

長寿医療研究開発費 平成24年度 総括研究報告

脊柱管狭窄症の分子病態と治療基盤に関する研究（24-12）

主任研究者 渡辺 研 国立長寿医療研究センター
運動器疾患研究部（骨細胞機能研究室長）

研究要旨

腰部脊柱管狭窄症は、高齢者に好発し、著しくQOLを低下させる運動器疾患であり、わが国の推定患者数は500万人以上に上る。このように高齢者の主要な運動器疾患にもかかわらず、本症の治療には、短期的効果や疼痛緩和の対症療法と、手術による狭窄圧の除去など、エビデンスに支持される治療法の選択肢は非常に限られている。主な狭窄要因である脊柱管内の黄色靭帯の変性肥厚について、オミックス解析による分子情報の取得から、脊柱管の臨床画像データの相関解析を行うとともに、診断・治療に資する分子病態について検討を行った。

主任研究者

渡辺 研 国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部（骨細胞機能研究室長）

分担研究者

酒井義人 国立長寿医療研究センター 脊椎外科（医長）

中村博幸 国立長寿医療研究センター 再生歯科医療研究部（副部長）

A. 研究目的

腰部脊柱管狭窄症は、高齢者に好発し、著しくQOLを低下させる運動器疾患であり、わが国の推定患者数は500万人以上に上る。このように高齢者の主要な運動器疾患にもかかわらず、本症の治療には、短期的効果や疼痛緩和の対症療法と、手術による狭窄圧の除去など、エビデンスに支持される治療法の選択肢は非常に限られている。診断ならびに手術技術の開発・改良が進み、現時点で手術治療が最も有効な治療方法とされている。しかし、

2011年に腰部脊柱管狭窄症診療ガイドラインが策定されたが、その前文において「現在のところ明確な病態が不明であり、原因が明確になれば将来再分類される可能性がある。」としており、病態や病型の統一概念が得られていない現状である。また、治療法の開発、とりわけ治療効果が高く、侵襲の低い生物製剤の利用が進んでいる他の運動器疾患（骨粗鬆症、関節リウマチなど）と大きく異なるのは、病態の理解と分類、治療法の開発などに資する分子病態が不明である事である。そこで、多層的疾患オミックスプロジェクトにおいて、腰部脊柱管狭窄症の黄色靭帯試料について分子情報が得られることから、これらの情報と臨床データを元に、病態の理解や診断・治療法の開発に資する腰部脊柱管狭窄症の分子病態・病理など分子基盤の解明（渡辺、中村）とその分子情報に裏付けられた病型分類の確立（酒井）を目的とする。

B. 研究方法

1. 分子病態に関する研究

Human FBLN5、MFAP4 ならびに HTRA1 cDNA は RT-PCR 法により単離し、pEF4-mycHisA に挿入した。HTRA1 はその活性に必須な Ser328 について PCR 法によって塩基置換によるアミノ酸変異 (Ser→Ala) を施した不活性型変異体 HTRA1SA を同様に作製した。HTRA1 には V5 タグ、FBLN5 および MFAP4 には myc-His タグを付与し、タンパク質の検出にはそれぞれ Anti-V5 タグ抗体ならびに Anti-myc タグ抗体を用いて行った。239T 細胞への遺伝子導入は FuGENE6 を用いた。FBLN5 ノックアウトマウス脊椎サンプルを関西医科大学中邨智之教授から供与頂き、エラスチカ・ワンギーソン染色ならびに I 型コラーゲンの免疫組織染色を行った。黄色靭帯細胞の調製は、PBS により洗浄した組織片をはさみで細かく切断し、コラゲナーゼ処理により組織片を分解し得られた細胞群を用いた。定量 PCR (Q-PCR) 法は、SYBR Premix Ex-taqII (タカラバイオ社) を用いて行った。

バイオインフォマティクス解析には、GeneSpring GX12 (Agilent 社) ならびに Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity 社) を用いた。

2. 病型分類に関する研究

国立長寿医療研究センターにおいて腰部脊柱管狭窄症および腰椎椎間板ヘルニアにより手術を施行し、多層的疾患オミックスプロジェクトで解析を行った 48 例（腰部脊柱管狭窄症 33 例：平均年齢 71.1±11.2 歳、腰椎椎間板ヘルニア 15 例：平均年齢 53.2±17.8 歳）について、術前 MRI 画像より L1/2～L5/s1 高位における黄色靭帯厚及び面積、脊柱管面積を計測した。黄色靭帯厚及び面積は左右計測値の平均値を採用した。また腰部脊柱管狭窄症においては術中所見および術前 MRI 画像より罹患高位の責任病変が靭帯性か骨性かを

分類した。臨床データは発症前および発症後の Barthel Index、術前の日本整形外科学会腰痛治療判定基準（JOA スコア；総 29 点満点、腰痛 3 点）、腰痛および下肢痛の visual analogue scale (VAS)、Roland Morris Disability Questionnaire (RDQ)、日常生活自立度を評価した。その他画像評価として、単純 X 線で腰椎側弯角（L1-S1 Cobb 角）、腰椎前弯角（L1-S1）、仙骨傾斜角、腰椎可動域（L1-S1）を、CT で関節水腫の厚さ（最大部位の左右平均値）と L4/5 椎間関節角（左右平均値）を、MRI で終板変性の有無を Modic change で評価し、体幹筋萎縮を L1/2 および L4/5 高位の横断面で多裂筋および脊柱起立筋断面積（左右の和）で評価した。また DXA 法で四肢筋量を身長²で除した skeletal muscle mass index (SMI)を計測し、それぞれ黄色靭帯評価との関連を検討した。

（倫理面への配慮）

本研究課題の実施にあたっては、厚生科学審議会答申「手術等で摘出されたヒト組織を用いた研究開発の在り方」（平成 10 年 12 月 16 日）等の関連指針に則り、肥厚黄色靭帯組織サンプルについては提供者の同意を前提とし、個人情報保護を徹底する。本研究は、倫理・利益相反委員会へ申請し、承認を受けた上で実施した。また、動物実験は、独立行政法人国立長寿医療研究センターの動物実験指針等に則り、動物愛護上の配慮に留意し、動物実験倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

1. 分子病態に関する研究

通常の腱・靭帯組織がコラーゲン線維を主とするのとは異なり、黄色靭帯は弾性線維を主とする特殊な靭帯組織である。多層的疾患オミックスプロジェクトのプロテオーム解析により顕著な増減を示す蛋白質は主に細胞外マトリックス分子であり、正常の弾性線維組織から変性・肥厚への変遷プロファイルを反映するものと考えられた。そこで、腰部脊柱管狭窄症由来変性黄色靭帯群で増加していた HTRA1 と、低下していた Microfibril associated protein-4 (MFAP4) について 293T 細胞を用いた共発現系を用いて相互作用解析を行ったところ、HTRA1 の発現用量依存的に MFAP4 発現量が減少した。一方、HTRA1 の活性中心である Ser328 を Ala に置換したプロテアーゼ活性欠損変異体 HTRA1SA では MFAP4 の減少が見られなかったことから、HTRA1 の酵素活性が MFAP4 の減少に寄与している可能性が考えられた。さらに腰部脊柱管狭窄症由来変性黄色靭帯群で顕著な発現低下が見られた Fibulin-5 (FBLN5) も HTRA1 で分解されることが示されたことから、Fbln5 ノックアウトマウスの腰椎黄色靭帯を観察したところ、腰部脊柱管狭窄症肥厚黄色靭帯に見られるような弾性線維の顕著な消失や膠原線維化の亢進は見られなかった。

一方、多層的疾患オミックスプロジェクトのトランスクリプトーム解析においては、転写因子 EGR2 が腰部脊柱管狭窄症由来変性黄色靭帯群で顕著に発現亢進していた。そこで、線維化との関連が示唆される FGF2 と TGF β について検討を行ったところ、FGF2 処理では発現変化は認められなかったものの、TGF β 処理によって EGR2 mRNA の発現が XX 倍にまで増加した。

黄色靭帯由来細胞を用いた検討では、遺伝発現プロファイリングをおこなったところ、COL21A1 ならびに ZIC1 が対象疾患群の腰部椎間板ヘルニア由来黄色靭帯細胞に比べて、腰部脊柱管狭窄症由来の黄色靭帯細胞での発現が高い傾向が観察された。

2. 病型分類に関する研究

本研究に用いた腰部脊柱管狭窄症における骨性狭窄は 19 例、靭帯性狭窄は 14 例であった。靭帯性狭窄は骨性狭窄群よりも有意に高齢であった。腰椎椎間板ヘルニアでは下肢痛が腰部脊柱管狭窄症よりも有意に強く、腰部脊柱管狭窄症では分類によらず腰痛が腰椎椎間板ヘルニアよりも有意に強い結果であった。ADL の低下では有意差を認めなかった。X 線評価ではヘルニア群で有意に側弯が少ない他、靭帯性狭窄では有意に前弯が強く、可動域も大きかった。椎間関節角は腰部脊柱管狭窄症で有意に急峻化していたがタイプ別では有意差を認めなかった。Modic 変化では有意差を認めなかった。腰部脊柱管狭窄症では各椎間とも黄色肥厚は腰椎椎間板ヘルニアに比べて大きい傾向にあり、両疾患とも下位腰椎ほど肥厚を認め、L4/5 が最も顕著であった。腰部脊柱管狭窄症を骨性狭窄と靭帯性狭窄に分けた分類では、靭帯性狭窄では L1/2 高位では骨性狭窄と比べ有意差は認めず、最狭窄部で有意な肥厚を認めた。脊柱管面積は骨性狭窄で有意に低いとは言えず、椎間別、病変別でも有意差を認めなかった。黄色靭帯面積の各高位での脊柱管面積に対する割合は、最狭窄部および L3/4, L4/5 高位で有意に靭帯性狭窄で高い比率であった。体幹筋断面積は多裂筋、脊柱起立筋とも、L1/2 および L4/5 両高位において、各群で有意差は認めなかった。DXA による四肢筋量評価では、靭帯性狭窄は上肢、下肢とも有意な筋量の低下を認め、SMI においても有意な低下を示した（年齢による補正済み）。罹患高位での黄色靭帯断面積は四肢筋量の低下と有意な相関を示したが ($p<0.01, r=0.45$)、年齢とも有意な正の相関を示した ($p<0.01, r=0.48$)。

D. 考察と結論

1. 分子病態に関する研究

FBLN5 と MFAP4 は弾性線維形成において、エラスチン分子のコアセルベーション過程とマイクロフィブリルの会合過程でそれぞれ重要な役割を担っており、これらのタンパク質が腰

部脊柱管狭窄症肥厚黄色靱帯で発現亢進していた細胞外プロテアーゼ HTRA1 の基質となり分解を受ける可能性を示した事は、黄色靱帯変性過程の上で HTRA1 の発現亢進が弾性線維の恒常性を破綻させている可能性を示している。一方、Fbln5 ノックアウトマウスの観察では Fbln5 欠損のみでは黄色靱帯変性が再現されないことから、単純な機能喪失だけでなく、組織変性に至るには別の因子が必要であると考えられた。HTRA1 は加齢黄斑変性や常染色体劣性脳血管病 (CARASIL) の原因遺伝子とも知られており、これらの疾患は網膜や血管の弾性線維の変性を伴っている。また、CARASIL には変形性脊椎症が合併している事が多く、脊椎の恒常性にも関与していることが示唆されている。これらのことから、HTRA1 が腰部脊柱管狭窄症の発症と何らかの関連性があると考え、靱帯での遺伝子発現誘導に用いる Tnmd-CreER トランスジェニックマウスの開発を含め、in vivo での検証実験に取りかかっている。

腰部脊柱管狭窄症由来黄色靱帯で発現亢進していた EGR2 が黄色靱帯変性との関連性が示唆されている TGF β により発現誘導されることが示された事から、線維化との関与が示唆された。また、加齢黄斑変性には TGF β ファミリーの GDF6 と相関が知られており、HTRA1 ノックアウトマウスでは GDF6 の発現亢進が報告されている事から、黄色靱帯変性過程において HTRA1-TGF β -EGR2 の経路が関与している可能性が考えられた。また、黄色靱帯由来細胞を用いた検討では、コラーゲン線維を主とする膠原線維性の腱・靱帯での発現が知られている COL21A1 が発現亢進しており、COL1A1, COL1A2 の発現亢進を特徴とする通常の線維化とは異なり、弾性線維性である黄色靱帯に特徴的な線維相の変遷を示唆している。EGR2 は腱細胞の分化との関連が報告されており、コラーゲン遺伝子の発現にも関与していることが知られている。現在、これらの経路について検証を行っている。

2. 病型分類に関する研究

腰部脊柱管狭窄症の分類においては 1954 年に Verbiest が疾患概念を確立して以降、狭窄の主因子は骨性要素や関節突起の肥厚、動的因子などが考えられ、黄色靱帯の肥厚は二次的な変化と考えられてきた。近年、画像検査の進歩により黄色靱帯の肥厚も主たる狭窄因子になり得ることが報告され、外科手術においては肥厚靱帯の切除のみでも良好な成績が得られる症例があることが報告されている。しかし靱帯肥厚の機序については不明であり、肥厚靱帯と臨床所見との見解を示した報告はなく、腰部脊柱管狭窄症の国際分類においても靱帯性狭窄は独立した概念とはなっていない。腰部脊柱管狭窄症の治療において、この黄色靱帯を標的にするには、靱帯性狭窄の臨床的背景や重症度を評価することは不可欠である。

靱帯性狭窄を MRI 画像横断面および術中所見より判断し臨床評価を行ったところ、黄色

靱帯肥厚は年齢と関連があることが明白であった。臨床症状は骨性狭窄と比較して特に重症度は変わらないが、骨性狭窄と比べて腰椎前弯と可動域が保たれており、腰椎における骨・関節の変性が少ないことが示唆される。この変性が少ないが故に靱帯に対する負荷がより大きくなっていることが考えられる。高位別に靱帯肥厚を評価すると、L1/2 高位での靱帯肥厚は骨性狭窄、靱帯性狭窄ともに起こっていないことから、下位腰椎における動的ストレスが靱帯肥厚の発生機序として最も考えられるであろう。今後、症例数を重ね L1/2 高位での靱帯肥厚に着目することにより、後天的な靱帯肥厚と先天性要素を持った靱帯肥厚の鑑別が可能となるかもしれない。遺伝的背景や分子レベルでの研究とのデータ照合により成果が期待される。

もう一つの注目として、加齢性筋肉減少症（サルコペニア）と黄色靱帯肥厚の関連が挙げられる。加齢とともに骨格筋、特に type II 線維が減少することは周知の事実であるが、その発生機序についてはまだ十分解明されていない。黄色靱帯の肥厚においても、type II collagen の増殖と弾性線維の減少が主たる原因と考えられてはいるが、上記の動的ストレスや、他の報告にもある椎間板高減少・椎弓間距離の短縮による解剖学的な影響による二次的なものであるかについては結論が出ていない。靱帯性狭窄において、体幹筋の萎縮には影響を与えず、四肢筋量の減少と関連していたことは興味深く、黄色靱帯肥厚と加齢性四肢筋量減少が単に加齢現象を示しているものなのか、あるいは共通の機序が働いているのか分子レベルでの解明が待たれる。

現状の研究段階での結論として、腰部脊柱管狭窄症における靱帯性狭窄と骨性狭窄の分類は、臨床的検討から発生機序が異なると考えられ、今後の黄色靱帯を治療標的とした場合の評価として有用かつ必須であると考えられる。さらなる症例数を重ねて本分類を確立していきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1 論文発表

- 1) Mouri A, Sasaki A, Watanabe K, Sogawa C, Kitayama S, Mamiya T, Miyamoto Y, Yamada K, Noda Y, Nabeshima T. MAGE-D1 regulates expression of depression-like behavior through serotonin transporter ubiquitylation. *J. Neurosci.* 32, 4562-4582, 2012
- 2) Dong L, Watanabe K, Itoh M, Huan CR, Tong XO, Nakamura T, Miki M, Iwao

- H, Nakajima A, Sakai T, Kawanami T, Sawaki T, Masaki Y, Fukushima T, Fujita Y, Tanaka M, Yano M, Okazaki T, Umehara H. CD4⁺ T cell dysfunctions through the impaired lipid rafts ameliorate concanavalin A-induced hepatitis in sphingomyelin synthase 1-knockout mice. *Int. Immunol.* 24, 327-37, 2012.
- 3) Lu MH, Takemoto M, Watanabe K, Luo H, Nishimura M, Yano M, Tomimoto H, Okazaki T, Oike Y, Song WJ. Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice. *J. Physiol.* 590, 4029-4044, 2012.
- 4) Mouri A, Noda Y, Watanabe K, & Nabeshima T. The roles of MAGE-D1 in the neuronal functions and pathology of the central nervous system. *Rev. Neurosci.*, *in press*.
- 5) Zama K, Mitsutake S, Watanabe K, Okazaki T, Igarashi Y. A sensitive cell-based method to screen for selective inhibitors of SMS1 or SMS2 using HPLC and a fluorescent substrate. *Chem. Physics Lipids.*, *in press*.
- 6) Sakai Y. Low Back Pain Pathogenesis and Treatment. InTech, 244, 2012.
- 7) Sakai Y. Osteophyte Formation in the Lumbar Spine and Relevance to Low Back Pain. Low Back Pain Pathogenesis and Treatment. InTech 27-40, 2012.
- 8) Yoshida D, Shimada H, Harada A, Matsui Y, Sakai Y, Suzuki T. Estimation of appendicular muscle mass and fat mass by near infrared spectroscopy in older persons. *Geriatr Gerontol Int* 12(4), 652-658, 2012.
- 9) Yoshida G, Kanemura T, Ishikawa Y, Sakai Y, Iwase T, Matsuyama Y, Ishiguro N. Cardiopulmonary function in elderly patients with cervical spondylotic myelopathy. *J Orthop Sci* 17(1), 3-8, 2012.
- 1 0) Nakashima H, Imagama S, Sakai Y, Nakamura H, Katayama Y, Ito Z, Wakao N, Matsuyama Y, Ishiguro N. Dumbbell-type hemangiopericytoma in the cervical spine: a case report and review. *J Orthop Sci.* Apr 14, 2012.
- 1 1) Ando K, Imagama S, Ito Z, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Sakai Y, Matsuyama Y, Ishiguro N. Differentiation of Spinal Schwannomas and Myxopapillary Ependymomas: MR Imaging and Pathologic Features. *J Spinal Disord Tech.* Mar 27, 2012.
- 1 2) 酒井義人 腰部脊柱管狭窄症における腰痛性間欠跛行. *J Spine Res.* 3(6):872-878, 2012.

- 1 3) 酒井義人 ロコモティブシンドロームとしての腰部脊柱管狭窄症～虚弱 (frailty)との係わりも含めて～ CLINICAL CALCIUM Vol.22, No.4, 59-66, 2012.
- 1 4) 酒井義人 理解を助けるトレーニング問題 高齢者運動器疾患について CLINICAL CALCIUM 22 (4), 113, 2012.
- 1 5) Eba H, Murasawa Y, Iohara K, Isogai Z, Nakamura H, Nakashima M. The Anti-Inflammatory Effects of Matrix Metalloproteinase-3 on Irreversible Pulpitis of Mature Erupted Teeth. PLoS ONE e52523, 2012.

2 学会発表

- 1) 渡辺 研 骨代謝とスフィンゴ脂質の機能 第7回スフィンゴセラピィ研究会 平成24年7月13日 能登
- 2) 渡辺 研、酒井義人、伊藤研悠、新飯田俊平、原田 敦 腰部脊柱管狭窄症肥厚靱帯由来細胞における転写因子の探索 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 平成24年10月27日 名古屋
- 3) 龔建生、紙田正博、東祥子、伊藤研悠、酒井義人、五十嵐文子、渡辺 研、山田哲司、尾野雅哉、原田 敦、新飯田俊平 プロテオミクスを基盤とした脊柱管狭窄症肥厚靱帯のタンパク質局在 第27回日本整形外科学会基礎学術集会 平成24年10月26日 名古屋
- 4) 渡辺 研 骨芽細胞系に発現する細胞外タンパク質リン酸化酵素 FAM20C/DMP4の同定 第85回日本生化学会大会 平成24年12月15日 福岡
- 5) 酒井義人、原田 敦、伊藤研悠 腰部脊柱管狭窄症における腰痛—神経性腰痛は起こりうるか— 第41回 日本脊椎脊髄病学会 平成24年4月19日 久留米
- 6) 酒井義人、原田 敦、伊藤研悠 腰部脊柱管狭窄症手術例におけるロコモティブシンドロームの影響 第85回日本整形外科学会学術集会 平成24年5月19日 京都
- 7) 酒井義人、原田 敦、竹村真里枝 高齢者頸髄症手術における四肢筋量の影響 第49回日本リハビリテーション医学会 平成24年6月2日 博多
- 8) 酒井義人、原田 敦 頸髄症手術におけるサルコペニアの影響 第54回日本老年医学会 平成24年6月29日 東京
- 9) 酒井義人 高齢者慢性腰痛症における神経障害性疼痛とプレガバリンの効果 第20回日本腰痛学会 平成24年11月3日神戸

- 1 0) 酒井義人 筋電図と筋音図を用いた腰痛患者の多裂筋活動の評価 第20回日本腰痛学会 平成24年11月3日 神戸
- 1 1) 中村博幸、中島美砂子 歯髄炎におけるMMP-3の抗炎症、組織再生作用の検討 日本結合組織学会 平成24年6月7、8日 東京
- 1 2) 中村博幸 MMP-3 の歯髄炎での抗炎症、組織再生作用の検討 日本再生歯科医学会（シンポジウムI）平成24年8月31日 神戸
- 1 3) 中村博幸、村澤裕介、磯貝善蔵 MMP-3の抗炎症、組織再生作用の検討 第10回日本エラスチン研究会 平成24年12月7、8日 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし