



Title	生体内石灰化制御分子ピロリン酸をターゲットにした脊柱靱帯骨化進展抑制療法に関する研究〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	平塚, 重人
Description	配架番号 : 2343
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12839号
Issue Date	2017-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67442
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Shigeto_Hiratsuka_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏 名 平塚 重人

学 位 論 文 題 名

生体内石灰化制御分子ピロリン酸をターゲットにした
脊柱靱帯骨化進展抑制療法に関する研究

(Studies on development of new therapeutic approach to ossification of the spinal
ligament targeting pyrophosphate)

【背景と目的】 厚生労働省難治性疾患克服研究事業の指定難病の一つである脊柱靱帯骨化症(ossification of the spinal ligament ; OSL)は椎骨をつなぐ靱帯が骨化し、脊柱の強直や脊髄の圧迫をきたす原因不明の疾患である。現状では発症を抑える方法どころか進行を抑える治療法も確立しておらず、姑息的な外科的治療が唯一の治療法である。OSL の骨化進展を抑制する可能性のある薬剤は、これまでいくつか報告されているが、効果が不十分であったり、副作用の問題などから未だ実用化へいたった薬剤はない。そのため、靱帯骨化の進展を抑制する新たな薬剤の開発が切望されている。本研究においてわれわれが着目したのはアパタイト結晶の成長を強力に抑制する内因性の石灰化（骨化）抑制分子、無機ピロリン酸（PPi）である。PPi は骨を除くすべての器官に発現し、組織への石灰の沈着や骨化を抑制する重要な分子である。異所性骨化は生体内石灰化抑制制御機構の破綻から生じる病態と考えられるため、靱帯骨化の進展も PPi 濃度を上昇させることによって抑制できる可能性がある。まず単純に外因性に PPi を投与する方法が考えられるが、PPi は、非組織特異的アルカリホスファターゼ（tissue-nonspecific alkaline phosphatase ; TNALP）によって速やかに加水分解されるため、PPi 単独投与は治療法としては成立しがたい。そこで本研究では、TNALP を阻害することにより、PPi の組織内濃度を上昇させられるのではないかと考えた。本研究では、ALP 阻害薬である Levamisole 単独投与および Levamisole と外因性 PPi の併用投与による靱帯骨化の進展抑制効果を検証するために、靱帯骨化症モデルマウスとして汎用される *Enpp1* 遺伝子変異の *ttw / ttw* tip-toe walking Yoshimura (*twy*) マウスモデルを用いて、靱帯骨化症の薬物治療の有効性と副次的作用を検討した。さらに、異所性骨化抑制の効果が動物実験で証明されている選択的レチノイン酸受容体- γ アゴニスト（RAR γ ）を positive control とし、同様に調査した。

【材料と方法】 5 週齢の雄性 *twy* マウス 20 匹を用いた。4 群に分け、Control 群には PBS 200 μ l /day を 1 日 1 回皮下投与した。Levamisole (5mg/kg/day)単独群と Levamisole と PPi 併用群 (Levamisole (5mg/kg/day)+PPi (160 μ mol/kg/day))は、浸透圧ポンプを用いて皮下持続投与とした。また positive control として RAR γ アゴニスト(6mg/kg/day) を 1 日 1 回皮下投与した。全身状態への影響を評価するため、体重の推移および肉眼的所見を経時的に観察した。同一個体における頸椎、腰椎の縦断的 micro-CT (投与後 0, 2, 4 週) 画像データを用いて、3 次元的骨微細構造解析、頸椎強直スコアおよび異所性石灰化巣の体積を計測し、頸椎強直と腰椎海綿骨を評価した。4 週間後に安楽死させ、採取した血清を用い

て無機ピロリン酸濃度を測定した。頸椎と腰椎の硬組織標本を用いて組織学的評価を行った。骨形態計測で骨形成などの動的指標を観察した。

【結果】Levamisole 5mg/kg/day 単独投与は、血清 PPi 濃度を 17%上昇させたが、骨化の進展は抑制できなかった。一方、Levamisole と外因性 PPi を併用投与すると、血清 PPi 濃度は 52%上昇し、positive control である RAR γ アゴニストと同等の靱帯骨化の進展抑制効果がみられた。懸念される副作用のひとつである骨粗鬆症化については、Levamisole 単独投与群および Levamisole と外因性 PPi の併用投与群のいずれでもみられなかったが、組織学的には Levamisole と外因性 PPi の併用投与群では生理的骨形成の最終段階である類骨の石灰化が抑制されていた。一方、RAR γ アゴニスト投与群では明らかな骨粗鬆症の発生がみられた。この他、Levamisole 単独投与及び外因性 PPi との併用投与は twy マウスの経時的な体重増加に影響を与えなかったが、RAR γ アゴニスト投与群では体重減少と粘膜障害を生じた。

【考察】Levamisole と外因性 PPi を併用投与すると、血清 PPi 濃度は 52%上昇し、positive control である RAR γ アゴニストと同等の靱帯骨化の進展抑制効果がみられた。この結果は、組織内 PPi 濃度を上昇させることができれば、ハイドロキシアパタイト結晶形成の阻害し、靱帯の異所性骨化の進行を抑制できるとした本研究の仮説を裏付けるものといえる。しかし Levamisole 単独投与群において、血清 PPi 濃度が健常マウス (twy マウスのバックグラウンドである ICR マウス) と同程度まで上昇したにも関わらず骨化の進展が抑制できなかったことを考えると、一度形成された骨化巣の進展を抑えるためには生理的なレベル以上に PPi 濃度を上昇させる必要があることを示唆している。Levamisole 単独投与については過去に本研究よりも高用量の Levamisole 投与により骨石灰化を抑制したとする報告があるが、この用量は世界保健機構 (WHO) 推奨の臨床使用量を大きく上回る用量である。また、われわれの予備実験ではこの先行研究と同じ用量を twy マウスに投与すると体重減少や個体死が生じた。そのため Levamisole の用量増加による PPi 上昇という治療戦略は安全上の理由から難しい。薬剤で異所性骨化を抑制しようとする場合、同時に生理的な骨形成を抑制する可能性があることに注意しなければならない。Levamisole 単独投与群および外因性 PPi との併用投与群のいずれも明らかな骨粗鬆症化は起きなかったが、組織学的には Levamisole と外因性 PPi の併用投与群では生理的骨形成の最終段階である類骨の石灰化が抑制されており、投与期間や投与濃度などには注意が必要であることが示唆された。

【結論】ALP 阻害薬 Levamisole と外因性 PPi の併用投与により、組織内 PPi 濃度を上昇させることができれば、ハイドロキシアパタイト結晶形成を阻害し、靱帯の異所性骨化の進行を抑制できることが示唆された。この併用療法では明らかな副作用は生じなかったものの、組織学的には骨形成の最終段階である類骨の石灰化障害を認めたことから、長期投与により骨粗鬆症が発生する可能性があることに注意すべきと考えられた。なお、Positive control として用いた RAR γ アゴニストについては靱帯骨化の進行抑制効果を示したが、同時に骨粗鬆症化を呈したことから靱帯骨化症への適応は難しいと考えられた。