

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16679

研究課題名（和文）椎体終板の多孔化抑制と骨量減少抑制に立脚した疼痛制御、その分子標的治療法の開発

研究課題名（英文）Development of molecular-targeted therapies for pain control on inhibiting porosity of the vertebral endplate and bone loss

研究代表者

牧野 紘士（Makino, Hiroto）

富山大学・附属病院・助教

研究者番号：50816022

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、脊椎退行性変化と疼痛の制御を目指すにあたり、椎体終板の多孔化に着目し、その病態と分子標的薬による制御することを目指してきた。CT画像を用いた解析で、腰椎椎間板症患者の骨性終板に多孔化がみられることが分かった。椎間板の細胞外マトリックス代謝の不均衡を改善する効果を持つ選択的c-Fos/AP-1阻害薬の破骨細胞分化への影響を確認した。マウス骨髄由来幹細胞を破骨細胞へ分化誘導したものに、選択的c-Fos/AP-1阻害薬を加えることで破骨細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。骨性終板の多孔化抑制に選択的c-Fos/AP-1阻害は有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに椎間板変性ならびに椎間板に関連する疼痛抑制効果および骨量増加効果を併せ持つ薬剤はなく、本研究でそれを示すことができれば、臨床応用も考慮される。脊椎退行性疾患患者における骨粗鬆症の合併例は稀ではなく、手術に至らない患者において、疼痛の軽減と骨量増加を期待できる治療法として確立することができれば、社会的利益は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have focused on bone defects of the vertebral endplate and its pathogenesis and controlled its molecular mechanism so that inhibiting spinal degenerative changes and pain. CT imaging analysis revealed the defects in the endplate of patients with lumbar disc disease. We confirmed the effect of selective c-Fos/AP-1 inhibitors on osteoclast differentiation, which have the effect of ameliorating the imbalance in extracellular matrix metabolism in the intervertebral disc. It was found that the differentiation of mouse bone marrow-derived stem cells into osteoclasts was inhibited by the addition of selective c-Fos/AP-1 inhibitors. The results suggest that selective c-Fos/AP-1 inhibition may be useful in suppressing the bone defects of the endplate.

研究分野：椎間板代謝

キーワード：椎間板 椎体終板 c-Fos

1. 研究開始当初の背景

脊椎の退行性変化として、椎間板、椎間関節といった組織が変性した状態である変形性脊椎症と骨量が低下し、骨脆弱性が増した状態である骨粗鬆症が代表的である。臨床的には、腰痛症や脊柱管狭窄症、骨粗鬆症性椎体骨折を引き起こし、これらが複合的に関連した病態も稀ではない。これらの疾患は、身体活動低下を引き起こし、患者の生活の質の低下だけでなく、家族や医療福祉への負担となり、社会的な問題となっている。現在、骨粗鬆症ならびに疼痛に対する薬物療法が中心であり、脊椎の退行性変化に対する根本的治療法はない。

我々は、脊椎の退行性変化の一つである椎間板変性に対して、選択的 c-Fos/AP-1 阻害が変性抑制効果を有することを明らかにした。また同時に疼痛関連行動解析と椎間板を支配する後根神経節での遺伝子発現を評価することにより、椎間板変性に関連する疼痛に対しても、この選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬が有効であることを明らかにした。ただ、選択的 c-Fos/AP-1 阻害がいかに疼痛抑制に至るか不明な点は残されていた。

近年、椎間板を構成する要素の一つである椎体終板における多孔化が、変性椎間板でみられることが報告され、その部位で破骨細胞活性が上昇し、innervation が起こることで疼痛を惹起するメカニズムが考えられている。実臨床において、破骨細胞抑制薬の腰痛に対する効果を示した報告も散見される。c-Fos は破骨細胞の成熟に必須な因子であり、c-Fos のノックアウトマウスでは、大理石骨病（破骨細胞が働かないことにより骨髄腔が形成されない）にいたる。これらのことから、選択的 c-Fos/AP-1 阻害は、椎体終板の退行性変化（多孔化）を抑制することで関連する疼痛の抑制に寄与するのではないかと、さらに破骨細胞抑制によって、骨量増加効果すなわち骨粗鬆症治療薬としても有用なのではないかと期待された。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト椎間板変性過程と椎体終板の変化の関連を明らかにし、選択的 c-Fos/AP-1 阻害が破骨細胞活性化を抑制することを示し、腰椎不安定性マウスを用いて椎体終板の変化と椎間板変性における分子生物学的機序ならびに選択的 c-Fos/AP-1 阻害が椎体終板の多孔化ならびに innervation を抑制できるかを検証することを目的とする。また、骨粗鬆症モデルマウスにおいて、選択的 c-Fos/AP-1 阻害が、骨量減少を抑制し、骨粗鬆症治療薬として有効かどうかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト Lumbar disc disease 患者の椎体終板の解析

腰椎椎間板症に対して CT、MRI 検査を施行した患者を対象として、椎体終板の変化と椎間板変性を評価する。具体的には、骨性終板の 3D-CT 画像を作製し、骨性欠損の局在と定量（深さ、大きさ）評価を行う。MRI 画像では、Schneiderman 's grade によって椎間板変性を評価する。椎体終板の骨性欠損の特徴と椎間板変性度の関連を解析し、これにより椎間板変性と関連する椎体終板の変化の特徴を検討する。

in vitro における選択的 c-Fos/AP-1 阻害の破骨細胞抑制効果の検証

マウス由来マクロファージ様細胞株 Raw 264.7 細胞を単層培養し、RANKL を付加することで、破骨細胞へ分化誘導する。本培養系に c-Fos/AP-1 阻害 (T-5224) を添加することで、その破骨細胞分化への効果を検証する。転写因子 c-Fos は、破骨細胞の分化に必須の転写因子であることから、T-5224 はその分化を強力に抑制することが予想される。TRAP 陽性の破骨細胞数を定量化し、破骨細胞分化能を比較する。一部の実験では、破骨細胞をデンチン上で培養し、吸収窩面積を定量化することで、骨吸収能を評価する。また破骨細胞関連遺伝子 (ACP5、NFATc1、Fra-1、CTSK、MMP-9) の発現や細胞内シグナル伝達に関して qPCR 法、ウエスタンブロット法を用いて検証する。

in vivo における椎体終板変化に対する選択的 c-Fos/AP-1 阻害の効果

8 週齢の C57BL6/J マウスに対して、L3-5 棘突起を切除し、Lumbar spine instability マウスを作成する。そのマウスに Vehicle (PVP) あるいは T-5224 (100mg/kg) を週 5 回ゾンデで経口投与し、投与開始 4、8 週間後に炭酸ガスと頸椎脱臼の併用により安楽死させ、X 線撮影、 μ CT 撮影、MRI 撮影、組織標本による解析を行う。X 線、MRI 撮影ならびに組織標本では、椎間板高、椎間板の信号強度 (T2 値)、組織学的スコア (Masuda K, et al. Spine. 2005.) を用いて定量評価し、椎間板変性の評価を行う。また μ CT 撮影、組織標本を用いて、骨微細構造ならびに組織学的スコア (End plate スコア; Boss N, et al. Spine. 2009) を評価し、椎体終板の変化を評価する。TRAP 染色を行い、椎体終板における破骨細胞数を定量化する。また免疫組織化学を用いて、椎体終板における innervation の評価を行う。これにより、選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬の椎間板変性、椎体終板の多孔化、innervation の抑制効果を明らかにする。

骨粗鬆症モデルマウスにおける c-Fos/AP-1 阻害の効果の検証

8 週齢の C57BL6/J マウスの卵巣を摘出することで骨粗鬆症マウスを作成する。そのマウスに Vehicle(PVP)あるいは T-5224 (100mg/kg)を週 5 回ゾンデで経口投与し、投与開始 4 週間後に炭酸ガスと頸椎脱臼の併用により安楽死させ、X 線撮影、 μ CT 撮影、組織標本による解析を行う。カルセインを用いた 2 重標識を行い骨石灰化速度、骨形成率といった骨の動的パラメータを両群で比較する。 μ CT では骨微細構造の評価を行う。これにより、選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬の骨量増加効果を明らかにする。

4 . 研究成果

ヒト Lumbar disc disease 患者の椎体終板の解析

腰椎椎間板症（椎間板ヘルニア、椎間板性腰痛）患者の 3DCT 画像を用いて、椎体終板の骨性欠損（終板の多孔化）評価を輪状骨端と中央部に分けて解析した。結果として、骨性欠損は、下位腰椎で多く見られ、中でも後方区画に多く存在することが明らかとなった。そして椎間板変性度とも有意に相関することを示した。これらのことから、例えば椎間板ヘルニアにおいて、椎体終板の変化が、ヘルニア塊の突出の一因となっている可能性が示唆された。また、骨性欠損の数と MRI における椎間板変性度は正の相関を示した。

in vitro における選択的 c-Fos/AP-1 阻害の破骨細胞抑制効果の検証

ウス由来マクロファージ様細胞株 Raw 264.7 細胞を単層培養し、RANKL を付加することで、破骨細胞へ分化誘導した。そこに選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬を加えることで、破骨細胞分化が抑制されるかを検討した。まずは、TRAP 染色での評価を試みたが、薬剤添加により細胞接着が阻害され、正確な評価が困難であった。マウス骨髄由来幹細胞を破骨細胞へ分化誘導したものでは、選択的 c-Fos/AP-1 阻害薬を加えることで TRAP 染色における破骨細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。

in vivo における椎体終板変化に対する選択的 c-Fos/AP-1 阻害の効果
実施できず

骨粗鬆症モデルマウスにおける c-Fos/AP-1 阻害の効果の検証
実施できず

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Makino Hiroto, Seki Shoji, Kamei Katsuhiko, Yahara Yasuhito, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 23
2. 論文標題 Efficacy of surgeon-directed postoperative local injection with an analgesic mixture in posterior fusion surgery for adolescent idiopathic scoliosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Musculoskeletal Disorders	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） 10.1186/s12891-022-05158-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 牧野 紘士、関 庄二、安田 剛敏、亀井 克彦、川口 善治	4. 巻 64
2. 論文標題 腰仙移行椎に伴ったL5神経根障害に対する手術加療の経験	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 中部日本整形外科災害外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 249 ~ 250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11359/chubu.2021.249	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 -
1. 著者名 Tung Nguyen Tran Canh, He Zhongyuan, Makino Hiroto, Yasuda Taketoshi, Seki Shoji, Suzuki Kayo, Watanabe Kenta, Futakawa Hayato, Kamei Katsuhiko, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 12
2. 論文標題 Association of Inflammation, Ectopic Bone Formation, and Sacroiliac Joint Variation in Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 349 ~ 349
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm12010349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nguyen Tran Canh Tung, Yahara Yasuhito, Yasuda Taketoshi, Seki Shoji, Suzuki Kayo, Watanabe Kenta, Makino Hiroto, Kamei Katsuhiko, Mori Kanji, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 61
2. 論文標題 Morphological characteristics of DISH in patients with OPLL and its association with high-sensitivity CRP: inflammatory DISH	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Rheumatology	6. 最初と最後の頁 3981 ~ 3988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/rheumatology/keac051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Seki Shoji, Iwasaki Mami, Makino Hiroto, Yahara Yasuhito, Kondo Miho, Kamei Katsuhiko, Futakawa Hayato, Nogami Makiko, Watanabe Kenta, Tran Canh Tung Nguyen, Hirokawa Tatsuro, Tsuji Mamiko, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 23
2. 論文標題 Association of Ligamentum Flavum Hypertrophy with Adolescent Idiopathic Scoliosis Progression?Comparative Microarray Gene Expression Analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5038 ~ 5038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23095038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Seki Shoji, Iwasaki Mami, Makino Hiroto, Yahara Yasuhito, Miyazaki Yoshitaka, Kamei Katsuhiko, Futakawa Hayato, Nogami Makiko, Tran Canh Tung Nguyen, Hirokawa Tatsuro, Tsuji Mamiko, Kawaguchi Yoshiharu	4. 巻 23
2. 論文標題 Direct Reprogramming and Induction of Human Dermal Fibroblasts to Differentiate into iPS-Derived Nucleus Pulposus-like Cells in 3D Culture	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4059 ~ 4059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23074059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 牧野 紘士, 関 庄二, 安田 剛敏, 鈴木 賀代, 箭原 康人, 渡邊 健太, 亀井 克彦, 川口 善治
2. 発表標題 腰部脊柱管狭窄症におけるSkip lesionに関連する因子の検討
3. 学会等名 第50回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------