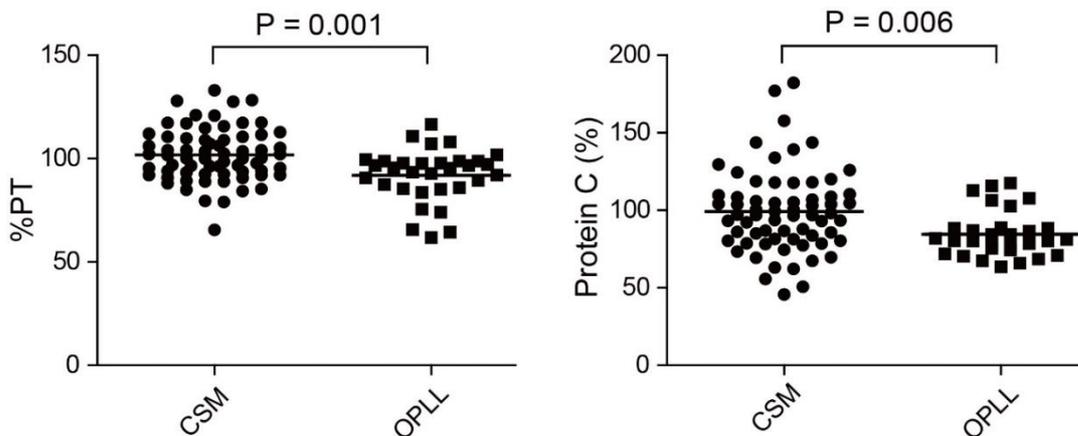


Fig 1. 臨床採血検体における頸椎症性脊髄と (CSM) と OPLL の比較

(2) 歩行機能の分析

6 週間のビタミン K 摂取量への介入後の footprint analysis では、VKS 群の stride length が他の 2 群に比較して有意に大きかった (図 2A, B)。Stride width については後肢で VKS 群が小さい傾向があったが、有意差には至らなかった (Fig. 2C)。

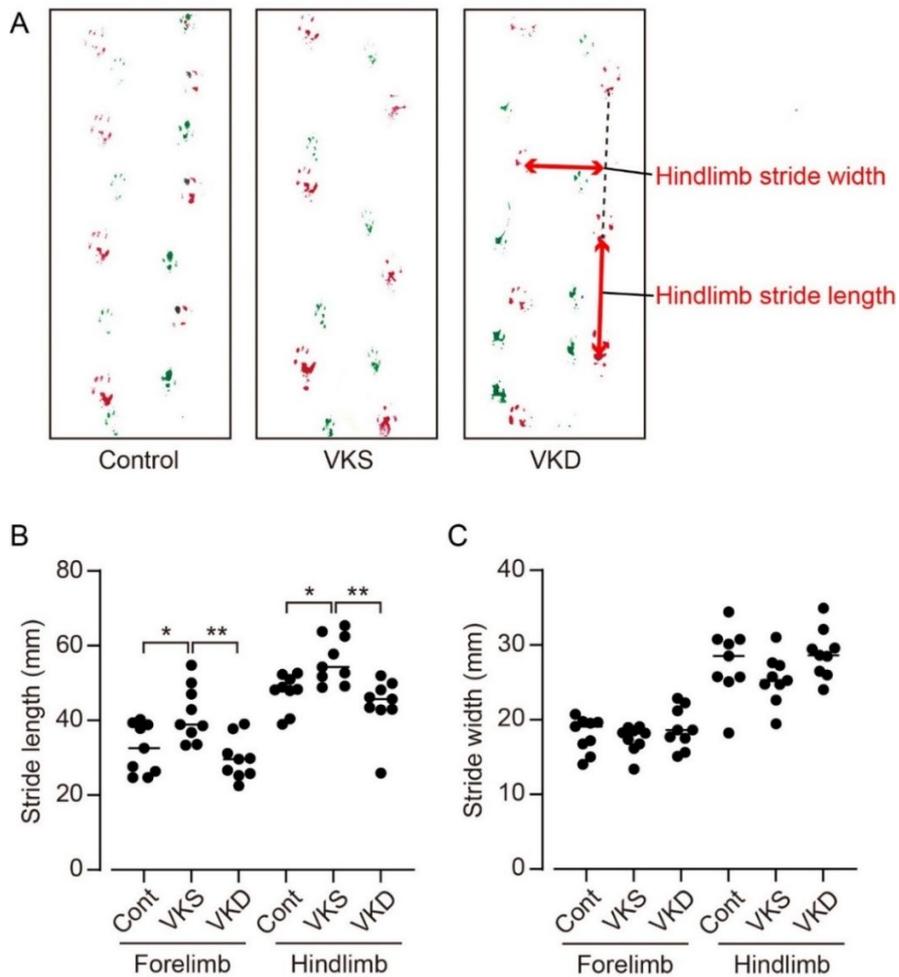


Fig. 2. Footprint analysis

(3) 画像解析

3D CT では連続した横断像上で異所性骨化を同定し (Fig. 3A-C)、3D 画像を構築した (Fig. 3D-F)。過去の報告の通り、twy マウスは C2 高位の後縦靭帯と環軸椎後方の間膜に骨化巣を形成していた。骨化巣の体積を定量化すると、VKS 群は他の 2 群に比較して有意に骨化巣の体積が小さかった (One-way ANOVA followed by the Tukey's post hoc test, * $P < 0.05$)。

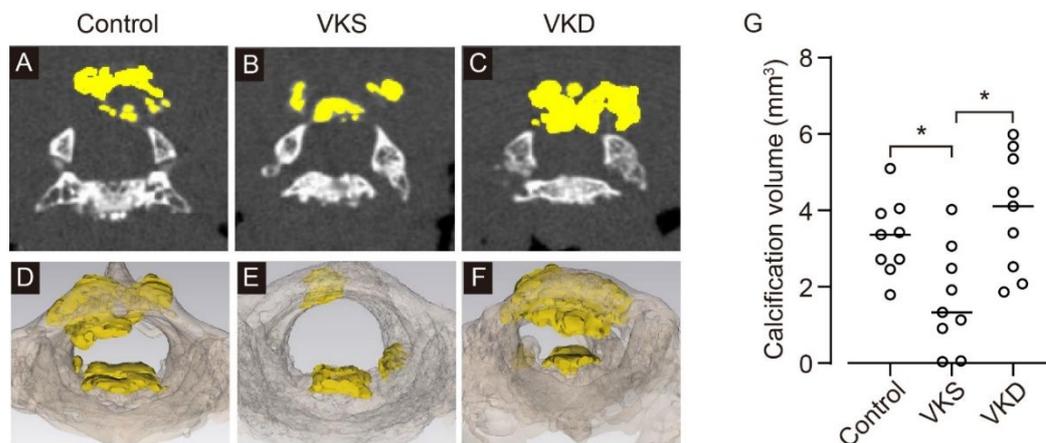


Fig. 3. マイクロ CT による石灰化巣定量化

(4) 血漿中 GRP 濃度

6 週間の介入後に採血し、ELISA キットを用いて血漿中 GRP 濃度の測定を行った。VKS 群の GRP 濃度は VKD 群よりも優位に高値であった (One-way ANOVA followed by the Tukey's post hoc test, * $P < 0.05$)。

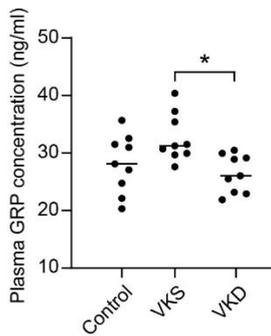


Fig. 4. 血漿中 GRP 濃度

(5) 組織学的検討

環軸椎矢状断組織において GRP に対する免疫染色を行った。C2 高位の後縦靭帯および環軸椎後方の間膜に骨化巣が確認され、骨化巣の周囲に DAB で茶色に標識された GRP 陽性細胞が集積していることが確認された (Fig. 5)。骨化巣の面積は VKD 群で最も大きかったが、骨化巣周囲の GRP 陽性細胞の数は最も少なかった。

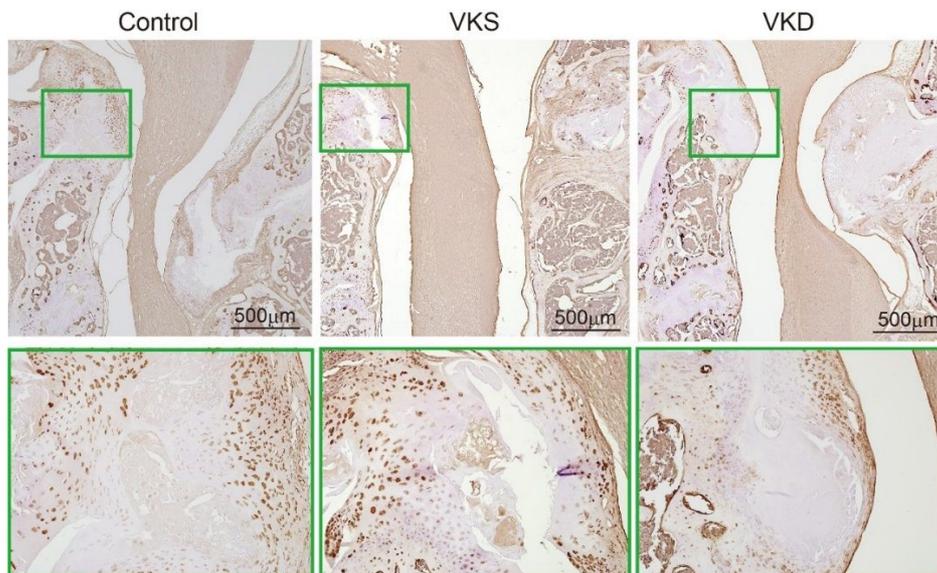


Fig. 6. GRP に対する免疫染色

(6) 蛍光二重染色

石灰化巣の周囲に集積する細胞に対して蛍光二重免疫染色を行った。GRP 陽性細胞の多くは増殖する軟骨細胞のマーカーである SOX9 が陽性であった。軟骨細胞から骨芽細胞への分化に必要なとされる転写因子である Runx2 は一部の細胞で陽性であった。

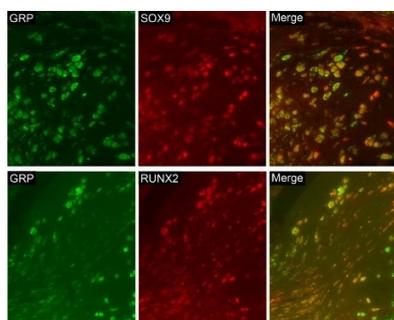


Fig. 7.

引用文献

1. Kimura, A. et al. Hemostatic function to regulate perioperative bleeding in patients undergoing spinal surgery: A prospective observational study. PLoS One 12, 2017.
2. Viegas, C. S. et al. Gla-rich protein is a novel vitamin K-dependent protein present in serum that accumulates at sites of pathological calcifications. Am J Pathol 175, 2009.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Atsushi Kimura
2. 発表標題 Therapeutic Effect of Vitamin K Supplementation in a Mouse Model of Cervical Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament
3. 学会等名 50st Annual Meeting of Cervical Spine Reserch Society (国際学会)
4. 発表年 2022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
---------	---------