

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16699

研究課題名（和文）脊柱靱帯骨化症による脊髄障害の病態解明研究

研究課題名（英文）Elucidation of the pathology of spinal cord dysfunction caused by spinal ligament ossification

研究代表者

鈴木 裕貴（Suzuki, Yuki）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：90880021

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）：脊柱靱帯骨化による脊髄障害モデルの作成に最適なラット週齢は、8 週齢以降であれば問題なく、24 週齢以降ならば理想的であることを明らかにした。さらに、TWYマウスの靱帯骨化部位とその程度には、個体によってバラツキが大きいことを明らかにし、病態解明のために、灰白質、白質への脊髄圧迫が同程度のマウスを4群、40匹選択することが可能になった。また、ラットの第5頸椎椎弓下にBone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)を含浸させたコラーゲンスポンジを留置して、脊柱管内異所性骨化を作成し、機能評価も可能である脊柱靱帯骨化による脊髄障害モデルを開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラットの脊柱管、脊髄拡大停止時期は生殖機能が成熟する6-7週齢より遅く、ヒトと大きく異なることが初めて明らかになった。また、ラットの脊椎脊髄が、成体になっても拡大し続けていることは、神経前駆細胞が残存していることを示唆し、ラットを使用した脊椎脊髄疾患を検討する際には、ヒトと大きく異なることに注意が必要である点で、脊椎脊髄疾患の基礎研究に重要な知見を提供した。さらに、BMP4を使用して、椎弓間を骨化させ、脊髄を経時的に圧迫する過程を再現するモデルを開発したが、これは、機能解析が可能で、遺伝子改変マウスを使用しない、脊柱靱帯骨化症の初めてのモデルになり、脊柱靱帯骨化症の脊髄の病態解析に貢献する。

研究成果の概要（英文）：The current study revealed that the optimal rat age for creating the experimental model of cervical spondylotic myelopathy was 8 weeks or older and that 24 weeks or older was ideal. Furthermore, the current study clarified that the location and degree of ligament ossification in TWY mice varied greatly depending on the individual, and in order to elucidate the pathology, 4 groups of 40 mice with similar levels of spinal cord compression in the gray and white matter were established. Moreover, by grafting a collagen sponge absorbed with BMP4 at the epidural space at the fifth cervical vertebra of rats, the animal model of myelopathy caused by ossification of spinal ligament was successfully developed. This model can be used for functional analysis.

研究分野：整形外科学

キーワード：圧迫性脊髄症 脊柱靱帯骨化 動物モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦で約3万人弱が、脊柱靱帯骨化による脊髄障害に苦しんでいる。現在、手術による除圧術が唯一の治療方法であるが、手術を実施しても、脊髄機能の改善が乏しい場合がある。また、手術をしても経年的に下肢機能が低下することも判明しており(診療ガイドライン 2011)、薬物療法など、新規治療方法の開発が長く待たれてきた。

本疾患の原因は、脊柱靱帯の骨化であるが、症状を引き起こす原因器官は脊髄であるので、脊髄障害の発症機序解明は、新規治療方法の開発に直接的につながる。特に、靱帯骨化による圧迫があっても無症候者がいることから(診療ガイドライン 2011)、単純な圧迫による阻血性障害だけが主たる病理でないことは明らかであるが、その詳細はいまだ不明なままである。

また、重要な点は、脊髄への圧迫性病変という点で、本疾患は外傷による脊髄損傷と重複する点がある一方、外傷性脊髄損傷は経時的に回復するのに対して、靱帯骨化による脊髄障害は、経時的に悪化していく。この点で、本疾患の病態解明研究に、脊髄損傷の知見が当てはまるとは限らないことに注意が必要である。さらに、本疾患に関する研究で、本質的な問題は、適切な動物モデルがないことである。一番汎用されているモデルは Tiptoe Walking Yoshimura (twy) マウスであるが、1) 骨化の程度と場所のバラツキが非常に大きい、2) 脊柱の靱帯だけでなく、四肢関節の靱帯も骨化するため運動機能の評価が正確にできない、3) 遺伝子欠損による影響がある、などの問題がある。また、近年、膨張性ポリマーの椎弓下設置も使用されているが、1) 弾力性があり、骨化を必ずしも模擬していない、2) 1日で最大膨張するため、慢性障害ではなく、急性障害に違い点は、改善すべき点である。

2. 研究の目的

本研究開発の目的は、脊柱靱帯骨化による脊髄障害モデルを開発することである。具体的には、以下の3つの目的を実施する。

- (1) 脊柱靱帯骨化による脊髄障害モデルの作成に、最適なラット週齢を明らかにする
CT 脊髄造影を各週齢の Lewis ラットに実施し、脊柱管、脊髄、space available cord (SAC)の成長曲線を明らかにする。
- (2) 脊柱靱帯骨化による慢性脊髄障害の細胞学的かつ分子学的病態を解明する
靱帯骨化自然発症モデルである Tiptoe walking. Yoshimura (TWY) マウスを使用して、プログラム細胞死の種類と細胞腫を明らかにする。
- (3) 脊柱靱帯骨化による慢性脊髄障害モデルの開発
Bone Morphogenic Protein (BMP)を使用して、椎弓間を骨化させ、脊髄が経時的に圧迫される過程を再現する。

3. 研究の方法

- (1) 脊柱靱帯骨化による脊髄障害モデルの作成に、最適なラット週齢を明らかにする

4-40 週齢の Lewis ラットの雌雄各 10 匹ずつに対して、体重、体長を計測後、脊髄造影 CT を撮影し、椎体に対して垂直、かつ椎体から椎弓まで全てが描出されている冠状断像を使用し、第5頸椎(C5)と第8胸椎(T8)の脊柱管縦径、脊柱管横径、脊髄縦径、脊髄横径を計測した(図1)。また、骨端線と骨膜を評価するために、4、8、24 週齢の雌ラットの C5 頸椎脱灰組織に Hematoxylin Eosin 染色と Safranin O 染色を行った。さらに、脊髄に内在する神経前駆細胞の未分化維持能の評価のため、4、8、24 週齢の雌ラットの頸髄組織中の BDNF、FGF2、VEGFA、IGF1 を Western blotting にて半定量した。

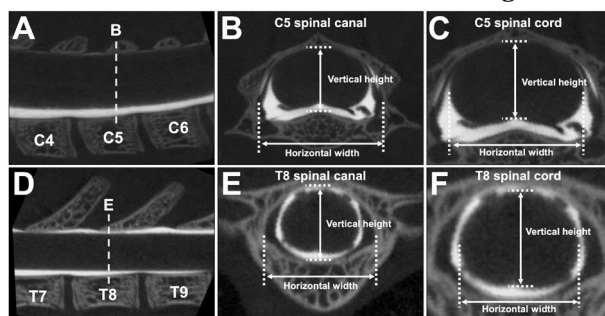


図1：ラットの脊柱管径、脊髄径の計測方法

A：頸椎の脊髄造影 CT の矢状断画像。点線は B、C の冠状断のレベルを指す。
B、C：C5 頸椎冠状断像。D：T8 胸椎高位の脊髄造影 CT の矢状断像。点線は E、F の冠状断のレベルを指す。
E、F：T8 胸椎高位の冠状断像。

- (2) 脊柱靱帯骨化による慢性脊髄障害の細胞学的かつ分子学的病態を解明する

靱帯骨化自然発症モデルである TWY マウス 120 匹に、低酸素プローブ (Hypoxyprobe) と Brdu を投与し、生後 5 週で灌流固定後、脊髄造影 CT を撮像した。そして、増殖細胞、低酸素状態細胞、Ferroptosis, Pyroptosis, Apoptosis, Necroptosis が起きている細胞を同定する。

- (3) 脊柱靱帯骨化による慢性脊髄障害モデルの開発

Bone Morphogenic Protein 4 (BMP4) を吸収させたコラーゲンスポンジを第五頸椎椎弓下に留置し、硬膜外に脊髄が経時的に骨組織で圧迫される過程を再現する。詳細な歩行解析と筋萎縮評価によって、脊髄障害の程度を定量する。

4. 研究成果

(1) 脊柱靱帯骨化による脊髄障害モデルの作成に、最適なラット週齢

C5 の脊柱管の横径は雄、雌でそれぞれ 20 週齢、12 週齢まで増加していた (図 2)。性機能が成熟する 6 週齢と比較すると、それぞれ、1.10 倍、1.04 倍まで拡大していた。C5 頸髄の横径は雄、雌共に 20 週齢まで増加していた。6 週齢と比較するとそれぞれ、1.16 倍、1.17 倍まで拡大していた。C5 space available for cord (SAC) の横径は雄、雌共に徐々に減少し、それぞれ 6 週齢、12 週齢で平衡に達した。C5 脊柱管の縦径は雄、雌でそれぞれ 20 週齢、12 週齢まで増加していた。6 週齢と比較すると、それぞれ、1.39 倍、1.20 倍まで拡大していた。C5 頸髄の縦径は雄、雌共に 24 週齢まで増加していた。6 週齢と比較するとそれぞれ、1.37 倍、1.33 倍まで拡大していた。圧迫性脊髄症モデルにおいて最も重要な、C5 SAC の縦径は雄、雌共に徐々に増加し、それぞれ 8 週齢、6 週齢で平衡に達した。8 週齢以降であれば、SAC が平衡状態となること、また、脊髄、脊柱管の成長が 24 週齢で停止することが判明した。これらのことは、Lewis ラットに脊柱管内占拠性物質を留置あるいは作成して、脊髄障害モデルを作成する場合、8 週齢以降であれば問題なく、24 週齢以降ならば理想的であることが判明した。

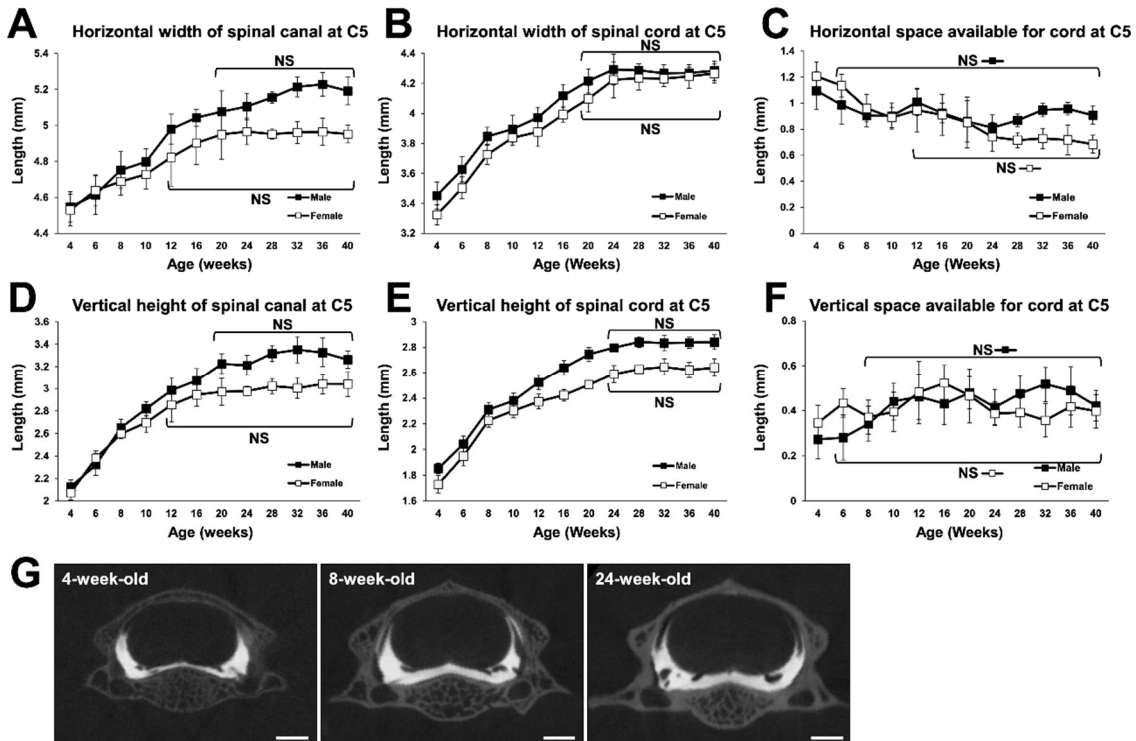


図 4 : ラットの頸椎 C5 の脊柱管径と脊髄径の成長曲線

A : C5 の脊柱管横径の雄、雌の成長曲線。それぞれ、20 週齢、12 週齢まで増大し続ける。
B : C5 の脊髄横径の雄、雌の成長曲線。共に、20 週齢まで増大し続ける。C : C5 横径 SAC の雄、雌の変化。徐々に減少し、それぞれ 6 週齢、12 週齢で平衡に達した。D : C5 の脊柱管縦径の雄、雌の成長曲線。それぞれ、20 週齢、12 週齢まで増大し続ける。E : C5 の脊髄縦径の雄、雌の成長曲線。共に 24 週齢まで増大し続ける。F : C5 の縦径 SAC の雄、雌の変化。徐々に増大し、それぞれ 8 週齢、6 週齢で平衡に達した。G : 4 週齢、8 週齢、24 週齢の、雌の C5 の脊髄造影 CT の冠状断画像。脊柱管、脊髄共に拡大している。All scale bars, 1mm. NS: No statistical difference was detected between these time points; Kruskal-Wallis analysis of variance and Steel-Dwass test.

(2) 脊柱靱帯骨化による慢性脊髄障害の細胞学的かつ分子学的病態を解明する

5 週齢の TWY マウスを灌流固定し、全例に脊髄造影を実施した。その結果、灰白質、白質への脊髄圧迫が同程度のマウスを 4 群 (図 3)、4 匹選択することが可能になった。

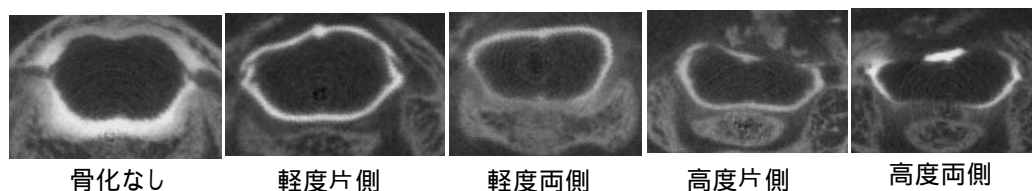


図 3 : TWY マウスの脊髄造影像

同じ 5 週齢でも、骨化の程度と脊髄変形の程度が大きく異なることがわかる

(3) 脊柱靱帯骨化による慢性脊髄障害モデルの開発

ラットの第5頸椎椎弓下に BMP4 を含浸させたコラーゲンスポンジを留置して、脊柱管内異所性骨化作成を試みたところ、一定の BMP 濃度を越えると異所性骨化が形成されるが、その後、骨組織が吸収されることが判明した。そこで、骨吸収抑制薬剤を併用したところ、異所性骨化は維持され、最終的に異所性骨化による脊髄圧迫と脊髄障害を発症させることが可能になった。

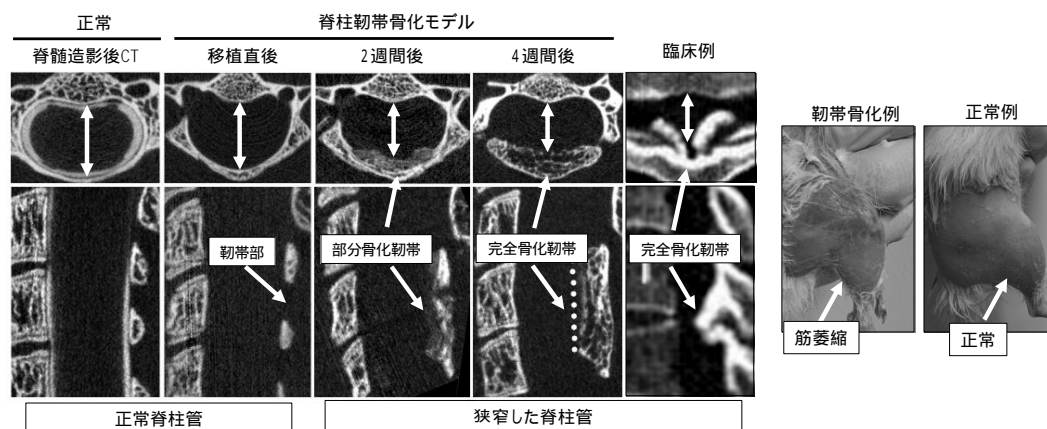


図4：ラット頸椎靱帯骨化モデル

ラット頸椎の黄色靱帯を切除し、BMP 4 を浸透させたコラーゲンシートを移植すると、2 周目には明瞭な脊柱管内の骨化を認め始め、4 周目には骨化が完成している様子がわかる。4 週では下肢の筋萎縮も明瞭である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sotome Akihito, Kadoya Ken, Suzuki Yuki, Iwasaki Norimasa	4. 巻 23
2. 論文標題 Spinal Canal and Spinal Cord in Rat Continue to Grow Even after Sexual Maturation: Anatomical Study and Molecular Proposition	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16076 ~ 16076
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms232416076	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 Suzuki Yuki, Nakagawa Shinsuke, Endo Takeshi, Sotome Akihito, Yuan Rufe, Asano Tsuyoshi, Otsuguro Satoko, Maenaka Katsumi, Iwasaki Norimasa, Kadoya Ken	4. 巻 19
2. 論文標題 High-Throughput Screening Assay Identifies Berberine and Mubritinib as Neuroprotection Drugs for Spinal Cord Injury via Blood-Spinal Cord Barrier Protection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1976 ~ 1991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13311-022-01310-y	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 Endo T, Kadoya K, Suzuki T, Suzuki Y, Terkawi MA, Kawamura D, Iwasaki N	4. 巻 7
2. 論文標題 Mature but not developing Schwann cells promote axon regeneration after peripheral nerve injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ Regenerative Medicine	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） 10.1038/s41536-022-00205-y	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11件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Sotome Y, Rufe Y, Asano T, Maenaka K, Nakagawa S, Iwasaki N	
2. 発表標題 Novel high-throughput drug screening assay identified new neuroprotection drugs for spinal cord injury	
3. 学会等名 ORS 2022 annual meeting（国際学会）	
4. 発表年 2022年	

1．発表者名 鈴木裕貴、角家健、五月女慧人、遠藤健、浅野毅、中川慎介、前仲勝実、岩崎倫政
2．発表標題 平滑筋弛緩薬バパペリンの新規効能：血液脊髄関門保護を介した脊髄損傷治療に対する神経保護効果
3．学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4．発表年 2022年

1．発表者名 五月女慧人、角家健、鈴木裕貴、遠藤健、中川慎介、前仲勝実、岩崎倫政
2．発表標題 次硝酸ビスマスの急性期脊髄損傷に対する神経保護効果とその機序の解明
3．学会等名 第141回北海道整形災害外科学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 鈴木裕貴、角家健、五月女慧人、遠藤健、船木智、周東智、前仲勝実、岩崎倫政
2．発表標題 VCP化合物による脊髄損傷後血液脊髄関門機能保護作用
3．学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術総会
4．発表年 2022年

1．発表者名 五月女慧人、角家健、鈴木裕貴、遠藤健、中川慎介、前仲勝実、岩崎倫政
2．発表標題 次硝酸ビスマスの急性期脊髄損傷に対する神経保護効果とその機序の解明
3．学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術総会
4．発表年 2022年

1．発表者名 五月女慧人、角家健、鈴木裕貴、遠藤健、中川慎介、前仲勝美、岩崎倫政
2．発表標題 整腸剤次硝酸ピスマスは二次損傷を抑制して脊髄損傷の機能回復を促進する
3．学会等名 第57回日本脊髄障害医学会
4．発表年 2022年

1．発表者名 Suzuki Y, Kadoya K, Sotome Y, Endo T, Asano T, Maenaka K, Nakagawa S, Iwasaki N
2．発表標題 Papaverine as a Neuroprotection Drug for Spinal Cord Injury Targeting on Blood-Spinal Cord Barrier protection.
3．学会等名 The 38th Annual Symposium of the National Neurotrauma Society
4．発表年 2021年

1．発表者名 Sotome A, Kadoya K, Suzuki Y, Endo T, Asano T, Maenaka K, Nakagawa S, Iwasaki N
2．発表標題 Clinical antispasmodic drug, Papaverine, is neuroprotective after spinal cord injury by minimizing secondary injury via protection of blood spinal cord barrier function
3．学会等名 The 60th ISCOS Annual Scientific Meeting
4．発表年 2021年

1．発表者名 五月女慧人、角家健、鈴木裕貴、遠藤健、浅野毅、中川慎介、前仲勝美、岩崎倫政
2．発表標題 抗精神薬 Brexpiprazole の急性期脊髄損傷に対する神経保護効果の検討
3．学会等名 第140回北海道整形災害外科学会
4．発表年 2021年

1. 発表者名 五月女慧人、角家健、鈴木裕貴、遠藤健、浅野毅、中川慎介、前仲勝美、岩崎倫政
2. 発表標題 Brexiprazoleの血液脊髄関門機能維持を介した脊髄損傷後神経保護効果
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五月女慧人、角家健、鈴木裕貴、中川慎介、前仲勝美、岩崎倫政
2. 発表標題 抗精神薬Brexiprazoleの急性期脊髄損傷に対する神経保護効果の検討
3. 学会等名 第56回日本脊髄障害医学会
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
---------	---------