

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09472

研究課題名(和文) からだに石灰がたまるメカニズム～慢性炎症による石灰化抑制機構の破綻～

研究課題名(英文) Disruption of biomineralization suppression mechanisms by chronic inflammation

研究代表者

太田 昌博(Ota, Masahiro)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：70823334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性炎症による石灰化抑制機構の局所的な破綻が、腱や靭帯の異所性石灰化に関与するかどうかを検証した。ヒト黄色靭帯由来の線維芽細胞はTNF α 、IL-6刺激によって、石灰化抑制分子であるピロリン酸濃度を低下させたが、ピロリン酸を制御するENPP1、ANK、TNAPの挙動だけでは説明がつく結果はえられなかった。線維芽細胞を骨誘導培地でTNF α またはIL-6の存在下で培養すると、IL-6添加群では石灰化は亢進したが、TNF α 刺激をすると石灰化は抑制された。ラットアキレス腱断裂モデルでは、異所性石灰化/骨化が誘導され、炎症を抑制によって骨化は抑制傾向を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の様々な臓器にリン酸カルシウム結晶(ハイドロキシアパタイト)が沈着する『異所性石灰化』は痛みや臓器機能障害を引き起こす。リン酸カルシウム結晶はさらなる炎症を引き起すと考えられており、炎症アンブ(増強)がその障害を慢性化、重症化させる可能性がある。現在、この病態に対する治療薬はなく、unmet medical needsのひとつといえる。本研究ではIL-6刺激がこの異所性石灰化あるいは骨化と、その慢性化に関わる可能性が示されたことから、この経路を遮断するような治療法が症状悪化を防ぐ治療法になりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We tested whether local disruption of biomineralization suppression mechanisms by chronic inflammation is involved in ectopic calcification of tendons and ligaments. TNF- α and IL-6-stimulated fibroblasts from human ossified lesion of ligamentum flavum decreased the concentration of pyrophosphate, a calcification inhibitory molecule, but the results could not be explained solely by the behavior of ENPP1, ANK, and TNAP, which regulate pyrophosphate. When fibroblasts were cultured in the presence of TNF α or IL-6 in osteogenic induction medium, calcification was enhanced in the IL-6 group, while TNF- α stimulation inhibited calcification. In a rat Achilles tendon rupture model, ectopic calcification/osteogenesis was induced, and ossification showed a suppressive trend by anti-inflammation therapy.

研究分野：骨代謝学

キーワード：異所性石灰化 慢性炎症 石灰化抑制機構 炎症アンブ IL-6 ピロリン酸代謝 靭帯 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨以外の臓器に“石灰がたまる”ことは一般的にもよく知られた現象であるが、ミネラル濃度異常を伴わない『異栄養性石灰化 (dystrophic calcification)』のメカニズムは十分に解明されていない。異栄養性石灰化には、腱、靭帯、血管の変性による石灰化の他、外傷後の筋や靭帯に生じる石灰化や皮膚筋炎病変や腫瘍性石灰化、脳梗塞や脊髄損傷後の筋に生じる石灰化等がある。沈着した石灰は生体内で異物として認識され炎症を惹起し、強い痛みや運動制限、心血管障害等を引き起こす。そのため、異所性石灰化のメカニズムの解明は石灰化を伴うさまざまな病態の治療に役立つ可能性がある。

ヒトの体液中のカルシウム (Ca) と P は基本的に過飽和状態にあり、いつでもアパタイト結晶が析出するのに十分な状態にあるといえる。しかし、骨を除く全ての組織は基本的に石灰化しない。これは、生物の各組織には石灰化を強力に抑制する仕組みが備わっているためである。すなわち、異栄養性石灰化は、臓器の石灰化抑制機構が破綻した結果発生すると捉えることができる。生体内石灰化抑制機構の重要な制御因子としてアパタイト結晶の成長を強力に抑制する無機ピロリン酸 (PPi) がある。PPi は ATP の加水分解産生酵素 ENPP1 (Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1) によって生成され、細胞外に分泌される。分泌された PPi は TNAP (tissue-nonspecific alkaline phosphatase) によって分解される。PPi は全身性に存在し、からだ石灰化するのを防いでいるが、唯一、石灰化が起こる骨組織においては、活性化骨芽細胞から TNAP が大量に分泌され、石灰化抑制分子である PPi 濃度が低下する。その結果、PPi の分解産物である無機リン (IP) が大量に供給され類骨の石灰化が進む。したがって、異栄養性石灰化は、IP を生成する TNAP と、PPi 合成を行う ENPP1 のバランスの異常 (破綻) が生じるためと考えることができる。

腱や靭帯の線維芽細胞における石灰化抑制機構破綻の原因や機序はわかっていないが、近年、線維芽細胞などの非免疫細胞における局所炎症誘導の分子機構である『炎症アンブ』がヒトのさまざまな疾患や病態に関与することが明らかになってきた。そこで、われわれは“炎症アンブによって生じる線維芽細胞の石灰化抑制機構の破綻が異栄養性石灰化を引き起こす”との仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、慢性炎症によって誘導される線維芽細胞の石灰化抑制機構の破綻によって異栄養性石灰化が生じるという仮説を検証することであり、とくに罹患頻度の高い腱や靭帯に生じる異所性石灰化を研究ターゲットとして研究を行った。具体的には、靭帯由来線維芽細胞を慢性炎症の主要メディエータである IL-6 や TNF で刺激した場合に PPi 代謝制御機構の恒常性破綻や、局所 PPi の減少による異所性石灰化が起こるかどうかが検証した。

また、慢性炎症が異所性骨化を悪化させるかどうかを慢性炎症モデルである肥満ラットモデルを用いて確認した。

3. 研究の方法

研究 1

倫理委員会承認のもと、脊椎除圧手術の際、切除廃棄される黄色靭帯組織から線維芽細胞を採取し、ヒト靭帯由来の初代培養線維芽細胞として実験に用いた。

慢性炎症に関与するサイトカイン IL-6, TNF によって PPi 代謝関連酵素群がどのような発現挙動を示すかを調査した。具体的には、PPi 産生酵素 ENPP1, PPi 輸送タンパク質 ANK, PPi 分解酵素/IP 産生酵素: TNAP の mRNA 発現変化量を real time PCR 法を用いて測定した。

同様の条件で培養した際の培地に含まれる PPi 濃度をキットを用いて測定した。

さらに、IL-6 または TNF 存在下で、石灰化誘導 (骨化誘導培地) を 21 日間行った後の石灰化量をアリザリンレッド染色で観察し、比較した。

研究 2

慢性炎症をきたす肥満モデルラット (Zucker Fatty ラット) に対して、アキレス腱切断を行った後 11 週間飼育し、異所性骨化をマイクロ CT を用いて観察した。また組織学的に異所性骨化領域を観察、評価した。介入 X によって炎症を抑制した場合に異所性骨化が抑制されるかどうかを調査した。

研究 3

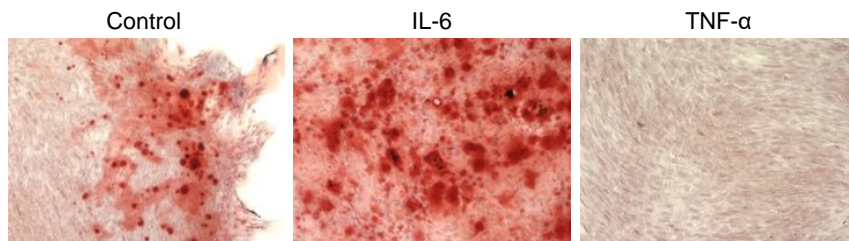
ヒト黄色靭帯骨化症の臨床検体サンプルを用いて免疫組織学的に骨化病変における IL-6 下流の STAT3 活性化および TNF 下流の p65 の活性化を観察した。

4. 研究成果

研究 1

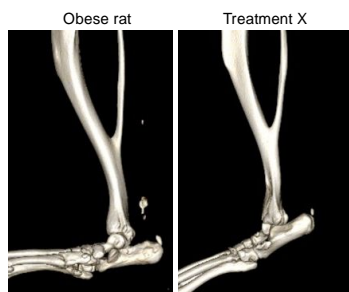
慢性炎症による石灰化抑制機構の局所的な破綻が、腱や靭帯の異所性石灰化に関与するかどうかを *in vitro* で検証した。ヒト脊椎黄色靭帯由来の線維芽細胞は IL-6 刺激によって ENPP1, ANK の発現は上昇したが、PPi 濃度は低下し、石灰化は Control と比較して促進した。一方、TNF では PPi 濃度は低下したが、石灰化は Control と比較して著明に抑制された。この結果から TNF による石灰化抑制は PPi 以外のメカニズムで石灰化が抑制されると考えられた。

石灰化はその抑制分子である PPi 濃度の低下によって促進するが、ENPP1, ANK, TNAP の挙動だけでなく、細胞の分化や増殖などさまざまなほかの要因も関与することがわかった。椎間板髄核細胞では TNF 刺激によって PPi 産生が促進し石灰化が進むことが報告されているが、靭帯由来細胞では予想に反して TNF 刺激によって石灰化が抑制されることわかった。一方、炎症アンブのキーレギュレータである IL-6 刺激では石灰化が促進する可能性が示されたことから、慢性炎症に伴う異所性石灰には IL-6 が関与する可能性が示唆された。



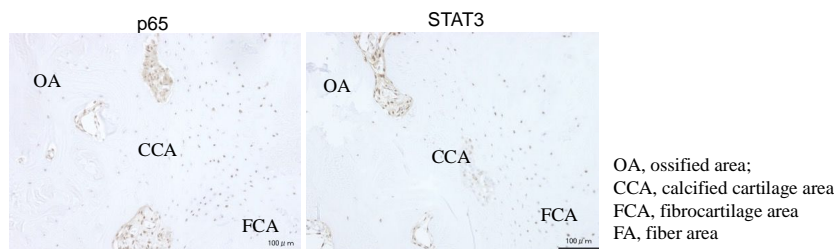
研究 2

慢性炎症を呈する肥満ラットのアキレス腱断裂モデルでは、11 週間後には大きな異所性石灰化 / 骨化が誘導されるが、炎症を抑制する介入治療 X によって骨化は減弱した。



研究 3

黄色靭帯骨化巣の組織サンプルでは、石灰化軟骨領域の軟骨様細胞やその近傍の線維芽細胞で STAT3 や p65 の発現が高かった。すなわち、骨化に関連する細胞で IL-6 や TNF 刺激経路の活性化が確認された。



生体内の様々な臓器にリン酸カルシウム結晶(ハイドロキシアパタイト)が沈着する『異所性石灰化』はさまざまな結合組織 / 臓器の痛みや機能障害を引き起こすが、本研究から慢性炎症が異所性石灰化あるいは骨化の悪化要因となることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	高畑 雅彦 (Takahata Masahiko) (40374368)	北海道大学・医学研究院・准教授 (10101)	

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