

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462301

研究課題名(和文)黄色靭帯肥厚の進行予防による新しい腰部脊柱管狭窄症治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new lumbar spinal canal stenosis therapy to prevent the progression of yellow ligament thickening.

研究代表者

堂園 将 (Dohzono, Sho)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号：10618945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究実施計画は、機械的ストレスによる黄色靭帯肥厚モデルが妥当であることを証明すること、黄色靭帯肥厚モデルにおける変化を組織学的あるいは分子生物学的に評価することである。日本白色家兎を用いて、負荷増大椎間をL3/4に設定し、隣接椎間(L2/3とL4/5)を固定した群では術後8週のレントゲン像において椎間に機械的ストレスが集中していることを示した。また、L3/4黄色靭帯の組織評価においては、応力負荷群の黄色靭帯内には軟骨様変化をみとめた。さらに2型コラーゲンの発現が有意に増大しており黄色靭帯組織の変性所見を認めた。

研究成果の概要(英文)：The aims of this research were to prove that yellow ligament thickening model in rabbit is useful, and to assess the changes in the thickened yellow ligament histologically. With regard to , L2/3 and L4/5 were fixed with plates and harvested 8 and 16 weeks after surgery. We found that range of motion at L3/4 increased. With regard to , we found that toluidine blue staining showed red-purple areas, which are known to represent metachromasia indicating cartilagespecific matrix, were prominently increased in the yellow ligament. Moreover, these cells and the matrix were positively stained with an antitype 2 collagen antibody by immunohistochemistry.

研究分野：整形外科

キーワード：黄色靭帯肥厚 機械的ストレス 腰部脊柱管狭窄 ウサギ PCR

1. 研究開始当初の背景

平成17年度の厚生労働省の調査では65歳以上の高齢者比率が20%以上となり今後も高齢社会が加速していくことが推測されている。65歳以上で腰痛・歩行障害を訴える頻度が高く、その原因疾患として腰部脊柱管狭窄症が45%もの割合を占めている。今後は高齢社会の加速に伴い腰部脊柱管狭窄症が増加していくことが予想され、低侵襲かつ低費用な治療の開発は重要な課題である。腰部脊柱管狭窄症とは黄色靭帯の肥厚と椎間板の変性による膨隆で馬尾神経あるいは神経根が圧迫を受けて腰痛や下肢痛などの症状を引き起こす疾患である(図1)。高頻度疾患であるにも関わらず、腰部脊柱管狭窄症の原因である黄色靭帯肥厚に関する研究報告は極めて少なく、組織学的に肥厚黄色靭帯では弾性線維の減少と膠原線維の増加が生じているとの報告が散見されるものの、その分子メカニズムについては未だ解明されていない。また現段階では対症療法を除けば腰部脊柱管狭窄症の根本的な治療は黄色靭帯の外科的切除による除圧しかない。これらのことから黄色靭帯の肥厚のメカニズムの解明は新治療法の開発に重要な意味合いを持つ。

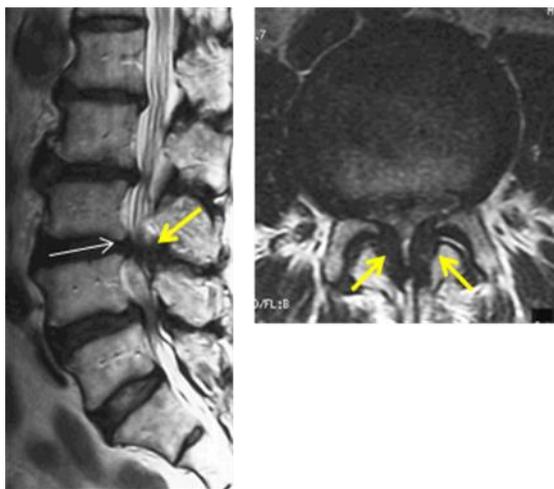


図1;腰部脊柱管狭窄症の典型的MRI。黄色矢印は黄色靭帯の肥厚、白矢印は椎間板の膨隆を示す

2. 研究の目的

我々はまず腰部脊柱管狭窄症罹患患者の手術時に採取された黄色靭帯を組織学的に検証した。黄色靭帯の肥厚には軟骨細胞の発現及びその増殖、それに伴う軟骨基質の増加を認め、黄色靭帯肥厚の原因には軟骨細胞の増殖が関与していることが推測された(図2)。また画像的検討で腰椎不安定性を認めた症例では黄色靭帯における軟骨化生が著明で、BMP signaling に関与する分子の発現上昇も強く、機械的ストレスが黄色靭帯肥厚に関与している可能性が示唆された(図3)。

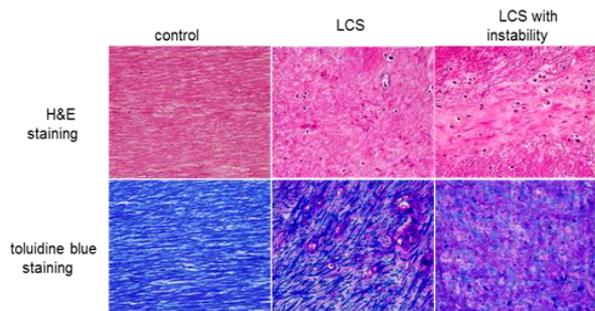


図2 健全な黄色靭帯(control)に比較し腰部脊柱管狭窄症(LCS)患者では細胞数と軟基質(下段赤紫色)が増加しており、特に不安定性を有する場合でその傾向が著明

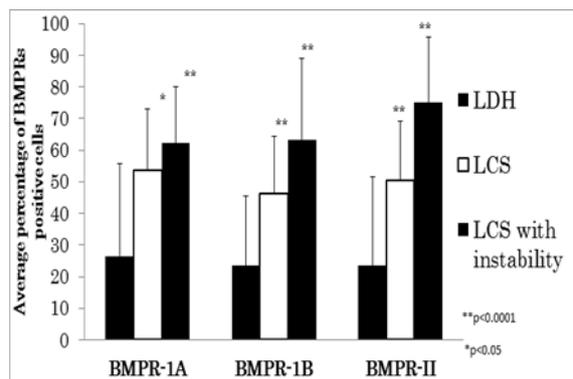


図3 BMP受容体の発現は腰部脊柱管狭窄症(LCS)患者特に不安定性を有する場合(LCS with instability)で高い。

上記の我々の研究を含めこれまでの研究では患者の手術時に採取された黄色靭帯を用いたものであり、多数の不確定因子が関与しているため肥厚メカニズムの解明は困難であった。そこで上述の研究結果と臨床において固定隣接椎間など機械的ストレスが集中する部位で黄色靭帯の肥厚が多いことに基づいて、我々は1椎間に機械的ストレスを意図的に高めることにより黄色靭帯の肥厚モデルを作成出来るのではないかと考えた。本研究の目的は上記動物モデルの妥当性を検証し、黄色靭帯肥厚のメカニズムを組織学および分子生物学的に解明することである。

3. 研究の方法

(1) ウサギを用いた黄色靭帯肥厚モデルの作成と評価

(2) 黄色靭帯肥厚における分子変動の網羅的検索

【対象】

日本白色家兎(手術時週齢20週、♀)

【手術】

負荷増大椎間をL3/4椎間に設定(図4)

① 腰椎側方固定術(L2/3・L4/5に固定プレートを用いて椎間固定(応力集中群))

② アプローチのみの群(sham群)

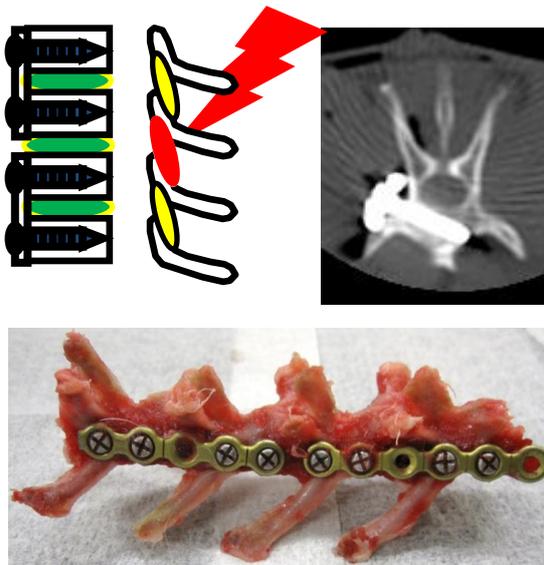


図 4 左上：シエーマ、右上：実際の固定後の CT 写真 下：実際の標本固定後の標本

【使用インプラント】

顎骨用ロッキング・プレート

評価方法

- ・単純レントゲン：前屈および後屈位から L3/4 椎間可動角を計測：術後 8 週および 16 週
- ・組織学的評価：トルイジンブルー (TB)、2 型コラーゲン免疫染色 (Col2)
- ・Quantitative PCR：肥厚が確認されたモデルから得られた黄色靭帯の RNA を抽出し、コントロール群と比較

4. 研究成果

術直後 CT (図 5)

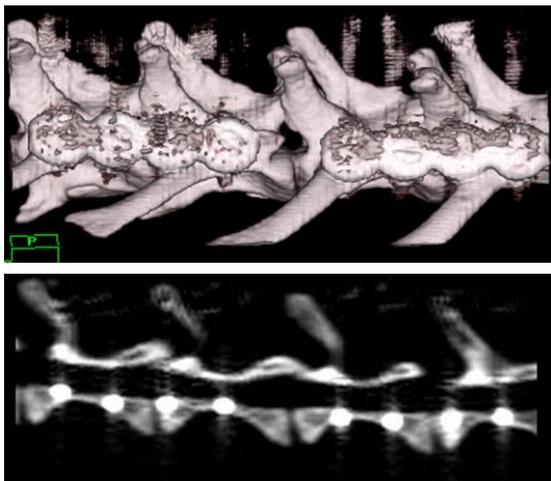
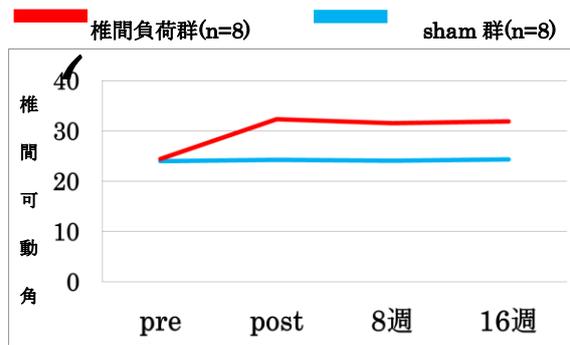


図 5：Screw は椎体を bi-cortical に貫通

レントゲン：術後 8 および 12 週時で、応力集中群の L3/4 レベルでの椎間可動角は Sham 群と比較して有意に増大していた



・組織学的評価

トルイジンブルー染色・II型コラーゲンの免疫染色にて黄色靭帯内に軟骨様の変化を認めた (図 6) これらの変化は人間の肥厚黄色靭帯と類似した変化であり、この動物モデルが黄色靭帯肥厚の動物モデルに値する可能性があるということを示唆している。

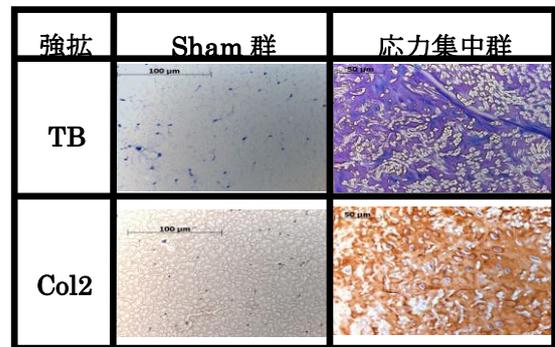


図 6 応力集中群において TB 染色および Col2 染色の濃染みとめた。

術後 8 および 16 週において、応力集中群では sham 群と比較して有意に TB 染色面積が大きく、黄色靭帯の軟骨様変化があることを示した

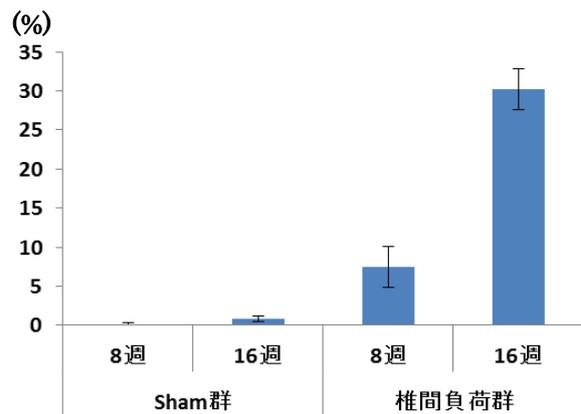


図 7 TB 染色面積

Quantitative PCR

Sham 群と比較して応力集中群で 2 型コラーゲンの発現が有意に増大しており、術後 8 週よりも 16 週の方が有意に増大していた (図 8)

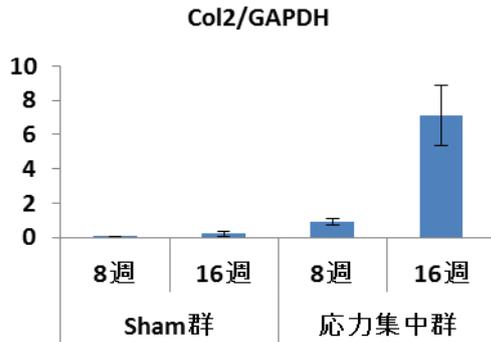


図8 Quantitative PCR

以上の結果から、動物モデルを用いた腰椎負荷モデルにおいても、応力が集中することを、画像動態的評価、組織学的評価、さらに **real-time PCR** による定量的な評価において実証した。また、その軟骨用変化は経時的に増大していた。

<引用文献>

1. Onodera T et al. J Orthop Sci. 2003;8(4):567-76.
2. Shafaq N et al. J Spinal Disord Tech. 2012; Apr;25(2):107-15.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. 発表者：月山国明
 発表演題：力学的負荷により黄色靭帯には弾性線維の破綻と軟骨化生が生じる-隣接椎間固定による椎間負荷増大動物モデルによる検証-
 学会名：第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会
 発表年月日 2013/10/7
 発表場所：幕張メッセ (千葉県千葉市)

2. 発表者：月山国明
 発表演題：力学的負荷により黄色靭帯に弾性線維の破綻と軟骨化生が生じる 椎間負荷増大動物モデルによる検証
 学会名：第 121 回中部日本整形災害外科学会
 発表年月日 2013/10/3
 発表場所：名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

[図書] (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂園 将 (DOHZONO, Sho)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医
 研究者番号：10618945

(2) 研究分担者

寺井 秀富 (TERAI, Hidetomi)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
 研究者番号：20382046

豊田 宏光 (TOYODA, Hiromitsu)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：50514238

中村 博亮 (NAKAMURA, Hiroaki)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：60227931

(3) 研究協力者

月山 国明 (TSUKIYAMA, Kuniaki)