 原 著

頸椎椎間板変性における骨増殖因子発現の検討

井田 裕己, 森本 哲也*, 鄭 倫成, 乾 多久夫*,
中瀬 裕之, 榎 寿右

Immunolocalization of Growth Factors in Degeneration of Cervical Intervertebral Discs

by

Yuki Ida, Tetsuya Morimoto*, Rinsei Tei, Takuo Inui*,
Hiroyuki Nakase, Toshisuke Sakaki

from

Department of Neurosurgery, Nara Medical University
Department of Neurosurgery, Osaka Police Hospital*

Several growth factors regulate bone remodeling. Evidence suggests bone morphogenetic protein (BMP) and transforming growth factor- β (TGF- β) promote bone regeneration following fracture and ligamentous ossification in ossification of the posterior longitudinal ligament (OPLL) and ossification of the yellow ligament (OYL). This study was conducted to determine whether BMP and TGF- β are related to intervertebral disc degeneration and cervical spondylosis. Intervertebral disc, posterior longitudinal ligament and posterior vertebral spurs were obtained during anterior discectomy procedures, and examined immunohistochemically. Intervertebral disc cells showed cluster formations in degenerated discs and these cells stained positive for BMP-2/-4 and TGF- β 2, which cannot be detected in normal disc. Numerous new blood vessels and mesenchymal cells were observed in migrated discs. Fibrocartilaginous tissue was especially noticeable around vertebral spurs. These tissues stained positive for both BMP-2/-4 and TGF- β 2, which may play a role in disc degeneration and may induce vertebral spurs in cervical spondylosis and ectopic ossification of the posterior longitudinal ligament.

Key word: BMP, TGF- β , intervertebral disc, cervical spondylosis

Spinal Surgery 16 (1) : 21~28, 2002

はじめに

椎間板の変性は加齢現象のひとつであり中高年においては一般的に認められる。加齢による椎間板の変性のみでは通常は無症状であり、線維輪の断裂により髄核が脱出した場合に、はじめて根症状や脊髄症として発症する。また、頸椎症における骨棘形成には椎間板変性が重要な役割を果たしていると言われているが、その機序はあきらかでない。一方、骨は、恒常的に形成と吸収を繰り返している生きた組織であり椎体も例外ではない。分子生

物学的研究の発達により、多数のサイトカインや成長因子が骨のremodelingや軟骨の形成に関与している事が明らかにされてきたが、そのなかでbone morphogenetic protein (BMP) は局所投与により、それ単独で異所性の骨化を誘発することが出来る唯一の因子であり、骨芽細胞分化の分子レベルでの鍵と言われている [17, 21, 22]。また、transforming growth factor- β (TGF- β) も骨膜下に投与された場合には骨形成を誘導でき、軟骨形成により内軟骨性骨化を誘導できる因子と言われている

(Received : November 17, 2001, Accepted : February 7, 2002)

奈良県立医科大学 脳神経外科, 大阪警察病院 脳神経外科* (連絡先: 井田裕己, 〒634-8522 奈良県橿原市四条町840 奈良県立医科大学 脳神経外科) Address reprint request to: Yuki Ida, M.D., Department of Neurosurgery, Nara Medical University, Shizyotyo 840, Kashihara, Nara, 634-8522, Japan

る [14, 15, 18]. これら, BMPおよびTGF- β は骨の remodelingにおける最も重要な因子と言われ, 骨折の再生過程や後縦靱帯骨化症 (OPLL) と黄靱帯骨化症 (OYL) での異所性骨化において発現が報告されている [5, 15, 19, 25]. 椎間板組織においては, 頸椎症モデル動物において変性椎間板細胞でのBMPの発現が報告 [13, 20] されているが, 臨床例でのBMP, TGF- β の発現に関しての報告はない. 我々は頸椎前方固定術の際に椎間板, 後縦靱帯, 骨棘を採取し, 免疫組織学的にBMP, TGF- β について検討を行うことによって, 椎間板の変性過程における増殖因子の関与と, さらに頸椎症における骨棘形成とその原因としての椎間板変性の関わりについて検討を行った.

対象及び方法

1999年8月から2000年5月までに頸椎前方固定術にて手術を行った頸椎椎間板ヘルニアと頸椎症の25例を対象とした. 年齢は35歳から78歳 (平均55.2歳). 術中に椎間板, 後縦靱帯, および椎体後方骨棘をそれぞれ採取した. 正常コントロールとして頸椎症状のない17歳男性と19歳女性の病理解剖時に採取された頸椎椎間板と椎体を比較検討した. 標本はホルマリン固定後パラフィン包埋し, 薄切切片スライドとし, HE染色および, 免疫組織染色を行った.

免疫染色は1次抗体としてRabbit polyclonal antibody to BMP-2/4とRabbit polyclonal antibody to TGF- β 2 (SantaCruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) を使用し 37°Cで20分間反応させ, これを Histofine simple stain PO (Nichirei, Tokyo, Japan) のキットを使用して可視化した. 陽性コントロールとして4週齢ラットの骨端軟骨を使用した. 核染色はヘマトキシリンで行った.

結 果

Fig. 1は38歳, 男性でC5-6頸椎椎間板ヘルニアの症例である. C5椎体下縁に後方骨棘が形成され, MRIにてC5-6椎間板が後縦靱帯内に脱出しており, 頸髄は著明に圧排変形していた. CTでは同レベルで後縦靱帯に石灰化を認めた. 前方固定手術に際し, 線維輪の断裂と同時に, 後縦靱帯内に大量の椎間板組織が迷入していることが確認され, 摘出された. このように後縦靱帯内や硬膜外腔に脱出した椎間板をmigrated discとして椎間腔に存在した髄核組織と区別して検討を行った. migrated

Fig.1

A 38-year-old male with C5-6 disc hernia. Cervical X-ray showing C5 vertebral spur formation. MRI showing C5-6 disc migration into the posterior longitudinal ligament. CT showing ossification of the posterior longitudinal ligament adjacent to the migrated disc.

discは25例中14例で確認された. 術前のレントゲンあるいはCT検査で後縦靱帯の石灰化が確認できたのは25例中9例あったが, これらの症例では全例でmigrated discが術中に確認され, 後縦靱帯の石灰化とmigrated discの関連が示唆された.

組織学的には変性した椎間板では髄核の細胞数が増加し, 2~3個の小群を形成して合胞細胞のような所見を呈し, 時には数個の細胞が集合し多核巨細胞様となる事が知られているが, 手術標本では全例で髄核細胞は増加, 合胞傾向を示し, 著明な椎間板変性の存在が示唆された. 免疫染色では, それら合胞傾向を示す細胞ではBMP-2/4およびTGF- β 2が著明に発現しており, その周辺の単核の細胞でもBMP-2/4およびTGF- β 2の発現が見られた (Fig.2下). それに対して, 若年者の病理解剖で得た変性のない椎間板では髄核細胞は単核で髄核内に一様に散在しており, BMP-2/4およびTGF- β 2は発現していなかった (Fig.2上).

Fig.2 upper

In the young control, disc cells in the nucleus pulposus were oval with a single round nucleus. Both BMP-2/4 and TGF- β 2 can not detected in the intervertebral disc.

Fig.2 lower

In surgical cases, the presence of chondrocyte cloning and clusters of chondrocytes were prominent in nucleus pulposus. Many of cloned or clustered disc cells were stained positive for BMP-2/4 and TGF- β 2. Also, some of mononuclear disc cells neared clustered cells were stained positive. ($\times 200$)

Fig.3

In the migrated disc, numerous new blood vessels and granulation tissues were observed at the edge of specimens. Degenerated disc cells and infiltrated mesenchymal cells were stained positive for BMP-2/4 and TGF- β 2. ($\times 100$)

Fig.4

In the specimens around the vertebral spur, fibrocartilaginous tissues were especially remarkable and were stained strongly positive for BMP-2/4 and TGF- β 2. ($\times 100$)

Fig.5

Hypothesis of spur formation and ectopic ossification of ligament mechanism in cervical spondylosis.

a: BMP and TGF- β production are increased with degeneration of intervertebral disc.

b: If anulus fibrosus is ruptured, BMP and TGF- β exist in degenerated nucleus pulposus may induce vertebral spur or ectopic ossification of posterior longitudinal ligament.

migrated discでは、変性した髄核組織に多数の新生血管と間葉系細胞の浸潤を認め、炎症機転の存在が示唆された (Fig.3左上)。免疫染色では合胞傾向を示す変性した髄核細胞と浸潤増殖した間葉系細胞はBMP-2/-4およびTGF- β 2を高度に発現していた (Fig.3下)。

手術症例では程度に差はあれど全例で椎体の後方骨棘を認め、これを採取したが、組織学的には骨棘周囲では肥大化した軟骨細胞と線維組織の著明な増殖を認め内軟骨性骨化による骨棘形成が示唆された。同部の軟骨細胞と増殖した間葉系細胞ではBMP-2/-4およびTGF- β 2が発現しており、特にTGF- β 2の発現は著明であった (Fig.4)。

以上をまとめると変性椎間板では髄核細胞が増加、合胞傾向を示し、それらの細胞ではBMP-2/-4およびTGF- β 2が発現していた。脱出髄核や、骨棘周囲では間葉系細胞の増殖を認め、髄核細胞だけでなくそれらの増殖した間葉系細胞でもBMP-2/-4およびTGF- β 2が高度に発現していた。

考 察

分子生物学の進歩により種々の成長因子が細胞の分化や個体発生、器官の形成や成長を高度に制御している事が明らかになってきたが、その中でもBMPおよびTGF-

β は骨のremodelingにおける最も重要な因子と言われ、骨芽細胞や破骨細胞の分化、軟骨形成において重要な役割を果たしている。BMPは当初、骨や軟骨形成を誘導する因子として骨基質から分離されたが、その後の研究で胚発生から器官形成など様々な段階で重要な役割を果たしていることが明らかにされた [24]。BMPは正常個体では骨芽細胞、骨髄間質細胞、歯芽細胞等に分布しており [10]、すでに15以上のisoformsが確認され、それぞれ異なった骨形成作用を有することが示されているが、その中でもBMP-2、-4、-7が特に重要とされている [4]。

TGF- β も少なくとも5個のisoformが確認され種々の組織で基質合成を促進し、特に骨組織では著明である。TGF- β isoformの質的な差は明らかでないが、TGF- β 2は軟骨の再生を制御していることが示唆されている [2, 16]。

これらBMPおよびTGF- β は多機能因子であり様々な分野で注目され研究が進められているが、椎間板研究の分野では、早期老化マウスにおいて変性椎間板細胞でのBMP-2/-4の発現 [20] や、マウス頸椎症モデルにおけるin situ hybridizationを用いての研究で、椎間板細胞において変性の早期にBMP-4とその受容体の遺伝子が発現し、変性の後期ではBMP-6が発現していることが報告されている [13]。ヒト臨床例においては骨折後の再生

過程 [6, 15, 17, 19] や後縦靱帯骨化症 [9, 25], 黄靱帯骨化症 [5] での病的靱帯骨化における発現が報告されているが通常の老化, 変性過程での発現についての報告はない. 今回の変性椎間板でのBMPおよびTGF- β の発現は通常の老化, 変性過程においてもこれら成長因子が重要な役割を果たしていることを示すものと思われる.

頸椎椎間板の変性は加齢現象のひとつであり, 組織学的には20歳代からみられ, 髓核軟骨細胞の空胞変性や合胞化傾向を認めるとされている [3]. 今回の検討でも, 対照若年者の髓核細胞は単核で多量の髓核基質内に散在していたが, 手術標本では椎間板は変性しており髓核細胞は多核で合胞傾向を示し, 多核巨細胞様を呈するものも多かった. migrated discでも同様の変性髓核を認め, 標本の辺縁部では新生血管や多数の間葉系細胞の浸潤がみられ炎症反応の存在が示唆された. 椎間板変性の分子生物学的機序はいまだ明らかにされていないが, 近年の研究により, 変性椎間板では matrix metalloproteinase-3や nitric oxide, CD68, interleukin-1 β , interleukin-6, prostaglandin E2等の物質の産生が亢進していることが報告されている [1, 7, 8]. 今回の増殖因子に関する免疫組織学的検討ではBMP-2/-4およびTGF- β 2が変性髓核細胞, 特に合胞細胞で著明に発現しており, 更に, その周囲の単核の髓核細胞でも発現が見られ, 増殖因子が椎間板の変性, 特に細胞数の増加に重要な役割を果たしていることが推測される. BMP-2/-4およびTGF- β 2の分布に明らかな差異はみられなかったが, 骨折の治癒過程における研究や膝関節症の研究でも両増殖因子が共同して軟骨細胞の増殖から内軟骨性骨化にて骨再生, 関節骨棘の誘導が起こると言われている [11, 15, 23]. また, 後縦靱帯骨化症での検討ではBMP-2およびTGF- β が同時に骨化靱帯の軟骨細胞で発現していることが示されており [9], 椎間板の変性もBMP-2/-4およびTGF- β 2を含む多数の増殖因子が複雑に制御しているものと思われる.

従来から, 頸椎症における骨棘形成には椎間板変性が重要な役割を果たしていると言われてきたがその分子生物学的な機序に関しては全く知られていなかった. 近年, マウスでの頸椎症モデルにおける免疫組織学的研究で椎間板髓核細胞でのBMP [13, 20] およびbFGF [12] の発現が相次いで報告されているが, 今回, 臨床症例でも, 変性髓核細胞においてBMP-2/-4およびTGF- β 2が発現していることが確認され, 骨棘周囲や後縦靱帯内に脱出した髓核では間葉系細胞が浸潤増殖し, それらも,

BMP-2/-4およびTGF- β 2を高度に発現していることが確認された.

これら変性椎間板での増殖因子の発現は, 本来無血管組織である髓核が線維輪内に止まっている間は周囲への影響が少ないと思われる. しかし, Fig.1の症例のように, いったん線維輪の変性, 断裂により変性髓核が脱出し椎体後縁に接触したり, 靱帯内に迷入したりすると, 同部位に骨増殖因子が作用することとなり, 間葉系細胞の遊走に続いて, 内軟骨性骨化が誘導され, 骨棘や異所性靱帯骨化の原因となるものと思われる (Fig.5).

近い将来, 遺伝子治療などにより, これら増殖因子を制御することが可能になれば椎間板ヘルニアや頸椎症が外科的手術なしで治療, さらに予防可能となるであろう.

結 論

変性椎間板ではBMP-2/-4およびTGF- β 2が発現しており, とくに髓核の合胞細胞で著明であった. また, BMP-2/-4およびTGF- β 2の発現は脱出髓核や骨棘周囲の軟骨細胞, 間葉系細胞でも著明であった. このような脱出髓核を認める症例では後縦靱帯の骨化を認めることが多かった.

BMP-2/-4およびTGF- β 2は骨増殖因子として知られ, 特に軟骨細胞の分化, 増殖や, 骨化に関連していると言われており, 椎間板の変性過程や頸椎症における骨棘形成, 靱帯の骨化に重要な役割を果たしているものと思われる.

なお本論文の要旨は, 第16回日本脊椎外科学会 (2001年6月, 横浜) において発表した.

文 献

1. Baba H, Maezawa Y, Furusawa N, Fukuda M, Uchida K, Kokubo Y, Imura S: Herniated cervical intervertebral discs: histological and immunohistochemical characteristics. *Eur J Histochem* 41: 261-270, 1997
2. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL: TGF- β gene families and bone. *Endocrine Reviews* 15: 27-39, 1994
3. 玄 奉学: 頸椎椎間板の臨床病理学的研究. *日整会誌* 64: 560~571, 1990

4. Groenveld EHJ, Burger EH: Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Euro J Neuroendocrinology* 142: 9-21, 2000
5. Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K, Nagamine T, Origuchi N, Maeda S, Imamura T, Kato M, Yoshida H, Sampath TK, ten Dijke P, Sakou T: Expression and localization of bone morphogenetic proteins and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum. *Bone* 21:23-30, 1997
6. Ishidou Y, Kitajima I, Obama H, Maruyama I, Murata F, Imamura T, Yamada N, ten Dijke P, Miyazono K, Sakou T: Enhanced expression of type I receptors for bone morphogenetic proteins during bone formation. *J Bone Miner Res* 10 (11): 1651-1659, 1995
7. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Donaldson WF, Evans CH: Herniated lumbar intervertebral discs spontaneously produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 21: 271-277, 1996
8. Kang JD, Stefanovic-Racic M, McIntyre LA, Georgescu HI, Evans CH: Toward a biochemical understanding of human intervertebral disc degeneration and herniation. *Spine* 22: 1065-1073, 1997
9. Kawaguchi H, Kurokawa T, Hoshino Y, Kawahara H, Ogata E, Matsumoto T: Immunohistochemical demonstration of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor β in the ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine. *Spine* 17: S33-36, 1992
10. Lianjia Y, Yan J: Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clin Orthop* 257: 249-256, 1990
11. 松永俊二, 大西敏之, 矢崎雄一郎, 石堂康弘, 酒匂 崇: BMPと骨軟骨形成. *整災外* 42: 927-936, 1999
12. Nagano T, Yonenobu K, Miyamoto S, Tohyama M, Ono K: Distribution of the basic fibroblast growth factor and its receptor gene expression in normal and degenerated rat intervertebral discs. *Spine* 20: 1972-1978, 1995
13. Nakase T, Ariga K, Miyamoto S, Okuda S, Tomita T, Iwasaki M, Yonenobu K, Yoshikawa H: Distribution of genes for bone morphogenetic protein-4, -6, growth differentiation factor-5, and bone morphogenetic protein receptors in the process of experimental spondylosis in mice. *J Neurosurg (Spine 1)* 94: 68-75, 2001
14. Noda M, Camilliere JJ: In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor β . *Endocrinology* 124: 2991-2994, 1989
15. Onishi T, Ishidou Y, Nagamine T, Yone K, Imamura T, Kato M, Sampath TK, ten Dijke P, Sakou T: Distinct and overlapping patterns of localization of bone morphogenetic protein (BMP) family members and a BMP type II receptor during fracture healing in rats. *Bone* 22 (6): 605-12, 1998
16. Roark EF, Greer K: Transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro. *Devel Dynam* 200: 103-116, 1994
17. Schmitt JM, Hwang K, Winn SR, Hollinger JO: Bone morphogenetic proteins: An update on basic biology and clinical relevance. *J Orthop Res* 17: 269-278, 1999
18. Seyedin SM, Thompson AY, Bentz H, Rosen DM, McPherson JM, Conti A, Siegel NR, Galluppi GR, Piez KA: Cartilage-inducing factor-A. *J Biological Chemistry* 261: 5693-5695, 1986
19. Shimizu T, Mehdi R, Yoshimura Y, Yoshikawa H, Nomura S, Miyazono K, Takaoka K: Sequential expression of bone morphogenetic protein, tumor necrosis factor, and their receptors in bone-forming reaction after mouse femoral marrow ablation. *Bone* 23 (2): 127-33, 1998
20. Takae R, Matsunaga S, Origuchi N, Yamamoto T, Morimoto N, Suzuki S, Sakou T: Immunolocalization of bone morphogenetic protein and its receptors in degeneration of intervertebral disc. *Spine* 24 (14): 1397-1401, 1999
21. Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150: 893-899, 1965

22. Urist MR, Strates BS: Bone morphogenetic protein. *J Dent Res* 50: 1392-1406, 1971
23. van Beuningen HM, Gransbeek HL, van derKraan PM, van den Berg WB: Differential effects of local application of BMP-2 or TGF- β 1 on both articular cartilage composition and osteophyte formation. *Osteoarthritis and cartilage* 6, 306-317, 1998
24. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Misock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA: Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* 242: 1528-34, 1988
25. Yonemori K, Imamura T, Ishidou Y, Okano T, Matsunaga S, Yoshida H, Kato M, Sampath TK, Miyazono K, ten Dijke P, Sakou T: Bone morphogenetic protein receptors and activin receptors are highly expressed in ossified ligament tissues of patients with ossification of the posterior longitudinal ligament. *Am J Pathol* 150 (4): 1335-1347, 1997

Reviewer's comment : 久保田 紀彦 (福井医科大学 脳神経外科)

頚椎の変性椎間板や骨棘病変の成り立ちを化骨促進のサイトカインを中心に免疫組織学的に検索した興味ある研究である。BMP (Bone Morphogenetic Protein) はすでに15ものisoformが発見されており、その主な働きは軟骨細胞内でプロテオグリカンの合成を刺激し、アルカリフォスファターゼの分泌を高め、副甲状腺レセプターの発現を増加させ、骨細胞の分化を促進させ、骨細胞内でのコラーゲン合成を促進させる骨形成作用の中心となるサイトカインである。

BMPは実験的にも、人体の脊椎疾患 (黄色靱帯骨化症や後縦靱帯骨化症) についてもBMPとそのレセプターの免疫組織学的な検索がなされている。この研究ではBMP-2/4と組織の基質合成に関するTGF- β -2が人体病変の変性椎間板, migrated disc, 骨棘形成部に存在したことを証明した価値ある論文である。今後は骨形成作用に強く関連する他のサイトカイン (OP-1/BMP-7, Acitivinsなど) やそのレセプターの免疫組織的研究や、これらのサイトカインを利用して脊椎変性疾患を制御できる研究に発展することを切望する。

Reviewer's comment : 富永 悌二 (広南病院 脳神経外科)

頚椎椎間板変性に伴う異常骨化を分子生物学的観点から検討した論文である。骨誘導あるいは骨形成促進に関与する物質として報告されてきたBMPおよびTGF- β に着目し、臨床例の変性椎間板での発現を免疫組織学的に検討している。これらの骨増殖因子は、変性椎間板のみならず骨棘周囲の線維軟骨組織でも発現していた。椎間板の変性に伴い骨増殖因子が発現し、変性した髄核の脱出が更に周囲靱帯や骨棘の変性の進行を加速するという筆者等の考察は説得力をもつ。椎間板の関与しない靱帯骨化もあり、異常骨化には他の諸因子が関与しているものと考えられるが、その一因を考察する優れた論文である。今後も更にこの分野での研究の発展が期待される。