

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16663

研究課題名（和文）黄色靭帯の肥厚と線維化の機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of thickening and fibrosis of ligamenta flava

研究代表者

林 二三男（HAYASHI, Fumio）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・徳島大学専門研究員

研究者番号：90772476

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：黄色靭帯肥厚の原因の解析を行った。今回、靭帯肥厚は靭帯の背側で生じていることが明らかとなった。そして、その原因として、SMA陽性の筋線維芽細胞が背側で増加していることが、免疫染色で明らかになった。さらに、背側と腹側に分離した黄色靭帯を用いたマイクロアレイ解析を施行したところ、低酸素のシグナルが活性化していることが明らかになった。実際、黄色靭帯由来の線維芽細胞に低酸素の刺激を行ったところ、SMAやコラーゲンの遺伝子発現が増加した。以上のことから、低酸素刺激で筋線維芽細胞が靭帯の背側で増加し、コラーゲン産生が増加していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰部脊柱管狭窄症は、脊椎手術の中で最も頻度の高い疾患である。その腰部脊柱管狭窄症の主な原因は、黄色靭帯の肥厚が考えられている。今のところ、この靭帯肥厚に関する治療は未だ何もない。そのため、靭帯肥厚のメカニズムの解明は治療につながられる可能性がある。今回の結果から、低酸素のシグナルや筋線維芽細胞が靭帯肥厚の重要な因子であることがわかった。今回の結果を基盤とし、さらに解析することで、靭帯肥厚の治療につなげていきたい。

研究成果の概要（英文）：An analysis of the cause of hypertrophy ligamentum flavum was performed. In this study, it was found that the hypertrophic ligamentum flavum occurred on the dorsal side of the ligament. Immunohistochemistry revealed that the number of SMA-positive myofibroblasts was increased in the dorsal region. Furthermore, microarray analysis of dorsal ligament and ventral ligament isolated ligamentum flavum revealed that hypoxia signals were activated. In fact, when fibroblasts derived from the yellow ligament were stimulated under hypoxia, gene expression of SMA and collagen was increased. These results indicate that hypoxic stimulation increases myofibroblasts in the dorsal side of the ligament and increases collagen production.

研究分野：脊椎外科

キーワード：黄色靭帯 線維化 コラーゲン 低酸素 筋線維芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの研究から黄色靭帯に豊富に含まれる弾性線維がメカニカルストレスなどにより主に背側に傷害を生じ、異常な膠原線維が増生、線維化が進行し、肥厚につながる事が示唆された。しかし、細胞、組織レベルではどの細胞が、どのような刺激により黄色靭帯の線維化に関わるかは不明である。今回研究代表者は他の臓器に生じる肺線維症、肝硬変、ケロイドなどの線維性増殖性疾患で筋線維芽細胞が関連していることに着目し、筋線維芽細胞と脊柱管狭窄症の線維化が関連しているかどうかを着想するに至った。

筋線維芽細胞は、例えば皮膚の場合外傷後の創傷治癒時などに、線維芽細胞などより分化し、 $\alpha$ -SMA を発現して創傷の範囲を収縮させる主な細胞と定義される。

## 2. 研究の目的

現在、腰部脊柱管狭窄症に関しては数種類の薬剤と手術しか治療がなく、より有効な治療法が望まれている。今回研究代表者は前述した筋線維芽細胞に着目し、腰部脊柱管狭窄症の主な原因である線維化を抑制する方法が発見できれば、今後アジア人に多い腰部脊柱管狭窄症患者の治療のひとつとなる可能性があると考えた。黄色靭帯における筋線維芽細胞の役割と線維化のメカニズムの基盤を確立することを研究目的とした。

具体的には、筋線維芽細胞の局在とその働きを解析し、炎症、低酸素などの外部刺激により、*in vitro*, *in vivo* で生じる変化、タンパクを分析し、脊柱管狭窄症への過程を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) 腰部脊柱管狭窄症手術患者(51-81歳)より得られたヒト黄色靭帯を HE, Masson-Trichrome 染色、Elastica van Gieson 染色、 $\alpha$ -SMA での免疫染色を行い、筋線維芽細胞の局在を調べた。 $\alpha$ -SMA を発現するのは血管以外では筋線維芽細胞が主となる。

(2) 手術採取した黄色靭帯由来の線維芽細胞に低酸素の刺激を行い、RT-qPCR などにより遺伝子発現の解析を行い、筋線維芽細胞との関連を調べた。

(3) 未固定遺体を用い、黄色靭帯とその周囲組織との関係を解析し、未固定遺体で黄色靭帯の線維化が手術を行っていない症例でも生じているのかを確認した。高齢非肥厚例として、研究代表者が属する施設にある未固定遺体より骨と付着部を一塊とした黄色靭帯サンプルの採取を行った。それとともに、手術患者より採取した肥厚した黄色靭帯の組織を調べ、両者間の違いを解析した。HE, Masson-Trichrome 染色による線維化の評価をおこなった。

(4) 外部刺激による *in vivo* で生じる変化を解析するため、脊柱管狭窄症モデル動物の作成を行った。モデル動物は動物実験施設において、他動的に専用の機械を用いて、約 12 週間腰椎屈曲伸展を繰り返すことにより作成する予定であったが、時間の制約上実現困難であり、30G 針で黄色靭帯に微小損傷を加えることにした。

## 4. 研究成果

(1) 手術採取した腰部脊柱管狭窄症患者の組織染色では、背側の層の組織が Masson-Trichrome で青く染色された。線維化スコアは硬膜層に比べて背側層で有意に高かった(図 1-A、1-B)。免疫組織化学では、背側の層では硬膜層よりも  $\alpha$ -SMA 陽性の細胞数が有意に多かった(背側層 16.8%、硬膜層 7.4%) (図 2-A、2-B)。

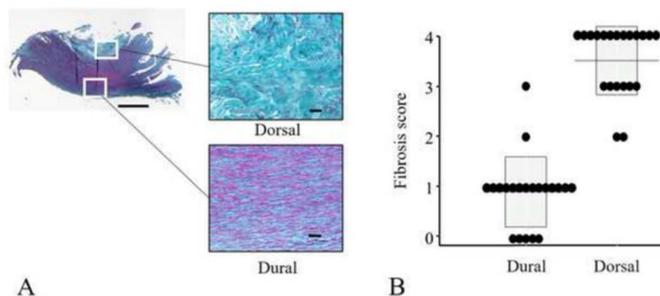


図 1. 背側で線維化が進行している

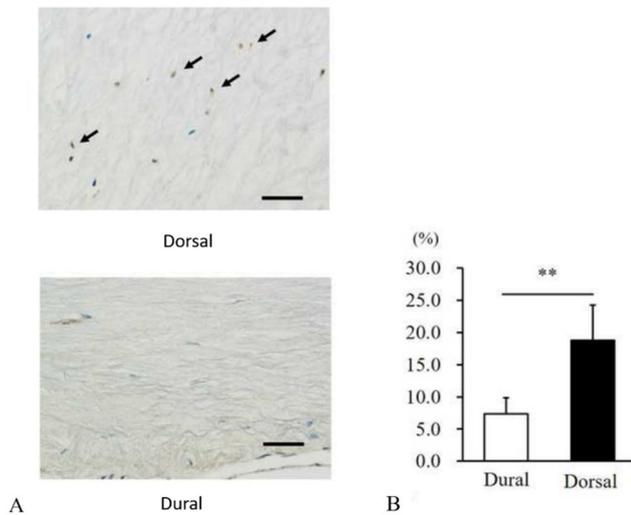


図2．黄色靭帯背側に筋線維芽細胞が多く存在する。(→が筋線維芽細胞を示す)

(2) 黄色靭帯由来の線維芽細胞に低酸素の刺激を行ったところ、有意に SMA やコラーゲンの遺伝子発現が増加した(図3)。

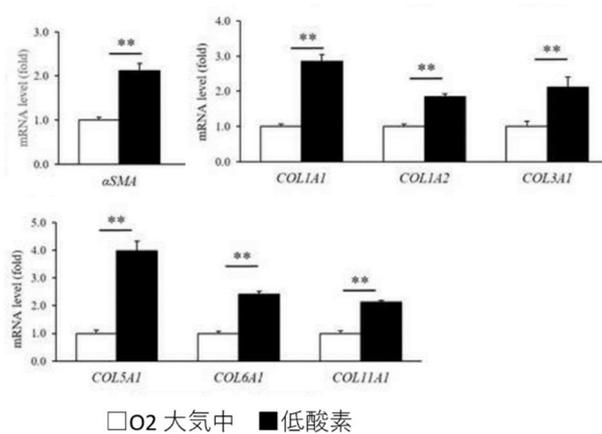


図3．大気中と低酸素環境下での筋線維芽細胞の発現とコラーゲン産生の関係

以上のことから、低酸素刺激で筋線維芽細胞が靭帯の背側で増加し、コラーゲン産生が増加していることが分かった。そしてこれらのコラーゲン増生の結果が腰部脊柱管狭窄症の発症の一因になっていることが示唆された。

(3) 未固定遺体において高齢でも肥厚していない黄色靭帯がみられ、必ずしも加齢により脊柱管狭窄症が生じるのではないことを確認できた。

(4) 30G針を使用して脊柱管狭窄症モデル動物を作成した。当初モデル動物にマウスを選択した。しかし、実際にマウスで微小傷害を加えることを試行すると、黄色靭帯のエリアが極めて小さく、傷害を加えることが困難な例が存在した。このことより、動物種をラットに変更した結果、黄色靭帯に30G針で微小傷害を加えることができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tonogai Ichiro, Hayashi Fumio, Tsuruo Yoshihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Direction and location of the nutrient artery to the fifth metatarsal at risk in osteotomy for bunionette	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Foot and Ankle Surgery	6. 最初と最後の頁 193 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fas.2017.10.006	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 -
1. 著者名 Sato Nori, Higashino Kosaku, Sakai Toshinori, Terai Tomoya, Goel Vijay K., Biyani Ashok, Ebraheim Nabil, Takata Yoichiro, Hayashi Fumio, Yamashita Kazuta, Morimoto Masatoshi, Manabe Hiroaki, Sairyō Koichi	4. 巻 65
2. 論文標題 Role of Epiligament in Ligamentum Flavum Hypertrophy in Patients? with Lumbar Spinal Canal Stenosis:a Pilot Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Medical Investigation	6. 最初と最後の頁 85 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2152/jmi.65.85	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 -
1. 著者名 Tonogai Ichiro, Hayashi Fumio, Tsuruo Yoshihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 57
2. 論文標題 Anatomic Study of Anterior and Posterior Ankle Portal Sites for Ankle Arthroscopy in Plantarflexion and Dorsiflexion: A Cadaveric Study in the Japanese Population	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Foot and Ankle Surgery	6. 最初と最後の頁 537 ~ 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.jfas.2017.11.029	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 -
1. 著者名 Yamamoto Norio, Kosaka Hirofumi, Higashino Kosaku, Morimoto Masatoshi, Yamashita Kazuta, Tezuka Fumitake, Hayashi Fumio, Takata Yoichiro, Sakai Toshinori, Nagamachi Akihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Vertebral Lateral Notch as Optimal Entry Point for Lateral Mass Screwing Using Modified Roy-Camille Technique	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asian Spine Journal	6. 最初と最後の頁 272 ~ 276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4184/asj.2018.12.2.272	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 -

1. 著者名 Tonogai Ichiro, Hayashi Fumio, Tsuruo Yoshihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Examination of the Origin and Branching Direction of the Anterior Medial Malleolar Artery From the Anterior Tibial Artery: A Cadaveric Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Foot & Ankle Specialist	6. 最初と最後の頁 167 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1938640018768046	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 -

1. 著者名 Tonogai Ichiro, Hayashi Fumio, Iwame Toshiyuki, Takasago Tomoya, Matsuura Tetsuya, Sairyō Koichi	4. 巻 5
2. 論文標題 Platelet-rich plasma does not reduce skeletal muscle fibrosis after distraction osteogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Orthopaedics	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40634-018-0143-7	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 -

1. 著者名 Tonogai Ichiro, Hayashi Fumio, Tsuruo Yoshihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Entry points of nutrient arteries at risk during osteotomy of the lesser metatarsals: a fresh cadaveric study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Foot and Ankle Research	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13047-018-0288-8	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 -

1. 著者名 Maeda Toru, Higashino Kosaku, Manabe Hiroaki, Yamashita Kazuta, Hayashi Fumio, Goda Yuichiro, Tsuruo Yoshihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 43
2. 論文標題 Pullout Strength of Pedicle Screws Following Redirection After Lateral or Medial Wall Breach	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 E983 ~ E989
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000002611	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 -

1. 著者名 Tonogai Ichiro, Hayashi Fumio, Tsuruo Yoshihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Distances from the deep plantar arch to the lesser metatarsals at risk during osteotomy: a fresh cadaveric study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Foot and Ankle Research	6. 最初と最後の頁 57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13047-018-0300-3	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 -

1. 著者名 Tonogai Ichiro, Hayashi Fumio, Tsuruo Yoshihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 13
2. 論文標題 The Origin of the Anterior Lateral Malleolar Artery From the Anterior Tibial Artery: A Fresh Cadaveric Study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Foot & Ankle Specialist	6. 最初と最後の頁 69 ~ 73
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1938640018823066	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 -

1. 著者名 Yamashita Kazuta, Higashino Kosaku, Hayashi Hiroaki, Takegami Kazuki, Hayashi Fumio, Tsuruo Yoshihiro, Sairyō Koichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Direct measurement of radiation exposure dose to individual organs during diagnostic computed tomography examination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-85060-5	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Fumio Hayashi , Kosaku Higashino , Masatoshi Morimoto , Yuichiro Goda, Toshinori Sakai, Yoichiro Takata , Fumitake Tezuka , Koichi Sairyō
2. 発表標題 Histochemical analysis of ligamentum flavum on various collagens and myofibroblasts compared dorsal layer with dural layer.
3. 学会等名 ORS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 FumioHayashi, Kosaku Higashino, Masatoshi Morimoto, Yuichiro Goda, Toshinori Sakai, Nori Sato, Yuki Morimoto, Yoichiro Takata, Fumitake Tezuka, Koichi Sairyo
2. 発表標題 Association between hypertrophy of ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis and increased myofibroblasts in dorsal layer of ligament.
3. 学会等名 PAMISS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumio Hayashi, Kosaku Higashino, Masatoshi Morimoto, Yuichiro Goda, Nori Sato, Yuki Morimoto, Toshinori Sakai, Yoichiro Takata, Fumitake Tezuka, Koichi Sairyo
2. 発表標題 Association of hypertrophy of the ligamentum flavum with an increase in myofibroblasts in the dorsal layer of the ligament in lumbar spinal canal stenosis.
3. 学会等名 ISLS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林二三男、東野恒作、森本雅俊、合田有一郎、酒井紀典、佐藤 紀、高田洋一郎、手束文威、西良浩一
2. 発表標題 腰部脊柱管狭窄症における黄色靱帯肥厚メカニズム ~線維化と筋線維芽細胞~
3. 学会等名 第47回日本脊椎脊髄病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林二三男、東野恒作、森本雅俊、合田有一郎、酒井紀典、佐藤 紀、高田洋一郎、手束文威、西良浩一
2. 発表標題 黄色靱帯肥厚メカニズムの解明~筋線維芽細胞に着目して~
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Fumio Hayashi, Kosaku Higashino, Masatoshi Morimoto, Yuichiro Goda, Toshinori Sakai, Nori Sato, Yoichiro Takata, Fumitake Tezuka, Koichi Sairyo
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of ligamentum flavum hypertrophy in lumbar spinal canal stenosis -Focusing on myofibroblast-
3. 学会等名 第50回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2018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