

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18506

研究課題名（和文）脊柱管狭窄症の新しい動物モデル 病態解明、臨床症状も判断可能なラットモデル

研究課題名（英文）A new animal model of lumbar spinal stenosis

研究代表者

加藤 賢治（KATO, Kenji）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：60551166

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：腰部脊柱管狭窄症の主因とされる神経を圧迫する黄色靭帯が肥厚するメカニズムはいまだ解明されておらず、進行予防のための治療は確立されておらず、現在可能な薬物療法は対症療法のみである。本研究では、薬剤開発や薬剤評価に使用が期待される動物モデルを作成し、そのメカニズムを検討した。ラット腰椎の椎間関節、棘間靭帯を切除することによる腰椎の不安定性は黄色靭帯を肥厚することが確認された。その黄色靭帯内ではタンパク異化を誘導する酵素や、組織修復、血管新生を示唆するたんぱくが発現することを確認することができ、黄色靭帯肥厚のメカニズムの研究を進められる動物モデルであると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰部脊柱管狭窄症の患者数は高齢化に伴い非常に多くなっている。経年的な変化によるものである程度の変形や脊柱管狭窄は防ぎようがないものであるが、本研究により黄色靭帯肥厚には異化タンパクが関与している可能性や、組織修復過程の過剰な反応が関与していることが示唆され、それらの発現を抑制することが肥厚の予防につながる可能性が考えられた。本動物モデルにより黄色靭帯肥厚の細胞レベルでメカニズム解明を進めることにより、脊柱管狭窄患者数の抑制を期待できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of thickening of the ligamentum flavum, which compresses nerves, which is the main cause of lumbar spinal canal stenosis, has not yet been elucidated, and no treatment has been established to prevent progression, and currently available drug therapy is only symptomatic treatment. In this study, we created an animal model that is expected to be used for drug development and drug evaluation. It was confirmed that lumbar instability caused by resection of the facet joints and interspinous ligaments in rat lumbar vertebrae caused thickening of the ligamentum flavum. It has been confirmed that enzymes that induce protein catabolism and proteins that suggest tissue repair and angiogenesis are expressed within the ligamentum flavum. We conclude that this animal model can be used to study the mechanism of ligamentum flavum thickening.

研究分野：整形外科

キーワード：腰部脊柱管狭窄症 黄色靭帯 動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

腰椎の変性、不安定性などに起因する腰部脊柱管狭窄症(狭窄症)は腰痛や下肢痛を主訴とする高齢者に多い疾患である。疼痛のために日常生活に支障をきたし、超高齢社会を迎えた日本においては社会的損失が非常に大きいものである。要因のひとつである黄色靭帯の肥厚メカニズムなどはいまだ解明されておらず有効な薬物療法が開発されていない。本研究の目的は行動解析により疼痛を客観的に判断することのできるラットを用いて狭窄症の動物モデルを確立することである。動物モデルで脊柱管狭窄を誘導し、脊柱管狭窄、黄色靭帯肥厚のメカニズムを究明する。本モデルは臨床症状を評価でき、薬剤の臨床前試験など創薬の開発への応用が期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は行動解析により疼痛を客観的に判断することのできるラットを用いて狭窄症の動物モデルを確立することである。ラットの脊柱後方要素を部分切除し、変性を惹起し脊柱管狭窄を誘導し、組織学的、分子生物学的に脊柱管狭窄、黄色靭帯肥厚のメカニズムを究明する。

## 3. 研究の方法

全身麻酔下に Sprague-Dawley ラットの脊柱後方要素である椎間関節、棘間靭帯を部分的に切除し脊柱に不安定性を惹起させる。対照は後方要素を展開するのみの Sham 手術群である。病態解析のため、ラットの行動解析による臨床症状と、組織学的、分子生物学的に検討する。

狭窄症の病態に基づいた最適な動物モデル作成とその妥当性の検討。

1. 椎間関節切除(不安定性の惹起) 2. 棘間靭帯切除(不安定性の惹起) 3. 黄色靭帯切開による損傷(損傷による狭窄、炎症の誘導)。これらの組み合わせでモデルを作成する。臨床症状の評価として以下の評価を行う。 a. 疼痛関連行動評価: von Frey テスト。 b. 間欠性跛行評価: rotarod テストを用いた歩行距離評価。 c. 形態学的評価: マイクロ CT、単純レントゲン撮影、組織学的検討

作成したモデルを使用した狭窄症の病態解析。

病態解析のためにラットの安楽死後に脊柱、および後根神経節を摘出し、組織学的、分子生物学的に検討する。黄色靭帯肥厚の狭窄程度は HE 染色により形態学的に確認する。椎間板の変性程度、および肥厚した黄色靭帯の軟骨化変性はサフラニン O 染色などで確認する。後根神経節において疼痛の指標とされる CGRP や Iba など免疫染色にて確認する。

狭窄症による疼痛メカニズムの究明

黄色靭帯の肥厚は腰椎の不安定性に炎症が加わるとより増大するとの報告がある。その炎症が疼痛に関与していないかを追究する。ヒト黄色靭帯で検討を行う。黄色靭帯は組織培養、および酵素融解による細胞単層培養を行う。初代培養での分泌、または IL-1 や TNF 刺激による分泌される疼痛物質の比較検討を ELISA 法にて比較する。細胞内メカニズムとして Ca チャネルの発現量、MAP キナーゼ、NF- $\kappa$ B 経路などのリン酸化シグナル伝達の関与を解明する。

#### 4. 研究成果

狭窄症の病態に基づいた最適な動物モデル作成とその妥当性の検討。

検討した黄色靭帯肥厚モデルは、脊椎後方の棘間靭帯、L4 下関節突起切除により動揺性を誘導したモデルとし、Sham 手術群と検討した。

Rotarod テストにおいて、ラットは術前に訓練を行うことにより、5 分間続けて歩けるようになった。術後、5 週ほどから手術群と対照群の間に差がみられ、実験手術群は歩行時間が短くなる傾向があった（図 1. 青: Experimental、手術群、黄色靭帯肥厚モデル。橙: control、Sham 手術群、対照）。

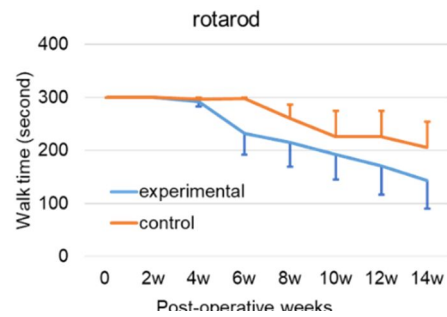


図 1

作成したモデルを使用した狭窄症の病態解析。

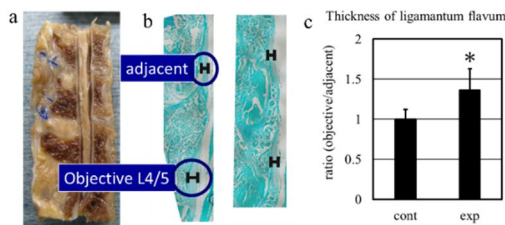


図 2

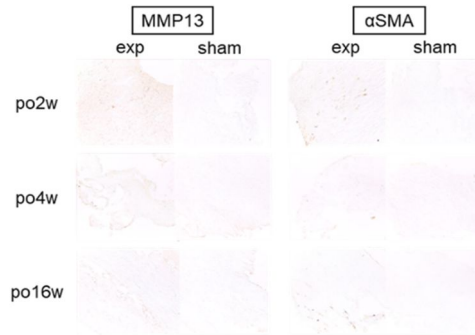


図 3

本モデルにおいて、実際に黄色靭帯が肥厚していることを組織学的に検討した（図 2 a: 切片写真。B: サフランin O 染色。C: 黄色靭帯の厚さ）。ラット個々の黄色靭帯の厚さを補正するために手術部位の黄色靭帯（Objective L4/5）を隣接の内因性の対象黄色靭帯（adjacent）にて除してどれほど肥厚しているかを検討した。不安定性誘導部分の黄色靭帯は優位に肥厚していることが確認できた。

また、免疫染色により、組織破壊の指標である MMP13 や組織修復の指標である SMA が実験群で濃染する傾向があり、組織破壊と過剰な組織修復により黄色靭帯肥厚が誘発される可能性が示唆された。

狭窄症による疼痛メカニズムの究明

手術時に破棄される黄色靭帯を使用し細胞実験を行った。炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$  や IL-1 を添加するとヒト黄色靭帯細胞より疼痛性サイトカインである IL-6 が時間依存的に分泌されることを確認した。また、抗炎症薬であるセレコキシブを投与すると IL-

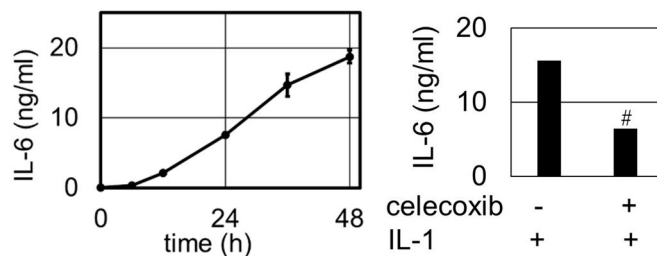


図 4

6 の分泌が低下し、腰部脊柱管狭窄症による疼痛コントロールは黄色靭帯からの炎症性物質の抑制によるものであることが示唆された（図 4、IL-1 添加による IL-6 の分泌）。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Vargas Vila Mario A., Gibbons Michael C., Wu Isabella T., Esparza Mary C., Kato Kenji, Johnson Seth D., Masuda Koichi, Ward Samuel R.	4. 巻 40
2. 論文標題 Progression of muscle loss and fat accumulation in a rabbit model of rotator cuff tear	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 1016 ~ 1025
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.25160	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato K, Akeda K, Miyazaki S, Yamada J, Muehleman C, Miyamoto K, Asanuma YA, Asanuma K, Fujiwara T, Lenz ME, Nakazawa T, An H, Masuda K	4. 巻 42
2. 論文標題 NF- $\kappa$ B decoy oligodeoxynucleotide preserves disc height in a rabbit anular-puncture model and reduces pain induction in a rat xenograft-radiculopathy model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Cells and Materials	6. 最初と最後の頁 90 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22203/eCM.v042a07	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yagi Kiyoshi, Goto Yuta, Kato Kenji, Suzuki Nobuyuki, Kondo Akira, Waseda Yuya, Mizutani Jun, Kawaguchi Yohei, Joyo Yuji, Waguri-Nagaya Yuko, Murakami Hideki	4. 巻 15
2. 論文標題 p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Interleukin-6 Secretion from Human Ligamentum Flavum-Derived Cells Stimulated by Tumor Necrosis Factor-	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asian Spine Journal	6. 最初と最後の頁 713 ~ 720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31616/asj.2020.0425	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yagi Kiyoshi, Goto Yuta, Kato Kenji, Suzuki Nobuyuki, Kondo Akira, Waseda Yuya, Mizutani Jun, Kawaguchi Yohei, Joyo Yuji, Waguri-Nagaya Yuko, Murakami Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Involved in Interleukin-6 Secretion from Human Ligamentum Flavum-Derived Cells Stimulated by Tumor Necrosis Factor-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asian Spine Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.31616/asj.2020.0425	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 後藤 祐太, 加藤 賢治, 鈴木 伸幸, 八木 清, 村上 英樹
2. 発表標題 ヒト黄色靭帯細胞においてTGF- 刺激によるIL-6分泌にはp38 MAPKおよびp44/42 MAPKが関与する
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤賢治 鈴木伸幸 村上英樹
2. 発表標題 夜間装具よりフルタイム装具を希望すると宣言した患者でも装着継続率は低く、夜間装具希望の患者の方が装着継続率が高い
3. 学会等名 第56回日本側彎症学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Goto, Kenji Kato, Nobuyuki Suzuki, Kiyoshi Yagi, Hideki Murakami
2. 発表標題 In Human Ligamentum Flavum-Derived Cells, Interleukin-1 Stimulates Interleukin-6 Secretion through MAP kinases
3. 学会等名 ORS 2023 ANNUAL MEETING (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y Goto, K Kato, N Suzuki, K Yagi, H Murakami
2. 発表標題 Transforming Growth Factor- stimulates Interleukin-6 Secretion from Human Ligamentum Flavum-Derived Cells through ERK and p38 MAPK.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 20.Y Goto, K Kato, N Suzuki, K Yagi, H Murakami.
2. 発表標題 The Induction of Posterior Instability of Rat Spine Caused Ligamentum Flavum Hypertrophy; a Rat Model of Lumbar Spinal Stenosis
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kiyoshi Yagi, Kenji Kato, Nobuyuki Suzuki, Akira Kondo, Yuya Waseda, Yuta Goto, Hideki Murakami
2. 発表標題 p38 Mitogen-Activated Protein Kinase is Involved in Interleukin-6 Secretion from Human Ligamentum Flavum-Derived Cells Stimulated by Tumor Necrosis Factor-
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 八木 清, 加藤賢治, 鈴木伸幸, 近藤 章, 水谷 潤, 村上英樹
2. 発表標題 TNF 刺激による黄色靭帯細胞でのIL-6産生にp38 MAPKが関与する
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Kenji Kato, Kiyoshi Yagi
2. 発表標題 A rat model to investigateligamentum flavum hypertrophyas well as gait disturbance
3. 学会等名 BioSpine Japan The 1st Meeting in Yokohama
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiyoshi Yagi, Kenji Kato, Nobuyuki Suzuki, Akira Kondo, Jun Mizutani, Koichi Masuda, Hideki Murakami
2. 発表標題 A New Rat Model of Lumbar Spinal Stenosis; Presenting Ligamentum Flavum Hypertrophy and Gait Disturbance
3. 学会等名 the 2020 orthopaedci research society annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関