

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 運動機能病態修復学分野 氏名 市川奈菜
<p>(論文題目)</p> <p>Coagulation, vascular morphology, and vasculogenesis in spinal ligament ossification model mice (骨化モデルマウスにおける血液凝固、血管形態および血管新生能の評価)</p>	
<p>(内容の要旨)</p> <p>【はじめに】</p> <p>後縦靭帯骨化症 (OPLL) は脊柱靭帯に生じた骨化により脊髄が圧迫されることで頸部痛や四肢の運動障害を引き起こし、患者の quality of life を著しく低下させる。また、OPLL 患者では、転倒などの軽微な外傷により脊髄損傷(SCI)が発生しやすい。静脈血栓塞栓症(VTE)は SCI における重篤な合併症の 1 つであり、SCI 後の VTE の発生率は 12-64%と高く、その死因の 9.7%を占めると報告されている。過去に我々は、頸椎 OPLL のある脊髄損傷患者では、麻痺症状の重症度に関わらず VTE の発生率が高いことを報告した。VTE の病態として Virchow の三徴 (血流の停滞、血液凝固能の異常、血管壁障害) が知られている。SCI 患者では下肢の麻痺により血流の停滞が生じることを考慮すると、三徴のうちの血液凝固能の異常と血管壁障害が、OPLL 患者の高い VTE 発生率に関与する可能性がある。しかしながら、OPLL における血液凝固能や血管形態については不明な点が多い。</p> <p>本研究の目的は脊柱靭帯骨化モデルマウス(ttw マウス)を用いて、脊柱靭帯の骨化、血栓形成に関する因子として血液凝固能と、靭帯、筋組織における血管形態および血管内皮細胞の管腔形成能を調査することである。</p> <p>【対象と方法】</p> <p>8-24 週齢の雄 TWY/Jic マウス(ttw)と C57BL/6J マウス(WT)を対象とした。脊柱靭帯骨化の評価として 8、16、24 週齢の ttw の頸椎マイクロ CT を撮影し、骨化巣の体積を測定した(n=3)。血液凝固能を評価するため、8、16、24 週齢の ttw と WT から心臓血を採取し、血小板数、プロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、フィブリノゲン、D-dimer を測定した(n=5)。血管形態の組織学的評価として 8、16、24 週齢の ttw と WT から下腿の筋、腱組織を採取し、凍結切片を作成した。単位面積あたりの血管面積(VA)、血管内腔面積、血管壁面積、血管壁が血管面積に占める割合(%VWA)を計測した(n=9)。管腔形成能の評価として 8-12 週齢の ttw と WT の大動脈から血管内皮細胞を単離培養し、In Vitro Angiogenesis Assay Kit を用いて管腔形成能(total tube length(TTL)、total branching points(BP)、total loops(TL))を評価した(n=6)。また、ttw の組織における間葉系幹細胞(MSCs)の局在を評価するため、血管内皮細胞マーカー(CD31)と MSCs マーカー(CD90)で二重免疫染色を行った(n=5)。</p> <p>統計解析として、骨化巣の各週齢での比較は一元配置分散分析を用いた。その他の解析は、Mann-Whitney U 検定と Kruskal-Wallis 検定を用いて ttw と WT で比較検討した。</p> <p>【結果】</p> <p>脊柱靭帯の骨化は、8 週齢の時点で軸椎歯突起後方に認められた。骨化巣は徐々に増</p>	

大し、24週では脊髄が高度に圧迫されていた。血液凝固能は8、16週齢でWTに比べてttwでPTが有意に短縮していた(それぞれ $p=0.046$ 、 0.046)。また、全ての週齢でWTに比べてttwでフィブリノゲンが高値だったが、有意差は認めなかった。組織学的評価では、全ての週齢でWTに比べてttwでVAが有意に小さかったが、%VWAは24週のみで有意差を認めた($p=0.007$)。管腔形成能は、WTに比べてttwで有意にTTL, BP, TLの全てが多い結果だった($p=0.008$)。MSCsの免疫染色では、ttwとWTの両方で血管周囲にMSCsが存在し、特に8週齢でWTに比べてttwで有意にMSCsが多く存在していた($p=0.001$)。

【考察】

ttwマウスを用いて、血栓形成に関わる因子を評価した。ttwではWTに比べて血液凝固が亢進しており、小血管が多く、血管内皮細胞の管腔形成能が高かった。PT、APTTは血液凝固能の指標として広く使用されており、PT、APTTの短縮とフィブリノゲンの上昇は凝固過剰状態を示し、VTE発生と関係することが過去に報告されている。

一般に、径の小さい毛細血管は一層の内皮細胞と周皮細胞からなるため脆弱である。過去には血管新生がヒトの血管、心臓の弁、骨格筋などの石灰化に寄与していること、ttwの脊柱靭帯骨化にも血管新生が先行していることが報告されており、血管新生と骨化は関連している可能性が示されている。本研究では、ttwの血管内皮細胞はWTに比べて有意に管腔形成能が高く、これらの結果からttwでは血管新生により生じた小血管が多く存在する可能性が示唆された。

また、過去の研究で、OPLL患者では脊柱靭帯組織の血管周囲にMSCsが多く存在し、そのMSCsは骨分化能が高いことが報告されている。本研究でもttwの組織において血管周囲にMSCsが多く存在しており、これらのことから、靭帯の骨化にはMSCsと血管新生が関与している可能性が考えられた。今後、ttwにおける脊髄損傷モデルにおいて、VTEの発生との関係を明らかにする必要がある。

【結語】

ttwはWTと比べて血液凝固が亢進し、脆弱な小血管が多く存在しており、VTEが発生しやすい危険因子を有すると考えられた。

(2189字)