

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18533

研究課題名(和文)変性黄色靭帯におけるグリコサミノグリカン解析と腰部脊柱管狭窄症の治療への応用

研究課題名(英文)Glycosaminoglycan analysis of human degenerated lumbar ligamentum flavum by mass spectrometry

研究代表者

河野 通快(Kono, Michihaya)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：30547740

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)：腰部脊柱管狭窄の主要因に黄色靭帯の肥厚があり、靭帯内部には軟骨組織が増生し、軟骨基質には種々のグリコサミノグリカン(GAG)を含有している。本研究は変性靭帯に含まれるGAGの組成を、未変性靭帯を対照として、質量分析の手法を用いて明らかにすることを目的とした。変性靭帯におけるGAG含有量は尾側部>中央部>頭側部の順で尾側部は頭側部と比較して有意に高値であった。さらにGAGを二糖化酵素で処理し、質量分析により解析した結果、3種のコンドロイチン硫酸(CS-0S, CS-4S, CS-6S)、ヒアルロン酸、ケラタン硫酸を検出し、いずれも未変性靭帯と比較して変性靭帯において有意に高値であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰部脊柱管狭窄症の有病率は高く、今後も患者数が増加することが推計されているが、現行の薬物治療は対症療法が主体で、根本的に病態を解決する薬物治療はない。われわれは腰部脊柱管狭窄における変性靭帯に含まれるグリコサミノグリカンの質量分析を行った結果、種々のグリコサミノグリカンを検出し、いずれも未変性靭帯と比較して有意に高値であることを明らかとした。以上の結果から腰部脊柱管狭窄において増加したグリコサミノグリカンが新たな治療標的となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Qualitative changes in the extracellular matrix, including glycosaminoglycans (GAGs), have been reported in thickened ligamentum flavum (LF) in lumbar spinal canal stenosis (LSCS); however, no detailed quantitative reports are available to date. This study sought to accurately measure the changes in GAGs, collagen, and elastin levels via degenerative thickening of LF and to confirm these histologic changes. Degeneration of LF resulted in quantitative increases in all GAG, collagen, and elastin components. Standardized by dry weight, the increase in GAGs was significant and the results were consistent with histology. The GAGs were originally present only in trace amounts and were markedly increased by degeneration, suggesting that the increase in GAGs contributes to tissue thickening because of their water-inducing properties. Increased GAGs in LF may be a new therapeutic target in LSCS.

研究分野：脊椎脊髄外科

キーワード：腰部脊柱管狭窄 黄色靭帯 グリコサミノグリカン 質量分析

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 ( 共通 )

1. 研究開始当初の背景

腰部脊柱管狭窄症の有病率は高く、今後も患者数が増加することが推計されている。現行の薬物治療は対症療法が主体で、根本的に病態を解決する薬物治療は開発されていない。腰部脊柱管狭窄の主要因に黄色靭帯の肥厚があり、靭帯内部には軟骨組織が増生し、軟骨基質には種々のグリコサミノグリカン含有している。従来の報告は組織学的評価等による相対的な比較が中心で、質量分析による定量評価を試みた報告はなかった。われわれは質量分析によって微量サンプルからグリコサミノグリカン分析する技術を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究は腰部脊柱管狭窄症における変性した黄色靭帯に含まれるグリコサミノグリカンの組成を、未変性靭帯を対照として、質量分析の手法を用いて明らかにすること。

3. 研究の方法

本研究は島根大学医学研究倫理委員会の承認を受け実施した。

腰部脊柱管狭窄の手術時に摘出した一側の変性黄色靭帯組織(4名,片側4標本)を頭尾方向、内外側方向に各々3等分した小組織片36検体を分析対象とした(図1)。

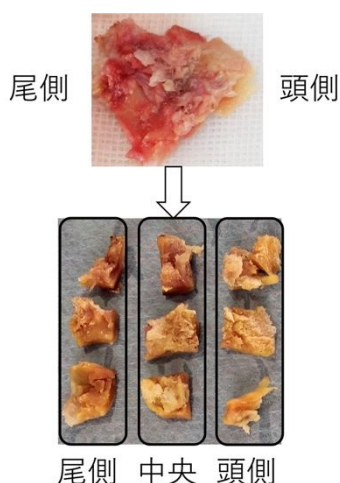


図1

各組織片を、サーモリシンによるタンパク分解で可溶化後、コンドロイチナーゼ ABC およびケラターナーゼで GAG 鎖を二糖まで分解し、LC-MS/MS で解析した(図2)。

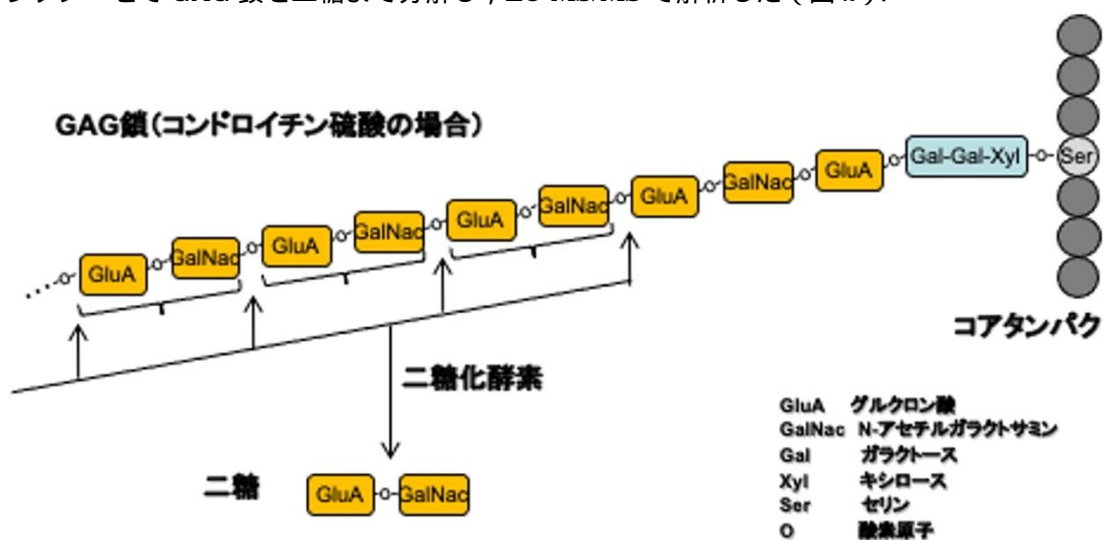


図2

対照として若年者の腰椎椎間板ヘルニアの手術時に摘出した未変性靭帯(3名,片側3標本,直径2.5mmの小組織片5検体)を解析した。

#### 4. 研究成果

GAG 含有量の平均値は変性靱帯：7.2 ± 5.7 μg/mg，未変性靱帯：3.5 ± 1.6 μg/mg と変性靱帯で有意に高値であった。

変性靱帯の部位別検討では，頭側部：2.5 ± 2.5 μg/mg，中央部：3.8 ± 3.7 μg/mg，尾側部：12.2 ± 5.6 μg/mg と尾側部は頭側部と比較して有意に高値であった。

変性黄色靱帯組織から 3 種のコンドロイチン硫酸 (CS-0S, CS-4S, CS-6S), ヒアルロン酸 (HA), ケラタン硫酸 (KS) を検出した (図 3)。

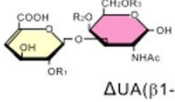
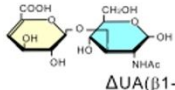
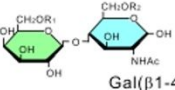
	二糖	構造	R1	R2	R3	分子量
コンドロイチン硫酸	ΔCS-0S	 ΔUA(β1-3)GalNAc	H	H	H	379.3
	ΔCS-2S		SO <sub>3</sub> H	H	H	459.4
	ΔCS-4S		H	SO <sub>3</sub> H	H	459.4
	ΔCS-6S		H	H	SO <sub>3</sub> H	459.4
	ΔCS-2S4S		SO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	H	539.4
	ΔCS-2S6S		SO <sub>3</sub> H	H	SO <sub>3</sub> H	539.4
	ΔCS-4S6S		H	SO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	539.4
	ΔCS-1S		SO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	619.5
ヒアルロン酸	ΔHA	 ΔUA(β1-3)GlcNAc	-	-	-	379.3
ケラタン硫酸	KS-6S	 Gal(β1-4)GlcNAc	H	SO <sub>3</sub> H	-	463.4
	KS-6S6S		SO <sub>3</sub> H	SO <sub>3</sub> H	-	543.4

図3

乾燥重量あたりの CS-0S, CS-4S, CS-6S, HA, KS の平均値はそれぞれ変性靱帯：0.14 ± 0.12 μg/mg, 1.9 ± 1.2 μg/mg, 3.7 ± 3.6 μg/mg, 0.78 ± 0.84 μg/mg, 0.68 ± 0.60 μg/mg, 未変性靱帯：0.04 ± 0.04 μg/mg, 0.38 ± 0.16 μg/mg, 0.38 ± 0.29 μg/mg, 0.14 ± 0.06 μg/mg, 0.06 ± 0.06 μg/mg で，全ての項目において変性靱帯が有意に高値であった。

ヒト黄色靱帯において，変性靱帯は未変性靱帯と比較して GAG 含有量が高値で，部位別には特に尾側部で未変性靱帯の約 3 倍に上昇していた。これは変性靱帯では尾側の椎弓付着部を中心に軟骨仮生が生じるとする過去の報告と一致した結果であった。また，変性靱帯で高値を示した GAG の組成は従来から報告されていた CS-6S 以外に，CS-0S, HA, KS が有意に上昇することが明らかとなり，靱帯の肥厚や硬化との関連が推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野通快・長子晴美・土屋美加子・真子卓也・内尾祐司
2. 発表標題 ヒト腰椎変性黄色靱帯における質量分析によるグリコサミノグリカンの二糖解析
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長子晴美・河野通快・三浦美樹子・宮地葵・原伸正・日吉峰麗・内尾祐司・土屋美加子
2. 発表標題 ヒト肥厚黄色靱帯グリコサミノグリカン(GAG)の二糖解析
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野通快・長子晴美・土屋美加子・内尾祐司
2. 発表標題 変性したヒト腰椎黄色靱帯におけるグリコサミノグリカンの分布
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長子晴美・河野通快・三浦美樹子・原伸正・日吉峰麗・内尾祐司・土屋美加子
2. 発表標題 肥厚黄色靱帯の局所的なコラーゲンとグリコサミノグリカン(GAG)量の変化
3. 学会等名 第93回日本生化学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 長子晴美・河野通快・三浦美樹子・原伸正・日吉峰麗・内尾祐司・土屋美加子
2. 発表標題 黄色靱帯肥厚によるタンパク組成変化
3. 学会等名 第44回日本医用マスメクトル学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長子晴美・三浦美樹子・河野通快・原伸正・日吉峰麗・土屋美加子
2. 発表標題 ラット組織におけるコラーゲン、エラスチンのクロスリンク組成の比較
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
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
---------	---------