

平成 31 年 5 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16697

研究課題名(和文) 脊柱退行変性により誘導される慢性炎症主体の新たな腰部脊柱管狭窄症動物モデルの確立

研究課題名(英文) A Novel Animal Model of Lumbar Spinal Stenosis: Induced by Degeneration and Inflammation

研究代表者

加藤 賢治 (Kato, Kenji)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：60551166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腰部脊柱管狭窄症に対する疾患特異的かつ効果的な薬物治療は、いまだ確立されていない。本研究では腰部脊柱管狭窄症の薬物治療開発のために分子生物学的な病態解明ならびに薬物効果判定に使用できる動物モデルを確立することを目的とした。本研究での動物モデルはラットの椎間関節を手術で切除し、脊柱変形から慢性的に黄色靭帯肥厚を誘導し脊柱管狭窄を発症させるものである。実験ではラットを全身麻酔の後に椎間関節を切除し、不安定性を惹起した。行動解析の実験では間欠性跛行の指標であるロタロッドで歩行時間が短くなると示唆するデータが得られている。今後は実際の黄色靭帯の肥厚程度を組織学的に検討していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰部脊柱管狭窄症の病態は未だ解明されておらず対症療法が主であり薬物無効な場合には手術治療が選択される。しかし高齢ゆえに手術ができない場合もあり、より効果的な疾患特異的な薬物治療確立が大きな課題である。本研究の目的はヒト腰部脊柱管狭窄症の病態に即した動物モデルの確立である。特色は手術でラットの椎間関節切除により脊椎不安定性を惹起し、変形から慢性的に脊柱管狭窄を発症させることである。行動解析の実験では間欠性跛行の指標とするロタロッドで椎間関節切除によりラットの歩行時間が短くなると示唆するデータが得られている。本動物モデルで病態が解明され、新規薬物開発が進められることの社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：The establishment of a disease-specific and effective therapy for lumbar spinal stenosis is a major issue. The purpose of this study was to generate an animal model that can be used to elucidate molecular biological pathology and to determine drug effects in accordance with the pathology of human lumbar spinal stenosis. The animal model in this study is intended to induce degeneration of spine column by resection of intervertebral joint of rats, to chronically develop lumbar spinal stenosis such as hypertrophy of the yellow ligament. The rats were anesthetized, and intervertebral joint was removed to induce instability. In the experiments of Rotarod behavioral analysis, our data suggests that the walking time is shortened by intervertebral joint resection, which is a clinical symptom of intermittent claudication. In the future, it is necessary to examine the degree of thickening of the yellow ligament in histological studies.

研究分野：整形外科

キーワード：腰部脊柱管狭窄症 動物モデル ラットモデル

1. 研究開始当初の背景

(1) 腰部脊柱管狭窄症(以下:狭窄症)は脊椎の退行変性や不安定性に起因する椎間板の骨棘形成、黄色靭帯や椎間関節の肥厚によって、慢性的に徐々に脊柱管の狭窄を来して症状が発現するものである。高齢者に多く、腰痛や下肢痛、間欠性跛行を主症状とし重症例では膀胱直腸障害や下肢麻痺を発症し、日常生活活動性(Activity of daily living: ADL)と生活の質(Quality of life: QOL)が著しく低下する。

しかしながら既存の薬物療法の代表的なProstaglandin製剤などは重症例には無効であることが多く、手術治療が必要となることがあるが、高齢のため全身予備能力などが悪く手術そのものを断念せざるを得ない場合もある。かかる場合の患者のADL障害、QOL障害は大きく社会経済的損失は大きい。ゆえに超高齢社会を迎えた我が国では腰部脊柱管狭窄症に対するより有効な薬物治療の確立が喫緊の課題である。そこで、薬物の開発には狭窄症に対する病態特異的動物モデルの確立が必要である。

(2) 病態特異的動物モデルは、簡便に作成できる、再現性が高い、薬剤効果を判定しうる中等度以上の症状発現を来す、などが必要である。今まででも以下のような狭窄症モデルが報告されている。

1: 脊柱管内シリコン挿入動物モデル

(Ito. et al., Spine. 2007, Watanabe. et al., Eur Spine J. 2007)

2: ラット椎体をワイヤーとプレートで締結し、慢性に狭窄症を発生させるモデル

(Iwamoto. et al., Spine. 1997)

しかしながら、これらのモデルは急性に狭窄を作成するために急性や亜急性炎症を伴い本質的に狭窄症の病態と異なること、またモデル作手技が煩雑かつ複雑で再現性に乏しい事が問題である。

申請者は、簡便で再現性あるウサギ椎間板変性モデル(Masuda et. al., Spine. 2005)を確立するなど脊椎疾患動物モデル作成で豊富な経験を有する University of California, San Diego (UCSD) Orthopaedic Surgery, Professor 舩田浩一先生のもとで研究に従事し、椎間関節切除による脊柱不安定性の惹起が、慢性的に脊柱管狭窄症を発症させるという発想から、椎間関節切除や棘突起切除行くと慢性的に脊柱管狭窄が生じ脊柱管狭窄症に特有な間欠性跛行や疼痛回避行動が生じる事を予備実験で見いだした。

2. 研究の目的

本研究の目的は腰椎椎間関節切除での脊柱不安定性惹起による慢性的な脊柱管狭窄誘導による、ヒト腰部脊柱管狭窄症の病態に即した動物モデルを確立することである。また本動物モデルにより分子生物学的な病態解明、およびこの確立された動物モデルによる新規薬剤開発への応用できるようにすることを目的とする。

3. 研究の方法

平成29年度の計画

【表1】 手術群

(1) 腰部脊柱管狭窄症動物モデルの作成と妥当性の検討

手術方法

雄 Sprague Dawley (SD) ラットを用いて狭窄症モデルを作成する。全身麻酔下にラットを腹臥位として手術を行う。【表1】のように、脊椎の不安定性を誘導する種々の脊椎後方要素切除を行う。初年度にまず予備的にこれら6群、各群4匹ずつで狭窄症の発症の程度を検討する。以下に示す解析によりグループ2~6のうち最適な実験モデルを検討、決定する。この決定された手術群とSham群との2群間で、各群8匹を用いて再度試験をし、最終的に実験群を確定する。

グループ	切除部位
1	Sham群、椎間関節露出のみ。
2	L4/5 椎間関節切除
3	L3/4 椎間関節切除
4	L3/4 および L4/5 椎間関節切除
5	L4/5 椎間関節切除および L4/5 棘間靭帯切除
6	L3/4 および L4/5 椎間関節切除に加え、L3/4 および L4/5 棘間靭帯切除

行動解析及び歩行解析

von Frey テスト、Rotarod テストにて疼痛分析をする。

von Frey テストとは、足底に対して垂直に von Frey Hair が曲がるまで押しつけ、動物が足をあげる機械刺激の閾値を測定する。異常感覚がある場合にはより細いフィラメントでの刺激でラットは反応し足を上げる。

Rotarod テストとは、回転する棒の上にラットをのせて徐々に速度を上げ、ラットが落下するまでの時間を測定するものである。狭窄症の症状が出現すればラットの歩行時間が低下することが予測される。これらテストを各動物の基礎値として術前に測定し、また術後 2 週ごとに施行して手術効果を各群間で比較し、判定する。

画像検査

不安定性、変性の進行を 4 週ごとにレントゲン側面像で確認する。筋緊張により不安定性の程度に差が出ることが危惧されるため、十分な麻酔下にて撮影する。サーモグラフィーを用いて血流の変化を測定する。特に RotaRod テストの前後での変化が期待される。また、脊髄神経の変性の具合を電気生理学的に検討する。

最終的に、屠殺後脊椎を取り出し、マイクロ CT を撮影する。CT 撮影時に血管描出をするため、屠殺前に Microfil を還流する。(Ghanavaati, et al., J Neurosci Methods 2015) 撮影は研究協力者である舩田教授のカリフォルニア大学サンディエゴ校にて行うため、脊椎サンプルは輸送される予定である。舩田教授の研究室はラットのマイクロ CT 撮影に精通しており (Yamaguchi, Masuda et al., Tissue Eng Part C Methods. 2014) 効果的な撮影、解析が可能である。

(2) 作成したモデルを用いての病態解析

モデル決定後に、狭窄症の病態解明のため、組織学的検討、分子生物学的検討を行う。ラットは CT 撮影用とは別に用意する。組織学的検討のために、ラットは PFA 還流固定により屠殺し、脊髄および後根神経節の凍結切片を作成する。疼痛マーカーである CGRP、ATF-3 や Iba1 などを免疫組織化学染色にて検討する。

分子生物学的検討についてはラットは通常屠殺ののち、直ちに脊髄、後根神経節を取り出し、タンパク抽出、RNA 抽出をおこない、タンパク発現、遺伝子発現を検討する。

平成 30 年度の計画

ひきつづき 29 年度と同じく、組織学的検討および分子生物学的検討を行うとともに腰部脊柱管狭窄症動物モデルの臨床前試験への応用として以下の実験を行う。

平成 29 年度に作成した動物モデルを用いて、薬剤効果判定実験を行う。薬剤群とプラセボ群の 2 群間で評価する。薬剤は最初は疼痛軽減作用が期待できる既知の薬剤として「PGE1 製剤」および「buprenorphine」を用いる。これらを行動解析前日に投与し、「行動解析」、「画像検査」、「組織学的検討」、および「分子生物学的検討」を行う。またその結果をもとに「薬物投与量」、「投与間隔」、「投与期間」などに関して詳細に検討を加えて行くが、新たな薬剤、具体的には疼痛コントロール効果を有するプレガバリンや選択的セロトニン再取り込み阻害剤など種々の薬剤効果に関して検討を加えて行く。

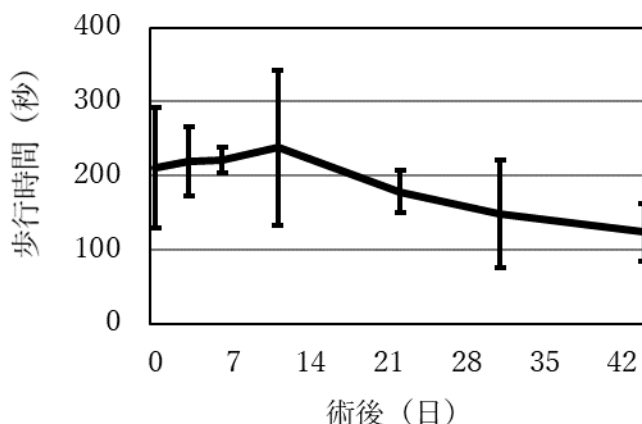
4. 研究成果

(1) 名古屋市立大学動物実験委員会に動物実験プロトコールを新規作成提出し承認を得て動物実験を開始した。最初の購入した実験動物群は Rotarod での歩行訓練が進まず、Rotarod 上を全く歩行しなかった。そのため間欠性跛行の重要な指標である歩行時間、歩行距離の低下を解析することはこの最初の実験動物群ではできなかった。その他の研究検討項目である von Frey テストの判断は可能と考え、手術による動物モデルの実験をすすめた。ラットを全身麻酔の後、後方より脊椎を展開し椎間関節を露出し関節を切除した。同時に棘間靭帯の切除も行い、脊柱の不安定性を惹起した。術後定期的に von Frey テストを継続したが術後 17 週までで疼痛過敏性は認められなかった。疼痛の研究においてのラットは特に変形性膝関節症モデルの場合には雄を用いることが多く当初、本研究も雄を用いて実験を開始した。しかし、雄 SD ラットは成長に伴う体重増加が脊柱管狭窄による疼痛過敏性の誘発より勝る印象でありそのため von Frey テストの長期継続でも疼痛過敏性が確認できなかったのではないかと考えられた。つまり、本動物モデルでの脊柱管狭窄による症状は中等度であり、顕著なものではないと考えられる。さらに言い換えると、本動物モデルは治療可能な中等度な脊柱管狭窄モデルである可能性が示唆され、新規薬物開発においても有用である期待がされる。

(2) 次に動物を雌の SD ラットに変更し同様の実験を行った。この第 2 次動物群は Rotarod での歩行訓練が奏功し歩行を行わせることができた。Rotarod での歩行解析には一定速度でどれだけの距離、時間を継続できるか、または速度を少しずつ上げてどれだけの速度まで対応で

きるかおよびそれまで時間を検討するかという方法がある。一定速度でどれだけの時間歩けるかの検討は検査速度の設定条件が決定しておらず、今回は少しずつ速度を上げる方法で実験を開始した。回転速度は1分間に5回転より開始し10分のうちに1分間に40回転まであがる設定とした。3匹のラットの椎間関節、棘間靭帯切除、および黄色靭帯の一部損傷を行うモデルを検討したところ、6週の経過では Rotarod の解析では経過とともに歩行可能な速度が減少していった。しかし経過が短いからか von Frey テストでは痛覚過敏性を示さなかった。

【図1】 Rotarod



(3) 本研究の成果はこの動物モデルは治療可能なレベルの中等度の脊柱管狭窄症のモデルであることが示唆された。本研究の独創的な点は、現存の急性・亜急性炎症を伴うモデルと異なり、慢性的に脊柱管狭窄を簡便かつ再現性をもって発症させるという点である。学術的特色としては、狭窄症の病態に即した動物モデルが確立される事で現存の脊柱管狭窄症類似モデルを大きく凌駕、発展できる点にある。本研究をとおして、よりよい薬剤治療効果判定が可能となるばかりでなく、より詳細な分子生物学的病態解明をとおして新たな創薬につながる可能性も秘めている。重症者ではADL, QOL低下から大きな社会的損失を伴う狭窄症において、我が国のみならず超高齢社会を迎えた国々における狭窄症治療にブレイクスルーをもたらす可能性があり、高齢者の健康寿命増大に寄与しうるきわめて重要な研究であると確信している。

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。