

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18041

研究課題名（和文）腰部脊柱管狭窄症の黄色靭帯肥厚における酸化ストレスの関与と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Involvement of oxidative stress in hypertrophied ligamentum flavum in lumbar spinal canal stenosis

研究代表者

鈴木 悟士（Suzuki, Satoshi）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：80573360

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では黄色靭帯肥厚における酸化ストレスの関与を調査し、抗酸化剤である N-acetyl cysteine (NAC) が黄色靭帯肥厚に対する治療標的となりうるか否かを検証した。ヒト変性黄色靭帯では酸化ストレスが蓄積されており、単離培養した黄色靭帯細胞でも酸化ストレスおよび TNF- α 投与により上昇したコラーゲン1型および3型、TNF- α の mRNA は抗酸化剤である NAC を添加することで有意に低下した。同様にプロコラーゲン1型のタンパクも NAC を添加することで有意に抑制されることが判明し、酸化ストレスは黄色靭帯肥厚に関与しており、抗酸化剤投与は腰部脊柱管狭窄症に対する治療となりうると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰部脊柱管狭窄症（以下LSS）は日本整形外科学会の提唱する locomotive syndrome の三大要因の一つであり、国内患者数は約365万人と報告されている。わが国の高齢化に伴い、患者数が更に増加することが予想されるが、現在のところLSSの病態は未だ完全には明らかにはなっておらず、確立された治療法は鎮痛薬やPGE製剤などの対症療法、または手術療法に限られていた。本研究の結果から、酸化ストレスは黄色靭帯肥厚に関与しており、抗酸化剤投与は黄色靭帯肥厚が主な病態である腰部脊柱管狭窄症に対する新規治療となりうる可能性があると思われ、高騰する医療費削減の観点からも社会的意義は大きいと思われた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the involvement of oxidative stress (OS) in ligamentum flavum (LF) hypertrophy and whether the antioxidant N-acetyl cysteine (NAC) is effective in LF hypertrophy. A positive association was found between 8-OHdG or TNF- α expression and cross-sectional area of LF, indicating that OS is accumulated in human LF. Flow cytometry analysis showed that H₂O₂, buthionine sulfoximine (BSO), and TNF- α treatment significantly increased intracellular reactive oxygen species in primary LF cells. NAC inhibited the induction of LF hypertrophy markers by OS or TNF- α in a real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. Western blotting analysis indicated that p38, Erk, and p65 phosphorylation were involved in intracellular OS signaling in LF cells. In conclusion, our results indicated that OS could be a therapeutic target for LF hypertrophy. NAC may have potential as a therapeutic agent against lumbar spinal canal stenosis.

研究分野：整形外科

キーワード：腰部脊柱管狭窄症 酸化ストレス

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 (以下 LSS) は日本整形外科学会の提唱する locomotive syndrome の三大要因の一つであり、国内患者数は約 365 万人と報告されている。わが国の高齢化に伴い、患者数が更に増加することが予想されるが、現在のところ LSS の病態は未だ完全には明らかにはなっておらず、確立された治療法は鎮痛薬や PGE 製剤などの対症療法、または手術療法に限られている。高騰する医療費削減の観点からも LSS の病態を制御しうる新たな治療法の確立が急務と考え、研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では第一に黄色靭帯肥厚における酸化ストレスの関与を調査し、次いで抗酸化剤である N-acetyl cysteine (NAC) が黄色靭帯肥厚に対する治療標的となりうるか否かを検証した。

3. 研究の方法

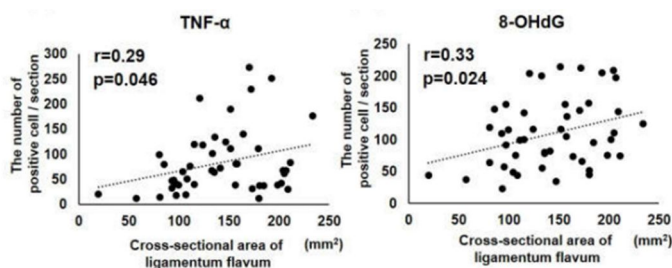
インフォームドコンセントを行い、同意が得られた 47 名の腰部脊柱管狭窄症および腰椎椎間板ヘルニアの手術時に採取した黄色靭帯を用いて TNF- α および酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の免疫染色を行った。

次いで単離培養したヒト変性黄色靭帯細胞に炎症性サイトカイン TNF- α および酸化ストレスとして過酸化水素およびブチオニンスルホキシミン (BSO) を添加し、細胞内の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) をフローサイトメトリー法で測定した。また同様に酸化ストレス、TNF- α 、抗酸化剤である N-acetyl cysteine (NAC) を添加し、コラーゲン 1 型および 3 型、TNF- α の各遺伝子発現を RT-PCR にて、プロコラーゲン 1 型のタンパク分泌を ELISA 法を用いて評価した。ROS の下流シグナルの検討は BSO を投与後 10 分後の MAPK および P65 について Western blotting 法にて検証した。

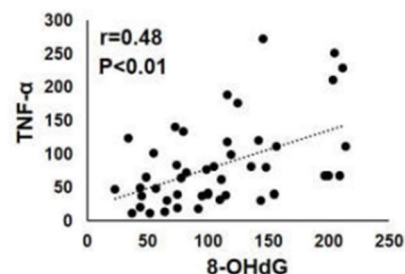
4. 研究成果

変性したヒト黄色靭帯では TNF- α の上昇とともに酸化ストレスマーカーである 8-OHdG が黄色靭帯の肥厚の程度に比例して上昇し (図 1)、8-OHdG と TNF- α の間にも中等度の正の相関が見られた (図 2)。

(図 1)

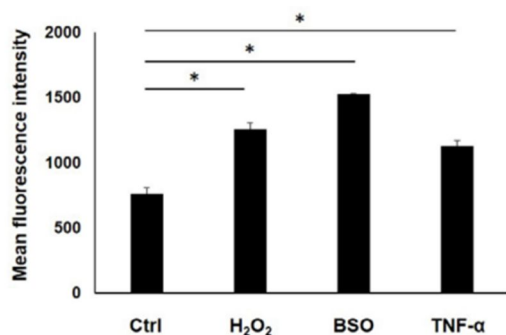


(図 2)



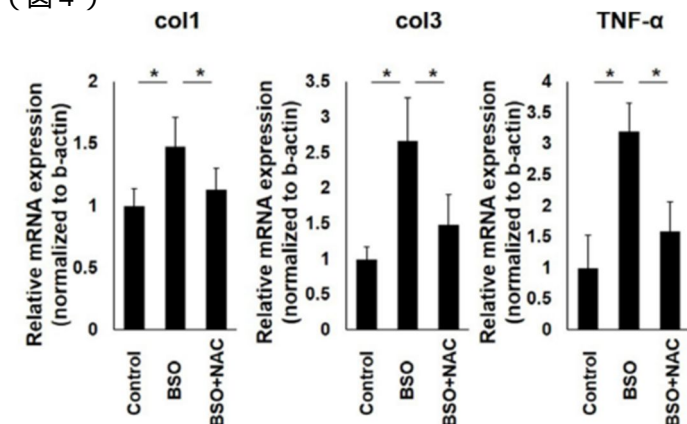
次いで単離培養したヒト変性黄色靭帯細胞に TNF- α および過酸化水素およびブチオニンスルホキシミン (BSO) を添加し、細胞内の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) をフローサイトメトリー法で測定したところ、コントロール群と比較し、両者とも有意に細胞内 ROS が上昇していた (図 3)。

(図 3)

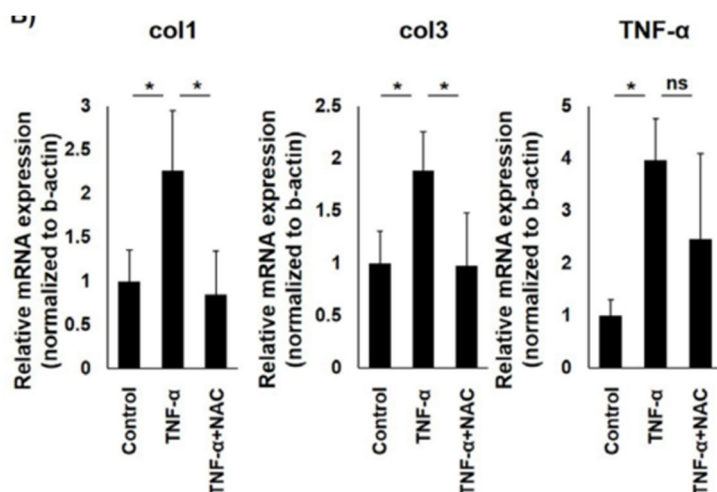


黄色靭帯細胞に TNF- α および酸化ストレスとして BSO、抗酸化剤として NAC を添加し、1 型および 3 型コラーゲン、TNF- α の各遺伝子発現を RT-PCR を用いて評価した。BSO を添加し、上昇し

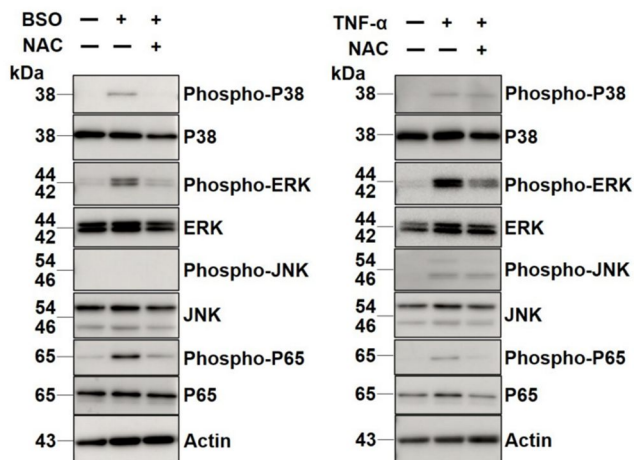
たコラーゲン 1 型および 3 型、TNF- α の mRNA は抗酸化剤である NAC を添加することで有意に低下した (図 4)。



また、TNF- α を添加して上昇した 1 型および 3 型コラーゲンの mRNA も NAC を添加することで有意に低下し、TNF- α の mRNA は低下する傾向を認めたが、有意差はなかった (図 5)。

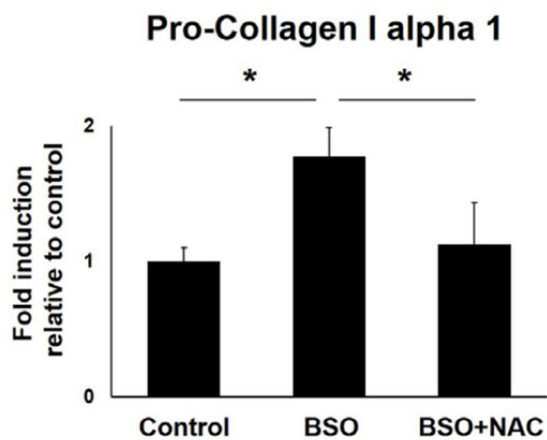


また、BSO 投与後 10 分で P38、ERK1/2、P65 でリン酸化が確認され、抗酸化剤を添加することにより上記のリン酸化が有意に抑制されており、抗酸化剤である NAC は下流シグナルにも影響を与えていることが判明した。さらに、TNF- α 添加によって誘導された ERK および P65 のリン酸化も NAC 投与により抑制される結果が得られた (図 6)。



最後に酸化ストレスがヒト黄色靭帯細胞においてコラーゲン産生に及ぼす影響を調査するため、BSO および BSO + NAC を添加し、プロコラーゲン 1 型 のタンパク分泌を ELISA 法で評価したところ、BSO で上昇したプロコラーゲン 1 型 のタンパクは NAC を添加することで有意に抑制されることが判明した (図 7)。

(図 7)



以上の結果から、酸化ストレスは黄色靭帯肥厚に関与しており、抗酸化剤投与は黄色靭帯肥厚が主な病態である腰部脊柱管狭窄症に対する治療をなりうる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito K, Kise H, Suzuki S, Nagai S, Hachiya K, Takeda H, Kawabata S, Ikeda D, Takubo K, Kaneko S, Fujita N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Potential Involvement of Oxidative Stress in Ligamentum Flavum Hypertrophy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm12030808	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 悟士 辻 収彦 岡田 英次朗 名越 慈人 八木 満 渡辺 航太 松本 守雄 中村 雅也 藤田 順之
2. 発表標題 炎症性サイトカインおよび酸化ストレスが腰部脊柱管狭窄症の黄色靭帯に与える影響
3. 学会等名 第34回 日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2020年～2021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
研究協力者	藤田 順之 (Fujita Nobuyuki)	藤田医科大学・整形外科・教授 (33916)	

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
---------	---------