

長寿医療研究開発費 平成27年度 総括研究報告

脊柱管狭窄症の病型分類基盤に関する研究（27-16）

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（室長）

研究要旨

腰部脊柱管狭窄症は、臀部から下肢の疼痛やしびれを伴い、その約90%に歩行障害が認められる高齢者に好発する運動器疾患である。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。一方で本症は症候群であるとの認識もあり、新たな治療法の開発の礎となる層別化が必要と思われる。本研究課題では狭窄要因別病型、とくに黄色靭帯肥厚による脊柱管狭窄（靭帯性狭窄）とそれ以外（非靭帯性狭窄）に着目し、黄色靭帯の変性肥厚のメカニズム解明、病型の臨床上の意義の提示、および臨床画像をもとにした客観的評価系の確立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（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）

山村政隆 国立長寿医療研究センター 放射線診療部（技師長）

A. 研究目的

腰部脊柱管狭窄症は高齢者に好発し、わが国の推定患者数は数百万人（250～570万人：紺野ら、吉村ら）であり、高齢化により本疾患は急増している。腰・下肢痛を有する患者の実態調査（2005年、戸山ら）では、実に41%と最も多くを占めるのが腰部脊柱管狭窄症である。疼痛を伴う歩行障害は、高齢者のADLを低下させるだけでなく社会参加を阻み、QOLの低下とさらには精神的な障害をも招き、介護予防の大きな課題となっている。高齢化にあるわが国において介護予防、健康寿命延伸実現には本症への対応が大きな課題である。しかしながら、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

牽圧の除去など、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。また、診断や治療法の開発の基盤となる分子情報にも乏しい。これまでにわれわれは靭帯性狭窄と非靭帯性狭窄といった臨床上ほとんど用いられていなかった狭窄要因による病型分類について、病院、研究所、バイオバンクの協同で病理を反映すると思われる分子レベルでの明確な差異を提示し、またこの病型分類の臨床的差異も見出されつつある。これまでに分担研究者の酒井らは、靭帯性狭窄において保存的治療による下肢痛 VAS、腰痛 VAS、RDQ、JOA スコアの改善が非靭帯性狭窄に比べ有意に良好であることを示した。また、黄色靭帯の分子解析（プロテオーム、トランスクリプトーム、DNA メチローム解析）では、靭帯性狭窄と非靭帯性狭窄で異なる分子パスウェイが関わっている可能性が示されたことから、病型間で質的に異なることで、加齢性の変性と病的肥厚が異なるものであることが示唆されてきている。直近の国内外の診療ガイドライン（腰部脊柱管狭窄症診療ガイドライン 2011 年日本整形外科学会・日本脊椎脊髄病学会監修；Evidence-based clinical guidelines for multidisciplinary spine care: Diagnosis and treatment of degenerative lumbar spinal stenosis, 2011 North American Spine Society）においても、本症は「症候群」との位置付けがなされており、その診療には、除圧・固定を目的とした外科手術による治療の他に、薬物治療を含め新しい治療法の開発のためには、エビデンスや明確な基準が示された患者または病態の層別化が必要である。そこで本研究課題ではこれまでに得られてきた情報をもとに、腰部脊柱管狭窄症の診療に資する狭窄要因に基づく病型の意義を明らかにし、標準化・普及化に向けた検討を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

PAX9 下流因子候補の絞り込みには、マウス間葉系細胞株 10T1/2 細胞には、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子発現系により、PAX9, SCX, MKX をそれぞれ単独で発現させ、RNA を回収して行った Agilent 社のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを用いた。同様に、マウス軟骨細胞株 ATDC5 細胞には、レトロウイルスベクターによる PAX9 と tamoxifen 特異的変異型エストロゲン受容体リガンド結合ドメインとの融合タンパク（PAX9ER）を用いた活性誘導系を用い、軟骨分化誘導を行い、24 時間ならびに 2 週間後の RNA を調製して行った Agilent 社のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを用いた。黄色靭帯より調製した初代黄色靭帯由来細胞に対し、レトロウイルスベクターによる PAX9 のノックダウン（RNA 干渉法）を行い、PAX9 transcripts の顕著な減少を示すことを realtime PCR で確認し、その RNA を用いて行った Agilent 社のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを用いた。これらのデータを GeneSpring GX13 を用いて、条件付け絞り込みを行い、候補の抽出を行った。マウス Fgf18 遺伝子のプロモータ領域（1.5kb）

について Transcription factor Affinity Prediction (TRAP) Web Tool (Max Planck Institute for Molecular Genetics) を用いて PAX9 結合部位の推測を行い、また、この領域を pGL4.10 に組み込みレポーターコンストラクトを作製した (pGL4-mFgf18p-luc 他)。PAX9 発現ベクターとレポーターコンストラクトを共発現させ、転写活性化能を評価した。

画像形態計測自動化ソフトの開発では、匿名化用のトリミングツールを用いて個人情報の削除を行い、MR 画像の体軸断面像 (axial) を用いた関心領域 (ROI) 抽出ソフトウェアをみずほ情報総研と作製した。

#### (倫理面への配慮)

本研究は、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に則り、国立研究開発法人国立長寿医療研究センター倫理・利益相反委員会の承認を得て、個人情報の保護を徹底し行われた。また動物実験は、国立研究開発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、動物実験倫理委員会の承認を得て、動物愛護上の配慮に留意して行った。

### C. 研究結果

黄色靭帯は、脊柱管の後方で椎弓間を結ぶ弾性線維を主とする靭帯である。黄色靭帯の変性肥厚による脊柱管内神経の圧迫が、腰部脊柱管狭窄症の原因の一つである考えられている。しかし、黄色靭帯に関する分子情報についての知見は限られている。これまでに黄色靭帯初代培養細胞において PAX9 が高発現していること、PAX9 の発現量が正常黄色靭帯と比較し、腰部脊柱管狭窄症黄色靭帯において減少していること、ならびに PAX9 が腰部脊柱管狭窄症で散見される軟骨化生に関わる軟骨分化を抑制することを明らかにしている。さらに PAX9 の軟骨分化抑制に関与し得る下流因子について検討を行った。間葉系細胞 10T1/2 細胞に腱靭帯分化に関わる転写因子 SCX や MKX、または PAX9 を発現させて遺伝子プロファイリングを行った。さらに tamoxifen 依存的活性誘導系 (PAX9ER) をもちいた ATDC5 細胞の軟骨分化抑制系についても遺伝子発現プロファイリングを行った。また、黄色靭帯初代培養細胞における PAX9 ノックダウンにより変動する遺伝子群についても検討を行い、これらの3つの細胞系における変動遺伝子のうち、PAX9 機能獲得系実験である 10T1/2 細胞と ATDC5 細胞で共通して PAX9 依存的に発現亢進した遺伝子群と、PAX9 機能喪失系実験である黄色靭帯細胞におけるノックダウンにより発現低下した遺伝子群の解析から、軟骨分化に関与する Fgf18 の遺伝子発現が PAX9 の発現 (活性) と相関して増減していることを見出した。そこで、Fgf18 遺伝子上流配列を検索し、PAX9 結合予想配列を含むプロモーター配列を用いて PAX9 とのルシフェラーゼアッセイを行ったところ、コ

ントロールと比較し、PAX9 プラスミド量依存的にルシフェラーゼ活性が上昇した。また、推定された Fgf18 プロモーター上における PAX9 の 4 つの相互作用サイトのうちの 2 つあるいは 1 つを含むプロモータープラスミドを作成し、PAX9 とのルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、PAX9 との結合には 5'側に存在する 2 つの相互作用サイトが重要であることが明らかになった。

これまでに、酒井らは MR 画像を元にして、黄色靭帯と脊柱管の面積比をもとにした狭窄要因による病型分類の提案を行っている。この臨床画像を用いた形態計測の自動化により、臨床画像をもとにした客観的評価系の確立を行うこととし、本年度においては、臨床画像情報から個人情報の削除を自動化するトリミングツールならびに ROI の抽出ソフトウェアを作成した。これをもとに、腰椎各椎間の臨床画像から断面を抽出し、断面積の算出をさせた。次に作成した ROI 抽出ソフトウェアを元に矢状断面像 (sagittal) とスライス位置情報に対応させることにより自動体積計算を行う機能を実装させた。体積計算の検証を行い、計算アルゴリズムの調整ならびにソフトウェア実行上の不具合等の修正を行った。

#### D. 考察と結論

FGF18 は ATDC5 細胞において軟骨細胞分化抑制活性が知られていること、また関節軟骨の保護作用が報告されていることから、FGF18 が PAX9 下流のエフェクターとして、黄色靭帯における軟骨化生の抑制と、椎間関節組織の保護に関わる可能性が考えられた。今後、関節組織における FGF18 の一つのソースが黄色靭帯である可能性について検証し、黄色靭帯変性 (FGF18 発現消失) と関節の integrity の変化について検討を進めている。また、臨床 MT 画像を用いた脊柱管の形態計測による客観的評価系の確立においては自動化をめざしており、機械学習用のデータを蓄積している。

#### 研究協力者

国立長寿医療研究センター

放射線診療部 安藤 和徳

放射線診療部 星野 都男

放射線診療部 中澤 智子

#### E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kamita M, Mori T, Sakai Y, Ito S, Gomi M, Miyamoto Y, Harada A, Niida S, Yamada T, Watanabe K, Ono M. Proteomic analysis of ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. *Proteomics* (2015) 15:1622-1630.
2. Hida T, Shimokata H, Sakai Y, Ito S, Matsui Y, Takemura M, Kasai T, Ishiguro N, Harada A. Sarcopenic and sarcopenic leg as potential risk factors for acute osteoporotic vertebral fracture among older women. *Eur Spine J* 2015 Epub ahead of print.
3. Sakai Y, Ito K, Hida T, Ito S, Harada A. Neuropathic pain in elderly patients with chronic low back pain and effects of pregabalin; A preliminary study. *Asian Spine J*. 9(2), 254-262, 2015.
4. Sakai Y, Ito K, Hida T, Ito S, Harada A. Pharmacological management of chronic low back pain in older patients: a randomized controlled trial of the effect of pregabalin and opioid administration. *Eur Spine J*. 24(6), 1309-1317, 2015.
5. Yamada A, Nakamura E, Sato N, Morita Y, Ito T, Sakai Y, Yamazaki K. Postural Sway Response to Local Vibratory Stimulation in Young, Middle-aged and Elderly People in Standing Position. *Journal of Robotics, Networks and Artificial Life* 2(1), 17-21, 2015.
6. Ito T, Sakai Y, Nakamura E, Yamazaki K, Yamada A, Sato N, Morita Y. Relationship between paraspinal muscle crosssectional area and relative proprioceptive weighting ratio of older persons with lumbar spondylosis. *J Phys Ther Sci* 27: 2247-2251, 2015.
7. 酒井義人 非特異的腰痛における体幹筋量および筋機能の及ぼす影響. *J Spine Res* 6: p1019-1023, 2015.
8. 伊藤 忠, 酒井義人, 山崎一徳, 中村英士, 山田彩加, 佐藤徳孝, 森田良文. 腰部脊椎症の高齢者への局所振動刺激による固有受容加重比率の性差. *理学療法科学* 2015;30(4):533-537.

### 2. 学会発表

1. 森 大気、酒井義人、村澤裕介、新飯田俊平、原田 敦、松田明生、大保木啓介、松本健治、渡辺 研 腰部脊柱管狭窄症由来の黄色靭帯細胞を用いたヒト黄色靭帯におけるPAX9の機能解析 第47回日本結合組織学会学術大会 2015.5.16 東京
2. Watanabe K. Depletion of sphingomyelin synthase genes, Sgms1 and Sgms2, in adult mice. 10<sup>th</sup> SphingoTherapy Conference 2015.6.17 加賀
3. 酒井義人、原田 敦、伊藤定之、伊藤研悠、飛田哲朗 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚の影響-保存治療における新しい分類- 第44回日本脊椎脊髄病学会

2015. 4. 16-19. 福岡

4. 酒井義人、原田 敦 腰部脊柱管狭窄症における治療成績とサルコペニア 第 52 回日本リハビリテーション医学会 2015. 5. 28. 新潟
5. 伊藤定之、渡辺 研、森 大気、原田 敦、新飯田俊平、酒井義人 腰部脊柱管狭窄症における肥厚黄色のトランスクリプトーム解析 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 2015. 10. 22. 富山
6. 酒井義人 高齢者慢性腰痛症に対するオピオイドとアセトアミノフェンの効果 第 23 回日本腰痛学会 2015. 11. 14. 東京
7. 酒井義人 高齢者慢性腰痛症におけるサルコペニア 第 23 回日本腰痛学会 2015. 11. 14. 東京
8. 酒井義人 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚を基盤とした新しい分類と治療成績 第 23 回日本腰痛学会 2015. 11. 15. 東京
9. 酒井義人 高齢者の腰痛における固有感覚受容と姿勢制御 第 23 回日本腰痛学会 2015. 11. 15. 東京
10. Ito S, Watanabe K, Mori T, Harada A, Niida S, Sakai Y. Transcriptomic Analysis of Ligamentum Flavum in Patients with Lumbar Spinal Stenosis. Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, 2016. 3. 6. Florida, USA.

#### 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