

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

椎圧の除去など、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 (Sakai et al. 2017)。また、黄色靭帯の分子解析では、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。28 年度においては、靭帯性狭窄と非靭帯性狭窄を分類する指標のひとつである最狭窄部における黄色靭帯面積/脊柱管面積比 (Ligamentum flavum/Spinal canal Area Ratio, LSAR) を用いたプロファイリングと前年度より引き続き、MR 画像形態計測自動化ソフトの開発を行った。

B. 研究方法

LSAR に基づき分類した、NCGG バイオバンク登録の靭帯性 LSS (n=10; 疾患群) および、非靭帯性 LSS あるいは腰部椎間板ヘルニア症 (n=10, 対照群) の患者の黄色靭帯から Total RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイ (2,588 miRBase mature miRNAs, Release 21.0, Agilent Technologies) に供した後、データ解析 GeneSpring GX (Agilent Technologies) およびパスウェイ解析 (Ingenuity Pathway Analysis, QIAGEN) を行った。靭帯性狭窄と非靭帯性狭窄に示差的に発現する miRNA の抽出には、Welch の T-test (cutoff, $p < 0.05$) を用いた。また、年齢および LSAR との相関は、ボンフェローニ補正を行いスピアマン順位相関係数 (cutoff $0.4 < |r_s|$) により解析した。

画像形態計測自動化ソフトの開発では、トリミングツールを用いて画像情報から個人情報

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作製した。さらに、靭帯部位のトレースを記録するソフトを作出し、機械学習用にデータを蓄積した。機械学習と体積自動計算ソフトはみずほ情報総研と作成した。

(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。本年度では特に miRNA のプロファイルを元にした解析を中心に行った。年齢層は靭帯性狭窄群 (75.70 ± 4.83 歳) ならびに対照群 (70.70 ± 10.98 歳) で有意な差異が認められなかった。黄色靭帯面積/脊柱管面積比 (LSAR) は、対照群と比較して、靭帯性狭窄による腰部脊柱管狭窄症を罹患した疾患群が有意に高かった (0.662 ± 0.154 vs 0.301 ± 0.068 , $p = 0.0000171$)。miRNA マイクロアレイにより、靭帯性狭窄において発現量が有意に変化した 10 個の miRNA が抽出された。抽出された miRNA のうち、9 個が靭帯性狭窄症例で低下し、1 個が増加していた、また、miR-423-5p、miR-4306、miR-516b-5p、および miR-497-5p は LSAR と相関したが、それらは年齢との相関は認められなかった。靭帯性狭窄症例において発現が増減していた miRNA のパスウェイ解析の結果、AHR シグナル、Wnt/ β -catenin シグナル、および insulin receptor シグナル経路が黄色靭帯肥厚に関与する可能性が示された。

これまでに、酒井らは MR 画像を元にして、他の臨床情報に加え、LSAR を一つの指標として加味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、ROI 情報の機械学習ソフトウェア開発の学習用データ蓄積のため、放射線診療部において手作業で 1,500 枚以上の腰椎 T2 画像について ROI をトレースした。予想通り個体間の ROI の分散が大きく、それらをまとめて学習させると予測精度が劣化してしまうことから、ROI の輪郭の類似性から 20 程度のクラスタにグルーピングして、クラスタごとに学習させることとした。臨床画像を用いるため 4mm 間隔の画像取得となるため、体積計算

には線形補完とスプライン補完を適応して検証したところ、現時点でROIの抽出点追加により精度の向上が見られ、ベータ版とした。今後、学習用画像の再検証と計算アルゴリズムの検討を行い、精度の向上を行う予定である。

D. 考察と結論

腰部脊柱管狭窄症患者における黄色靭帯変性肥大の分子病理を解明するための総合的なオミックス研究の数は増加している。これらの検討では、年齢層が低い腰椎椎間板ヘルニア患者の黄色靭帯試料を対照として使用している。黄色靭帯厚は年齢に関連するとのいく報告されている。実際、本研究においてLSARは被験者(n=20)の年齢($r_s = 0.548, p = 0.012$)に相関し、年齢相関miRNA発現パターンも同定された。酒井らが提案した新しい分類システムを用いて、腰部脊柱管狭窄症患者を、靭帯性狭窄を定義することによって選択することができ、対照となる非靭帯性狭窄の黄色靭帯試料を同様の年齢層の高齢者の患者から得ることが可能となった。形態学的パラメータであるLSARは、この病型分類の診断上の意義に加えて、黄色靭帯肥厚の分子メカニズムを研究する上で、分子プロファイリングのための定量的臨床マーカー候補でもある可能性を示した。

本研究では年齢相関発現miRNAを軽度の有意性($p < 0.05$)で抽出し、さらに肥厚黄色靭帯および非肥厚黄色靭帯を有する患者間で差次的に発現するmiRNAを同定した。これらのmiRNAは重複しておらず、黄色靭帯の加齢に伴う肥厚と病的肥厚が異なる分子病理を有し得ることを示唆している。最近、黄色靭帯肥厚に関与するmiRNA種が報告されている。Chenら脊柱管狭窄症(平均65.67歳)および腰椎椎間板ヘルニア(平均25.17歳)サンプルを比較し、黄色靭帯のmiR-155レベルが黄色靭帯厚($r = 0.958, p < 0.01$)と関連し、I型およびIII型コラーゲンのmRNAおよびタンパク質発現レベルが増加したことを示した(Chen et al. 2014)。一方、Xuら腰部脊柱管狭窄症(66.7±7.1歳)および腰椎椎間板ヘルニア(36.5±3.2歳)の比較により、腰部脊柱管狭窄症患者からの黄色靭帯で発現レベルが上昇し、I型およびIII型コラーゲンの分解を阻害するTIMP2を抑制することにより黄色靭帯肥厚を調節するmiR-221を同定した(Xu et al. 2015)。本研究では、これらのmiRNAは、黄色靭帯肥厚に有意に関連するものとして抽出されなかった一方、本研究において年齢相関miRNAとして同定されたmiR-29cおよびmiR-223もまた、Xuらによって示差的に発現するmiRNAとしてリストアップされている。この差はおそらく対照試料の選択によるものであるが、詳細な分析のためにはさらなる分析が必要である。

線維性変化が黄色靭帯肥厚の進行における主要な事象であることは広く受け入れられている。miR-497-5pのみが肥厚した黄色靭帯において増加することが確認され、LSARに対して正相関していた。最近、miR-497-5pは、肺線維症をもたらす肺内在性間葉系幹細胞の

筋線維芽細胞分化を誘導することが記載されている。黄色靭帯における筋線維芽細胞は、肥厚に関与している可能性が報告されており、したがって、miR-497-5p は、黄色靭帯における筋線維芽細胞の促進を介して肥厚に役割を果たす可能性があることを示唆している。内膜の線維化を特徴とする閉塞性動脈硬化症患者の硬化性試料において、miR-4306 が有意に減少したことが報告されている。これらのことから、miR-497-5p ならびに miR-4306 は、LF の線維性変化においても役割を果たす可能性がある。一方、LSAR と相関する発現 miRNA として抽出された miR-423-5p および miR516b-5p も、変性肥厚に潜在的に関与していると考えられるが、現時点で病理に関連する機能情報は入手できなかった。これらの 4 つの miRNA のさらなる機能解析は、黄色靭帯肥厚における直接的な意義を実証するために必要と考えられる。

これらの miRNA が潜在的に関与する標準的経路をバイオインフォマティクスにより予測した。AHR シグナル伝達は、薬物代謝における酵素の誘導に関与する細胞内受容体型転写因子である AHR の活性化によって誘発され、免疫応答および細胞周期制御に関与する。AHR の主要リガンドの中には、テトラクロロジベンゾダイオキシシンであり、これは喫煙によって血清中で上昇する。リガンドによって誘発された AHR シグナル伝達は、炎症を調節し、アテローム性動脈硬化症の発症に関連する可能性がある。また、Ahr ノックアウトマウスでは肝の線維化が亢進することなど、AHR シグナル伝達のリガンド非依存性作用も示されており、AHR シグナル伝達の調節機能は様々な線維化様病変に関与することが知られている。

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達は、骨関節の発生および関節の完全性の調節など、発生、生理学的および病理学的状況においても多面的な役割を果たす。黄色靭帯の骨化を伴う患者由来の培養黄色靭帯細胞において、周期的なメカニカル年レスにより β -カテニンシグナル伝達が誘発されることが報告されている。TGF β 1 は、AHR 経路および Wnt/ β -カテニン経路の両方に関与しており、また組織線維症の主要な調節因子として知られており、黄色靭帯肥厚においても重要な役割を果たすことが示唆されている。一般的に、組織の線維化は持続的な炎症状態により引き起こされると考えられている。最近、マウスモデルの黄色靭帯の変性肥厚に機械的ストレスとマクロファージ浸潤の両方が関与していることが示された (Saito et al. 2017)。このことから、弾性線維の喪失などの黄色靭帯の加齢性変化に加え、狭窄の原因となるような病的な黄色靭帯の肥厚には炎症などの TGF β 発現亢進を伴うイベントが想定される。

また、インスリン受容体シグナル伝達が黄色靭帯関連経路として抽出された。本研究では腰部脊柱管狭窄症の本病型分類間でインスリン抵抗性指標 (HOMA-IR) が靭帯性狭窄症例において有意に高値であることを明らかにしていることから、臨床的意義と基礎的検討

の交点となり、非常に興味深く、今後の検討課題とした。

研究協力者

国立長寿医療研究センター

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. Mori T, Sakai Y, Kayano M, Matsuda A, Oboki K, Matsumoto K, Harada A, Niida S, Watanabe K. MicroRNA transcriptome analysis on hypertrophy of the ligamentum flavum from patients with lumbar spinal stenosis. Spine Surg. Related Res. in press.
2. Sakai Y, Ito S, Hida T, Ito K, Koshimizu H, Harada A. Low Back Pain in Patients with Lumbar Spinal Stenosis- Hemodynamic and electrophysiological study of the lumbar multifidus muscles. Spine Surg. Related Res. 1, 82-89, 2017.
3. Sakai Y, Ito S, Hida T, Ito K, Harada A, Watanabe K. Clinical outcome of lumbar spinal stenosis based on new classification according to hypertrophied ligamentum flavum. J Orthop Sci.22, 27-33, 2017.
4. Imagama S, Ito Z, Ando K, Kobayashi K, Hida T, Ito K, Tsushima M, Matsumoto T, Nakashima H, Wakao N, Sakai Y, Matsuyama Y, Ishiguro N. Rapid Worsening of Symptoms and High Cell Proliferative Activity in Intra- and Extramedullary Spinal Hemangioblastoma: A Need for Earlier Surgery. Global Spine J. 7, 6-13, 2017.
5. Hida T, Sakai Y, Ito K, Ito S, Imagama S, Ishiguro N, Harada A. Collar Fixation Is Not Mandatory After Cervical Laminoplasty: A Randomized Controlled Trial. Spine 42, E253-E259, 2017.
6. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. Exp. Anim. 65:455-463, 2016.
7. Imagama S, Ito Z, Wakao N, Ando K, Hirano K, Tauchi R, Muramoto A, Matsui H, Matsumoto T, Ishiguro N, Sakai Y, Katayama Y, Matsuyama Y. Posterior Surgery for Adolescent Idiopathic Scoliosis with Pedicle Screws and Ultra-high Molecular

- Weight Polyethylene Tape: Achieving the Ideal Thoracic Kyphosis. Clin Spine Surg. 29, E376-E383, 2016.
8. Kamiya Y, Horii E, Sakai Y, Inoue H. Cervical cord compression in pediatrics with hereditary multiple exostoses: a report of two cases and review of the literature. J Pediatr Orthop B 25, 267-270, 2016.
 9. 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. 25, 3424-3431, 2016.
 10. 酒井義人, 原田 敦, 伊藤定之, 飛田哲朗, 伊藤研悠, 渡辺 研 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. J Spine Res 7: p1028-1033, 2016
 11. 酒井義人, 原田 敦, 伊藤定之, 飛田哲朗, 伊藤研悠 慢性腰痛症におけるサルコペニア J Spine Res 7: p1019-1023, 2016.
 12. 伊藤忠, 久保晃, 酒井義人, 山崎一徳, 山田彩加, 五十嵐和真, 佐藤徳孝, 森田良文 慢性腰痛を有する高齢者への固有感覚に対する局所振動刺激時の姿勢動揺. 理学療法科 31(4): p527-533, 2016
 13. 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 15, 1622-1630, 2015.
 14. 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, 254-262, 2015.
 15. 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, 1309-1317, 2015.
 16. 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, 17-21, 2015.
 17. 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.
 18. 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.
 19. 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 30, 533-537, 2015.

2. 学会発表

1. Mori T, Murasawa Y, Sakai Y, Harada A, Niida S, Watanabe K. Possible function of PAX9 in ligamentum flavum. Orthopaedic Research Society 2017 Annual meeting, 2017.3.21 San Diego, CA, USA.
2. 森 大気、村澤裕介、酒井義人、原田 敦、新飯田俊平、渡辺 研 ヒト黄色靭帯における PAX9 の機能解析：PAX9 は FGF18 の発現量を亢進することで軟骨分化の抑制に寄与する 第 48 回日本結合組織学会学術大会 2016.6.24. 長崎
3. 酒井義人、原田 敦. 高齢者脊柱矢状面アライメントにおける骨粗鬆症とサルコペニアの影響 第 18 回日本骨粗鬆症学会 2016.10.6. 仙台
4. 酒井義人、竹村真里枝、原田 敦 骨粗鬆症性椎体骨折保存治療における骨粗鬆症治療とサルコペニアの重要性 第 18 回日本骨粗鬆症学会 2016.10.6. 仙台
5. 酒井義人 高齢者慢性腰痛に対する病態を考慮した薬物療法（ランチョンセミナー）第 29 回日本臨床整形外科学会学術集会 2016.7.17. 札幌
6. 酒井義人 慢性腰痛症とサルコペニア（シンポジウム）第 29 回日本臨床整形外科学会学術集会 2016.7.17. 札幌
7. 酒井義人 高齢者の腰痛症におけるサルコペニア（シンポジウム）第 38 回日本疼痛学会 2016.6.25. 札幌
8. 酒井義人、竹村真理枝、原田 敦 骨粗鬆症性椎体骨折保存治療におけるサルコペニアの重要性第 53 回日本リハビリテーション医学会 2016.6.10. 京都
9. 酒井義人、原田 敦、伊藤定之 サルコペニアと姿勢異常—加齢による骨格筋減少は脊柱矢状面アライメントに影響を及ぼすか—第 58 回日本老年医学会 2015.6.9. 金沢
10. 酒井義人 脊椎疾患とロコモティブシンドローム（シンポジウム）第 58 回日本老年医学会 2016.6.8. 金沢
11. 酒井義人、原田 敦、伊藤定之、飛田哲朗、伊藤研悠. 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 89 回日本整形外科学会学術集会 2016.5.14. 横浜
12. 酒井義人、原田 敦、伊藤定之、伊藤研悠、飛田哲朗. 非特異的腰痛における体幹筋の重要性—電気生理学的および臨床的評価—（シンポジウム）第 45 回 日本脊椎脊髄病学会 2016.4.14. 幕張
13. Watanabe K. Depletion of sphingomyelin synthase genes, Sgms1 and Sgms2, in adult mice. 10th SphingoTherapy Conference 2015.6.17 加賀
14. 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
15. 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. Orlando, FL, USA.
16. 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
17. 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

18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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

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