

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10892

研究課題名(和文) 筋骨格系の異所性骨化症の発症分子機構の解明と治療法開発

研究課題名(英文) Molecular Mechanisms and Treatment of Heterotopic Ossification in Musculoskeletal system

研究代表者

江面 陽一 (EZURA, Yoichi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：50333456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎靭帯及び大関節周囲部に生じる異所性骨化症は、発生部位とその病態により、四肢麻痺や関節拘縮などの原因となる。有効な予防および治療法を確立するため、本研究はその発症機構と病態形成のメカニズム解明を進めた。マウスの踵骨腱切離モデルを用いて加齢・炎症・神経障害に基づく異所性骨化発症の病態理解を進め、運動負荷に伴う骨化促進に関わる分子を同定した。培養腱細胞の実験系で、予防・治療法開発に寄与する基盤的知見を積み重ね、腱および靭帯組織由来の異所性骨化症の発症に関わると推定された活性酸素と核酸代謝産物の影響を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腱・靭帯から発生する異所性骨化は、様々な運動器系疾患の発症および増悪因子として重要な意味を持つ。とくに脊椎周囲に生じる靭帯骨化症は、後縦靭帯骨化症や広汎性特発性骨増殖症のような罹病率の高い運動器系難病の病態形成の根源として重要である。本研究の成果は、上記のような根源的治療法のまだない疾患に対する有効な治療法を開発するための、基盤形成としての意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Ectopic ossification occurring in the spinal ligament and larger joints causes various disorders including paralysis, neuropathies, and joint contracture, depending on the site of occurrence and its condition. In order to establish effective prevention and treatment, this study investigated the pathogenesis of ectopic ossification in mouse tendons, ligaments and entheses, using model experiments based on aging, inflammation, neuropathic status and mechanical stress. To clarify the mechanism of pathogenesis, cultured tendon cells were also utilized. Our study accumulated fundamental knowledge that would contribute to develop effective methods for disease prevention and treatment. We examined the effects of reactive oxygen species and nucleic acid metabolites as a mechanism presumed to be the onset mechanism of ectopic disease that develops from tendon and ligament tissues using a culture system of tendon cells.

研究分野：基礎整形外科学、骨生理学、骨代謝学

キーワード：異所性骨化 酸化ストレス アデノシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

重度の関節損傷や侵襲的手術に誘発される「異所性骨化症」は、様々な臨床場面での症状が問題となるが、十分に有効な治療法は確立されていない。遺伝性に筋肉内に異所性骨化を生じる「進行性骨化性線維異形成症 (FOP)」は、BMP 受容体として機能する IA 型アクチビン受容体の機能獲得型変異を原因とし、外傷性刺激に应答して分泌されるアクチビンが BMP シグナル増加に寄与することで発症することが明らかにされ、この知見に基づく治療薬開発が進められている。しかし分子メカニズムの異なる一般的な異所性骨化症の治療にこのような薬物が適用される可能性は少ない。したがって、一般的な筋骨格系の異所性骨化症については、個々の病態に応じた治療法を開発する必要があり、そのため、個々の病態に関わる分子機構を明らかにしてゆく必要がある。これまでに指摘されてきた機構として、糖尿病など代謝障害の関与に加えて、加齢と変性の関与が指摘されている。また関節手術後の骨化性筋炎や、膝関節内側に生じる外傷後性の Pellegrini-Stieda 病などでは、「広範囲の組織損傷」、「神経障害の合併」、「炎症遷延化」などが関与して、「組織損傷に伴う末梢神経障害が炎症性細胞を動員して各種メディエーターが異所性骨化を進行させる」と推定されている。いっぽう脊椎靭帯骨化症 (主に OPLL) には遺伝的素因の関与が推定されるが、外傷および変性組織に対する組織修復機構の関与も想定される。脊椎椎間板の骨化が病状進行に先行する「強直性脊椎炎」においては腸炎・皮膚炎と関連するサイトカイン・シグナルから骨形成が誘導される。大動脈壁と脊椎靭帯などに骨化病変を形成する「乳児全身性動脈石灰化症 (GACI)」と類縁疾患は、異所性骨化の抑制因子として重要な、細胞膜上のヌクレオチド脱リン酸化酵素やピロリン酸 (PPi) トランスポーター分子 (Ank) が原因遺伝子として関与する。したがって、脊椎および四肢関節周囲に発症する異所性骨化の多くに、末梢神経障害やサイトカイン・シグナルと、核酸・ピロリン酸代謝系制御をつなぐ分子径路が関わる。しかし以上のような種々の機構を統合する概念は打ち立てられていない。

## 2. 研究の目的

本研究は、外傷誘発性の異所性骨化に随伴する石灰化阻害因子や石灰化促進因子の発現制御と炎症応答の関与を解明するという目的により開始された。この過程から明らかにされた酸化ストレス、核酸代謝物およびその受容体、トランスポーターやその他の細胞膜蛋白質などの腱・靭帯骨化に果たす役割について解明を進めることが目的であった。

## 3. 研究の方法

脊椎靭帯及び大関節周囲部に生じる異所性骨化症は四肢麻痺や関節拘縮などの原因となる病態であり、その発症機構の解明と有効な予防治療法の開発が望まれる。本研究はマウスの踵骨腱切離モデルを用いて加齢・炎症・神経障害に基づく異所性骨化発症の病態理解を進めるとともに、有効な治療法開発の糸口となる基盤的知見の確立を目指した。

まず野生型 C57BL/6J マウスにおける踵骨腱切離モデルによる石灰化を異なる週齢で行い評価した。また脊椎靭帯の異所性骨化を自然発症する Slc29a1 遺伝子欠損マウスを導入して、その靭帯付着部の骨化進行について明らかにした。このモデル実験系において、神経障害誘発性の炎症性サイトカインとピロリン酸代謝制御因子の組織レベルと異所性骨化の時系列的随伴を明らかにすることで、「異所性骨化の発症機序」の解明と、「有効な治療法」の開発をめざしたが、踵骨腱切離に追加する手術手技の変更点として単純切離ではなく注射針による部分欠損作成の影響を検討し、背部皮膚への熱傷刺激、周辺組織へのサイトカイン投与の影響を検討した。細胞培養の実験系では腱細胞株 TT-D6 および趾屈筋腱由来の初代腱細胞の石灰化骨結節誘導アッセイにより、炎症性サイトカイン、活性酸素、成長因子に加えて核酸代謝産物およびその受容体阻害薬等の影響について検討した。

## 4. 研究成果

まず、様々な組織に潜在する多能性前駆細胞の培養系で、炎症性サイトカインへの応答として、Ent1 や Ank などの「細胞外ピロリン酸制御系因子」の発現が抑えられ、生体石灰化に促進的に作用することを示した。これらの細胞培養による実験系から、酸化ストレス応答が腱細胞の骨分化を促進する可能性を見出したが、この培養系を用いて細胞外へ分泌される多様な因子の定量比較を試みた。酸化ストレス負荷による石灰化促進は細胞株 TT-D6 を用いてまず見出されたが、初代腱細胞培養においても確認され、コンディション培地の使用によっても石灰化は誘導されたことから、酸化ストレスを受けた腱細胞が分泌する因子による石灰化促進であることが示された。腱細胞における再現性が示されたが、関節包組織や靭帯、腱を含めた組織潜在性の各種間葉系幹細胞と初代腱細胞を用いた、酸化ストレス負荷の骨分化誘導性については十分に明らかにされず今後の課題として残され

た。炎症性サイトカインはT T - D 6 細胞の骨分化をむしろ抑制する傾向が見られたが、異なる細胞においては骨化結節形成を促進する結果が得られ、その応答性には細胞種特異性が存在した。いっぽう酸化ストレスを受けた細胞の放出する因子として推定される核酸代謝物の影響については、ATP およびアデノシンに対する受容体シグナルを想定して、各種阻害薬とアゴニスト投与による検討を行い、アデノシンの関与について成果をまとめた。

インビボモデルの異所性骨化形成については、まず野生型およびSlc29a1 遺伝子欠損マウスを用いて、踵骨腱切離および部分切除による異所性骨化の発症過程を週齢別に時系列的に解析し、加齢の影響を検討した。術後8週間の時点での腱内骨化レベルと石灰化病巣の組織形態像が明らかにされたが、石灰化制御因子の発現レベルとの関連は十分に明らかにされなかった。熱傷負荷とサイトカイン負荷の影響は明らかにできなかったが、マウスの腱・靭帯付着部への生理的レベルのメカニカルストレス負荷も骨化促進に寄与することが明らかにされた。鶴見大学歯学部の中藤彰博士との共同研究において解明された、Anxa 5 欠損による腱靭帯付着部の骨化促進という現象の解明について本研究は貢献した。なおSlc29a1 遺伝子欠損マウス由来の趾屈筋腱細胞を用いた培養系においては、その石灰化誘導における野生型細胞との相違について検討を進め、とくにアデノシンに基づく石灰化促進機構について成果をまとめている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Shimada A, Ideno H, Arai Y, Komatsu K, Wada S, Yamashita T, Amizuka N, Poschl E, Brachvogel B, Nakamura Y, Nakashima K, Mizukami H, Ezura Y, Nifuji A. Annexin A5 Involvement in Bone Overgrowth at the Enthesis. Journal of Bone and Mineral Research 33(8) 2018年 1532-1543

〔学会発表〕(計 1 件)

佐久間朋美、パワプタノン・ナ・マハサラカム チャンチダ、林欣、小林裕、梶川修平、猪瀬弘之、大川淳、野田政樹、江面陽一。腱・靭帯細胞の骨化制御に関わる酸化ストレスとアデノシンの影響。日本軟骨代謝学会 2019年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。