

長寿医療研究開発費 平成25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。今年度においては、黄色靭帯のトランスクリプトーム解析から病態のパスウェイ解析と狭窄要因を元にした病型分類の評価を行った。

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

国立長寿医療研究センターの倫理・利益相反委員会の承認をうけ、インフォームドコンセントの事前同意を得て腰部脊柱管狭窄症の手術から取得した黄色靭帯を液体窒素で凍結し、破碎を行った後、miRNeasy kit (Qiagen 社)を用いてRNAの調製を行った。マイクロアレイ解析はAgilent社製のものを使用し、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。また、腱・靭帯特異的遺伝子組換えマウスの検討には、タモキシフェンの投与により組換え誘導を行い、レポーターはmT/mGマウス（遺伝子組換えの起きていない組織・細胞ではmgTomato=赤色蛍光、遺伝子組換えの起きている組織・細胞ではmGFP=緑色蛍光）との交配により作出したマウスを用いて、検出は脱灰組織を川本法により切片を調製し蛍光顕微鏡にて観察を行った。

### 2. 病型分類に関する研究

腰部脊柱管狭窄症のため手術を施行した患者230例の臨床データをまとめた。平均年齢72.6歳（50～91歳）、男性126例、女性104例、術式は脊椎固定術102例、椎弓形成術（除圧術）128例であった。術前MRIにおけるT2強調横断像より最狭窄部の黄色靭帯部分の断面積および脊柱管断面積を面積計算ソフト（SYNAPSE<sup>®</sup>, FUJIFILM MEDICAL）を用いて計測した。術前MRI画像および術中所見より馬尾または神経根狭窄の主たる圧迫因子を靭帯性および非靭帯性（骨性狭窄、椎間板ヘルニアを含む）に分類し、臨床データと照合した。また靭帯性狭窄を定義するため、SPSSを用いてROC曲線を作成し、Youden Indexから最狭窄部

における靭帯成分の占める割合を靭帯面積/脊柱管面積でもとめ、靭帯性狭窄の cut off 値を求めた。

#### (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、個人情報の保護を徹底する。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

腰部脊柱管狭窄症における変性肥厚黄色靭帯のトランスクリプトーム解析を行ったところ、非変性黄色靭帯(腰椎椎間板ヘルニア由来試料)との比較において、1.5倍以上の増減として、変性黄色靭帯で565個の遺伝子発現亢進ならびに495個の遺伝子発現低下が検出された。これらの変動遺伝子についてIPAにより解析を行ったところ、炎症関連遺伝子の発現亢進、またパスウェイ解析では遺伝子発現変化が組織線維化の遺伝子変化と高い相関がある事が示された。そこで、これらのデータを狭窄要因に基づく病型分類(靭帯性狭窄と非靭帯性狭窄)により分別して、上流因子解析を行ったところ、靭帯性狭窄群では、上位からIFN $\gamma$  (activation Z score, 5.787)、TNF(同、2.819)、MAPキナーゼ阻害剤U0126(同、-2.424=阻害)などが推測された。一方、非靭帯性狭窄群においては、CSF2(同、3.793)、IL10(同、1.304)などが推測され、腰部脊柱管狭窄症の黄色靭帯では炎症が関わるものの、狭窄要因による病型でその成因が異なることが示唆された。

一方、モデル作出のため、靭帯特異的ならびに薬剤(tamoxifen)依存的に遺伝子組換えを起こすTnmd-CreERマウスを樹立した。トランスジェニックマウスのファウンダーは6系統得られ、そのうち1系統は繁殖できず、残りの5系統について解析を行ったところ、少なくとも1系統で腰椎黄色靭帯において薬剤依存的な遺伝子組換えを起こすことが判明した。また、系統間では時期特異性もあることから、系統の特徴により使い分けを行うことも可能と思われた。

#### 2. 病型分類に関する研究

靭帯性狭窄は113例(49.1%)、非靭帯性狭窄は117例(50.9%)であり、平均年齢は靭帯性

74.6±6.5 歳、非靱帯性 70.7±6.8 歳と有意に靱帯性で高齢であった(p<0.01)。術式も固定：除圧は靱帯性 34:79、非靱帯性 68:49 と有意に靱帯性では除圧術が選択されていた(p<0.01)。術前の痛みは腰痛、下肢痛とも VAS (0-10) および日本整形外科学会腰痛治療判定基準(JOA スコア; 29 点満点)では靱帯性・非靱帯性で有意差はなく、ADL 評価としての Roland Morris Disability Questionnaire (RDQ; 24 点満点)、EQ-5D(0-1)、健康度 VAS (0-10) のいずれも靱帯性・非靱帯性で有意差は認めなかった。SF-36 においては physical および mental component の 8 項目すべてで両群間で有意差を認めなかった。

画像所見では DXA 法で計測した四肢筋量は上肢・下肢とも靱帯性・非靱帯性で有意差はなく、単純 X 線での腰椎前弯角 (L1-S1)、仙骨傾斜角、腰椎可動域 (L1-S1) すべて両群間で有意差を認めなかった。MRI 上における腰背筋断面積も L1/2 高位および L4/5 高位の脊柱起立筋・腰部多裂筋断面積ともに靱帯性・非靱帯性で有意差は認めなかった。L4/5 高位の椎間関節角および椎間関節水腫の程度においても両群間で有意差を認めなかった。Hand-Held Dynamometer (Isoforce GT-300 ; OG GIKEN) で計測した術前の背筋力、腹筋力においても有意差を認めなかった。

MRI における最狭窄部の靱帯面積は靱帯性狭窄で 129.8±37.8mm<sup>2</sup>、非靱帯性狭窄で 63.2±32.0mm<sup>2</sup> と有意に靱帯性で大きく (p<0.01)、最狭窄部の靱帯面積/脊柱管面積は靱帯性 0.59±0.18、非靱帯性 0.31±0.13 と有意に靱帯性で病変における靱帯の占める割合が大きかった (p<0.01)。靱帯性・非靱帯性狭窄と靱帯面積/脊柱管面積の ROC 曲線を作成した。AUC は 0.92、95%CI=0.891~0.950 であった。

#### D. 考察と結論

腰部脊柱管狭窄症の診療において未だ狭窄要因による病型分類は広く認識されている訳ではないが、黄色靱帯に着目し解析を進めた事により、1) 病型により黄色靱帯の変性の分子病態が異なり、その成因も異なると考えられること、2) その病型は画像により客観的に分類できる可能性があることが示唆された。分子病態に関する研究では、靱帯性狭窄ならびに非靱帯性狭窄とも炎症関連遺伝子の発現亢進が検出されたが、これは組織の加齢変化の影響を受けていると考えられる。これまでに様々な組織の加齢性変化について遺伝子発現プロファイリングが行われてきているが、ほとんどの例で炎症関連遺伝子の発現亢進が見られる。しかし、今回病型に分けて解析する事により、炎症の分子病態がかなり異なる事が明らかとなった。これは黄色靱帯の変性肥厚が顕著なものでは加齢性とは異なる分子病態が見いだされており、黄色靱帯肥厚が加齢性変化だけでなく、狭窄要因となる「病的肥厚」の病態を示唆している。また、病型分類に関する研究では、これらの分類を客観的に評価するための臥位 MR 画像の計測データを元に分類モデルのドラフトが病型を反映し

ていたことから、今後、狭窄に関わる他の組織因子（腰椎や周辺組織のパラメータ）を加味することにより、病型診断ツールの開発につなげていければと考える。

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靭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、今後の黄色靭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) Eguchi T, Watanabe K, Hara ES, Ino M, Kuboki R, Calderwood SK. OstemiR: a novel panel of microRNA biomarkers in osteoblastic and osteocytic differentiation from mesenchymal stem cell. PLoS One, 8, e58796 2013.
- 2) Yano M, Yamamoto T, Nishimura N, Gotoh T, Watanabe K, Ikeda K, Garan Y, Taguchi R, Node K, Okazaki T, Oike Y. Increased oxidative stress impairs adipose tissue function in sphingomyelin synthase 1 null mice. PLoS One, 8, e61380, 2013.
- 3) Murasawa Y, Watanabe K, Yoneda M, Zako M, Kimata K, Sakai LY, Isogai Z. Homotypic versican G1 domain interactions enhance hyaluronan incorporation into fibrillin microfibrils. J. Biol. Chem. 288, 29170-29181, 2013.
- 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., 24, 61-70, 2013.
- 5) Ito Z, Imagama S, Kanemura T, Hachiya Y, Miura Y, Kamiya M, Yukawa Y, Sakai Y, Katayama Y, Wakao N, Matsuyama Y, Ishiguro N. Bone union rate with autologous iliac bone versus local bone graft in posterior lumbar interbody fusion (PLIF): a multicenter study. Eur Spine J, 22:1158-1163, 2013.

- 6) Sakai Y, Imagama S, Ito Z, Wakao N, Matsuyama Y. Outcome of back exercise for flexion and extension-provoked low back pain. Orthoped. Muscul. System 1, 119-124, 2013.
- 7) Imagawa S, Ito Z, Wakao N, Seki T, Hirano K, Muramoto A, Sakai Y, Matsuyama Y, Hamajima N, Ishiguro N, Hasegawa Y. Influence of spinal sagittal alignment, body balance, muscle strength, and physical ability on falling of middle-aged and elderly males. Eur Spine J. 22:1346-1353, 2013.
- 8) 酒井義人 高齢者慢性腰痛症に対するプレガバリンの効果 別冊整形外科 Vol.63, p93-99, 2013.
- 9) 酒井義人 筋肉と脊柱管狭窄症—ロコモティブシンドロームの関連 Bone Joint Nerve Vol.3 No.1, p111-117, 2013.

## 2 学会発表

- 1) 森 大気, 紙田正博, 酒井義人, 伊藤定之, 山田哲司, 尾野雅哉, 原田 敦, 新飯田俊平, 渡辺 研 腰部脊柱管狭窄症の変性黄色靭帯からの病態関連分子の解析 第45回日本結合組織学会・第60回マトリックス研究会大会合同学術集会 2013年6月28日, 和歌山
- 2) 森 大気, 紙田正博, 酒井義人, 伊藤定之, 山田哲司, 尾野雅哉, 原田 敦, 新飯田俊平, 渡辺 研 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯変性関連分子の解析 第86回生化学会大会, 2013年9月12日, 横浜
- 3) 森 大気, 渡辺 研, 紙田正博, 酒井義人, 伊藤定之, 山田哲司, 尾野雅哉, 原田 敦, 新飯田俊平 プロテオーム解析を利用した腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯変性関連分子の解析 第28回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013年10月17日, 千葉
- 4) Mori T, Kamita M, Sakai Y, Ito S, Yamada T, Ono M, Harada A, Niida S, Watanabe K. Alteration of Elastic Fiber Proteins in Ligamentum Flavum from Patients with Lumbar Spinal Canal Stenosis. 2014 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Mar. 16, 2014, New Orleans, LA, U. S. A

- 5) 酒井義人、原田 敦、伊藤定之 Lipo PGE1 製剤の腰部脊柱管狭窄症に伴う腰痛に対する効果 第 37 回東海プロスタグランディン研究会 2013. 5. 18. 名古屋
- 6) 酒井義人、原田 敦、伊藤定之 腰部脊柱管狭窄症におけるサルコペニア 第 86 回日本整形外科学会学術集会 2013. 5. 24. 広島
- 7) 酒井義人、原田 敦、竹村真里枝 高齢者慢性腰痛症における神経障害性疼痛の関与 第 50 回日本リハビリテーション医学会 2013. 6. 15. 東京
- 8) 酒井義人、原田 敦 サルコペニアによる ADL 低下における体幹筋の影響 第 55 回日本老年医学会 2013. 6. 6. 大阪
- 9) 酒井義人 高齢者慢性腰痛症に対する薬物療法—ランダム化試験によるプレガバリンとオピオイドの比較試験— 第 21 回日本腰痛学会 2013. 11. 2. 東京
- 10) 酒井義人 Lipo PGE1 製剤の腰部脊柱管狭窄症に伴う腰痛に対する効果 第 21 回日本腰痛学会 2013. 11. 2. 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