

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09255

研究課題名（和文）黄色靱帯肥厚の分子メカニズム解明による腰部脊柱管狭窄症の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel treatment for lumbar spinal stenosis by identifying the molecular mechanism of ligamentum flavum thickening

研究代表者

鈴木 亨暢（Suzuki, Akinobu）

大阪公立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00445016

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：当研究は力学負荷及び終末糖化産物（Advanced Glycation End-products; AGEs）が黄色靱帯肥厚に与える影響とその分子メカニズムの解明を目的として行った。黄色靱帯肥厚ウサギモデルを用いて力学負荷による黄色靱帯肥厚に関わる3遺伝子を同定したが、糖尿病・黄色靱帯肥厚ウサギモデルは術後感染により飼育継続が出来ず、糖尿病（AGEs）と力学負荷の相互作用の評価が不能であった。そこで糖尿病ラットモデルを作製し、同モデルにおける黄色靱帯でのAGEs蓄積を確認した。今後は黄色靱帯肥厚ラットモデルを確立し、ラットを用いてAGEsと力学的負荷の相互作用を調査していく方針である。

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高齢者の歩行障害を引き起こす代表的疾患であり、黄色靱帯の肥厚が腰部脊柱管狭窄症の主要原因である。本研究により力学的負荷に伴う黄色靱帯の変動遺伝子が同定され、黄色靱帯肥厚における分子メカニズムの一端が明らかとなった。現在、腰部脊柱管狭窄症の治療法は手術による黄色靱帯切除や疼痛に対する対症療法のみである。さらなる研究が必要ではあるが、本研究結果を応用した非侵襲的な予防法や治療法の開発が可能になると考えられ、腰部脊柱管狭窄症を有する患者の健康寿命の延伸に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the effects and mechanisms of Advanced Glycation End-products (AGEs) and mechanical stress on ligamentum flavum hypertrophy (LFH) using an animal model of diabetes mellitus. Three genes were identified to be involved in mechanical loading-induced LFH using a rabbit LFH model. However, it was impossible to evaluate the interaction of diabetes (AGEs) and mechanical stress in the diabetic rabbit model due to wound infection. Then, we made a diabetic rat model and confirmed AGEs accumulation in the ligamentum flavum in the diabetic rat model. We plan to establish a rat model of LFH and investigate the interaction between AGEs and mechanical loading using rats.

研究分野：整形外科、脊椎外科

キーワード：黄色靱帯 終末糖化産物 腰部脊柱管狭窄症 糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腰部脊柱管狭窄症(以下 LSS)は高齢者の歩行障害を引き起こす代表的疾患である。黄色靭帯の肥厚は狭窄の主原因であり、力学負荷が黄色靭帯肥厚に関与すると考えられているが、その分子メカニズムは未だ十分解明されていない。超高齢社会を迎えたわが国では、LSS 患者も増加しているが、治療法は手術による黄色靭帯切除や疼痛に対する対症療法のみという現状がある。LSS の発生メカニズム解明により、狭窄の主要因である黄色靭帯肥厚の抑制が可能となれば、非侵襲的な治療や疾患の予防が可能となり、要介護者の減少や介護費用の低減、ひいては健康寿命の延伸に繋がる。

我々はこれまでに黄色靭帯の肥厚および変性について、手術時に採取されたヒト黄色靭帯組織や、ウサギによる隣接椎間障害モデル(以下ウサギ黄色靭帯肥厚モデル)(文献 1)を用いて、力学的ストレス分子を複数同定し、報告してきた(文献 2, 3, 4)。

一方で近年、様々な加齢性変性疾患の原因となる因子である終末糖化産物(Advanced Glycation End Products; 以下 AGEs)が注目されている。AGEs はコラーゲンの架橋形成や AGEs 受容体に結合し炎症を惹起する事で組織障害を引き起こすことが知られているが、我々は LSS 患者の肥厚黄色靭帯においても AGEs 蓄積が増加していることを見出した。また、AGEs 蓄積量は糖尿病患者の黄色靭帯でより多いが、糖尿病の有無に関わらず年齢と正の相関がみられた(文献 5)ことから、黄色靭帯が加齢性に肥厚する要因の一つとして AGEs が関与している可能性が示唆された。この様に力学的ストレス応答以外にも代謝応答による分子メカニズムも黄色靭帯肥厚に関与していると考えられるが、これらの詳細な分子メカニズムや相互作用については未だ不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、黄色靭帯における力学的ストレスに対する応答、および代謝産物に対する応答の個々の分子メカニズムおよび相互作用について、糖尿病ウサギおよび糖尿病ラットの黄色靭帯肥厚モデルと、ヒト肥厚黄色靭帯を用いて解明し、LSS の新規予防法ならびに薬物療法を開発することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖尿病ウサギ黄色靭帯肥厚モデルの作製とその組織学的、分子生物学的解析

New Zealand White Rabbit に膵島  $\beta$  細胞を破壊する Alloxan を静脈内投与し、糖尿病ウサギモデルの作製を行った。Alloxan 100mg/kg を 250mg/ml、50mg/ml、25mg/ml の 3 種類の濃度で単回投与する群および Alloxan 50mg/kg (25mg/ml) を 1 週ごとに複数回投与する群を作製した。次に Alloxan 100mg/kg を 50mg/ml の濃度で単回投与し、低血糖ショックを防ぐために Alloxan 投与直後に 20% ブドウ糖液を耳静脈より投与し、さらに投与後翌日まで飲み水を 5% ブドウ糖液へ変更する群を作製した。各群ともに週 1 回血糖値をモニタリングし、血糖値 200mg/dl を超える血糖値上昇の状態が維持されているものを糖尿病ウサギとした。

この糖尿病ウサギモデルとして安定した個体を 2 群に分け、過去に報告したウサギ黄色靭帯肥厚モデルとして第 2-3 腰椎および第 4-5 腰椎を金属プレートで固定し、第 3-4 腰椎に力学的負荷が生じるようにした力学的負荷群と、椎体側面の展開のみを行ったシャム群を作製した。対照として Alloxan を投与しない非糖尿病ウサギ力学負荷群及び同シャム群を作製した。

さらに上記のモデルを用いて、黄色靭帯における機械的ストレスと AGEs の相互作用について組織学的に評価し、分子変動を網羅的に解析した。組織学的解析としては上記各群より黄色靭帯を採取し、Elastica Van Gieson (EVG) 染色による弾性線維面積の計測、Toluidine blue (TB) 染色による軟骨基質陽性面積の計測を行った。また分子生物学的解析としては、それぞれの黄色靭帯(シャム群及び力学負荷群の固定椎間、力学負荷椎間の 3 群、1 群あたり各 3 検体)から RNA を抽出して次世代型シーケンサを用いた RNA-seq による網羅的遺伝子解析を行った。

#### (2) 糖尿病ラット黄色靭帯肥厚モデルの作製とその組織学的解析

##### 糖尿病ラットモデルの作製

過去の報告(文献 6)を参考に Sprague-Dawley Rat の腹腔内に Streptozotocin を投与することによって、糖尿病ラットモデルを作製した。8~10 週齢の雌性ラットを 6 時間絶食とした後、Streptozotocin 65mg/kg を腹腔内投与し、通常餌と低血糖発作予防のために 10% ショ糖液を自由に与えた。Streptozotocin 投与後 1 日目に 10% ショ糖液から通常水に変更し、尾静脈より血糖測定を行った。Streptozotocin 投与後 10 日目に再び 6 時間絶食とした後に血糖測定を行い、血中グルコース濃度が 150mg/dl 以上のものを糖尿病ラットとした。対照として腹腔内にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を投与した非糖尿病ラットを作製した。糖尿病ラットを 8 週間飼育後に犠牲死させ、黄色靭帯を含む脊椎組織、右大腿骨、腎臓を採取して各組織における AGEs の蓄積について免疫組織化学染色で評価を行った。

## ラット黄色靱帯肥厚モデルの作製

7~10 週齢の雌性ラットの a) L5-6 棘上靱帯切除および b) L5/6 椎間関節外側切除に加え、抗菌系を用いて c) L4-5, L6-S 棘突起を締結して L5/6 レベルに力学負荷をかけることで、同部位に黄色靱帯肥厚および変性を誘発させることとした(図 1)。椎弓背側の傍脊柱筋の展開のみを行ったシャム群、a) + b)を行った非固定群、a) ~ c)すべてを行った固定群の 3 群に分けて術後 8 週時の黄色靱帯を採取し、組織学的検討 (HE, EVG, TB 染色)を行った。

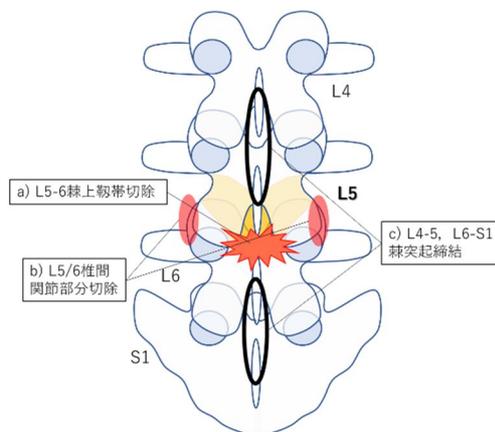


図 1. ラット黄色靱帯肥厚モデル

## 4. 研究成果

### (1) 糖尿病ウサギ黄色靱帯肥厚モデル

Alloxan 100mg/kg を投与したウサギは 250mg/ml の単回投与群は 5 羽中 4 羽が当日又は翌日に、50mg/ml の単回投与群は 2 羽中 1 羽が、25mg/ml の単回投与群では 7 羽中 5 羽が翌日に死亡し、膵島 β 細胞が破壊され一気にインスリンが放出されて低血糖となり死亡している可能性が考えられた。これらの単回投与群で生存した 4 羽は全て Alloxan 投与後 3 週においても血糖値 200mg/dl 以上が維持されていた。一方 Alloxan の 1 回投与量を 50mg/kg (25mg/ml) に減らして複数回投与とした群では、10 羽中 10 羽で生存が確認されたが、投与後 3 週で血糖値 200mg/dl を維持できたのは 1 羽のみであり適切な血糖値上昇状態を維持できていないことが判明した。これらの結果をもとに、100mg/kg (濃度 50mg/ml) を単回投与後にブドウ糖投与を行う群を作製したところ、本群では 9 羽中 8 羽が生存し、8 羽中 7 羽で投与後 3 週における血糖値 200mg/dl 以上を維持することが可能であった。これらの 7 羽のうち 3 羽を用いて、力学負荷による黄色靱帯肥厚モデルを作製したが、3 羽中 3 羽が死亡した (内 2 羽は感染、1 羽は衰弱死)。コントロールとして作製した非糖尿病ウサギ力学負荷モデルは 10 羽中 7 羽、同シャム群は 9 羽中 7 羽が 52 週生存した。

上記において長期生存が可能であった非糖尿病ウサギを 48 週後に犠牲死させて黄色靱帯を採取した。力学負荷群における L3-4 椎間の黄色靱帯では EVG 染色により弾性線維の減少、及び TB 染色により軟骨基質の増生が認められ、腰部脊柱管狭窄症患者における肥厚黄色靱帯と同様の組織学的変化がみられた(図 2)。

非糖尿病ウサギ力学負荷モデル群 (固定椎間 n=3, 力学負荷椎間 n=3) およびシャム群 (n=3) の黄色靱帯 (52 週モデル) から採取した RNA を用いて RNA-seq を施行したところ、力学負荷によって発現が増

加し、固定 (力学負荷なし) によって発現が低下する遺伝子として 33 遺伝子が同定された。過去に我々が作製したウサギ黄色靱帯肥厚モデル (非糖尿病) から採取した 16 週時の黄色靱帯 (コントロール (シャム群) 力学負荷椎間、固定椎間より採取) と、過去に報告されている腰部脊柱管狭窄症のヒト黄色靱帯のマイクロアレイの結果を参照し、重複する遺伝子変動を検討したところ、Periostin, HAPLN1, Biglycan の 3 遺伝子が抽出された。これらの 3 遺伝子について、非糖尿病ウサギ力学負荷モデル (52 週) の黄色靱帯における発現を Real time RT-PCR にて検証した所、3 遺伝子とも力学負荷によって有意に上昇し、固定によって低下が認められた。

### (2) 糖尿病ラット黄色靱帯肥厚モデルの作製

上述の如く、糖尿病ウサギモデルに力学的負荷を加えて黄色靱帯肥厚モデルの要素を付加する試みは、全例死亡となり飼育継続が困難であった。この結果を受け、ラットにおいてインプラントを使用せず黄色靱帯肥厚モデル作製を行った報告 (文献 7, 8) があることから、動物種をラットに変更して糖尿病と力学負荷を生じさせ、糖尿病ラット黄色靱帯肥厚モデルを作製することとした。

#### 糖尿病ラットモデル

Streptozotocin 65mg/kg を投与したラットは 4 匹中 3 匹が投与翌日に随時血糖 250mg/dl 以上を呈していた。投与後 10 日目の血糖測定では 4 匹すべてが随時血糖 400mg/dl 以上で、高血糖状態

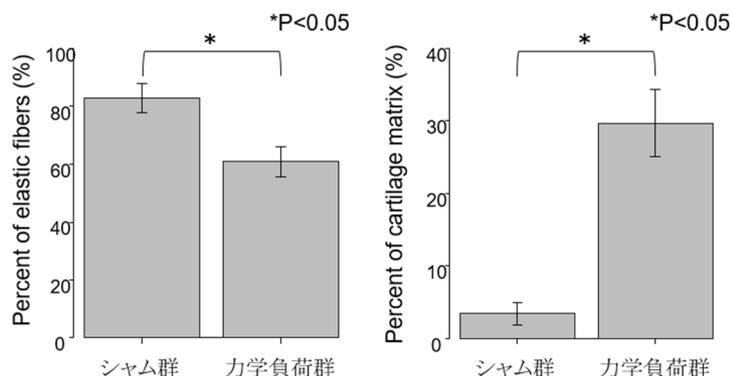


図 2. 非糖尿病ウサギ L3-4 椎間黄色靱帯における弾性線維と軟骨基質

を維持していた。糖尿病ラットの8週時点での黄色靭帯を含む脊椎組織、右大腿骨、腎臓において抗AGEs抗体(ab23722, abcam)による免疫染色を行ったところ、AGEs蓄積について糖尿病と非糖尿病では明らかな差を

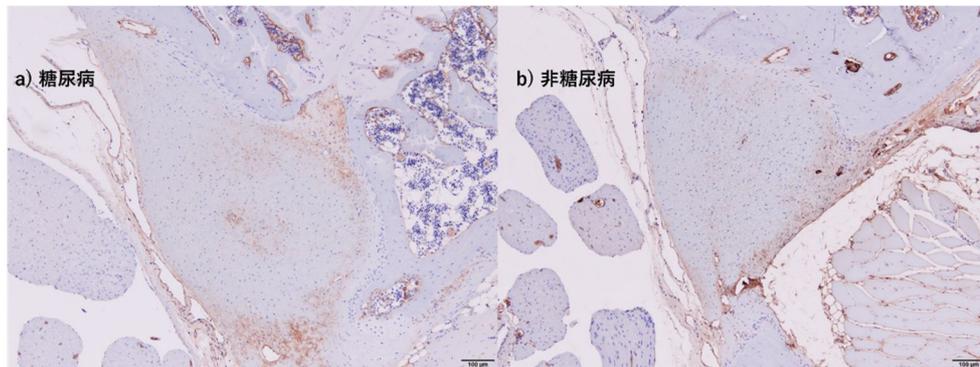


図3. ラット脊椎組織におけるAGEs免疫組織学的染色  
a)糖尿病ラット b) 非糖尿病ラット

認めなかった(図3)。しかしながら、黄色靭帯内、右大腿骨海綿骨内、腎臓にAGEs陽性部分を認め、免疫染色における抗体濃度や反応時間などの再設定に加え、糖尿病期間の延長や力学負荷の追加等が必要であると考えられた。

#### ラット黄色靭帯肥厚モデル

シャム群、非固定群、固定群のラットから採取した術後8週目のL5/6黄色靭帯について組織学的検討を行ったところ、HE染色、EVG染色において、黄色靭帯面積および弾性線維の割合については各群で明確な差を認めなかった。一方、TB染色においては、非固定群および固定群で、シャム群にはない軟骨基質増生の増生を認めた(図4)。これはヒト腰部脊柱管狭窄症患者における肥厚黄色靭帯と同様の所見であり、L5/6への力学的負荷の増加による変化と考えられるが、全体的な変化が乏しいことから椎間関節切除量の増加や力学負荷期間の延長などがさらに必要と考えられる。

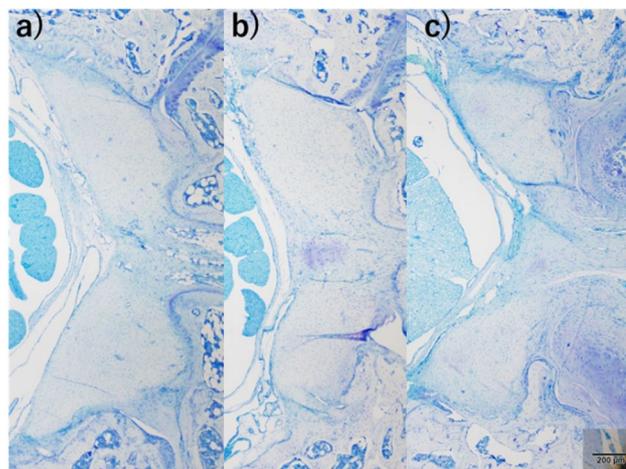


図4. ラットL5/6黄色靭帯におけるTB染色  
a)シャム群 b) 非固定群 c)固定群

#### <引用文献>

1. Hayashi K, Suzuki A, et al. Mechanical stress induces elastic fibre disruption and cartilage matrix increase in ligamentum flavum. *Sci Rep.* 2017 ;12;7(1):13092
2. Shafaq N, Suzuki A, Terai H, et al. Cellularity and Cartilage Matrix Increased in Hypertrophied Ligamentum Flavum: Histopathological Analysis Focusing on the Mechanical Stress and Bone Morphogenetic Protein Signaling. *J Spinal Disord Tech.* 2012;25(2):107-15.
3. Hayashi K, Suzuki A, et al. Mechanical stress induces elastic fibre disruption and cartilage matrix increase in ligamentum flavum. *Sci Rep.* 2017 ;12;7(1):13092
4. Hayashi K, Suzuki A, Terai H, et al. Fibroblast Growth Factor 9 Is Upregulated Upon Intervertebral Mechanical Stress-Induced Ligamentum Flavum Hypertrophy in a Rabbit Model. *Spine.* 2019;44(20):E1172-E1180
5. Maruf MH, Suzuki A, Terai H, et al. Increased Advanced Glycation End Products in Hypertrophied Ligamentum Flavum of Diabetes Mellitus Patients. *Spine J.*2019; (10):1739-1745.
6. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr Protoc.* 2021: Apr;1(4):e78.
7. Sato N, Higashino K et al. Role of Epiligament in Ligamentum Flavum Hypertrophy in Patients with Lumbar Spinal Canal Stenosis:a Pilot Study. *J Med Invest.* 2018;65(1.2):85-89.
8. Wang B, Gao C et al. The increased motion of lumbar induces ligamentum flavum hypertrophy in a rat model. *BMC Musculoskelet Disord.* 2021 Apr 6;22(1):334.

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 0件）

1. 著者名 Yabu Akito, Suzuki Akinobu, Hayashi Kazunori, Hori Yusuke, Terai Hidetomi, Orita Kumi, Habibi Hasibullah, Salimi Hamidullah, Kono Hiroshi, Toyoda Hiromitsu, Maeno Takafumi, Takahashi Shinji, Tamai Koji, Ozaki Tomonori, Iwamae Masayoshi, Ohyama Shoichiro, Imai Yuuki, Nakamura Hiroaki	4. 巻 37
2. 論文標題 Periostin increased by mechanical stress upregulates interleukin 6 expression in the ligamentum flavum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202200917RR	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
研究分担者	寺井 秀富  (Terai Hidetomi)  (20382046)	大阪公立大学・大学院医学研究科・准教授   (24405)	

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