

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号： 14101
研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2010 ~ 2012
課題番号： 22591631
研究課題名 (和文) VEGF (血管内皮増殖因子) 中和抗体を用いた後縦靭帯骨化症治療の開発
研究課題名 (英文) anti-VEGF neutralizing antibody inhibits the progress of ossification of the ligament in the ossification of the spinal ligament
研究代表者
浅沼 由美子 (ASANUMA YUMIKO)
三重大学・大学院医学系研究科・リサーチアソシエイト
研究者番号： 10361966

研究成果の概要 (和文) :

Tiptoe Walking (ttw)マウスは、全身性に靭帯組織の骨化形成がおこるマウスであり、脊椎においても後縦靭帯骨化および黄色靭帯骨化を生じることが知られている。このマウスに血管内皮増殖因子 (VEGF) の中和抗体を腹腔内投与し、骨化部分の面積を経時的に計測したところ、VEGF 中和抗体投与群 (V 群) はコントロール群 (PBS 投与 ; P 群) に比べ、骨化の増大が抑制されることが分かった。また P 群で多数のオステオカルシン陽性細胞と type X collagen の発現を認めたのに対し、V 群ではサフランニン陽性で、type X collagen の発現はほとんどみられなかったことから、V 群では VEGF 作用を抑制することにより、軟骨細胞の肥大化や骨芽細胞の誘導が阻害されて軟骨成分が多く残存していた可能性が考えられた。これは、脊椎靭帯骨化過程における内軟骨性骨化が抑制されている可能性が考えられた。また、V 群に比べ P 群で骨化巣部分の血管新生が多く確認され、VEGF 中和抗体投与による血管新生の抑制も、軟骨細胞から骨組織、骨髄組織への置換の抑制に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) :

Tiptoe Walking (ttw) mouse is a model for ectopic ossification of various soft tissues in the extremities and spine. Ectopic ossification of spinal ligaments results in ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) and of the yellow ligament (OYL) of the spine. In this study, anti-VEGF neutralizing antibody was administered intraperitoneally in ttw mouse and the ossified area of the spinal ligament was measured. The increase of the ossification of the spinal ligament was inhibited in the ttw mouse, which anti-VEGF neutralizing antibody was administered (group V), compared with the control ttw mouse, which PBS was administered (group P). Osteocalcin immunopositive cells and expression of type X collagen were observed in the ossification front of group P, whereas safranin-O staining cells was seen and expression of type X collagen were little in that of group V, which indicates that hypertrophy of the chondrocytes and/or induction of the osteoblasts are inhibited and chondrocytes are persisted. It suggests that suppression of VEGF may inhibit the course of endochondral ossification in the spinal ligament. Vascular invasion was suppressed in the ossified area of the spinal ligament in group V compared with that in group P, which suggested that inhibition of vascular invasion by administration of anti-VEGF neutralizing antibody may also suppress the endochondral ossification in the spinal ligament.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：脊椎外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学

1. 研究開始当初の背景

後縦靭帯骨化症 (OPLL) は、脊柱の全長を縦走する椎体後縁の後縦靭帯が骨化することにより脊椎管狭窄をきたし、脊髄圧迫障害を来す疾患である。好発年齢は40歳以上で、比較的若い働き盛りの年齢層にも発症するため、脊髄障害により労働に支障を来す人も多い。従来アジア地区特に東アジアに多く認められており、わが国での罹患率は非常に高く1.9~3.2%と報告されている(Nakamura, 2006, OPLL 2nd edition)。OPLLの原因は全身的骨化素因、局所の力学的要因、炎症性サイトカイン、ホルモン異常、カルシウム代謝異常、糖尿病、遺伝、慢性外傷、椎間板脱出、全身的退行変性などがあげられているが、明らかな原因はいまだ不明である。したがってOPLLに対する治療は現時点では根本的治療がなく対症療法の域を出ない。脊髄障害が重篤な場合は外科的治療が行われ、その術式としては脊椎前方または後方から進入する方法があるが、いずれの方法にも問題がある。まず前方手術は骨化巣を切除する方法であるが、難易度が非常に高く脊髄障害の合併に細心の注意を要する。一方、後方手術は骨化巣に対する操作なしに脊髄を除圧する方法で比較的安全的な術式であるが、骨化巣がそのまま残存するため、長期的には骨化巣の伸長、肥大化により再度脊髄障害を来す可能性が残される。また胸椎レベルの後縦靭帯骨化は前後いずれの術式を選択しても脊髄障害の合併が18%に見られることが報告されており(Seichi, 2006, OPLL 2nd edition)、非常に脊髄合併症の高い手術になる。また後縦靭帯骨化は脊椎全長に生じるため、一人の患者が何箇所もの手術を幾度となく受けることも多い。手術の回数を重ねる度に手術の難易度は増し、脊髄障害を合併する危険性も高くなるため外科的治療すら断念せざるを得ないこともあり、四肢の麻痺やしびれ、疼痛といった脊髄症状の進行をみているしかない場

合もある。OPLLは特定疾患治療研究事業対象疾患に認定されており、未だ効果的な治療方法も、またその原因すら明らかにされていないのが現状である。

OPLLや黄色靭帯骨化症(Ossification of the ligamentum flavum; OLF)に見られる脊椎靭帯の骨化は内軟骨性骨化が主体とされ、靭帯内の間葉系細胞が軟骨細胞に分化し、この軟骨細胞が新生血管の侵入を促進し、新生血管から誘導された骨芽細胞を介して骨基質の沈着が起こる(Yoshikawa, 2006, OPLL 2nd edition)。靭帯内に分化誘導された軟骨細胞からはVEGFやBone morphogenetic protein (BMP)-2、Transforming growth factor (TGF) β といった成長因子の発現が確認されている(Yayama et al., J Neurosurg Spine 2007)。VEGFは血管新生促進因子としてよく知られた成長因子であるが、未分化間葉系細胞の肥大軟骨細胞や骨芽細胞、破骨細胞への分化にも関与し、内軟骨性骨化過程においては重要な役割を担うことがわかっている(Maes et al., J Clin Invest. 2004, Dai and Rabie, J Dent Res. 2007)。応募者はこれまで、ヒト椎間板細胞がVEGFを発現することを証明し、そのVEGF発現が椎間板変性を惹起するとされる炎症性サイトカイン(interleukin-1 β ; IL)により増加することから、VEGFが無血管組織である椎間板へ新生血管を誘導し、椎間板の変性過程に関与する可能性を示した。この研究でVEGF発現は椎間板の外層部分に位置する線維輪(AF)の方が内層に位置する髄核(NP)よりも多く発現していることも示した。後縦靭帯は深層と浅層の2層よりなり、靭帯骨化は通常、椎体後角(椎間板に隣接)の後縦靭帯深層から発生するとされる(Nobuyuki, OPLL 2nd edition)。この靭帯骨化の起始部がAFと接していること、またAFではVEGF発現がNPに比べ多いことから、AFで発現しているVEGFが、後縦靭帯骨化の発生に重大な影響を及ぼしているという着想に至った。したがってAFや靭帯内の軟骨細胞で産

生される VEGF 発現を抑制することにより後縦靭帯骨化の伸長および肥大化を様々な段階で抑制できると仮説した。さらに注目すべき点は、VEGF の中和抗体は腫瘍の増殖抑制や、血管新生および血管透過性の抑制により転移を制御する有効な薬剤としてすでに臨床応用されている (Gerber and Ferrara, Cancer Res. 2005)。したがって、副作用や安全性、至適用量についての基礎データがあり、OPLL に対する効果が証明されれば、臨床応用に非常に有利な薬剤と考えられることである。

2. 研究の目的

本研究の目的は血管内皮細胞増殖因子 VEGF が、OPLL における靭帯骨化を促進する一因であることを証明し、さらに VEGF 中和抗体により骨化抑制効果を検証することにある。具体的には、VEGF の後縦靭帯骨化の促進作用と、その中和抗体による骨化抑制作用を明らかにするために、ttw マウスに VEGF、VEGF 中和抗体、PBS を投与し、後縦靭帯の骨化をマイクロ CT で経時的に観察し、観察終了時に組織学的評価を行って骨形成に関与する変化(血管新生、弾性線維の配列、軟骨様細胞の出現、骨形成マーカーの発現)について組織学的評価を行う。またヒト黄色靭帯細胞に VEGF を添加した場合の骨形成マーカーの発現量の違いについて OLF、OPLL、その他の疾患で比較し、疾患別による靭帯細胞の特性を明らかにする。

3. 研究の方法

- マイクロ CT を用いた靭帯骨化抑制効果の検討: ttw マウス(3 週齢)を 3 群に分け(各群 10 匹)、それぞれ VEGF タンパク(50ng /100 μ l)、VEGF 中和抗体(100 μ g /100 μ l)、PBS(100 μ l)を隔日、3 週間に渡り腹腔内投与する。後縦靭帯の骨形成変化はマイクロ CT にて 1 週ごとに 8 週目まで観察する。以上の実験に用いる各群 10 匹は、予備実験の結果の Power Analysis(80%)を用いて算出した。また、VEGF 中和抗体の投与頻度および濃度は腫瘍の増殖および転移を有意に抑制したとするこれまでの報告を参考にしして計画した(Gerber and Ferrara, Cancer Res. 2005)。
- 組織学的評価: 観察終了時(薬剤投与開始後 8 週目)に安楽死させ、脊椎(頭頸移行部を含め頸椎全長)を採取し脱灰標本を作製する。HE 染色の他に、血管新生の評価(VCAM-1 と CD31 免疫染色により、新生血管の定量的評価を行う)、弾性線維破綻の評価(Elastica Van

Gieson 染色、1 型コラーゲン免疫染色)、軟骨様細胞の評価(サフラニン-O 染色と 2 型コラーゲン免疫染色)、骨形成マーカーの確認(ALP、Runx2、osteocalcin 免疫染色)を行い、3 群間(VEGF、VEGF 中和抗体、PBS 投与群)の比較検討を行う。

4. 研究成果

ttw マウス(5 週齢)を用い、VEGF 中和抗体(1 μ g/ μ l, 100 μ l)(V 群)または PBS(100 μ l)(P 群)を一週に一度、3 週間、腹腔内投与し、後縦靭帯骨化および黄色靭帯骨化過程をマイクロ CT を用いて評価した。後頭骨から頸椎全長にわたって、スライスされた CT 横断面を用い、各スライスにおける骨化部分の面積を Lumina Vision (Mitani Co. Japan) により計測し、すべてのスライスにおける骨化面積の総和を算出。薬剤投与開始時の骨化面積(コントロール)に対する、投与開始後 5 週目と 12 週目の骨化面積の比を算出し、2 群を比較した。その結果、薬剤投与後、5 週目および 12 週目の骨化面積の総和はコントロールに比べ、P 群(5 週目; 6.4 \pm 1.7 倍、12 週目; 25.4 \pm 8.3)、V 群(5 週目; 3.7 \pm 0.3 倍、12 週目; 8.6 \pm 2.5 倍)の増加であり、P 群に比べ V 群で骨化の増大が抑制される傾向を認めた。薬剤投与 12 週目で、頸椎を採取し、組織学的評価を行ったところ、P 群で多数のオステオカルシン陽性細胞を骨化前線に認めた。また骨化先端部では P 群で type X collagen の発現を認めたのに対し、V 群ではサフラニン陽性で、type X collagen の発現はほとんどみられなかった。また、Factor VIII 免疫染色による血管新生の評価では、V 群に比べ、P 群で骨化巣部分の血管新生が多く確認された。以上の結果より、VEGF 中和抗体投与群では靭帯骨化部分において軟骨成分が多く残存しており、VEGF 作用を抑制することにより、軟骨細胞の肥大化や骨芽細胞の誘導が阻害されている可能性が考えられた。

ttw マウスは、全身性に靭帯組織の骨化形成がおこるマウスであるため、骨髄自身に骨形成に関して対照マウス(ICR マウス)と違いがあるかについて確認した。この目的のために、脛骨および大腿骨から骨髄を採取培養し、実験に用いた。その結果、ICR マウスと比較して、ttw マウスでは、増殖スピードが著しく早いことが分かった。したがって、一旦、骨芽細胞が形成されると、その早い増殖スピードで骨化が誘導されていく可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計1件)

脊柱靭帯骨化症における VEGF 中和抗体の骨化抑制効果；淺沼 由美子、淺沼 邦洋、明田 浩司、笠井 裕一、須藤 啓広、三重大学整形外科、2010年10月14-15日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

淺沼 由美子 (ASANUMA YUMIKO)

三重大学・大学院医学系研究科・リサーチ
アソシエイト

研究者番号： 10361966

(2) 研究分担者

笠井 裕一 (KASAI YUICHI)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 20242943

淺沼 邦洋 (ASANUMA KUNIHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 20378285

(3) 連携研究者

明田 浩司 (AKEDA KOJI)

三重大学・医学部付属病院・講師

研究者番号： 20422826

須藤 啓広 (SUDO AKIHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 60196904