

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	機能再建再生科学領域脊椎脊髄病態修復学教育研究分野 荒木 亮
(論文題目) Effect of teriparatide on ligamentum flavum mesenchymal stem cells isolated from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament (テリパラチドによる脊柱靱帯骨化症由来 MSCs の骨分化促進に関する検討)	
(内容の要旨) <p>【背景】 脊柱靱帯骨化症の一つである後縦靱帯骨化症(ossification of the posterior longitudinal ligament: OPLL)は脊柱管内の靱帯が骨化することで脊髄及び神経根を圧迫することによる神経症状を呈したり、頸椎の可動域制限によって運動機能障害を呈する疾患である。当科ではこれまでに OPLL 患者の手術中に採取される脊柱靱帯から間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells: MSCs)を分離・培養し、脊柱靱帯の骨化のメカニズムとして MSCs の分化異常が関与している可能性を報告してきた。国内の OPLL の有病率は 1.9-4.3%と報告されており、その頻度は年齢とともに増加する。高齢な OPLL 患者では骨粗鬆症を合併することが多いが、骨折リスクの高い骨粗鬆症に対し有効性の高い骨形成促進剤のテリパラチド (Teriparatide: TPD) による靱帯骨化増大リスクについては不明な点が多い。動物実験では、靱帯骨化症モデルマウスに TPD を投与し、靱帯の骨化が促進されたと報告されている。また、TPD はヒト副甲状腺ホルモン(parathyroid hormone: PTH) の生物活性を有する遺伝子組み換えポリペプチド製剤であり、PTH1 受容体(PTH1R)を介して骨同化作用を有し、その作用機序として MSCs の骨分化促進作用が証明されている。しかし OPLL 患者に対する TPD 投与で、靱帯の骨化が促進されるかどうかは検証されていない。</p> <p>本研究の目的は OPLL 患者脊柱靱帯由来 MSCs の PTH1R の発現を解析し、TPD 投与が骨分化に対し影響するかを検討することである。</p> <p>【方法】頸椎手術中に切除された OPLL 患者 13 名の脊柱黄色靱帯(ligamentum flavum: LF)から MSCs (OPLL 患者由来 LF-MSCs) を分離・培養し実験に用いた。対象群として同数の頸椎症性脊髄症(cervical spondylotic myelopathy: CSM)患者由来 LF-MSCs を用いた。そのうち各 3 サンプルに対し Western blot を用いて PTH1R 発現を解析した。残りの各 10 サンプルは培養細胞がコンフルエントに達した後に骨分化誘導培地で培養し、各濃度の TPD(3nM、10nM、30nM)を週 1 回投与し、計 21 日間培養した。21 日間培養後に Alizarin red 染色を行い、吸光度を測定し石灰化を定量評価した。また培養細胞から Total RNA を抽出し RT-PCR を行った。非骨分化誘導培地の TPD 非投与下で培養した CSM 患者由来 LF-MSCs をコントロールとして、$\Delta\Delta$CT 法を用いて TPD 各濃度における骨化関連遺伝子(<i>OCN</i>, <i>OSX</i>, <i>OCN</i>, <i>RUNX2</i>, <i>BMP2</i>)の相対的発現量を測定した。統計学的解析として PTH1R 発現量については、OPLL 患者由来 LF-MSCs と CSM 患者由来 LF-MSCs の 2 群間比較を Mann-Whitney U 検定で行った。石灰化定量評価と骨化関連遺伝子の相対的発現量については Two-way ANOVA を用いて、2 群間比較および各 TPD 濃度間比較を行った。</p> <p>【結果】</p> <p>OPLL 患者由来 LF-MSCs と CSM 患者由来 LF-MSCs のいずれにおいても PTH1R 発現を認めた。その相対的発現量はそれぞれ 1.67 ± 0.04、1.50 ± 0.24 であり、両群間で差を認めなかった($P = 0.51$)。Alizarin red 染色の吸光度測定値は OPLL 患者由来</p>	

LF-MSCs において TPD 非投与で 2.16、TPD 投与(3nM、10nM、30nM)でそれぞれ 2.03、2.10、1.94 であった。CSM 患者由来 LF-MSCs ではそれぞれ 1.22、1.22、1.28、1.27 であった。その値は OPLL 患者由来 LF-MSCs で有意に高値であったが($P < 0.01$)、各 TPD 濃度間の差は認めなかった($P = 0.98$)。OPN を除く全ての骨化関連遺伝子の発現は OPLL 患者由来 LF-MSCs で有意に高値であった(*OCN*、 $P = 0.009$; *RUNX2*、 $P = 0.018$; *OSX*、 $P = 0.015$; *BMP2*、 $P = 0.011$)。各 TPD 濃度間で骨化関連遺伝子の発現量に有意差は認めなかった($P > 0.05$)。

【考察】

LF-MSCs は OPLL 患者由来、CSM 患者由来ともに PTH1R を発現していたことから、TPD が LF-MSCs に作用し脊柱靱帯の骨化に影響し得る可能性が示唆された。OPLL 患者由来 LF-MSCs は CSM 患者由来 LF-MSCs と比較し強い石灰化を示し、さらに骨化関連遺伝子の発現が有意に高かったことから、高い骨分化能を有していると考えられた。しかし TPD 投与による LF-MSCs の骨分化促進作用を認めなかった。そのひとつめの理由として、MSCs の由来組織による細胞特性の違いが挙げられる。過去にマウスに TPD を投与し、骨髄由来 MSCs において骨化関連遺伝子の発現が上昇したとの報告もあるが、MSCs の分化能や細胞増殖能などの性質は、その由来組織に大きく影響を受けることが報告されている。本研究の結果から、LF-MSCs の由来組織の特性として TPD の骨分化促進作用を受けなかった可能性が考えられた。この LF-MSCs の特性により、OPLL 患者への TPD 投与は脊柱靱帯の骨化を促進することなく骨密度の上昇をもたらし、さらには骨折予防に寄与する可能性がある。ふたつめの理由として、*in vitro* と *in vivo* における薬物代謝の違いが挙げられる。TPD は *in vivo* で投与された場合、速やかに骨形成マーカーが上昇し、その後遅れて骨吸収マーカーが上昇する *anabolic window* と言われる剥離期間が存在する。この TPD 投与による *anabolic window* の形成により、骨分化促進効果が発揮され则认为されている。*In vitro* での TPD 投与では *anabolic window* の形成が *in vivo* とは同様ではないと考えられ、*in vivo* と *in vitro* での TPD の代謝メカニズムの違いを考慮した投与方法の検討が必要であると考えられた。

【結語】

OPLL 患者由来 LF-MSCs は PTH1R を発現していた。OPLL 患者由来 LF-MSCs は高い骨分化能を示したが、TPD 投与による骨分化促進効果は認めなかった。これらの結果から骨粗鬆症を有する OPLL 患者に対する TPD 療法は安全である可能性が示唆されたが、*in vitro* と *in vivo* の違いなどさらなる検討が必要であると考えられた。