

長寿医療研究開発費 平成29年度 総括研究報告（総合報告及び年度報告）

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（骨細胞機能研究室長）

研究要旨

3年間全体について

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。

29年度について

黄色靭帯変性に関する分子プロファイリングを元に、黄色靭帯弾性線維変性のモデルマウスの作出を行った。また、病型における臨床的特徴と手術成績について検討を進め、本病型分類の意義について考察を加えた。また、MR画像形態計測自動化ソフトについてβ版を用いて精度検証を行った。

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 整形外科部（部長）

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）（平成27・28年度）

奥下信彦 国立長寿医療研究センター 放射線診療部（技師長）（平成29年度）

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。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。これまでに、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を行ってきた。しかし、黄色靭帯変性肥厚について基礎的検討を進めるためには動物モデルの作出が必要である。これまでに腰部脊柱管狭窄症のモデルは非常に限られている。そこで、マウス遺伝学を用いた黄色靭帯の弾性線維変性モ

デルの作出を目的とした。

B. 研究方法

治療法開発基盤となる分子レベルの病因・病理に関する研究

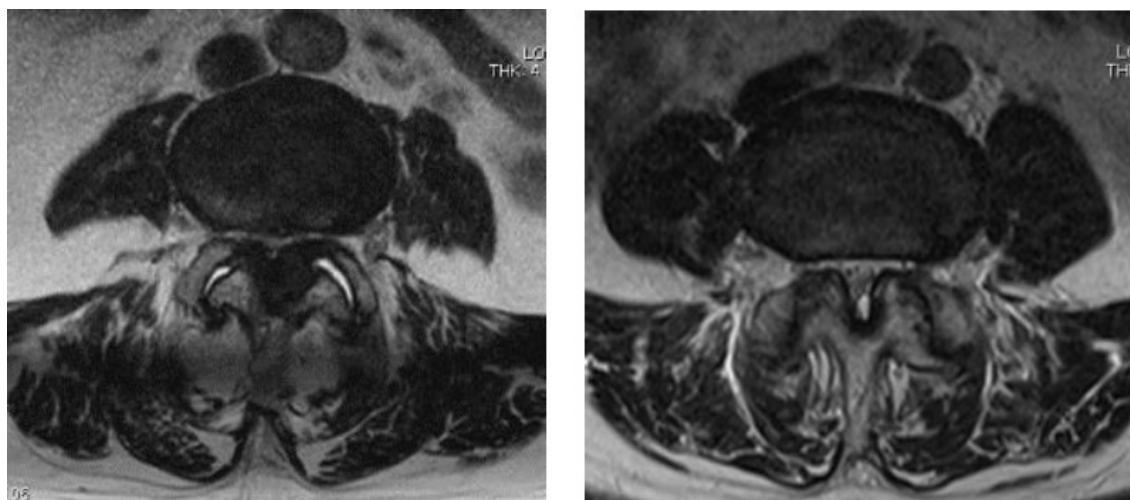
PAX9 下流因子候補の絞り込みには、マウス間葉系細胞株 10T1/2 細胞には、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子発現系により、PAX9, SCX, MKX をそれぞれ単独で発現させ、RNA を回収して行った Agilent 社のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルを用いた。同様に、マウス軟骨細胞株 ATDC5 細胞には、レトロウイルスベクターによる PAX9 と tamoxifen 特異的変異型エストロゲン受容体リガンド結合ドメインとの融合タンパク (PAX9ER) を用いた活性誘導系を用い、軟骨分化誘導を行い、24 時間ならびに 2 週間後の RNA を調製して行った Agilent 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)。

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。

マウスエラスチン遺伝子のエクソン 2 を挟むように loxP エlement を相同組換えにより挿入し、エラスチン遺伝子コンディショナル KO マウス作製用の flox マウスを作成した。Sox9-CreKI マウスは理研 BRC より、Dermo1-Cre マウスが広島大学より、ScxCre-H マウスは京都大学 (広島大学宿南教授) よりそれぞれ入手した。

腰部脊柱管狭窄症診療における臨床上の意義に関する研究

研究期間内にデータ収集可能であった腰部脊柱管狭窄症手術患者 352 例（平均年齢 72.7 ± 6.6 歳、48～91 歳、男性 202 例、女性 150 例）につき、術前 MRI T2 強調横断像における最狭窄高位の黄色靭帯面積と骨性脊柱管面積を、面積計算ソフト（SYNAPSE®, FUJIFILM MEDICAL）を用いて計測した。黄色靭帯肥厚の定義は先行研究（Sakai, et al. Clinical outcome of lumbar spinal stenosis based on new classification according to hypertrophied ligamentum flavum. J Orthop Sci. 22(1), 27-33, 2017.）より得られた、cutoff 値：黄色靭帯/脊柱管面積比（LSAR） >0.4275 を採用した。（図 1）



韧带型 非靭帯型
図 1. MRI T2 横断像による黄色靭帯肥厚の分類（2017 Sakai）

臨床成績は術前および術後 1 年での visual analogue scale (VAS; 腰痛および下肢痛)、Barthel Index、日本整形外科学会腰痛治療判定基準（JOA スコア）、Roland-Morris Disability Questionnaire (RDQ)、EQ5D、Geriatrics depression scale (GDS)、SF-36 で行った。

臨床画像を元にした客観的評価系の確立に関する研究

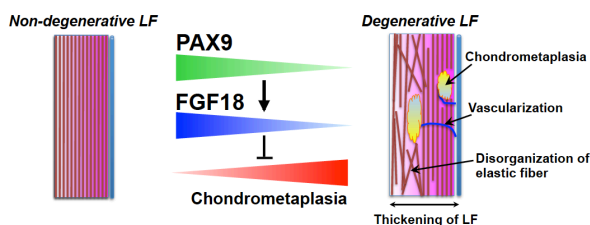
臨床画像（MRI）を用いるにあたり、連結不可能匿名化するためにトリミングツールを用いて DICOM 画像からこれらの情報を削除した。トリミングツールは Windows 7 以降（64bit）を動作環境とし、ランタイム Matlab 2014b(64bit)を必要とするものを作成、トリミングに用いた。脊椎画像は体軸断面像（axial）と矢状断面像（sagittal）を使用した。画像より黄色靭帯をトレースするにあたり、ROI の抽出ソフトを開発し、黄色靭帯を正確にトレースするに十分な S/N を確保できるスライス厚について 1mm、2mm、4mm について検討した。ROI 抽出ソフトウェアについても、Windows 7 以降（64bit）を動作環境とし、ランタイム Matlab 2014b(64bit)を必要とするものを作成、ROI 抽出を行った。体積計算の

搭載のため、β版のツールの入出力形式ならびに GUI を検討し、動作確認した。またファントム (2cc シリンジ・JIS ファントム) を用いて撮像し、体積既知のコントロールとした。ツールならびにソフトウェアの作成はみずほ情報総研に依頼した。

C. 研究結果

治療法開発基盤となる分子レベルの病因・病理に関する研究

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。また、Fgf18 のノックダウンにより、PAX9 抑制性の Acan 発現が回復した。FGF18 は受容細胞によりその応答が異なることが知られており PAX9-FGF18 軸が腰椎の integrity にも関与している可能性が考えられた。



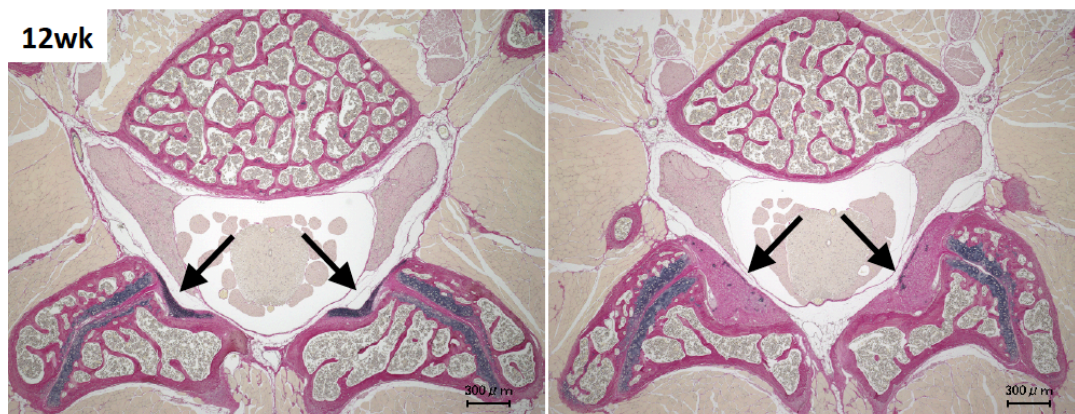
行った。その結果、PAX9 との結合には 5' 側に存在する 2 つの相互作用サイトが重要であることが明らかになった。また、Fgf18 のノックダウンにより、PAX9 抑制性の Acan 発現が回復した。FGF18 は

本研究課題で提案した病型について検討においては、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。

Table Predicted pathways involving the miRNA

Canonical pathways	p value
Aryl hydrocarbon receptor signaling	0.000776
Pentose phosphate pathway (oxidative branch)	0.00278
Wnt/ β -catenin signaling	0.00361
GADD45 signaling	0.00774
Insulin receptor signaling	0.0106

29 年度においては、黄色靭帯変性肥厚の最も顕著な病理像である弾性繊維の減少や変性をモデル化するため、エラスチン遺伝子の flox マウスを作出し、靭帯特異的組換え誘導マウス (ScxCre-H) との交配による検討を行ったところ、腰椎黄色靭帯厚が顕著に増加し、明らかな肥厚を示し (cKO vs control, $261.7 \pm 34.9 \mu\text{m}$ vs. $64.2 \pm 5.7 \mu\text{m}$, $p < 5 \times 10^{-5}$)、マウスの遺伝学的手法による安定的な黄色靭帯肥厚モデルを作出に成功した。



axial at L5-L6 level (EVG)

この肥厚には靭帯細胞の増殖亢進が見られるものの顕著な炎症像は見られなかった。本研

究でも炎症性因子の関与を示してきたが、弾性線維機能低下が機能代償的な肥厚をもたらすことが考えられ、炎症の関与（線維化）と弾性線維機能低下の両方が脊柱管狭窄の原因となりうる病的な変性肥厚に関わる可能性を示した。

腰部脊柱管狭窄症診療における臨床上の意義に関する研究

黄色靭帯肥厚性腰部脊柱管狭窄症の臨床的特徴：

352 例中、靭帯型は 169 例、非靭帯型は 147 例、椎間板ヘルニア合併などにより判定不能が 36 例であった。判定不能であった 36 例を除く 316 例につき、靭帯型と非靭帯型の demographic data を表 1 に示す。靭帯型では有意に高齢であったため、以下解析に年齢を補正した 2 群間比較で統計処理を行った。靭帯肥厚群では病型分類で馬尾型が有意に多く認められた。靭帯肥厚群では腰椎骨密度、背筋力において有意差を認めたが、四肢骨格筋量では有意差を認めなかった。また肥厚型では腰椎前弯と仙骨傾斜角が有意に大きかった。

表 1. 腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚

	靭帯型 n=169	非靭帯型 n=147	p 値
平均年齢 (歳)	74.59±5.99	71.38±6.34	<0.0001
性別 (男:女)	103:66	73:74	0.0573
身長 (cm)	156.98±8.40	155.78±9.55	0.9844
体重 (kg)	60.09±10.99	59.48±10.98	0.4833
BMI	24.23±3.08	24.43±3.59	0.4862
喫煙指数	293.00±449.43	262.50±388.86	0.5625
収縮期血圧 (mmHg)	133.72±19.18	134.99±19.63	0.1818
Hb	13.41±1.54	13.47±1.69	0.9293
CPK	132.39±98.63	130.18±107.04	0.5286
ABI	1.14±0.11	1.14±0.11	0.5359
TBI	0.76±0.13	0.77±0.13	0.2194
SMI (g/m ²)	6.74±0.99	6.74±0.90	0.5075
四肢脂肪量 (g)	6010.66±2235.48	6524.78±2806.28	0.0725
腰椎骨密度 YAM 値	103.46±22.06	97.68±23.13	0.0239
腰椎前弯角 (°)	34.06±12.43	30.97±12.52	0.0329
仙骨傾斜角 (°)	28.44±8.51	26.36±9.50	0.0396
腰椎可動域 (°)	53.15±24.01	47.89±22.03	0.0430
変性すべり (+) (%)	28.4	56.5	<0.0001
背筋力 (N)	166.83±46.23	155.95±39.30	0.0409
腹筋力 (N)	116.54±37.36	113.01±34.65	0.4224
腰部多裂筋面積 (mm ²)	1063.63±335.44	1058.19±417.73	0.8962
脊柱起立筋面積 (mm ²)	1981.60±542.59	1896.68±526.14	0.1362
L1/2 靭帯面積 (mm ²)	50.49±22.32	38.39±16.90	<0.0001
最狭窄部靭帯面積 (mm ²)	135.06±41.10	60.40±28.90	<0.0001

Mean ± S.D.

BMI: body mass index, ABI: Ankle-Brachial Index, TBI: Toe Brachial Index

SMI: skeletal muscle mass index (四肢骨格筋量/身長²), YAM: young adult mean,

ABI および TBI は左右平均を示す。腰部多裂筋および脊柱起立筋面積は L4/5 高位での左右総和を示す。

また靭帯肥厚型では有意に変性すべりの合併が少なく、非靭帯では変性すべりの合併が 50% を超えていた。靭帯肥厚群では最狭窄部高位での黄色靭帯面積に加え、L1/2 高位での

靱帯面積も有意に高値であった。

臨床症状の相違を表 2 に示す。腰部脊柱管狭窄症の患者立脚型評価は JOA スコアの腰痛を除いて、特に黄色靱帯肥厚で有意差は認めなかった。

表 2. 黄色靱帯肥厚と腰部脊柱管狭窄症の治療前臨床所見

	靱帯型 n=169	非靱帯型 n=147	p 値
病型分類 (両尾:混合:神経根)	85:69:15	53:69:25	0.0144
Barthel Index	92.90±14.72	92.59±16.29	0.8522
腰痛 VAS	4.62±2.98	4.91±2.58	0.3675
下肢痛 VAS	6.37±2.70	6.76±2.23	0.1660
RDQ	12.52±5.63	13.13±5.65	0.3224
EQ5D	0.54±0.18	0.55±0.19	0.7099
EQ5D VAS	51.06±21.97	50.28±20.99	0.7482
GDS	5.81±4.06	5.42±3.69	0.3737
JOA スコア (総合)	17.04±3.98	16.93±4.50	0.8069
JOA スコア (腰痛)	2.17±0.75	2.34±0.78	0.0427
SF-36 Physical function	40.68±23.94	42.76±25.31	0.4419
SF-36 Role physical	42.06±28.46	40.22±27.35	0.5543
SF-36 Bodily pain	32.27±21.13	28.86±18.29	0.1289
SF-36 General health	50.92±17.70	49.87±16.53	0.5874
SF-36 Vitality	47.25±21.16	48.61±21.50	0.5731
SF-36 Social functioning	59.10±28.96	56.80±26.51	0.4642
SF-36 Role emotional	49.90±32.59	48.30±29.88	0.6485
SF-36 Mental health	54.20±21.09	53.78±22.23	0.8608

Mean ± S.D.

黄色靱帯肥厚性腰部脊柱管狭窄症の手術成績 (表 3) :

腰部脊柱管狭窄症に対して行われた手術は、除圧術 185 例、固定術 131 例であった。黄色靱帯肥厚群では術後下肢痛 VAS の改善が有意に不良であった。ADL の評価においては全ての評価項目で両群間に有意差は認めなかった。

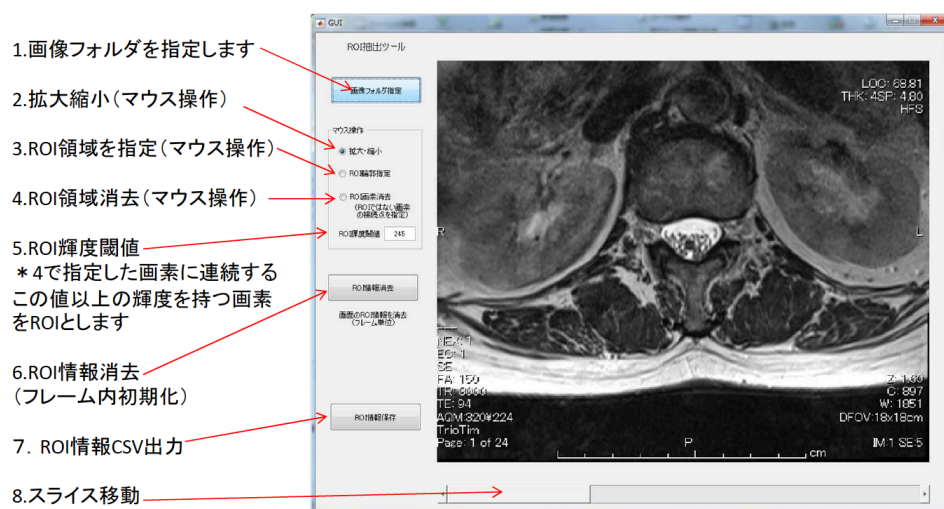
表 3. 黄色靱帯肥厚型腰部脊柱管狭窄症の手術成績

	靱帯型 n=169	非靱帯型 n=147	p 値
Barthel Index	97.26±8.73	97.98±6.71	0.4070
腰痛 VAS	2.50±2.73	2.15±2.46	0.2267
下肢痛 VAS	2.78±3.08	1.99±2.50	0.0139
RDQ	8.61±6.64	8.25±6.77	0.6317
EQ5D	0.69±0.19	0.72±0.20	0.2874
EQ5D VAS	66.79±22.40	67.68±21.45	0.7151
GDS	4.84±4.35	4.46±3.82	0.4030
JOA スコア (総合)	25.05±3.52	25.36±3.34	0.5274
JOA スコア (腰痛)	2.74±0.46	2.78±0.49	0.5850
JOA スコア改善率 (%)	71.10±21.26	71.96±22.29	0.7806
SF-36 Physical function	58.89±25.21	61.55±27.23	0.3353
SF-36 Role physical	53.10±30.41	55.45±29.83	0.4812
SF-36 Bodily pain	53.37±24.66	57.68±26.73	0.1361
SF-36 General health	55.68±18.65	53.58±17.50	0.2983
SF-36 Vitality	53.62±23.66	55.67±21.58	0.4232
SF-36 Social functioning	67.21±26.62	68.19±25.90	0.7408
SF-36 Role emotional	55.92±31.70	58.79±33.07	0.4192
SF-36 Mental health	60.92±23.41	63.55±21.05	0.2953

Mean ± S.D.

臨床画像を元にした客観的評価系の確立に関する研究

本研究課題では 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、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、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 程度のクラスターにグルーピングして、クラスター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。



次に脊柱管断面積、黄色靭帯断面積とそれをもとにした自動体積計算機能を組み込んだソフトウェアを製作し、検証を行ったところ、取得画像の状態により、大きく計算結果が異なっていた。特に画像が不鮮明な状態で ROI の設定に大きなずれが生じていた。概ね 7 割程度の画像に対しては計算可能と考えられたが、汎用性と精度においては今後改善が必要と考えられた。

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 \pm 7.1 歳) および腰椎椎間板ヘルニア (36.5 \pm 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ストレスにより 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に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。

黄色靭帯弾性線維変性のモデルを靭帯特異的エラスチン欠損を誘導して作成し、顕著な肥厚を観察したが、顕著な炎症像は得られていない。炎症を惹起しうるマイクロダメージなどの黄色靭帯の損傷がないことも一つの理由となると思われる。一方、慢性閉塞性肺疾患のモデルにおいては、組織破壊によるエラスチン断片が、Damage-associated molecular pattern (DAMP) として炎症を惹起・亢進する可能性が示唆されている。本モデルでは、エラスチン欠損により、DAMP となりうるエラスチン断片が存在しないことも考えられると、よりエラスチン断片が黄色靭帯変性において炎症の発現に関与している可能性も否定できない。これまでに、Connectivity Map を用いて mRNA プロファイルから肥厚に抗する候

補薬剤候補を見出しており、当該マウスでの検討を行う予定である。

腰部脊柱管狭窄症において黄色靭帯肥厚を狭窄の主因とする患者は53.5%に認められた。この黄色靭帯肥厚型は高齢者に多く認められ、また有意差は認めないものの男性に多い傾向にあったが、骨粗鬆症やサルコペニアといった加齢に伴う筋骨格系の変化とは関連を認めなかった。しかし黄色靭帯肥厚型では変性すべりの割合が有意に少なく、変性すべりが女性に比較的多いことも挙げられるが、変性すべりの進行と黄色靭帯肥厚は相反する変性変化である可能性がある。また黄色靭帯肥厚型では腰椎前弯が大きく、腰椎可動域が有意に大きいといった特徴を持ち、これは黄色靭帯が buckling によるたわみと力学的ストレスの関連が考えられるが、力学的ストレスの比較的關係しない L1/2 高位においても有意に靭帯面積が大きいことから、個体固有の性質や遺伝的背景も評価する必要があると考えられた。また黄色靭帯肥厚型においては、治療前の症状には非靭帯型と比較して特筆すべき点はないが、術後神経症状の主である下肢痛 VAS の改善が有意に不良であったことから、黄色靭帯肥厚により治療成績が不良であるとされる馬尾障害を発症する傾向にあると考えられた。このように黄色靭帯の肥厚に着目した臨床分類により治療成績の差異を示すことが認められ、臨床上の指標として有益であることが示された。

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 (平成 27 年度)

放射線診療部 星野 都男

放射線診療部 中澤 智子

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. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. 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.
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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
 13. 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.
 14. 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
 15. 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
 16. 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.
 17. 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
18. 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. Rel. Res.* 1, 211-217, 2017.
 19. Murasawa Y, Nakamura H., Watanabe K, Kanoh H, Koyama E, Fujii S, Kimata K, Zako N, Isogai Z. The versican G1 fragment and serum-derived hyaluronan-associated proteins interact and form a complex in granulation tissue of pressure ulcers. *Am. J. Pathol.* 188, 432-449, 2018.
 20. 王 晨堯、渡辺 研 運動器疾患とプレシジョン・メディシン アンチ・エイジング医学 13, 651-656, 2017.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. Imagama S, Ito Z, Ando K, Kobayashi K, Hida T, Ito K, Tsushima M, Ishikawa Y, Matsumoto A, Morozumi M, Tanaka S, Machino M, Ota K, Nakashima H, Wakao N, Sakai Y, Matsuyama Y, Ishiguro N. Optimal Timing of Surgery for Intramedullary Cavernous Hemangioma of the Spinal Cord in Relation to Preoperative Motor Paresis, Disease Duration, and Tumor Volume and Location. *Global Spine J.* 7(3):246-253, 2017.
 26. Sakai Y, Matsui M, Ito S, Hida T, Ito K, Koshimizu H, Harada A. Sarcopenia in elderly patients with chronic low back pain. *Osteoporosis and Sarcopenia* 3(4):195-200, 2017.
 27. Ito T, Sakai Y, Yamazaki K, Igarashi K, Sato N, Yokoyama K, Morita Y. Proprioceptive change impairs balance control in older patients with low back pain. *J Phys Ther* 29:1788-1792, 2017.
 28. Kobayashi K, Ando K, Kato F, Kanemura T, Sato K, Hachiya Y, Matsubara Y, Kamiya M, Sakai Y, Yagi H, Shinjo R, Nishida Y, Ishiguro N, Imagama S. Reoperation within 2 years after lumbar interbody fusion: a multicenter study. *Eur Spine J.* 2018.
 29. 酒井義人 高齢者によくみられる疾患・障害とそれに対するリハビリテーション *Geriatric Medicine Vol.* 55(2), p211-215, 2017.

30. 酒井義人 高齢者の腰痛症におけるサルコペニア PAIN RESEARCH 32: p13-18, 2017.
31. 酒井義人 腰痛とサルコペニア 脊椎脊髄ジャーナル 30(5), p573-578, 2017.
32. 酒井義人 加齢に伴う筋の変化 ペインクリニック 38(11), p1407-1413, 2017.
33. 酒井義人 伊藤定之 原田 敦 伊藤研悠 飛田哲朗. 非特異的腰痛における体幹筋の電気生理学的および臨床的評価ー腰部脊柱管狭窄症手術例での検討ー J Spine Res 8: p1054-1059, 2017.
34. 酒井義人 原田 敦 伊藤定之 小清水宏行 伊藤研悠 飛田哲朗サルコペニアは腰部脊柱管狭窄症の手術成績に影響する. J Spine Res 9: p43-49, 2018.

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. 10th 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.
11. 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
12. 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
13. 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

14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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
22. 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.
23. 森 大気、酒井義人、村澤裕介、原田 敦、新飯田俊平、渡辺 研 PAX9-FGF18 軸による黄色靭帯の恒常性維持機構 第 49 回日本結合組織学会学術大会 2017. 6. 17 津
24. Watanabe K. Possible roles of PAX9 on the integrity of ligamentum flavum. Gordon Research Conference on Elastin, Elastic Fibers & Microfibrils, Aug. 2, 2017. Biddeford, ME, USA.
25. 森 大気、酒井義人、原田敦、村澤裕介、新飯田俊平、渡辺 研 黄色靭帯における PAX9 下流因子 FGF18 の同定 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017. 12. 7 神戸
26. 酒井義人 小清水宏行 原田 敦 伊藤定之 伊藤研悠 飛田哲朗. 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 46 回日本脊椎脊髄病学会 2017. 4. 13-15. 札幌
27. 酒井義人 小清水宏行 原田 敦 伊藤定之 伊藤研悠 飛田哲朗. 高齢者慢性腰痛症に対するオピオイドを併用した薬物療法. 第 46 回日本脊椎脊髄病学会 2017. 4. 13-15. 札幌
28. 酒井義人 原田 敦 小清水宏行 渡辺 研 伊藤定之 伊藤研悠 飛田哲朗. 加齢による腰椎黄色靭帯肥厚とビタミン D. 第 90 回日本整形外科学会学術集会 2017. 5. 18. -21. 仙台
29. 酒井義人 原田 敦. サルコペニアは高齢者脊椎手術における成績不良因子である. 第 54 回日本リハビリテーション医学会 2017. 6. 15-17. 岡山
30. 酒井義人 原田 敦. 腰部脊柱管狭窄症における病態、治療効果とビタミン D. 第 59

- 回日本老年医学会 2017. 6. 14-16. 名古屋
31. 酒井義人 高齢者脊椎疾患とサルコペニア. 第 72 回日本体力医学会大会
2017. 9. 17-18. 松山
 32. 酒井義人 松井寛樹 原田 敦 小清水宏行 伊藤定之 伊藤研悠 飛田哲朗. 腰部
脊柱管狭窄症手術成績におけるサルコペニアの関与. 第 19 回日本骨粗鬆症学会
2017. 10. 20-22. 大阪
 33. 酒井義人 腰痛とサルコペニア. 第 25 回日本腰痛学会 2017. 11. 3. -4. 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