

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18485

研究課題名（和文）腰部脊柱管狭窄症における肥厚した黄色靭帯の組織構造を画像化する新規診断装置の開発

研究課題名（英文）Development of a novel diagnostic device for imaging the tissue structure of thickened ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis

研究代表者

矢部 裕 (Yutaka, Yabe)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00803016

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：腰部脊柱管狭窄症は高齢者に多い脊椎変性疾患であり、患者の生活の質を低下させ、要支援・要介護の要因ともなる。腰部脊柱管狭窄症の主要因は黄色靭帯の肥厚とされるが、その病態は未だ解明されておらず、肥厚に関わる因子の画像化もなされていない。本研究では網羅的な遺伝子・タンパク解析を行い、黄色靭帯肥厚に関わる因子を同定した。また超音波顕微鏡を使用し、肥厚した黄色靭帯の弾性的変化をとらえることに成功した。

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主要因とされる黄色靭帯肥厚の病態は未だ不明であり、肥厚に関わる因子の画像化もなされていない。病的な組織の画像化を行うことは、病変部位に選択的に治療を行う上で大きな意義がある。本研究では黄色靭帯肥厚に関わる因子を同定するとともに、病変部位の画像化の可能性を示した。画像化により薬物治療の効果判定や、選択的な手術治療など新たな治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Lumbar spinal canal stenosis is a common degenerative disease of the spine in the elderly, reducing the quality of life of patients and contributing to the need for support and care. The main cause of lumbar spinal canal stenosis is the thickening of the ligamentum flavum, but the pathogenesis of the disease has not yet been elucidated, and the factors involved in the thickening have not yet been visualized. In this study, we conducted comprehensive gene and protein analysis to identify the factors involved in the thickening of the ligamentum flavum. Using ultrasound microscopy, we were able to observe changes in the elasticity of the thickened ligamentum flavum.

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 肥厚 画像化

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腰部脊柱管狭窄症は脊柱管の狭窄により神経が圧迫され、神経障害を呈する腰椎変性疾患で、下肢痛や痺れ、歩行障害、排尿障害を生じて患者のQOL(生活の質)を低下させる。近年超高齢社会の到来と共に患者数は急増し、本邦では240万人が罹患していると推定される。脊柱管の狭窄は黄色靭帯の肥厚がその主要因とされており、靭帯の背側で弾性線維が減少することから、主に靭帯の背側に病変があると考えられているがその病態は未だ解明されていない。腰部脊柱管狭窄症の治療は手術が選択されることが多く、肥厚した黄色靭帯を一塊に摘出する。しかしながらMRI等の画像では狭窄が多椎間に見られ、主病巣以外の軽度に肥厚した黄色靭帯を予防的に摘出することも多い。黄色靭帯の前方には神経組織を包む硬膜があり、黄色靭帯の摘出の際の合併症である硬膜損傷は神経損傷や手術後の水頭症、脳出血の原因となり、その発生率は3~9%と高い。また黄色靭帯摘出後の硬膜周囲の癒着や、腰椎間の不安定性は将来的な再狭窄の原因となる。黄色靭帯の病変部位を同定し選択的に取り除くことができれば、狭窄の進行予防とともに正常部位の温存によりこれらの問題を防げる可能性がある。東北大学医工学研究科で開発された「三次元高周波超音波顕微鏡装置」は、非侵襲的に10ミクロンの高解像度で三次元弾性イメージングが可能な装置である。また「光音響顕微鏡装置」は光音響現象により発生した超音波を、超音波振動子で受診し画像化する。超音波イメージングと光学的イメージングの長所を併せ持ち、高い解像度と深達度で組織の評価を行う。また使用するレーザー光の波長により組織に特異的なイメージングが可能である。これらの装置を改良し黄色靭帯の弾性変化をとらえ、この変化に関わる因子を画像化することが可能となれば、病態の解明につながるとともに新たな治療法の開発に大きく寄与する。

2. 研究の目的

本研究の目的は組織の超音波特性と組織像との比較検討を行い、黄色靭帯の弾性の画像化とともに弾性の低下に関わる因子を同定すること、その因子の画像化を行う装置の開発を念頭に置いた。

2. 研究の方法

(1) 黄色靭帯組織の弾性の評価

腰部脊柱管狭窄症患者から採取した黄色靭帯組織を使用し組織の弾性の評価を行った。超音波顕微鏡の設定ののち黄色靭帯組織の音速を計測し、パラフィン包埋した黄色靭帯組織から作成した切片と比較を行い弾性に関わる因子の検討を行った。

(2) 網羅的な遺伝子解析

画像化を試みる因子の候補を絞り込むため、黄色靭帯肥厚に関わる因子を検討した。腰部脊柱管狭窄症患者から採取した黄色靭帯組織を腹側と背側に分けmRNAの抽出を行い、腹側をコントロールとして背側に生じている遺伝子の変化を評価した。DNAマイクロアレイにより網羅的な遺伝子解析を行った。

(3) 網羅的なタンパク解析

腰部脊柱管狭窄症患者から採取した黄色靭帯組織を腹側と背側に分けタンパクの抽出を行い、腹側をコントロールとして背側に生じているタンパクの変化を評価した。nanoLC/ESI-MS/MSによるショットガンプロテオーム解析により網羅的なタンパク解析を行った。

腰部椎間板ヘルニア患者から採取した肥厚していない黄色靭帯組織をコントロールとし、腰部脊柱管狭窄症患者から採取した黄色靭帯組織に生じているタンパクの変化を評価した。nanoLC/ESI-MS/MSによるショットガンプロテオーム解析により網羅的なタンパク解析を行った。

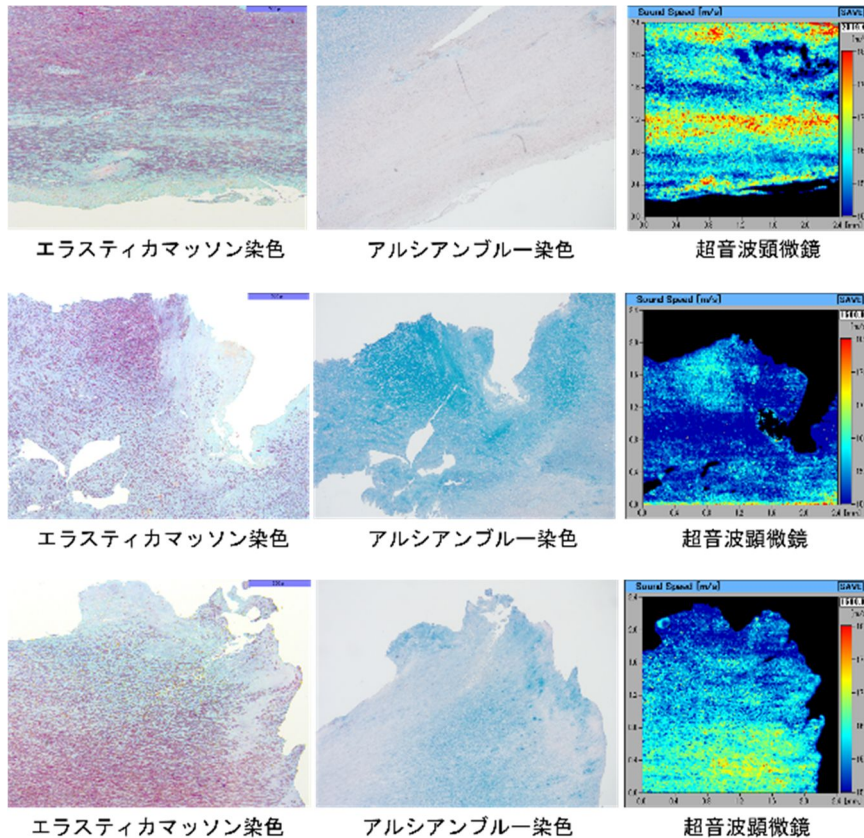
(4) 光音響顕微鏡装置を使用した黄色靭帯組織の画像化

遺伝子解析、タンパク解析の結果から肥厚した黄色靭帯で増加する因子を主眼に置いて光音

顕微鏡装置の調整を行い、黄色靭帯肥厚に関わる因子の画像化の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 肥厚した黄色靭帯組織では背側で弾性線維が減少していた。超音波顕微鏡での計測では弾性線維の減少した組織では音速が低くなる傾向があり、組織の軟化が生じている可能性が示された。また同部位では一致してプロテオグリカンが増加していた。弾性線維が減少しプロテオグリカン等の細胞外基質に置換されることにより、組織が疎となっている可能性が示唆された。



エラスティカマッソン染色・・・弾性線維：黒紫色

アルシアンブルー染色・・・プロテオグリカン：青色

超音波顕微鏡・・・音速（早い 遅い）：赤色 黄色 青色

組織（硬い 柔らかい）

(2) 8例の黄色靭帯を採取した。そのうち5例をプールサンプルとして使用した。マイクロアレイスライドを使用し、プローブ毎にシグナル強度を集計した。プローブの総数は56,605個であった。ノーマライズ処理した8サンプルのシグナル強度データのうち、8サンプル全てでシグナル強度が測定されてかつ最大値と最小値の差が1以上のプローブ19,932個について階層的クラスタリングを行った。結果腹側と背側の違いより個体差の方が遺伝子の発現への影響が大きいことが示唆された。また4群の腹側と背側の遺伝子の発現比で1以上 (up-regulated) または-1以下 (down-regulated) の転写産物を検出した。結果4の増加した遺伝子が同定された。線維化、組織修復、炎症に関わる因子が増加していた。またこれらの遺伝子について Gene Ontology のエンリッチメント解析を行った。結果共通して変動する遺伝子群について特定の Gene Ontology には結びつかなかった。黄色靭帯の腹側であっても変性がみられる組織もあり、コントロールの設定に検討が必要と思われた。

(a) ST8p/a up-regulated
Term
GO:0001501~skeletal system development
GO:0050832~defense response to fungus

(b) ST8p/a down-regulated
Term
GO:0071346~cellular response to interferon-gamma
GO:0086091~regulation of heart rate by cardiac conduction
GO:0007267~cell-cell signaling
GO:0086005~ventricular cardiac muscle cell action potential
GO:0006954~inflammatory response

(c) ST11p/a up-regulated
Term
GO:0001501~skeletal system development
GO:0030198~extracellular matrix organization
GO:0007186~G-protein coupled receptor signaling pathway
GO:0070098~chemokine-mediated signaling pathway
GO:0030574~collagen catabolic process
GO:0007267~cell-cell signaling

(d) ST11p/a down-regulated
Term
GO:0006954~inflammatory response

(e) ST14p/a up-regulated
Term
GO:0030049~muscle filament sliding
GO:0003009~skeletal muscle contraction

(f) ST14p/a down-regulated
Term
(none)

(g) pool_p/a up-regulated
Term
GO:0030574~collagen catabolic process
GO:0022617~extracellular matrix disassembly
GO:0030198~extracellular matrix organization
GO:0001503~ossification
GO:0007155~cell adhesion
GO:0030199~collagen fibril organization
GO:0071356~cellular response to tumor necrosis factor

(h) pool_p/a down-regulated
Term
(none)

(3)

8例の黄色靭帯を採取し、そのうち5例をプールサンプルとして使用した。4群の腹側と背側に発現したタンパクの比較検討をおこなった。全体で約2500のタンパクが抽出され、特徴としてはバイグリカン、デコリンなどのプロテオグリカンが多くみられた。腹側と背側の比較では共通して変動するタンパクは同定できなかった。今後遺伝子解析や組織評価と合わせて解析を行う。

腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯4例、腰部椎間板ヘルニア患者の黄色靭帯4例を使用した。全体で1151のタンパクが抽出された。275のタンパクが腰部脊柱管狭窄症の黄色靭帯で発現し、13の増加したタンパクが同定された。組織修復、軟骨化生、アミロイド沈着に関わる因子が増加していた。Gene Ontology解析では9の生物学的プロセスが同定された。超音波顕微鏡の結果と併せて黄色靭帯の肥厚部位の画像化のターゲットとして軟骨化生に伴い増加するプロテオグリカンが候補として挙げられた。

Term

GO:0030198~extracellular matrix organization

GO:0048048~embryonic eye morphogenesis

GO:0010952~positive regulation of peptidase activity

GO:0001523~retinoid metabolic process

GO:0022617~extracellular matrix disassembly

GO:0002576~platelet degranulation

GO:0044267~cellular protein metabolic process

GO:0030308~negative regulation of cell growth

GO:0010951~negative regulation of endopeptidase activity

(4) 光音響顕微鏡の調整を行い、プロテオグリカンの描出を試みたが、画像化には至らなかった。今後膠原線維やアミロイドなど他の因子の検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------