

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10389

研究課題名(和文) ヒスタミンH2受容体拮抗薬の後縦靭帯骨化症に対する抑制機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the inhibitory mechanism of histamine H2 receptor antagonist against posterior longitudinal ligament ossification

研究代表者

山本 健一 (Yamamoto, Kenichi)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任研究員

研究者番号：90583162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：後縦靭帯骨化症OPLLに対するH2受容体拮抗薬の予防効果・治療効果を検討し、その作用点の解明とヒスタミンの石灰化に対する関与についての解明を行った。OPLLのモデルマウスであるtip toe mouse(TTWmouse)を用いた。Famotidine投与群で異所性骨化を抑制する傾向を認めた。また、ヒスタミンH2受容体ノックアウトマウスとTTWマウスを交配により生まれる複合変異マウスにおけるOPLLの病態についての解析を行ったところ μ CTでOPLLの縮小傾向を認めたが組織切片については明らかな変化はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the prophylactic and therapeutic effects of H2 receptor antagonists on posterior longitudinal ligament ossification ophthalmopathy, clarified the point of action, and investigated the involvement of histamine in mineralization. We used tip toe mouse (TTWmouse) which is a model mouse of OPLL. Famotidine administration group showed a tendency to suppress ectopic ossification. Analysis of the pathology of OPLL in complex mutant mice born by mating of histamine H2 receptor knockout mice with TTW mice revealed a shrinkage tendency of OPLL at μ CT but no obvious change in tissue sections was seen.

研究分野：再生医学

キーワード：後縦靭帯骨化症 ヒスタミンH2受容体拮抗薬

1. 研究開始当初の背景

後縦靭帯骨化症は、脊椎椎体の後縁を連結し脊柱のほぼ全長を縦走している後縦靭帯が骨化することにより脊柱管狭窄をきたし、脊髄または神経根の圧迫・障害により神経症状をおこす疾患である。1975年厚生省の特定疾患に指定され、調査研究班が設置された。日本人の約3%に発生する(整形外科MOOK(50):12-25,1987/Spine 21:2474-2478,1966)。頸椎に最も多くみられるが、胸椎や腰椎にも生じる。治療法としては、椎弓形成術(Spine 6:354-364,1981)や骨化浮上術などの新しい頸椎手術術式が開発され、その病態生理に関しては圧迫生髄障害の脊髄病理、骨形成、骨代謝など脊椎外科にとどまらない、多岐にわたる基礎研究がおこなわれるようになった。本症の発症メカニズムについては、未だ明らかにされていないが家族歴を有する症例があることから遺伝的発生要因が疑われている。しかしながら、原因遺伝子は特定されていない。

シメチジン・ラニチジン・ファモチジンなどに代表される、ヒスタミンH₂受容体拮抗薬(H₂ブロッカー)は、臨床的には主に消化性潰瘍治療剤として使用されているが、1979年のSherwoodの報告(N Engl J Med 1979 Jan 25;300(4):200-1)以来、副甲状腺機能亢進症や透析患者の異所性石灰沈着症に対しても使用されている。ヒスタミンH₂受容体拮抗薬が石灰化に及ぼす作用については、1979年にSherwoodらが初めて、原発性上皮小体機能亢進症にシメチジンを投与し、上皮小体ホルモン(PTH)と血中Ca濃度を正常化させたことを報告した(N Engl J Med 30:200-201,1979)。その後、腎透析患者における二次性上皮小体機能亢進症において、シメチジンが血中PTH濃度を低下させる可能性も報告されている(N Engl J Med 302:671-674,1980)。

近年、特に肩関節に主にみられる石灰沈着性腱炎にもH₂ブロッカー投与が有効であるという報告が散見されている。それは、従来から石灰沈着性腱炎に対して行われているNSAIDsの経口投与や水溶性ステロイド剤関節腔内注射、外科的石灰摘出術に加えて、H₂ブロッカーの経口投与の併用により、沈着した石灰化物の吸収を促進するというものである(MB Orthop. 21(10):55-65,2008)。わが国でも临床上、石灰沈着性腱炎に対するH₂ブロッカー投与の有効性に関していくつか報告されており、疼痛改善と単純X線像での石灰沈着の縮小が認められている(整形外科50:1439-1441,1999)。その作用機序として

は、上皮小体のヒスタミンH₂受容体への直接作用などが指摘されている(整形外科46:1549-1554,1995)。しかしながら、これらに対する基礎的研究は現在のところほとんど行われておらず、細胞レベル・分子レベルでの詳細な作用機序の解明が待たれるところである。

申請者らは2008年よりH₂ブロッカーの異所性石灰化に対する効果を解析し、ファモチジンが異所性骨化(または石灰化)モデルマウスであるttwマウスのアキレス腱の石灰化を抑制し、さらに腱細胞における骨分化マーカー遺伝子の発現に対するファモチジンの抑制作用がその分子機序であることを突き止めた(Yamamoto K et al. J Orthop Res 30(12):1958-62,2012)。この知見に基づき、腱板以外の異所性骨化、特にOPLLを含む靭帯骨化症についてもH₂ブロッカーの予防または治療効果について研究する価値があると考え本研究を計画するに至った。また、さらに異所性石灰化の機序についても不明な点が多いことなどに注目し、ヒスタミンの石灰化への関与と骨軟骨代謝の解明も視野に入れた研究を計画した。

2. 研究の目的

後縦靭帯骨化症は、脊椎椎体の後縁を連結し脊柱のほぼ全長を縦走している後縦靭帯が骨化することにより、脊柱管狭窄をきたし脊髄または神経根の圧迫・障害により神経症状をおこす疾患である。本症の発症メカニズムについては未だ明らかにされておらず、治療法としては侵襲的な外科的治療が主である。本研究は、申請者が最近見出したヒスタミンH₂受容体拮抗薬(H₂ブロッカー)の石灰化抑制作用をさらに発展させ、H₂ブロッカーが後縦靭帯骨化症(OPLL)の予防・治療に対し有効であるかを検討するものである。H₂ブロッカーのもつ石灰化抑制効果を分子生物学的に検証し、異所性石灰化・靭帯骨化抑制の作用点をも含めて解明する。また、生体における他の石灰沈着症・靭帯骨化症のメカニズムの解明も視野に入れている。

3. 研究の方法

ヒスタミンH₂受容体拮抗薬の予防効果と治療効果を検討し、さらにその作用機序を細胞レベル・分子レベルで明らかにするため、以下の検討を行う。第一に、各種細胞におけるヒスタミンH₂受容体の発現解析と石灰化に対するH₂ブロッカーの影響を調べ、かつヒスタミン自体の石灰化への効果を検討する。第二に、後縦靭帯骨化をきたすTTW/Jic-ICR(ttw/ttw)mouseへのH₂ブロッカー投与の効果を放射線学的に解析し、効果が認められた場合はその過程を組織学的に詳細に検討する。第三に、ヒスタミンの後縦靭帯骨化における役割を遺伝学的に証明するため、ヒスタミンH₂受容体ノックアウトマウスとTTWマウスを交配により生まれる複合変異マウスにおける後縦靭帯骨化の程度について解析

する。最後に、上記の検討から得られた知見に基づき、OPLLに対するH₂ブロッカーによる石灰化抑制効果の作用点とヒスタミンの石灰化への関与を検証する。

4. 研究成果

各種細胞(骨芽系細胞 MC3T3-E1、腱細胞 TTD6、軟骨系細胞 ATDC5 など)におけるヒスタミン H₂ 受容体の発現解析と石灰化誘導培養系における、H₂ブロッカーの石灰化抑制効果の解析を行った。背景と目的:「靭帯骨化に対する H₂ブロッカーの効果」と「ヒスタミンの石灰化における役割」を明らかにするため、培養細胞において H₂ 受容体の発現解析を行い、石灰化に対する H₂ ブロッカーとヒスタミンの影響を検討。対象と方法:骨芽細胞系細胞株 MC3T3-E1 を 24-well に 5000 cells/well で播種し、培養液は石灰化誘導培地と、石灰化誘導培地に bone morphogenic protein 2(BMP2)を 2 ng/ml 混合したものを用意。ヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬として Famotidine, Cimetidine, Ranitidine, Lafutidine, Roxatidine, Nizatidine 0, 20 n, 200 n, 2 μ, 20 μ, 200 μ (g/mL) 存在下で 3 週間培養し Von Kossa 染色と ALP 染色を行った。また、RT-PCR で H₂ 受容体及び骨分化・軟骨肥大化マーカーである Osteocalcin (OC)、Collagen type 1, 10 (Col1, 10) の発現を調べる(Biochem Biophys Res Commun. 2007 Jun 15;357(4):854-60)。

1. 腱由来細胞株 TTD6についても同様に石灰化誘導培地、石灰化誘導培地+BMP2 (2 ng/mL) に Famotidine, Cimetidine, Ranitidine, Lafutidine, Roxatidine, Nizatidine 0, 20 n, 200 n, 2 μ, 20 μ (g/mL) を添加し、Von Kossa 染色・ALP 染色・遺伝子発現解析を行った(Exp Cell Res 287 (2003) 289-300)。
2. マウス初代腱細胞を、Shimada らの方法に従って採取し(Histochem Cell Biol 2014 Aug;142(2):205-15.)、上記と同様の解析を行った。

マウス奇形種由来細胞株 ATDC5 については、

Famotidine, Cimetidine, Ranitidine, Lafutidine, Roxatidine, Nizatidine 0, 20 n, 200 n, 2 μ, 20 μ (g/mL) 存在下で、20 日間 Pi 添加 DMEM にて培養して石灰化を誘導する。上記の細胞と同様に、Von Kossa 染色・ALP 染色・遺伝子発現解析を行った(J Bone Miner Res. 2003 August ; 18(8): 1430-1442, Experimental Cell Research 287 (2003) 289-300)。ATDC5 細胞を用いた予備検討から、ファモチジンが用量依存的に OC と Col10 の発現を抑制する結果が得られた。ヒスタミンによる石灰化誘導効果の解析についても H₂ ブロッカーの石灰化抑制の評価と同様に MC3T3-E1、TTD6、マウス初代腱細胞、ATDC5 を用い評価を行った。

(2) OPLL のモデルマウスである tip toe mouse(TTW/Jic-ICR (ttw/ttw) mouse:TTW マウス)を用いた、H₂ブロッカーによる靭帯骨化抑制についての解析。背景と目的:OPLL に対する H₂ブロッカーの靭帯骨化抑制のメカニズムを明らかにするため、OPLL を発症する TTW/Jic-ICR (ttw/ttw) mouse(Nat Genet. 1998 Jul;19(3):271-3)にヒスタミン H₂ 受容体拮抗薬を投与、後縦靭帯骨化が抑制されるかを調査した。対象と方法:生後 4 週齢の TTW/Jic-ICR (ttw/ttw) mouse 24 匹に、Famotidine を濃度 4.57 mg/L (*) で飲水に混和し、投与後 4 週(8 週齢), 8(12), 11(15), 14(18), 17(21)で採材し μCT で後縦靭帯骨化の増減を評価する。また、組織切片についても評価した。(*)水分摂取量約 3.5 mL/日・匹(20 g) famotidine のヒト最大投与量 40mg/day = 16.0 μg/20 g から計算)。すでに予備実験を開始しており、Famotidine 投与群で異所性骨化を抑制する傾向を認めている。

(3) ヒスタミン H₂ 受容体ノックアウトマウスと TTW マウスを交配により生まれる複合変異マウスにおける OPLL の病態についての解析。背景と目的:ヒスタミンの後縦靭帯骨化における役割を遺伝学的に証明する

ため、ヒスタミン H2 受容体ノックアウトマウスと TTW マウスの交配により生まれる複合変異マウスにおける後縦靭帯骨化の程度について解析する。対象と方法：Histamine H2R knockout mouse と TTW mouse を交配し、(2)と同様に μ CT で後縦靭帯骨化の増減を評価し、組織切片についても評価したところ CT では骨化抑制の傾向がみられたが、組織上抑制は明らかではなかった。

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)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 健一(Yamamoto, Kenichi)
東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・
特任研究員
研究者番号：90583162

(2)研究分担者

鄭 雄一(Tei, Yuichi)
東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・
教授
研究者番号：303450531

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()