

令和元年6月19日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15668

研究課題名(和文)黄色靭帯肥厚の分子生物学的メカニズムの解明と新規薬物治療法の開発

研究課題名(英文) Macrophage Infiltration is a Causative Factor for Ligamentum Flavum Hypertrophy through the Activation of Collagen Production in Fibroblasts

研究代表者

岡田 誠司 (Okada, Seiji)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：30448435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：腰部脊柱管狭窄症は中高齢者に好発し、下肢の痛みとしびれや歩行障害をきたすことにより著しい日常生活動作の低下をもたらす疾患である。この主な原因は黄色靭帯の肥厚による馬尾神経圧迫であるが、肥厚の要因となる細胞群や原因遺伝子を含め、そのメカニズムは殆ど解明されていなかった。我々はマウスモデルを用いて、メカニカルストレスの蓄積とマクロファージの浸潤がその要因であることを明らかにした。これらの知見は腰部脊柱管狭窄症に対する治療に新しい治療戦略に繋がるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の成果は、黄色靭帯肥厚の分子生物学的メカニズムにアプローチした初めての報告であり、同時に黄色靭帯肥厚研究における再現性のあるマウスモデルを確立したものである。現在、黄色靭帯肥厚による腰部脊柱管狭窄症や神経根圧迫による下肢症状に対しては、手術加療による黄色靭帯切除しかないが、将来的には1型コラーゲンの融解などで低侵襲に病態を改善できる可能性があり、本研究で確立した動物モデルが有効に活用されるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Ligamentum flavum (LF) hypertrophy causes lumbar spinal canal stenosis, leading to leg pain and disability in activities of daily living in elderly individuals. Although there have been previous studies on LF hypertrophy, its pathomechanisms have not fully elucidated. In this study, we demonstrated that infiltrating macrophages were a causative factor for LF hypertrophy. Induction of macrophages into the mouse LF by applying a micro-injury resulted in LF hypertrophy along with collagen accumulation and fibroblasts proliferation at the injured site, which were very similar to the characteristics observed in the severely hypertrophied LF of human. However, we found that macrophage depletion by injecting clodronate-containing liposomes counteracted LF hypertrophy even with micro-injury. These results suggested that macrophage infiltration was crucial for LF hypertrophy by stimulating collagen production in fibroblasts, providing better understanding the pathophysiology of LF hypertrophy.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：黄色靭帯 腰部脊柱管狭窄症

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

### 1. 研究開始当初の背景

腰部脊柱管狭窄症は中高齢者に好発し、下肢の痛み・しびれや歩行障害をきたすことにより著しい日常生活動作の低下をもたらす疾患である。本疾患の主な病因は黄色靭帯の肥厚による馬尾神経圧迫であるが、この黄色靭帯の肥厚に関しては、加齢や腰椎不安定性が関与することが推測されているものの、肥厚の要因となる細胞群や原因遺伝子を含め、そのメカニズムは殆ど解明されていない。これは、黄色靭帯が無血管組織であり、殆ど線維芽細胞のみから構成されているという解剖学的特性が関与していると考えられる。従来の研究では、若年者椎間板ヘルニア患者から採取された『肥厚していない黄色靭帯』と、腰部脊柱管狭窄症患者から摘出された肥厚黄色靭帯の組織学的な比較により、肥厚した黄色靭帯では 膠原線維の増加、弾性繊維の断片化、血管新生が認められることなどは明らかになっているが、どのような細胞が膠原繊維を産生するのか、肥厚した靭帯では細胞数に変化は認められるのか、などの基本的なことが解明されていない。分子的な考察も組織全体を用いた解析しか行われていないため、線維化に重要である増殖因子 TGF- $\beta$  が肥厚黄色靭帯では発現が増加しているとの報告はあるが、その分泌ソースや作用する細胞も全く不明である。すなわち、これらの病理的变化は肥厚の原因ではなく、単に結果を観察しているに過ぎない可能性が高い。そこで我々は、黄色靭帯肥厚の分子生物学的メカニズムを明らかにするためには、疾患を再現した適切な動物モデルが有効であると考えた。

### 2. 研究の目的

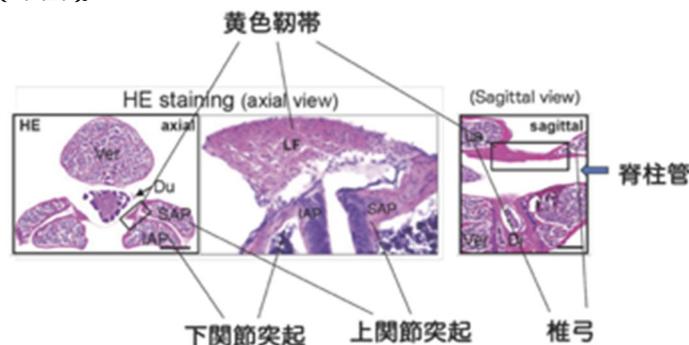
本研究の目的は、メカニカルストレスによる黄色靭帯肥厚の動物モデルを確立し、肥厚現象を段階的かつ細胞生物学的に解析することで黄色靭帯肥厚の包括的なメカニズムを明らかにすることである。特に、肥厚黄色靭帯の全体的な組織像ではなく、レーザーマイクロダイセクションなどの先駆的な技術を用いて細胞選択的に発現遺伝子の解析を行うことで、黄色靭帯肥厚の細胞特性と分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

実験動物は成体 B6 マウス(雌)8 週齢を用いた。まず、マウスにおける黄色靭帯が解析可能な組織であるか、さらにはヒト黄色靭帯との解剖学的相関があるかどうかを HE 染色ならびに EVG 染色にて確認した。次に、腰椎への持続的な機械的刺激を負荷するために、独自のデバイスを作成し、メカニカルストレスによる持続的応力負荷を、第 6/7 腰椎に集中させるというマウス黄色靭帯肥厚モデルの作成を試みた。黄色靭帯の肥厚は axial 薄切片にて定量し、BrdU 投与にて細胞増殖を評価した。また、弾性繊維および膠原繊維量に関しては EVG 染色にて評価した。炎症性サイトカインならびに線維化に重要である TGF- $\beta$ 、筋繊維芽細胞のマーカーである SMA の発現遺伝子を定量的 RT-PCR にて比較した。末梢血からの炎症細胞浸潤を評価するために、放射線照射を行なったマウスに GFP マウス由来の骨髄を移植し、末梢血を GFP 陽性細胞に置き換えたキメラマウスを作成した。また、線維芽細胞を同定するために、Col1-TG マウスを用いた。マクロファージの染色は CD11b 抗体を用いて免疫染色を行なった。線維芽細胞選択的な発現遺伝子を解析するために、Col1-TG マウスの黄色靭帯凍結切片を用いてレーザーマイクロダイセクションによる GFP 陽性細胞の選択的回収を行い、定量的 RT-PCR を行なった。全ての実験は、当該施設の動物実験委員会ならびに生命倫理委員会の承認を得た遺伝子組み換え実験・動物実験計画書に基づき行われた。

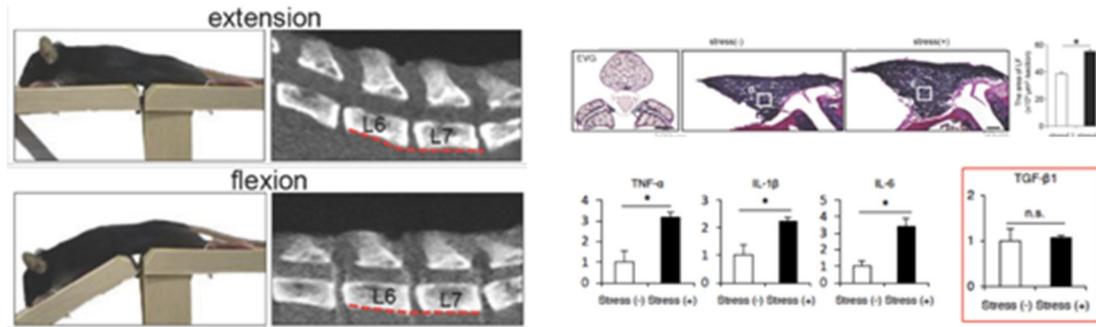
### 4. 研究成果

まず、マウスの腰椎部を解剖したところ、黄色靭帯は上関節突起と下関節突起の間に存在し、sagittal 切片でも脊柱管の背側を走行しており、さらに上位椎弓の下部 2/3 から下位椎弓頭側に付着していた(下図)。



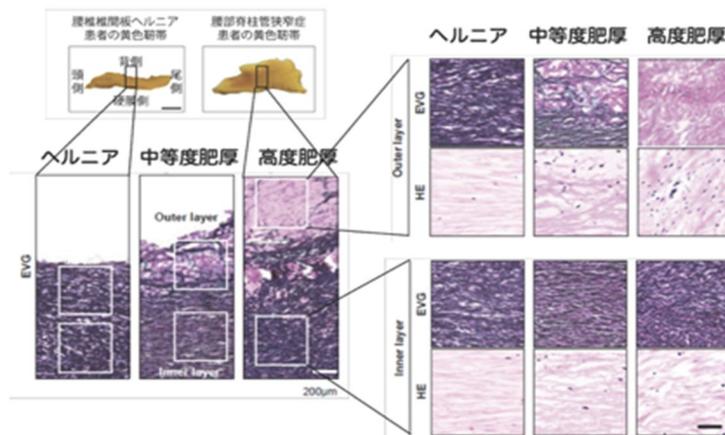
これはほぼヒト黄色靭帯と同様の解剖学的特徴を有しており、マウスモデルを用いた黄色靭帯研究が可能であることが確認された。次に、メカニカルストレスの持続的負荷が黄色靭帯の肥厚を生じられるかを検討するため、L6/7 部に応力が集中する様な自家製のデバイスを作成した。これは、図の様に 1 分間に 20 サイクルの腰椎伸展と屈曲を強制的に繰り返すデバイスであり、麻酔下のマウスを 1 日 3 時間、12 週間の負荷をかけ続けた。

その結果、12週間後には有意な黄色靭帯の肥厚を認め、コラーゲン繊維の増加とエラスチン繊維の走行の乱れを確認した。しかしながら、核染色にて細胞数の有意な増加は確認したが、GFP陽性の末梢血の浸潤は認めなかった。さらに、IL-1 や IL-6 などの炎症性サイトカインの発現上昇は認められたものの、線維化に重要であると言われる TGF- $\beta$ 1 の遺伝子発現に変化は見られなかった。

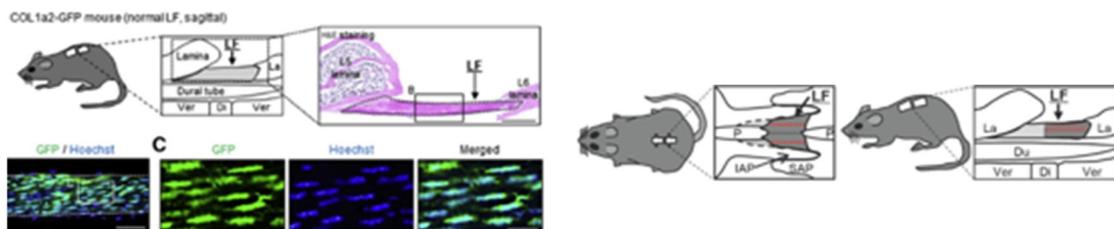


さらに、ヒト脊柱管狭窄症患者の肥厚黄色靭帯と比較した場合、組織学的な構築は重度飛行ではなく、中等度の肥厚に相当しており、さらなる負荷の持続が必要と考えられた。しかし、6ヶ月の負荷を加えたマウスに於いても同様の結果であった。

そこで、再度ヒト黄色靭帯のサンプルを詳細に観察したところ、非常に興味深い所見が得られた。すなわち、正常黄色靭帯でも高度に肥厚した黄色靭帯でも、腹側（硬膜側）ではほぼ同様な弾性繊維の構築が保たれているが、高度に肥厚した黄色靭帯では背側にコラーゲンの層のみが地層が積み重なる様に堆積することで全体の厚みが増していることに気がついた。しかも、この堆積したコラーゲン層には豊富な細胞成分を認め、これらは浸潤したマクロファージであることが明らかとなった。



そこで、黄色靭帯肥厚に対するマクロファージの役割を明らかにするため、線維芽細胞選択的にGFPを発現する Col1a2-EGFP マウスを用いて実験することとした。

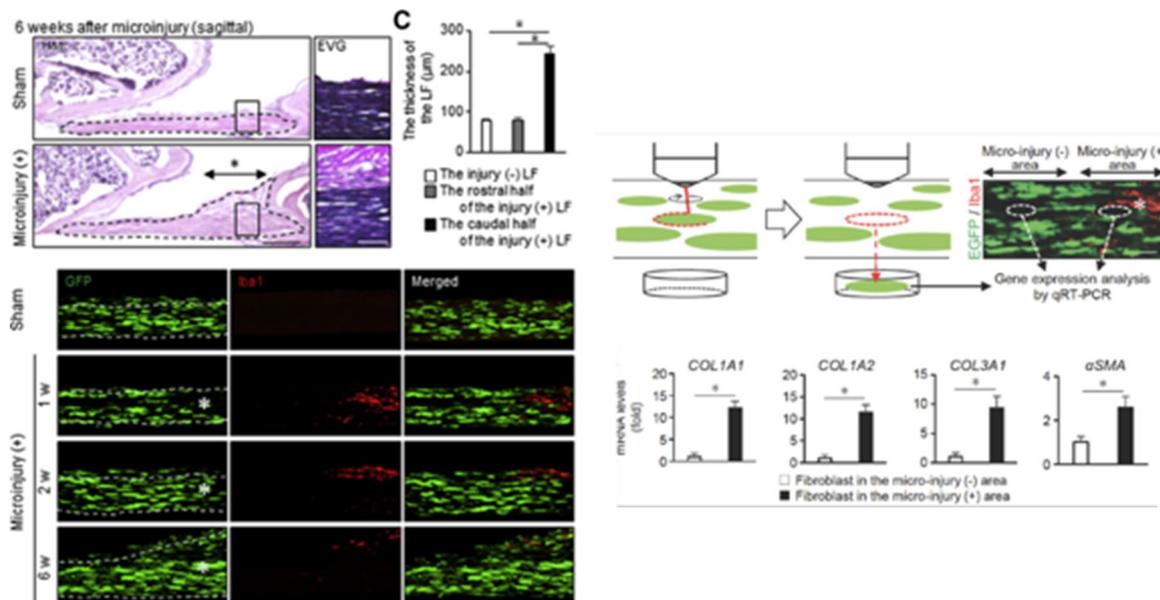


このマウスを用いて黄色靭帯を観察したところ、上図の如くほぼ全ての黄色靭帯を構成する細胞は GFP 陽性の線維芽細胞であり、黄色靭帯は線維芽細胞より構成される組織であることが確認された。このマウスを用いて黄色靭帯の尾側 1/2 にメスにて micro-injury を加えてマクロファージの浸潤を誘導し、黄色靭帯が肥厚するかを解析した。

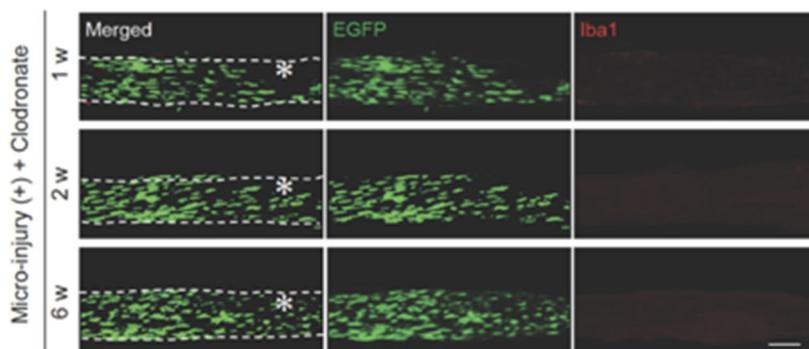
その結果、micro-injury を加えた部分のみが肥厚し、特にその肥厚様式がヒト高度肥厚黄色靭帯と同じく、コラーゲン層のみが堆積して全体が肥厚するという興味深い結果が得られた。免疫染色によっても、マクロファージが浸潤した部分を中心に黄色靭帯が肥厚していることを確認した。

さらに、レーザーマイクロダイセクションを用いて、マクロファージ浸潤近傍の線維芽細胞と非損傷部の線維芽細胞を選択的に採取し遺伝子発現を比較したところ、損傷部の線維芽細胞に

於いてはコラーゲンの遺伝子発現が上昇し、筋繊維芽細胞のマーカーである SMA の上昇も確認していた。



実際、クロドロナートを投与し末梢血中の単球を枯渇させた状態で同様に黄色靭帯に micro-injury を加え、同様に 6 週間観察したが、わずかな修復反応は認められるものの肥厚は生じておらず、micro-injury ではなく、浸潤マクロファージが黄色靭帯に決定的な役割を果たしていることを明らかにした。



このメカニズムについては明らかではないが、肺の繊維化に於いて TGF- $\beta$  が ADAM10 の発現を上昇させ、この ADAM10 がエフリン B4 を shedding することで線維芽細胞の活性化が生じることが報告されている (Nat Med, 23:1405-, 2017)。我々は、浸潤マクロファージによる TGF- $\beta$  が黄色靭帯肥厚に重要な役割を果たしているものと推測している。これらの結果は、黄色靭帯肥厚の分子生物学的メカニズムにアプローチした初めての報告であり、同時に黄色靭帯肥厚研究における再現性のあるマウスモデルを確立した。現在、黄色靭帯肥厚による腰部脊柱管狭窄症や神経根圧迫による下肢症状に対しては、手術加療による黄色靭帯切除しかないが、将来的には 1 型コラーゲンの融解などで低侵襲に病態を改善できる可能性があり、本研究で確立した動物モデルが有効に活用されるものと考えている。

## 5. 主な発表論文等 (計 24 件、すべて査読あり)

(研究代表者に下線、研究代表者が corresponding author の場合は\*印)

1. Kobayakawa K, Ohkawa Y, Yoshizaki S, Tamaru T, Saito T, Kijima K, Yokota K, Hara M, Kubota K, Matsumoto Y, Harimaya K, Ozato K, Masuda T, Tsuda M, Tamura T, Inoue K, Edgerton VR, Iwamoto Y, Nakashima Y, Okada S\*. Macrophage centripetal migration drives spontaneous healing process after spinal cord injury. Sci Adv. 2019 May 15;5(5):eaav5086. doi: 10.1126/sciadv.aav5086.
2. Baba S, Matsumoto Y, Kawaguchi K, Iida K, Saiwai H, Okada S, Matsunobu A, Shioyama Y, Nakashima Y. Post-carbon-ion radiotherapy vertebral pathological fractures in upper cervical primary malignant spinal tumors treated by occipito-cervical fusion. Arch Orthop Trauma Surg. 2019 Apr 3. doi: 10.1007/s00402-019-03183-x.
3. Kijima K, Kubota K, Hara M, Kobayakawa K, Yokota K, Saito T, Yoshizaki S, Maeda T, Konno D, Matsumoto Y, Nakashima Y, Okada S\*. The acute phase serum zinc

- concentration is a reliable biomarker for predicting the functional outcome after spinal cord injury. *EBioMedicine*. 2019 Mar;41:659-669. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.03.003.
4. Saiwai H, Okada S, Kawaguchi KI, Saito T, Hayashida M, Matsushita A, Matsumoto Y, Nakashima Y. Prone position surgery for a professional sumo wrestler with thoracic ossification of the posterior longitudinal ligament resulting in intraoperative brachial plexus injury by hypertrophic pectoral muscles. *J Clin Neurosci*. 2019 May;63:227-230. doi: 10.1016/j.jocn.2019.01.047.
  5. Yokota K, Kubota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Maeda T, Katoh H, Ohkawa Y, Nakashima Y, Okada S\*. Pathological changes of distal motor neurons after complete spinal cord injury. *Mol Brain*. 2019 Jan 9;12(1):4. doi: 10.1186/s13041-018-0422-3.
  6. Yamada H, Ozawa T, Kishi H, Okada S, Nakashima Y, Muraguchi A, Yoshikai Y. B Cells Expressing Cyclic Citrullinated Peptide-Specific Antigen Receptor Are Tolerized in Normal Conditions. *J Immunol*. 2018 Dec 15;201(12):3492-3496. doi: 10.4049/jimmunol.1800826.
  7. Hara M, Yokota K, Saito T, Kobayakawa K, Kijima K, Yoshizaki S, Okazaki K, Yoshida S, Matsumoto Y, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S\*. Periostin Promotes Fibroblast Migration and Inhibits Muscle Repair After Skeletal Muscle Injury. *J Bone Joint Surg Am*. 2018 Aug 15;100(16):e108. doi: 10.2106/JBJS.17.01230.
  8. Bekki H, Harimaya K, Matsumoto Y, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Nakashima Y. Which Side-Bending X-ray Position is Better to Evaluate the Preoperative Curve Flexibility in Adolescent Idiopathic Scoliosis Patients, Supine or Prone? *Asian Spine J*. 2018 Aug;12(4):632-638. doi: 10.31616/asj.2018.12.4.632.
  9. Kawaguchi K, Harimaya K, Matsumoto Y, Hayashida M, Okada S, Iida K, Kato G, Tsuchiya K, Doi T, Oda Y, Iwamoto Y, Nakashima Y. Effect of cartilaginous endplates on extruded disc resorption in lumbar disc herniation. *PLoS One*. 2018 Apr 17;13(4):e0195946. doi: 10.1371/journal.pone.0195946.
  10. Harada A, Maehara K, Ono Y, Taguchi H, Yoshioka K, Kitajima Y, Xie Y, Sato Y, Iwasaki T, Nogami J, Okada S, Komatsu T, Semba Y, Takemoto T, Kimura H, Kurumizaka H, Ohkawa Y. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun*. 2018 Apr 11;9(1):1400. doi: 10.1038/s41467-018-03845-1.
  11. Yugué I, Okada S, Maeda T, Ueta T, Shiba K. Sensitivity and specificity of the 'knee-up test' for estimation of the American Spinal Injury Association Impairment Scale in patients with acute motor incomplete cervical spinal cord injury. *Spinal Cord*. 2018 Apr;56(4):347-354. doi: 10.1038/s41393-017-0046-y.
  12. Okada S\*, Hara M, Kobayakawa K, Matsumoto Y, Nakashima Y. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. *Neurosci Res*. 2018 Jan;126:39-43. doi: 10.1016/j.neures.2017.10.004.
  13. Iida K, Matsumoto Y, Setsu N, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Nakashima Y. The neurological outcome of radiotherapy versus surgery in patients with metastatic spinal cord compression presenting with myelopathy. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2018 Jan;138(1):7-12. doi: 10.1007/s00402-017-2817-5.
  14. Saito T, Hara M, Kumamaru H, Kobayakawa K, Yokota K, Kijima K, Yoshizaki S, Harimaya K, Matsumoto Y, Kawaguchi K, Hayashida M, Inagaki Y, Shiba K, Nakashima Y, Okada S\*. Macrophage Infiltration Is a Causative Factor for Ligamentum Flavum Hypertrophy through the Activation of Collagen Production in Fibroblasts. *Am J Pathol*. 2017 Dec;187(12):2831-2840. doi: 10.1016/j.ajpath.2017.08.020.
  15. Matsumoto Y, Baba S, Endo M, Setsu N, Iida K, Fukushi JI, Kawaguchi K, Okada S, Bekki H, Isoda T, Kitamura Y, Honda H, Nakashima Y. Metabolic Tumor Volume by 18F-FDG PET/CT Can Predict the Clinical Outcome of Primary Malignant Spine/Spinal Tumors. *Biomed Res Int*. 2017;2017:8132676. doi: 10.1155/2017/8132676.
  16. Matsumoto Y, Shinoto M, Endo M, Setsu N, Iida K, Fukushi JI, Kawaguchi K, Okada S, Bekki H, Imai R, Kamada T, Shioyama Y, Nakashima Y. Evaluation of Risk Factors for Vertebral Compression Fracture after Carbon-Ion Radiotherapy for Primary Spinal and Paraspinal Sarcoma. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9467402. doi: 10.1155/2017/9467402.
  17. Renault-Mihara F, Mukaino M, Shinozaki M, Kumamaru H, Kawase S, Baudoux M, Ishibashi T, Kawabata S, Nishiyama Y, Sugai K, Yasutake K, Okada S, Nakamura M, Okano H. Regulation of RhoA by STAT3 coordinates glial scar formation. *J Cell*

- Biol. 2017 Aug 7;216(8):2533-2550. doi: 10.1083/jcb.201610102.
18. Hara M, Kobayakawa K, Ohkawa Y, Kumamaru H, Yokota K, Saito T, Kijima K, Yoshizaki S, Harimaya K, Nakashima Y, Okada S\*. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. *Nat Med*. 2017 Jul;23(7):818-828. doi: 10.1038/nm.4354.
  19. Semba Y, Harada A, Maehara K, Oki S, Meno C, Ueda J, Yamagata K, Suzuki A, Onimaru M, Nogami J, Okada S, Akashi K, Ohkawa Y. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2017 Sep 6;45(15):8758-8772. doi: 10.1093/nar/gkx475.
  20. Yokoyama N, Matsunobu T, Matsumoto Y, Fukushi JI, Endo M, Hatano M, Nabeshima A, Fukushima S, Okada S, Iwamoto Y. Activation of ERK1/2 Causes Pazopanib Resistance via Downregulation of DUSP6 in Synovial Sarcoma Cells. *Sci Rep*. 2017 Mar 28;7:45332. doi: 10.1038/srep45332.
  21. Yokota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Ohkawa Y, Harada A, Okazaki K, Ishihara K, Yoshida S, Kudo A, Iwamoto Y, Okada S\*. Periostin Promotes Scar Formation through the Interaction between Pericytes and Infiltrating Monocytes/Macrophages after Spinal Cord Injury. *Am J Pathol*. 2017 Mar;187(3):639-653. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.11.010.
  22. Saito T, Yokota K, Kobayakawa K, Hara M, Kubota K, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Matsumoto Y, Doi T, Shiba K, Nakashima Y, Okada S\*. Experimental Mouse Model of Lumbar Ligamentum Flavum Hypertrophy. *PLoS One*. 2017 Jan 6;12(1):e0169717. doi: 10.1371/journal.pone.0169717.
  23. Matsumoto Y, Matsunobu T, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Bone and soft tissue tumors presenting as sciatic notch dumbbell masses: A critical differential diagnosis of sciatica. *World J Clin Oncol*. 2016 Oct 10;7(5):414-419.
  24. Matsumoto Y, Harimaya K, Kawaguchi K, Hayashida M, Okada S, Doi T, Iwamoto Y. Dumbbell Scoring System: A New Method for the Differential Diagnosis of Malignant and Benign Spinal Dumbbell Tumors. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2016 Oct 15;41(20):E1230-E1236.

〔雑誌論文〕(計 24件)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 岡田誠司、幸博和、松下昌史、林田光正、川口謙一、中島康晴. マウスモデルを用いた黄色靭帯の肥厚メカニズム解析. 第91回日本整形外科学会学術総会 (2018.5.24-27, 神戸).
2. 岡田誠司、斉藤武恭、幸博和、松下昌史、林田光正、川口謙一、中島康晴. 黄色靭帯の肥厚メカニズム解明. 第47回日本脊椎脊髄病学会(2018.4.12-14 神戸).
3. Okada S. Disturbance of ribcage development causes progressive thoracic scoliosis. The 12<sup>th</sup> Asia Travelling Fellowship of Japanese Society of Spine Research (Sept 25, 2017, Beijing, China).
4. Okada S. Spinal Cord Regeneration and Astroglia. The 21<sup>th</sup> Seminar of the Study Group for Spine and Nerve (Mar 24, 2018, Tokyo).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/pathophysiology/index.html>

## 6. 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)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。