

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22734

研究課題名（和文）骨代謝異常に伴う骨密度低下が脊柱側弯の進行に及ぼす影響の解明

研究課題名（英文）The effects of low bone mineral density associated with abnormal bone metabolism on the progression of scoliosis

研究代表者

横川 文彬（Yokogawa, Noriaki）

金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任助教

研究者番号：90623645

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：必須アミノ酸のトランスポーターであるL-type amino acid transporter 1 (LAT1) をコードする遺伝子Slc7a5を軟骨細胞特異的に不活化させた側弯症マウスの経時的な観察により、側弯発生・進行過程における特発性側弯症との類似性の有無、さらには骨密度低下が側弯進行の原因であるか否かについて検証した。LAT1不活化マウスは早期発症特発性側弯症と類似した特徴を持ち、また、骨密度の低下が側弯の発症・進行に続発して起こることが確認され、特発性側弯症における骨密度低下が側弯進行の結果として起こることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性側弯症において骨密度低下と側弯進行は密接に関連していると考えられてきたが、臨床的な研究には限界があり、骨密度低下が側弯進行の原因かあるいは結果かはこれまで不明のままであった。L-type amino acid transporter 1を軟骨細胞特異的に不活化することによって得られた、特発性側弯症と類似した特徴をもつマウスの経時的な観察においては、側弯症の進行がほぼ終了した後に骨密度の低下が起こっており、骨密度の低下は側弯進行の「原因」ではなく「結果」であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Through the longitudinal observation of scoliosis mice with chondrocyte-specific inactivation of Slc7a5, the gene encoding the essential amino acid transporter L-type amino acid transporter 1 (LAT1), we examined whether the development and progression of scoliosis is similar to that of idiopathic scoliosis, and whether reduced mineral bone density is a cause of scoliosis progression. LAT1-inactivated mice were characterized as having features similar to early-onset idiopathic scoliosis, and bone mineral density loss was observed to occur secondary to the onset and progression of scoliosis, suggesting that bone mineral density loss in idiopathic scoliosis is a consequence of scoliosis progression.

研究分野：整形外科

キーワード：側弯症 マウス LAT1 アミノ酸トランスポーター 骨密度 軟骨 成長板

1. 研究開始当初の背景

脊柱側弯症の有病率は2-4%といわれており、その8割以上は原因となる基礎疾患を有さない特発性側弯症に分類される (Letellier K, et al. 2017)。特発性側弯症の発生については、骨・軟骨の構造、骨代謝、神経、骨格筋、結合組織、成長ホルモン、遺伝子等の異常の関与が示唆されているものの、病因の特定には至っていない。特発性側弯症は、脊椎の急速な成長 (growth-spurt) に伴って進行する特徴があり、側弯が一定程度以上に進行した場合には手術療法が必要となるが、その侵襲性の高さや脊椎固定による可動性の制限等の将来への影響も不明であるため、最も重要な治療目標は、手術を回避できるような側弯の進行を可能な限り抑制することである。しかしながら、側弯の進行抑制効果が唯一立証されている装具療法の、長時間の装着が必要なため、小児にとって心身ともに負担が大きいため、その治療効果も限定的 (Schiller JR, et al. 2010) である。そのため、より効果的・効率的に側弯の進行を抑制する治療法の開発が待望されている。この側弯の進行抑制に関して、介入可能な事象として骨密度低下が注目を集めており、実際、特発性側弯症患者の約3割は骨密度の低下を認め、骨密度の低下は側弯の進行リスク因子であったと報告されている (Cheung J, et al. 2015)。

2. 研究の目的

当研究グループでは、必須アミノ酸のトランスポーターであるL-type amino acid transporter 1 (LAT1) をコードする遺伝子 Slc7a5 を軟骨細胞特異的に不活化させたマウス(Lマウス)が、生後に高率に側弯を呈することを確認した (図1)。本研究の目的は、Lマウスの経時的な観察を通して、特発性側弯症と類似した発生・進行過程を示すかどうか調査し、骨密度低下が側弯進行の原因であるか否かを検証することである。さらには、屠殺検体を用いて、椎体骨や成長板を詳細に調査し、側弯症の病因・病態の解明の手がかりを得る事を目的とした。

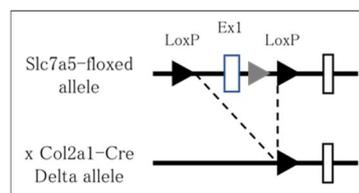
図1. 側弯症マウスの3DC T (矢頭：側弯の頂椎)



3. 研究の方法

Slc7a5-floxed マウスと Co2a1-Cre マウスを交配することで、Lマウス (Col2a1-Cre; Slc7a5 fl/fl) を確保した (図2)。遺伝型は Tail cut を行い、Genotyping により確認した。Lマウス 14匹 (L群) および野生型マウス 8匹 (W群) について、生後1、2、4、6、8週時に全長、体重、Cobb角、椎体回旋角、骨密度について調査した。さらに、8週齢のLマウス 10匹と野生型マウス 5匹の屠殺検体を用いて、 μ -CT による形態学的評価、病理学的評価を行った。 μ -CTでは骨密度 (Bone volume/Tissue volume: BV/TV)、骨梁幅・数・間隙、Structure model index (SMI)、Fractal次元、Trabecular bone pattern factor (TBPf)、Node Strut (N.ND/TV) を調査し、3次元的な骨構造を評価した。病理は Hematoxylin Eosin (HE) 染色にて、骨芽細胞面、破骨細胞面を計測し、Alcian Blue hematoxylin/Orange G (ABH/OG) 染色にて、成長板の評価を行った。経時的に観察して得た縦断的データには2-Way ANOVA および Post hoc analysis を行い、病理や μ -CTで得た横断的データにはt検定や1-Way ANOVA、Post hoc analysis を行った。統計処理は SPSS version 25 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) を用いて、有意確率5%未満を有意とした。

図2. Cre-loxP システムによる Slc7a5 の Knock out



4. 研究成果

結果

Lマウスは先天的奇形椎を有さず、14匹中9匹 (64%) に Cobb角 > 10の側弯症 (Main thoracic curve が左に凸: 5匹、Main thoracic curve が右に凸: 4匹) を認め、残りの5匹は矢状面の変形のみを呈した (図3)。Lマウス 14匹中、雄9匹、雌4匹と雄が多かった。側弯を呈したマウスの頂椎は、5匹が Th10、3匹が Th9、1匹が Th5 であった。Lマウスの側弯進行の特徴を調査するために、経時的な Cobb角、椎体回旋角を計測したところ、W群に比べて、L群は1週齢から有意に大きく、これらの脊柱変形は6週齢までに (Growth-spurt に伴って) 急速に進行し、以降は緩やかな進行に留まった (図4)。一方、骨密度は Cobb角の増加が緩やかになった6週以降に有意にLマウスが低値を示した (図5)。Lマウスが有意に低値を示した6週、8週における骨密度と Cobb角、椎体回旋角の相関を調査す

図3. LAT1 不活化マウスの表現型

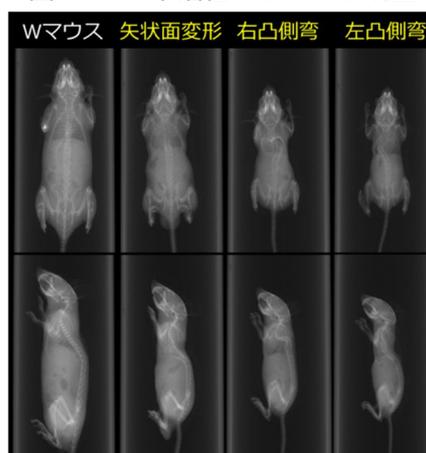


図4. Cobb角および椎体回旋角の経時的変化

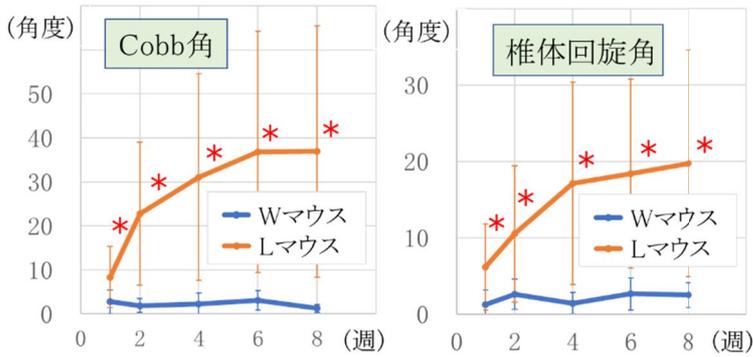


図5. 骨密度の経時的変化

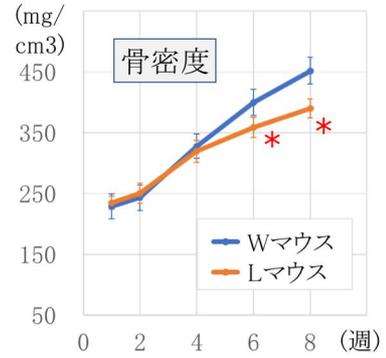
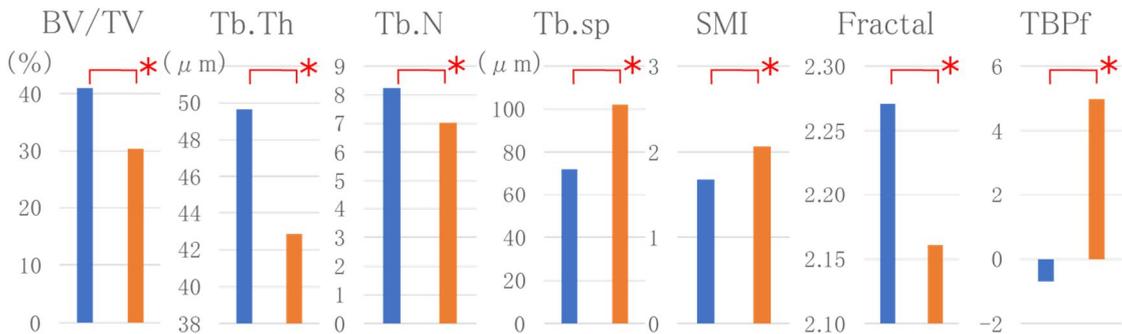


図6. Micro-CTによる3次元骨形態評価(生後8週) Wマウス Lマウス



ると、海綿骨密度では Cobb 角との相関係数 $r=-0.597(p<0.001)$ 、椎体回旋角との相関係数 $r=-0.658(p<0.001)$ 、皮質骨密度では Cobb 角との相関係数 $r=-0.615(p<0.001)$ 、椎体回旋角との相関係数 $r=-0.580(p<0.001)$ と強い負の相関を認めた。μ-CT での評価では、骨梁幅・数・間隙、TBPf、フラクタル次元、SMI に有意差を認め、3 次元骨形態も簡素な構造であることが示唆された(図6)。L マウスにおける発現型の違い(側弯の有無)は椎体骨の骨構造の違いが関与している可能性があると考え、椎体中央で左右に分けてμ-CT での評価も行ったが、側弯の凹側、凸側でいずれの項目でも差を認めなかった。また、側弯を呈した L マウスと矢状面のみの変化を呈した L マウスの比較でも、μCT のほとんどの検査項目で有意な差は認めなかった。病理学的検討では L マウスは、W マウスに比べて破骨細胞面は有意差を認めなかったが、骨芽細胞面は有意に LAT1 で低下していた(図7)。ABH/OG 染色では L マウスの成長板は W マウスに比べて有意に肥厚しており(図8)、頂椎においては凹側で顕著な肥厚であった(図9)。

(考察)

特発性側弯症は3次元の回旋を伴う側弯を呈する有病率の多い脊柱変形疾患(2-4%)であり、発症年齢によって早期発症特発性側弯症(0~10歳未満)、思春期特発性側弯症(10~18歳未満)に分類される。2歳までの発症では性差を認めず、左凸胸椎カーブの側弯を呈する例が多く(93%)、2歳以降の発症では、女兒に多く見られるようになり(85%)、右凸胸椎カーブを呈しやすい(Scott Jc, et al. 1955)。さらに6歳以降の発症となると、女:男=8~10:1となり、多くが右凸胸椎カーブを呈する(Tolo VT, et al. 1978)。思春期特発性側弯症では男女比が女:男=11:1で、右凸の胸椎側弯を呈する例が多い(Ohtsuka Y, et al.1988)。本研究では、L マウスは先天的な奇形椎を有さない点、マウスの性成熟が8週と早熟な生物であることを考慮しても、ほとんどが早期(1週齢または2週齢)に側弯を発症している点、雄のマウスの罹患が多い点、右凸胸椎カーブだけでなく、左凸胸椎カーブの側弯も呈する点など、早期発症特発性側弯症に似た特徴を有していた。さらに側弯の自然経過においても、急成長(Growth spurt)に伴って側弯が進行する点や回旋を伴った側弯である点など特発性側弯症と共通する特徴を有していた(Lonstein JE. et al)。

この早期発症特発性側弯症に類似した特徴をもつ L マウスにおける骨密度は、野生型マウスに比べて4週齢までは同等で、6週齢から L マウスが有意に低値を示していた。他方、L マウスの側弯は1または2週齢の早期から発症し、6週齢までに急速に進行していた。骨密度の低下は側弯に先行せず、6週齢から認めているため、側弯症の「原因」ではない可能性が高い。一方、側弯の進行に関しては、骨密度と Cobb 角や椎体回旋角に強い負の相関を認めたため、骨密度は

図7. 骨芽細胞及び破骨細胞面 (生後8週)

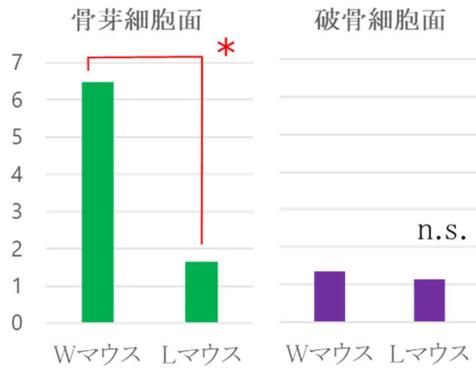


図8. 成長板及び椎体終板 (生後8週)

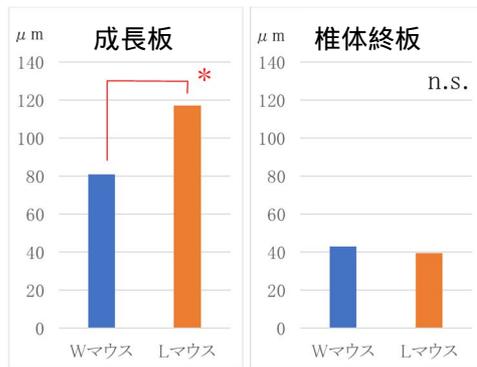
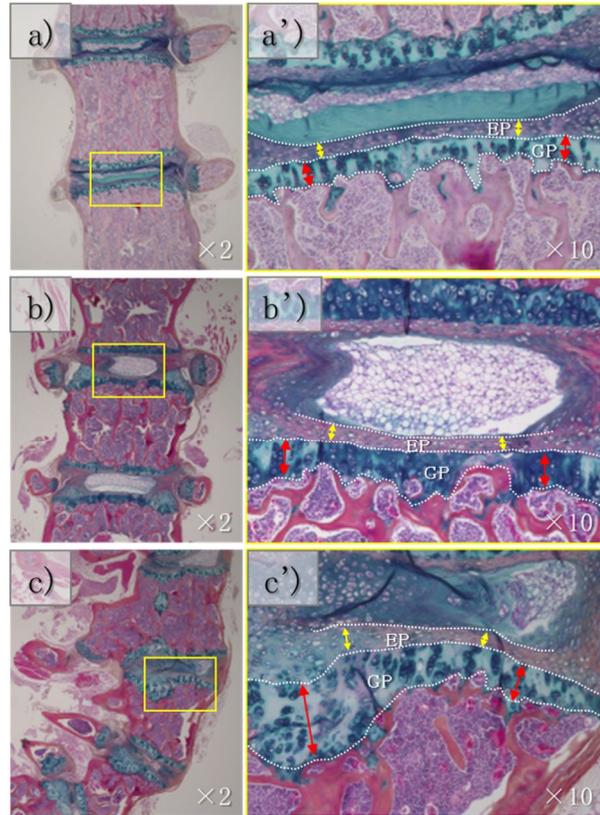


図8-2. 成長板の病理組織像 (ABH/OGs 染色)

a, a': W マウス、b, b': L マウス、c, c': L マウス頂椎



側弯の進行予測因子である可能性がある。過去の報告でも、側弯進行の因子として「初診時の大きな Cobb 角」や「低い Riser 分類での発症」などに加えて、「骨密度低値」があげられており (Hung WY, et al. 2005)、本研究の結果は骨密度低値が進行予測因子であるという報告を支持する結果であった。

骨構造に関しては、過去に高解像度末梢型定量的 CT (HR-pQCT) を用いた研究において、橈骨の骨構造解析ではあるものの、側弯症患者における海綿骨構造の劣化が報告されている (Yu WS, et al. 2014)。本研究においても、 μ CT で L マウス椎体の低骨密度だけでなく、3 次元骨形態の簡素化 (骨質の低下) を認め、特発性側弯症における脊椎骨構造の劣化を支持する結果となった。一方、凹側凸側にわたった検討では骨構造に差は認められず、骨密度低下と同様に、骨構造劣化が側弯症の直接的な原因にはならないことが示唆された。

LAT1 不活化マウスのように遺伝子改変による側弯症マウスは過去に報告があり、その多くは軟骨細胞特異的に遺伝子操作したモデルである。Liu Z らは、Prmt5 を軟骨細胞特異的に不活化して作成された側弯症マウスにおいて成長板の肥厚を認め、軟骨内骨化の異常によって脊柱変形を来したと報告している (Liu Z, et al. 2019)。本研究の L マウスにおいても成長板の肥厚を認め、さらに頂椎においては凹側で顕著に肥厚していたことから、成長板における軟骨内骨化の異常が側弯症の発症原因であることが示唆された。また、骨芽細胞の減少や骨密度低下、骨構造の簡素化もこうした軟骨内骨化の異常を反映したものである可能性がある。

本研究の limitation としては、マウスは 4 足歩行動物でありヒトとは脊椎への力学的負荷が異なること、LAT1 をコードする遺伝子 Slc7s5 はゲノムワイド関連解析 (GWAS) にて疾患感受性領域として抽出されていないことなどが挙げられる。

(結論)

L マウスは特発性側弯症、特に早期発症特発性側弯症と類似した特徴を有していた。L マウスにおいて、骨密度低下、骨質の低下 (骨構造の簡素化) が側弯症の「原因」ではない可能性が高いものの、側弯症の「進行予測因子」となりうる可能性が示唆された。また、成長板における軟骨内骨化の異常は特発性側弯症の一因である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 半田真人, 出村諭, 横川文彬, 他
2. 発表標題 新規側弯症モデルとしてのLAT1不活化マウスの有用性の検討
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 半田真人, 出村諭, 横川文彬, 他
2. 発表標題 新規側弯症モデルとしてのLAT1不活化マウスの有用性の検討
3. 学会等名 日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 半田真人, 出村諭, 横川文彬
2. 発表標題 新規側弯症モデルとしてのLAT1不活化マウスの有用性の検討
3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 半田真人, 出村諭, 横川文彬
2. 発表標題 新規側弯症モデルとしてのLAT1不活化マウスの有用性の検討
3. 学会等名 日本側弯症学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 半田真人、出村諭、横川文彬
2. 発表標題 The usefulness of LAT1-inactivated mice as a novel model of scoliosis
3. 学会等名 American Academy of Orthopaedic Surgeons Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 半田真人、出村諭、横川文彬
2. 発表標題 軟骨特異的LAT1不活化マウスは側弯症を呈する
3. 学会等名 日本脊椎脊髄外科学会
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
---------	---------