

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：86403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20003

研究課題名(和文)腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚機序の解明

研究課題名(英文)Analysis of hypertrophic Ligamentum Flavum from Lumbar Spinal Canal Stenosis

研究代表者

合田 有一郎(Goda, Yuichiro)

独立行政法人国立病院機構高知病院(臨床研究部)・統括診療部・リハビリテーション科医師

研究者番号：70581148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腰部脊柱管狭窄症の主な原因のひとつに黄色靭帯の肥厚があげられる。タンパク解析では、黄色靭帯の背側において非肥厚靭帯群に比べて肥厚靭帯群ではエラスチンの占める割合が低下し、コラーゲンが増加していた。マイクロアレイの結果からはコラーゲン3、4、6、12が腹側に比べて背側でRNAの発現増加傾向が認められた。RT-PCRの結果からはコラーゲン1、コラーゲン3が背側でRNAの発現増加を認めた。高齢者群では背側のエラスチンファイバーが減少しており、背側、尾側で軟骨基質を認めた。腰部脊柱管狭窄症の発症において黄色線維の背側組織が発症に関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The ligamentum flavum with hypertrophy had lower elastin contents and higher collagen contents than that without hypertrophy. The expression of gene markers for extracellular matrix fibrosis significantly increased, such as transforming growth factor-beta-1, -smooth muscle actin, connective tissue growth factor, Angiopoietin-like protein 2 (Angptl2) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-2 (TIMP-2). Angptl2 and TIMP-2 concentration was significantly higher in the dorsal side of the ligamentum flavum than in the ventral side the ligamentum flavum. The increased expression of TGF-1 related gene from hypertrophy of the ligamentum flavum might induce fibrotic thickening in the ligamentum flavum for lumbar spinal canal stenosis. The increased expression of Angptl2 and TIMP-2 in the dorsal side of ligamentum flavum may play an important role of fibrosis and hypertrophy of the ligamentum flavum.

研究分野：脊椎外科

キーワード：腰部脊柱管狭窄症 黄色靭帯

1. 研究開始当初の背景

全科を通して、病院を受診する第一位の主訴は腰痛であり、その中で高齢者の代表的脊椎疾患が、腰部脊柱管狭窄症である。社会全体の高齢化がすすみ、本疾患に罹患する患者数は非常に多い。腰部脊柱管狭窄症とは、脊柱管内を走行している神経組織に対する機械的圧迫であり、主な原因に黄色靭帯の肥厚が挙げられる。神経に対する圧迫が進行すると、腰痛、下肢痛・しびれ、歩行障害、排尿障害が出現する。しかしながら、その原因は未だ解明されておらず、根治的治療としては、黄色靭帯の外科的摘出のみというのが現状である。靭帯の肥厚の機序が明らかとなれば、これを制御するための新しい治療法の糸口となる。それにより、手術を回避できる症例が増えれば、医療経済に与える効果も大きいと考えられた。

2. 研究の目的

当教室の研究では、胎児の黄色靭帯はElastica Van Gieson染色にて黒色に染色され、弾性線維が豊富であることを示した。一方、高齢者では、黄色靭帯背側で、弾性線維が減少し、膠原線維を主体とする癒痕形成(図3a)や、軟骨化生が見られた(Kosaka et al. Spine. 2007)。また、癒痕を形成しやすい靭帯背側部分は腹側に比べ、腰椎運動中、伸張ストレスが5倍にも上がることを生体力学的に示した(Sairyō et al. Spine. 2005, 2007)。このように、黄色靭帯の肥厚は、細胞外マトリックスに何らかの変化が起こっていると示唆される。また、肉眼的(組織)及び、遺伝子レベルの研究により、型コラーゲンやエラスチンが存在していることが分かっている。しかし、実際、どのタンパク質が存在するのか、また、そのタンパク質はどのような割合で存在しているのかについては、現在までに、きちんと調べられたものは見当たらない(過去に、黄色靭帯組織そのもののタンパク解析を行った研究は見当たらない)。黄色靭帯肥厚の病態の主は、細胞外マトリックスにあり、従来の遺伝子レベルの研究とは異なり、既に産生されているタンパク質を解析することが必要である。

1969年にNachemsonらは、“黄色靭帯はエラスチン60-70%、コラーゲン30-40%から構成されている”と報告している(J Anat. 1969;105:188-189)が、結果の記載のみであり、実験方法・測定方法は不明である。そして、何よりもサンプルが手術検体からではなく、cadaverから採取されたものであるため、タンパク質解析には好ましくない。より生体に近づくためには、やはり、手術検体を用いて解析すべきである。本研究は、既に、当病院の倫理委員会の承認を得ており、当研究室は患者の同意を得ることができれば、手術中

の黄色靭帯の検体を得ることが可能な研究室である。

本研究の目的は、まだ不明の多い黄色靭帯の組成(肥厚群と非肥厚群)を、タンパク解析を行うことにより明らかにし、さらに黄色靭帯に対するメカニカルストレスと慢性炎症の関連を明らかにすることで、薬物による保存的治療の開発の手助けとすることにある。

3. 研究の方法

(1) 腰部脊柱管狭窄症における肥厚した黄色靭帯のタンパク質組成を解析: 腰部脊柱管狭窄症の主な病態は黄色靭帯の肥厚であるが、その肥厚メカニズムに関して詳細は不明である。胎児の黄色靭帯では弾性線維が豊富なものに対して、肥厚した靭帯では膠原線維が増生しており(Kosaka et al. Spine. 2007)、組成の違いと靭帯の肥厚に何らかの因果関係が存在している可能性がある。そのため、徳島大学運動機能外科で手術を施行された腰椎椎間板ヘルニアや靭帯肥厚のない腰部脊柱管狭窄症患者から採取された黄色靭帯を健常群として黄色靭帯肥厚群でのタンパク質組成の差異についてLC/MS/MSを用いて調べた。また、肥厚黄色靭帯における部位別(背側・中間・腹側)のタンパク質組成の差異を調べた。

(2) 高齢者群の4例の黄色靭帯を肥厚の主な部位である背側と肥厚の少ない部分として考えられる腹側を分離し、マイクロアレイを行った。高齢者群の背側部分と腹側部分をマイクロアレイの結果をもとに個々の遺伝子発現をRT-PCRを行い解析した。組織学的解析としてAlcian Blue、Elastica van Gieson染色、コラーゲンXII、IL-6、VEGF、カドヘリン-11の免疫染色を高齢者群と若年者群の両群に行った。

4. 研究成果

(1) 肥厚靭帯群5例(男性4例、女性1例、平均年齢71歳)、非肥厚靭帯群5例(男性3例、女性2例、平均年齢25歳)であった。検体を洗浄、薄切し臭化シアン分解の後、複数の蛋白分解酵素(リシルエンドペプチターゼ、トリプシン等)を用いて可溶化し、LC-MS/MSで解析を行った。解析結果はエラスチン: 肥厚靭帯群 35.0±13.1%、非肥厚靭帯群 57.2±5.7%、コラーゲン: 肥厚靭帯群 57.8±13.9%、非肥厚靭帯群 31.8±9.6%であり、肥厚靭帯群は非肥厚靭帯群に比べてエラスチンの割合が減少しコラーゲンが増加する傾向を認めた。

3層比較では、エラスチン(背・中間・腹側)(36.3±10.8%、44.5±9.5%、56.3±13.1%)、コラーゲン(56.3±13.1%、48.8±11.6%、36.0±13.7%)と、より背側でのコラーゲンの増加とエラスチンの減少を認めた。非肥厚靭帯群に比べて肥厚靭帯群ではエラスチンの占める割合が低下し、コラーゲンが増加していた。

(2) 50000を超えるデータが得られた。4例

の平均において、発現量上位 25%を 1 とした時の 0.5 以上のうちで背側、腹側で比較して、それぞれ 2 倍以上発現していた遺伝子は 237 遺伝子同定された。これを EntrezGeneID を持つものを GeneOntology 解析し、 $P < 0.05$ のものは 74 グループ同定された。創傷治癒に関わる血管新生やコラーゲン代謝、細胞外マトリックスに関する項目を高い有意差を持って認めた。TGF-related genes に関して 4 例個々にみていくと、線維芽細胞に線維化を促す TGF- β 1 の遺伝子である TGFB1 は、4 例全てで正の値であり、高発現と考えられた。TGF- β 1 の下流にあり組織の線維化に関わる CTGF も、非常に高発現していた。TGF- β 1 により、線維芽細胞が α -SMA 陽性の筋線維芽細胞へと変化するが、 α -SMA の遺伝子である ACTA2 も 4 例全てで非常に高発現していた。

TIMP/MMP

靭帯組織内でのコラーゲンの分解、リモデリングに関わるコラーゲナーゼ・ゼラチナーゼと呼ばれる MMP とそれを抑制する TIMP をみてみると、MMP9 は比較的発現していたものの、その他の MMP の発現は抑えられており、TIMP は 1~4 まで全例で高発現しており、特に TIMP2 は極めて高発現していた。これらの MMP と TIMP の発現量を比べると MMP の発現量に比べて、TIMP が著明に発現していた。腹側と背側との関連性をみると、TIMP/MMP の比は、2 例で腹側の比が大きく、2 例で背側の比が大きかった。平均では腹側 46.92、背側 18.69 と腹側の値が大きかったが、統計学的有意差は認めなかった。この結果、種々のコラーゲンが靭帯内で強発現していたが、線維化に関わるコラーゲン I, III, IV, V, VI, XII および XIV 型では、4 例すべてにおいて背側でより強く発現していた。特に COL1, 6, 12 の発現量が極めて高かった。軟骨に関する II, IX, X, XI 型コラーゲンについては、II, XI 型の高発現は認められたが、IX, X 型の発現量は少なかった。

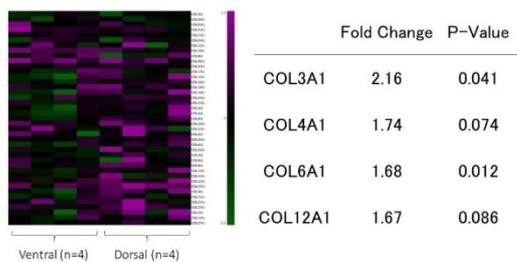


図1 背側と腹側のマイクロアレイ解析

マイクロアレイの結果からはコラーゲン 3、4、6、12 が腹側に比べて背側で RNA の発現増加傾向が認められた。

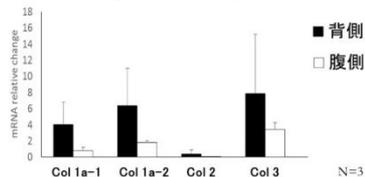


図2 組織のRT-PCRによるRNA解析

RT-PCR の閣下からはコラーゲン 1、コラーゲン 3 が背側で RNA の発現増加を認め、コラーゲン 3 についてはマイクロアレイの結果と一致しており、今後、コラーゲン 4、6、12 も同様であった。

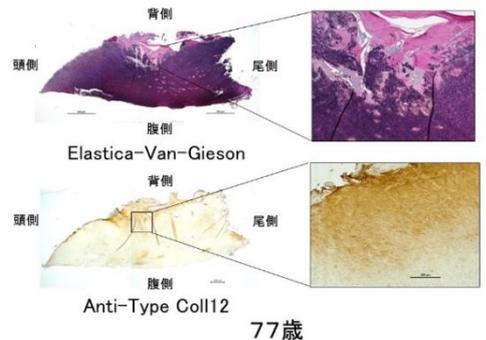


図3 高齢者群、組織染色による解析①



図4 高齢者群、組織染色による解析②

高齢者群では背側のエラスチンファイバーが減少しており、背側、尾側で軟骨基質を認めた。免疫染色では同部位の type XII コラーゲンの染色性が増加しており、マイクロアレイの結果と一致した。また IL-6、カドヘリン-11 においても背側、尾側で発現が認められた。

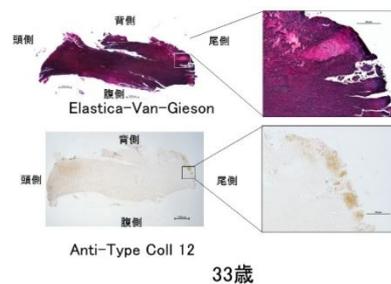


図5 若年者群、組織染色による解析①

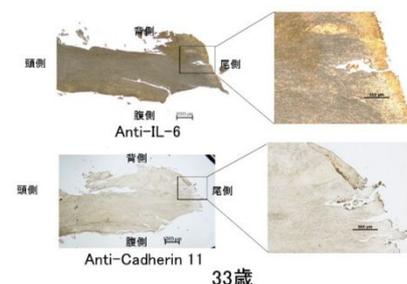


図6 若年者群、組織染色による解析②

若年者群ではエラスチンファイバーの低下傾向はなく、尾側のみ軟骨基質を認めた。

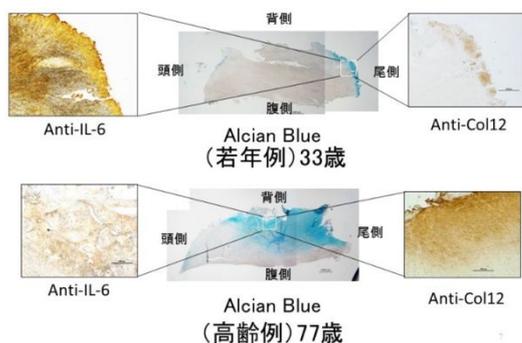


図7 高齢者群と若年者群の対比①

腰部脊柱管狭窄症の発症において黄色線維の背側組織が発症に関与していると考えられた。線維成分の変化には炎症サイトカイン、血管新生、接着因子の増加、軟骨化成が重要な因子であると考えられた。

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 1件)

Sato N, Tanoguchi T, Goda Y, Kosaka H, Higashino K, Sakai T, Katoh S, Ysui N, Sairyō K, Taniguchi H
Proteomic Analysis of Human Tendon and Ligament: Solubilization and Analysis of Insoluble Extracellular Matrix in Connective Tissues., Journal of Proteome Research、査読有、12巻、2016、4709 - 4721

[学会発表](計 1件)

合田有一郎

腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚の病態は線維増殖性疾患に類似する

第44回日本脊椎脊髄病学会 2015.04.16
福岡市

6. 研究組織

(1)研究代表者

合田 有一郎 (GODA, Yuichiro)

独立行政法人国立病院機構高知病院リハビリテーション科医師

研究者番号：60291986