

令和元年6月4日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10790

研究課題名(和文)腰部脊柱管狭窄症における脊柱管内炎症ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the inflammatory network system of the lumbar spinal canal in the patients with lumbar spinal canal stenosis

研究代表者

山畑 仁志(YAMAHATA, Hitoshi)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：70589803

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)：腰部脊柱管狭窄症患者の手術症例より肥厚した黄色靭帯を採取し、免疫組織学的検討を行った。免疫染色で組織内のIL-6, p-STAT3の発現を検討した。IL-6は抗体の問題もあり染色される細胞はfibroblastの一部であったが、p-STAT3は肥厚した組織の血管内皮細胞, fibroblastに発現していた。JAK-STAT系の活性化は確認でき、黄色靭帯の肥厚と相関していた。Fibroblastの培養を試みたが、継代の問題で同様の検討は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯の肥厚への炎症性サイトカインの関わりに関する報告はあるが、IL-6/JAK/STATの靭帯内での発現、作用を調べた報告はない。今回靭帯内でこれらの炎症性サイトカインの発現を認めたことは、同じ脊柱管を構成する因子である椎間板、椎間関節との炎症性サイトカインを介するネットワークが、腰部脊柱管狭窄症の病態に強く関係していることを示唆するものである。今後さらに培養細胞レベルでの発現、阻害因子などを検討することで、新たな治療法に関する知見が得られる可能性が期待出来る。

研究成果の概要(英文)：The thickened yellow ligament was collected from a surgical case of a patient with lumbar spinal canal stenosis and immunohistologically examined. The expression of IL-6 and p-STAT3 in tissues was examined by immunostaining. Although IL-6 was a problem of antibody and the stained cells were part of fibroblasts, p-STAT3 was expressed on vascular endothelial cells and fibroblasts of thickened tissues. Activation of the JAK-STAT system was confirmed and correlated with thickening of the yellow ligament. We tried to cultivate fibroblasts, but it was difficult to consider the same because of the problem of passage.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：腰部脊柱管狭窄症 黄色靭帯 肥厚 JAK-STAT系 炎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

黄色靭帯の肥厚は腰部脊柱管狭窄症の発症に関する重要な要素と考えられている。黄色靭帯は弾性線維、膠原線維によって構成され、出生時は弾性線維が 80%、膠原線維が 20% であるが、加齢とともに弾性線維の割合が減少し、特に肥厚した靭帯では膠原線維に置き換わって癒痕化していることが分かっている (Sairyo et al. Spine 30:2649-2656, 2005)。また、黄色靭帯は解剖学的に硬膜に接する腹側と骨組織に付着する背側の二層構造をしており (Olszewski et al. Spine 21:2307-2312, 1996)、癒痕化は機械的刺激の強い背側に著しいことが分かっている (Sairyo et al. Spine 30:2649-2656, 2005)。癒痕化には様々な炎症性サイトカインの関わっていることが知られており、現在まで TGF- β 、MMP13、IL-6、などの発現が報告されている (Loehr et al. Acta Neurochir 153:134-141, 2011; Lakemeiser et al. J Spinal Disord Tech 26:400-406, 2013; Cui G et al. J Orthop Sci 16:785-790, 2011)。IL-6 は受容体を介して細胞内の JAK/STAT 系を活性化し、細胞の増殖作用、血管新生に関わると考えられるが、黄色靭帯での働きについては、伝達系の発現を含めまだ不明な点が多い。

一方、同じ脊柱管を構成する解剖学的因子である、椎間関節・椎間板においても、炎症性サイトカインについて検討されている。変性した椎間関節の関節嚢における炎症性サイトカインの産生・分泌に関する検討 (Igarashi et al. Spine 29:2091-2095, 2004; Igarashi et al. J Orthop Sci 12:154-160, 2007) や、腰椎椎間板ヘルニアの軟骨細胞における炎症性サイトカイン IL-6 の産生に関する報告 (Kang et al. Spine 21:271-277, 1996) は、脊柱管内における炎症のネットワークの形成を示唆するものである。

我々は腰椎椎間板ヘルニアの臨床検体を用いて、軟骨細胞内で JAK/STAT 系の活性化が起こっていることを証明した (Osuka et al. NeurosciLett 569:55-58, 2014)。我々は IL-6/JAK/STAT 系が脊柱管内炎症ネットワークのキーワードの一つと考えているが、この IL-6/JAK/STAT 系に関する黄色靭帯での検討はまだされていない。

2. 研究の目的

腰部脊柱管狭窄症は高齢者に多く、歩行障害、下肢痛など生活レベルを下げる原因となり、近年高齢化社会の中注目されている疾患である。黄色靭帯は脊柱管の背側に位置し、靭帯が肥厚することで脊柱管の狭小化をきたす。靭帯の肥厚には、加齢や機械的ストレス以外に様々なサイトカインなどが関係していると報告されているが、その細胞内シグナル伝達系には不明な点が多い。一方、脊柱管狭窄症は黄色靭帯肥厚のみではなく、隣接する椎間関節の変性肥厚、椎間板ヘルニアも関わっており、これらの原因にも炎症性サイトカインの影響が示唆されている。IL-6 は代表的な炎症性サイトカインで、細胞内の JAK-STAT 系を活性化することでその作用を現している。我々はこの IL-6/JAK/STAT 系に着目し、脊柱管内の炎症のネットワークを調べ、腰部脊柱管狭窄症の病態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 肥厚した黄色靭帯組織中の JAK/STAT 系の発現と、靭帯の肥厚に対する影響を調べる
こと、(2) 靭帯から採取した組織を培養して、JAK/STAT 系の賦活・制御が細胞に与える
影響を調べること、(3) HMGB-1 の発現を靭帯組織で確認し、靭帯肥厚に対する影響を調

べる事, (4) 培養細胞を用いて, HMGB-1 の IL-6 に対する影響を調べる事, の 4 つの目的達成を目指した。

4. 研究成果

腰部脊柱管狭窄症患者の手術症例より肥厚した黄色靭帯を採取し, IL-6-JAK-STAT 系の発現の有無を調べた。Western blotting では, JAK, STAT3, p-STAT 蛋白の発現を認め, 黄色靭帯組織内での JAK-STAT 系が活性化されていることが確認できた。IL-6 については, ELISA を用いて検討を行ったが, 抗原性の問題か定量的な同定が困難であった。続いて, 免疫染色で組織内での発現, 局在について検討した。IL-6 は抗体の問題もあり染色される細胞は fibroblast の一部であったが, p-STAT3 は肥厚した組織の血管内皮細胞, fibroblast に発現しており, 炎症に関わる因子であるマクロファージには発現していなかった。また実際の症例における MRI 所見での黄色靭帯の肥厚の程度と, 免疫組織での p-STAT3 の発現の間には正の相関があった。以上の結果は 2017 年に論文にまとめ publish された (Yamahata H et al. J Orthopaedic Sci 22:190-196, 2017)。

実際の組織中で JAK-STAT 系の活性化は確認できたが, その上流にあたると考えられる IL-6 との関係については実際の組織では確認が困難であった。そのため, 実際の手術症例から採取した靭帯組織から, fibroblast の培養を行い in vitro での実験系を計画した。培養細胞に対して IL-6 による刺激を行い, 培養細胞内での JAK-STAT 系蛋白の発現, 細胞増殖の程度, 阻害因子を加えることでの反応, を通して, IL-6-JAK-STAT 系の一連の流れを検討する予定であった。しかしながら, 培養細胞の確保, 継代の問題が解決できず, in vitro の実験系の確立に至らず, in vitro の結果を出すことが困難であった。

今回の検討では, 細胞内の JAK-STAT 系の活性化が黄色靭帯の肥厚に強く関係していることを同定できた。In vitro の実験は今後のさらなる検討が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

[Yamahata H](#), [Sugata J](#), [Mori M](#), [Niuro T](#), [Yonenaga M](#), [Yamaguchi S](#), [Hiwatari T](#), [Okada T](#), [Arita K](#), [Yoshimoto K](#). Measurement of cervical sagittal alignment parameters on X-ray films of adults without severe spinal deformity whose shoulder hides the lower cervical column. World Neurosurg. 121 : e147-e153, 2019 DOI: 10.1016/j.wneu.2018.09.051. 査読有

[Yamahata H](#), [Niuro T](#), [Mori M](#), [Yamaguchi S](#), [Yonenaga M](#), [Sugata J](#), [Hiwatari T](#), [Okada T](#), [Atsuchi M](#), [Arita K](#), [Yoshimoto K](#). Is the atlas size associated with the pathophysiology of symptomatic spinal canal stenosis at the C1 level? J Clin Neurosci. 57 : 58-62, 2018 DOI: 10.1016/j.jocn.2018.08.036. 査読有

[Yamahata H](#), [Hirano H](#), [Yamaguchi S](#), [Mori M](#), [Niuro T](#), [Tokimura H](#), [Arita K](#). What Is the Most Representative Parameter for Describing the Size of the Atlas? CT Morphometric Analysis of the Atlas with Special Reference to Atlas Hypoplasia. Neurol Med Chir (Tokyo). 57 : 461-466, 2017 DOI: 10.2176/nmc.oe.2017-0055. 査読有

[Yamahata H](#), [Osuka K](#), [Aoyama T](#), [Yasuda M](#), [Tokimura H](#), [Arita K](#), [Takayasu M](#): Expression of the JAK/STAT signaling pathway in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis. J Orthop Sci. 22 : 190-196, 2017 DOI: 10.1016 / j.jos.2016.11.005. 査読有

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平野 宏文

ローマ字氏名：HIRANO Hirofumi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学総合研究科

職名：客員研究員

研究者番号（8桁）：00264416

研究分担者氏名：大須賀 浩二

ローマ字氏名：OSUKA Koji

所属研究機関名：愛知医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：40378013

研究分担者氏名：有田 和徳

ローマ字氏名：ARITA Kazunori

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学総合研究科

職名：客員研究員

研究者番号（8桁）：90212646

(2)研究協力者

研究協力者なし。

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。