

令和元年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10824

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メカニズムの解明

研究課題名(英文) Pathomechanism of ligament flavum hypertrophy in patients with the lumbar spinal canal stenosis

研究代表者

西良 浩一 (SAIRYO, Koichi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：10304528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎の代表的な変性疾患の一つに腰部脊柱管狭窄症があり、その原因は黄色靭帯の肥厚が挙げられる。高齢に伴い黄色靭帯は肥厚していくことが分かっているが、その原因のメカニズムははっきりわかっていない。本研究で、タンパク質の分泌に強く関わっている小胞体ストレス応答が、黄色靭帯肥厚にも関わっていることが明らかになった。また、黄色靭帯から採取した線維芽細胞を用いた解析でもコラーゲン産生に伴い小胞体ストレスが惹起されていた。小胞体ストレスが靭帯肥厚の原因であるコラーゲン産生に強く関わっていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の高齢化の進展に伴い、脊椎の変性疾患が増加している。その代表疾患として腰部脊柱管肥厚症がある。特に日本人などのアジア人ではその有病率が多いといわれている。その原因の一つに黄色靭帯の肥厚が挙げられる。しかしながら、現在のところ薬剤を用いての靭帯肥厚を改善させることはできず、症状が強い場合、手術加療以外に存在していない。今回の調査にて、黄色靭帯の肥厚には小胞体ストレスが強く関わっている。小胞体ストレスを軽減させられる薬剤は、現在研究段階では複数種類存在しており、今後そのような薬剤による黄色靭帯肥厚の改善が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Lumbar spinal canal stenosis is one of the typical degenerative diseases of the spine. The cause of lumbar spinal canal stenosis is thickening of the yellow ligament. It is known that yellow ligaments become thicker as they get older, but the mechanism of the cause is not clear. In this study, it has been clarified that the endoplasmic reticulum stress response, which is strongly related to protein secretion, is also related to flavum ligament thickening. In addition, endoplasmic reticulum stress was also induced in association with collagen production in analysis using fibroblasts collected from the flavum ligament. It has been clarified that endoplasmic reticulum stress is strongly involved in collagen production which is the cause of flavum ligament thickening.

研究分野：脊椎外科

キーワード：黄色靭帯 コラーゲン線維 筋線維芽細胞 小胞ストレス

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

#### 1. 研究開始当初の背景

腰部脊柱管狭窄症の主な病態として、神経周囲に存在するコラーゲン線維の増加に伴う黄色靭帯の肥厚による神経の圧迫が考えられているが、なぜ加齢に伴い黄色靭帯が肥厚するかについての報告は少ない。

コラーゲンなどの分泌タンパク質は、細胞内小器官である小胞体でジスルフィド結合やN-結合型糖鎖付加などの修飾を受ける。さらにコラーゲンに必要な triple helix の形成も小胞体内で行われる。この小胞体の働きにより、タンパク質は正常な形に折りたたまれ、適切な機能を発揮する。しかし、低酸素環境などの外的要因やタンパク質合成の需要の増加などの内的要因によりタンパク質の折りたたみ異常をきたすことがある。この状態を小胞体ストレスという。すべての細胞には、小胞体ストレスを軽減するための小胞体ストレス応答と呼ばれる適応応答機構がある。

#### 2. 研究の目的

黄色靭帯肥厚は主にコラーゲン線維が増加し、若年者の非肥厚靭帯に比べ高齢者では数倍の厚さになる。これはタンパク質合成需要増加の状態であり、小胞体ストレス応答が惹起されている可能性が考えられる。そのため本研究では、黄色靭帯肥厚のメカニズムを、小胞体ストレス応答の観点から明らかにすることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

・手術時に採取した高齢者(n=4, 平均年齢 81 歳)、若年者(n=4, 平均年齢 20 歳)の黄色靭帯から mRNA を抽出し、microarray 解析を行った。

・102 検体の黄色靭帯(15-86 歳)を、1. 若年(39 歳未満)靭帯肥厚なし(腰椎椎間板ヘルニア、分離症)、2. 中年(40-65 歳)靭帯肥厚なし(腰椎椎間板ヘルニア)、3. 中年(40-65 歳)靭帯肥厚あり(脊柱管狭窄症・変性すべり症)、4. 高齢(66 歳以上)靭帯肥厚あり(脊柱管狭窄症・変性すべり症・変性側弯症)にわけ、比較検討した。

・黄色靭帯由来線維芽細胞に TGF- $\beta$  刺激(5ng/ml)しコラーゲン産生を促したときに、小胞体ストレスがかかっているかを RT-qPCR および Western blotting で検討した。

小胞体ストレス応答とコラーゲン産生の関わりを調べるために、NIH3T3 細胞(マウス皮膚線維芽細胞)に一過性に ATF6 を過剰発現(pCDF1-FLAG-ATF6-puro)し、control(pCDF1-EGFP-IRES-puro)と比較し、TGF- $\beta$  (5ng/ml)で刺激した時の Col1a-1 の産生を、Western blotting で評価した。

・黄色靭帯由来線維芽細胞に、ATF6 経路の阻害剤である PF429242 (Site 1 protease 阻害剤 1.0  $\mu$ M)を、TGF- $\beta$  (5ng/ml)と共に投与した時の、コラーゲン産生を細胞内(Western blotting)・細胞外(培地中の分泌コラーゲンを ELISA で測定: Human Collagen type I ELISA kit; ACE)で評価した。

#### 4. 研究成果

肥厚した黄色靭帯で、線維化のシグナルとともに小胞体ストレス応答が活性化

マイクロアレイ解析で、高齢者の黄色靭帯では、炎症や TGF- $\beta$  シグナルといった線維化の代表的なシグナルと並んで、小胞体ストレス応答も優位に活性化していた。102 検体を用いた RT-qPCR では、中年および高齢者の肥厚がみられる群で、線維化(CO11A-2, CO114, FN, HSP47)・小胞体ストレスマーカー(ATF6, GRP78, IRE1, SEL1, PERK, ERO1)が優位に増加し

ていた。

また Western blotting でも靭帯肥厚のある群で GRP78・94 の発現増加が確認できた。qPCR での発現量を線維化マーカーと小胞体ストレスマーカーの相関を検討したところ、GRP78 は COL1A-2 ( $r=0.64$ ,  $p=0.001$ ) と GRP94 は COL14 との相関 ( $r=0.62$ ,  $p=0.001$ ) を認めていた。

#### 黄色靭帯由来線維芽細胞はコラーゲン産生とともに小胞体ストレス応答が活性化する

黄色靭帯由来線維芽細胞に TGF- $\beta$  刺激を行ったところ、qPCR で COL1A-1 の増加とともに、ATF6 経路・IRE1 経路・PERK 経路いずれも優位に活性化していた。また Western blotting でも、コラーゲン産生とともに経時的に小胞体ストレス応答が活性化していた。

#### ATF6 過剰発現でコラーゲン産生は増加し、ATF6 経路の阻害剤投与でコラーゲン産生は低下する

ATF6 を過剰発現し、TGF- $\beta$  刺激を行うとコラーゲンの産生量が増加していた。そして、ATF6 経路の阻害剤である site one protease inhibitor を投与したところ、western blotting で COL1A-1 の産生量が減少していた。さらに、培地中の 1 型コラーゲンの量を ELISA で評価したところ、ATF6 阻害剤を投与するとコラーゲン量は低下していた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Yoshioka S, Nakano S, Kinoshita Y, Nakamura M, Goto T, Hamada D, Sairyo K. Comparison of a highly porous titanium cup (Tritanium) and a conventional hydroxyapatite-coated porous titanium cup: A retrospective analysis of clinical and radiological outcomes in hip arthroplasty among Japanese patients. 査読あり J Orthop Sci. 2018 Nov;23(6):967-972. doi: 10.1016

Maeda T, Higashino K, Manabe H, Yamashita K, Hayashi F, Goda Y, Tsuruo Y, Sairyo K. Pullout Strength of Pedicle Screws Following Redirection After Lateral or Medial Wall Breach. 査読あり Spine. 2018 Sep 1;43(17):E983-E989. doi: 10.1097

Tonogai I, Hayashi F, Iwame T, Takasago T, Matsuura T, Sairyo K. Platelet-rich plasma does not reduce skeletal muscle fibrosis after distraction osteogenesis. 査読あり J Exp Orthop. 2018 Jul 13;5(1):26. doi: 10.1186

Yamamoto N, Kosaka H, Higashino K, Morimoto M, Yamashita K, Tezuka F, Hayashi F, Takata Y, Sakai T, Nagamachi A, Sairyo K. Vertebral Lateral Notch as Optimal Entry Point for Lateral Mass Screwing Using Modified Roy-Camille Technique. 査読あり Asian Spine J. 2018 Apr;12(2):272-276. doi: 10.4184

Sairyo K, Chikawa T, Nagamachi A. State-of-the-art transforaminal percutaneous endoscopic lumbar surgery under local anesthesia: Discectomy, foraminoplasty, and ventral facetectomy. 査読あり J Orthop Sci. 2018 Mar;23(2):229-236. doi: 10.1016

Yamashita K, Sakai T, Takata Y, Hayashi F, Tezuka F, Morimoto M, Kinoshita Y, Nagamachi A, Chikawa T, Yonezu H, Higashino K, Sakamaki T, Sairyo K. Utility of STIR-MRI in Detecting the Pain Generator in Asymmetric Bilateral Pars Fracture: A

Report of 5 Cases . 査読あり Neurol Med Chir (Tokyo) . 2018 Feb 15;58(2):91-95 .  
doi: 10 . 2176

Morimoto M, Takahashi Y, Kubo T, Sugiura K, Tamaki Y, Toki S, Suganuma K, Inoue  
K, Adachi K, Chikawa T, Sairyo K, Nagamachi A . Prognostic value of dynamic MRI  
positive enhancement integral color mapping in osteosynthesis of undisplaced femoral  
neck fractures . 査読あり J Orthop Sci . 2017 Jul;22(4):722-725 . doi: 10 . 1016

Kita K, Sakai T, Yamashita K, Nagamachi A, Sairyo K . Spontaneous lumbar spinal  
subdural hematoma: a case report . 査読あり Br J Neurosurg . 2017 May 13:1-5 . doi:  
10 . 1080

Tezuka F, Sairyo K, Sakai T, Dezawa A . Etiology of Adult-onset Stress Fracture in the  
Lumbar Spine . 査読あり Clin Spine Surg . 2017 Apr;30(3):E233-E238 . doi: 10 .  
1097

〔学会発表〕(計 5 件)

林二三男, 東野恒作, 森本雅俊, 合田有一郎, 高田洋一郎, 手束文威, 酒井紀典, 西良浩一  
肥厚黄色靭帯と筋線維芽細胞に関する組織学的解析

第 25 回腰痛学会

2017 年 11 月 3 日 ~ 2017 年 11 月 4 日

東京コンファレンスセンター・品川・東京都

佐藤紀 合田有一郎 東野恒作 酒井紀典 加藤真介 西良浩一

腰部脊柱管狭窄症患者における肥厚黄色靭帯の完全可溶化とプロテオーム解析の確立

第 128 回中部日本整形外科学会災害外科学会学術集会

2017 年 4 月 7 日 ~ 2017 年 4 月 8 日

神戸国際会議場・神戸・兵庫県

林 二三男, 東野 恒作, 森本 雅俊, 合田 有一郎, 酒井 紀典, 西良 浩一

FACIT コラーゲンと筋線維芽細胞を含めた黄色靭帯肥厚の組織学的解析

第 128 回中部日本整形外科学会災害外科学会学術集会

2017 年 4 月 7 日 ~ 2017 年 4 月 8 日

神戸国際会議場・神戸・兵庫県

森本雅俊・阿部光伸・林二三男・高田洋一郎・西良浩一

黄色靭帯肥厚における小胞体ストレスの役割

骨・Ca クラスタ

2017 年 02 月 11 日 ~ 2017 年 02 月 11 日

徳島大学・徳島県・徳島市

森本雅俊・阿部光伸・林二三男・高田洋一郎・西良浩一

小胞体ストレスは黄色靭帯肥厚を助長する

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会

2016 年 10 月 13 日 ~ 2016 年 10 月 14 日

福岡国際会議場・福岡県・福岡市

〔図書〕(計 件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：森本 雅俊

ローマ字氏名：(MORIMOTO, Masatoshi)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：医員

研究者番号（8桁）：20748701

研究分担者氏名：東野 恒作

ローマ字氏名：(HIGASHINO, Kosaku)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部(医学域)

職名：徳島大学専門研究員

研究者番号（8桁）：80380129

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。