

## 長寿医療研究開発費 2019年度 総括研究報告

### 脊柱管狭窄症の個別化医療基盤の形成（30-2）

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狭窄要因による Sakai 分類をはじめ、いくつかの病型に分類される症候群であり、その病因も様々であると考えられる。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。本年度は本症の個別化医療基盤の形成の一環として、ゲノム医療シーズの開発とその臨床パラメータとの相関、ならびにビタミンDの骨格筋の作用メカニズムについての検討を行った。

#### 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 整形外科部（部長）

細山 徹 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部（室長）

重水大智 国立長寿医療研究センター 臨床ゲノム解析推進部（ユニット長）

#### A. 研究目的

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運動器疾患である。本症は高齢者に好発し、年々増加傾向にあり、わが国の患者数は300～600万人に上ると推定されている。また、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。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。その上で、新規診断・治療法の開発に資する病態の基礎的な情報が乏しい状況である。本研究の目的は、直近の診療ガイドラインでも本症が症候群という位置付けがされていることから、ゲノム情報をはじめとした患者個々の特性や臨

床情報をもとに層別化・個別化した医療を目指すことにおいて、個別化・層別化シーズとなるゲノム情報・臨床情報を探索する上で、1) ゲノム医療シーズならびに病態解明の礎となる遺伝要因の同定、2) 靭帯性狭窄の原因とされる黄色靭帯変性肥厚の分子メカニズムの解明、3) サルコペニア等加齢に伴う変化と脊柱管狭窄症等の腰椎疾患における臨床的意義の検証を各サブテーマの目的とする。

## B. 研究方法

脊柱管狭窄症が家族内集積症例のゲノム解析：倫理・利益相反委員会の承認、ならびに参加者の同意のもと、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターに来院・通院されている方を発端者として、家族内協力者を得た。発端者ならびに協力者にはバイオバンク登録にも同意いただき、バイオバンクから試料提供をうけて全ゲノム解析、全エクソーム解析を行った。多型・変異の抽出には、Ingenuity Variant Analysis もしくは、重水らの構築したパイプラインを用いた。ゲノム編集マウスを用いた *ex vivo* での検証実験では尾部椎間板を実体顕微鏡下で摘出したものを用いた。

成因・進行に関与する老化関連因子に関する研究：酒井らが構築している腰部脊柱管狭窄症データベースを用い、各種パラメータについて多変量解析を行い、黄色靭帯肥厚と各種パラメータの検討を行った。

骨格筋に対するビタミン D の作用に関して、マウス骨格筋細胞株 Ric10 に対して高濃度活性化型ビタミン D ( $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ,  $1\times 10^{-6}\text{M}$ ) で増殖ならびに分化期において処理した。マーカーの発現は定量 PCR 法と免疫ブロット法で検討した。

### (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」ならびに「ヒトゲノム・遺伝子解析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

腰部脊柱管狭窄症は、国内の推定患者数が数百万人にのぼるとされており、いわゆる Common Disease との認識があるが、人種間差や最近の解析では 66.9%という相当な遺伝率を示すことが報告されており、遺伝性因子の関与が示唆される。これまでに国立研究開

発法人国立長寿医療研究センターに来院・通院されている方を発端者として、家族内協力者が得られた7家系の登録を行った。最初の家系での解析では発症と関連するバリエントフィルタリングの結果、家系内の罹患に相関し、公開ゲノムDBに登録されていないもの、もしくは *minor allele frequency* が1%未満のレアバリエントを抽出し、そのうち、コードするタンパク質に機能異常が推測されるもので、CADDスコア > 30のものを抽出し、*in vitro* での機能解析、*in silico* でのシミュレーションを行い、タンパク質活性を消失する変異であることが示唆されたことから、ゲノム編集法をもちい、マウスにおいてヒトと高い相同性を有すオーソログに同じ点変異を導入し、変異マウスを作出した。この家系の症例の検討から、今年度においては変異マウス椎間板変性について検討を行った。尾部の椎間板組織を *ex vivo* で IL-1 $\beta$  処理し、炎症に関する遺伝子応答を検討したところ、一部の遺伝子群では変異マウスで発現亢進する傾向が見られた。一方で、12ヶ月齢の同マウスの腰椎椎間板の形態学的検討では野生型マウスと変異マウスで臨床症状を反映する顕著な差異は認められなかった。そこで、脊椎不安定化モデルを作出し、椎間板体積変化について検討を行ったところ、変異マウスではより狭小化が進む傾向が観察された。現在、組織学的検討を行っている。

靭帯性狭窄では非靭帯性と比べて有意に年齢が高かったが、栄養状態、貧血、CRP、ビタミンD値に有意差は認めず、骨密度、骨格筋指数 (SMI)、体脂肪率では有意差を認めなかった。動脈硬化を示すABI、TBIでは、腰部脊柱管狭窄症そのもので有意に高値を示したが、靭帯性・非靭帯性では有意差を認めなかった。しかし炎症及び老化の指標となるPAは靭帯性狭窄で有意に高値であった。耐糖能とインスリン抵抗性では靭帯性狭窄で有意に高値であった。脊椎アライメントにおいても、靭帯性狭窄では腰椎前弯と可動域が保たれ、逆に非靭帯性でPI-LL mismatchesが起こっていることは、靭帯肥厚は腰椎アライメントを保持するための生体反応としても考えうる。

他の高位についての靭帯脊柱管面積比 (flavum canal ratio: FCR) は狭窄高位のみならず、全ての椎間高位で靭帯性狭窄では有意な靭帯肥厚を呈していた。FCRの各椎間での分布をみると、メカニカルな要素の影響雄受けるL4/5とほとんどその影響を受けないL1/2高位のみが二峰性の分布を示した。

高濃度の活性型ビタミンDは、増殖中の筋芽細胞において筋形成調節因子 (MRF) である *myf5* および *myogenin* の発現を減少させた。さらに、高濃度のビタミンDは、筋特異的な融合関連マイクロペプチドをコードする *Tmem8c* (Myomaker) および *Gm7325* (Myomerger) の発現抑制により、筋芽細胞-筋芽細胞および筋芽細胞-筋管融合を低減させた。ビタミンDの同様の阻害効果は、不死化したヒト筋原細胞でも観察された。一方で、高濃度のビタミンDは、タンパク質同化作用の刺激により、多核筋管の肥大も誘導し

た。

#### D. 考察と結論

腰部脊柱管狭窄症の家族内集積例のゲノム解析により、同症の発症と関連するレアバリエントを模したゲノム編集マウスを用いた検討では変異マウスでは炎症やストレスへの応答が亢進している傾向があり、この変異が脆弱性を導き、臨床症状の発現に関与する可能性が考えられた。今後、この他の家系での解析を進めるとともに、このレアバリエントを有す遺伝子のパスウェイを含めた多型解析を進める予定である。

加齢変性が少ない高位である L1/2 においても靭帯肥厚を呈することは、メカニカルな因子以外の要素が黄色靭帯肥厚に働いている可能性を示唆するとともに、L1/2 高位での靭帯肥厚の評価が変性以外の要素によるものの可能性を追求する今後の方向性のあり方として有効であると考えられる。

インスリン抵抗性について有意な関連が指摘され、動脈硬化の指標である ABI や TBI といった因子と黄色靭帯肥厚との関連は認められなかったことから、腰椎における黄色靭帯肥厚が動脈硬化に至る以前に既に始まっていることを示唆する。その一方で腰部脊柱管狭窄症における黄色靭帯肥厚は加齢に伴うメカニカルな変性や老化の一過程だけでなく、その発生に加齢以外の要素も併せ持つ二面性を有する疾患であると考えられる。また、骨格筋におけるビタミン D 作用に関する研究では、ビタミン D 濃度や骨格筋分化ステージにより作用が異なり、積極的な同化作用を支持するものではなかったことから、ビタミン D 補充療法はサルコペニアの治療より、加齢に伴う筋肉量の減少の予防の効果が高い可能性が示唆された。今後、実効濃度の検討や *in vivo* での検討を行う。

#### E. 健康危険情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto G, Hashizume C, Watanabe K, Taniguchi M, Okazaki T. Deficiency of sphingomyelin synthase 1 but not sphingomyelin synthase 2 reduces bone formation due to impaired osteoblast mineralization. *Mol. Med.* 25, 56, 2019.
- 2) Taniguchi M, Ueda Y, Matsushita M, Nagaya S, Hashizume C, Arai K, Kabayama K, Fukase K, Watanabe K, Wardhani L, Hayashi K, Okazaki T. Deficiency of

- sphingomyelin synthase 2 prolongs survival by inhibition of lymphoma infiltration through ICAM-1 reduction. *FASEB J.* 34, 3838-3854, 2020.
- 3) Sakai Y, Wakao M, Matsui H, Tomita K, Watanabe T, Iida H. Surgical results in older patients with lumbar spinal stenosis according to gait speed in relation to the diagnosis for sarcopenia. *J Orthop Surg.* 28, 1-8, 2020.
  - 4) Sakai Y, Matsui H, Ito S, Hida T, Ito K, Koshimizu H, Harada A. Electrophysiological function of the lumbar multifidus and erector spinae muscles in elderly patients with chronic low back pain. *Clin Spine Surg* 32, E13-19, 2019.
  - 5) Kobayashi K, Ando K, Kato F, Kanemura T, Sato K, Hachiya Y, Matsubara Y, Kamiya M, Sakai Y, Yagi H, Shinjo R, Ishiguro N, Imagama S. Trends of postoperative length of stay in spine surgery over 10 years in Japan based on a prospective multicenter database. *Clin Neurol Neurosurg.* 177; 97-100, 2019.
  - 6) Ito T, Sakai Y, Yamazaki Y, Oikawa M, Morita Y. Relationship between L4/5 lumbar multifidus cross-sectional area ratio and fall risk in older adults with lumbar spinal stenosis: A retrospective study. *Geriatrics (Basel)* 4, E38, 2019.
  - 7) Kobayashi K, Ando K, Kato F, Kanemura T, Sato K, Hachiya Y, Matsubara Y, Kamiya M, Sakai Y, Yagi H, Shinjo R, Ishiguro N, Imagama S. Predictors of prolonged length of stay after lumbar interbody fusion: A multicenter study. *Global Spine J.* 9, 466-472, 2019.
  - 8) Noshio R, Ito Y, Morita Y, Ito T, Yamazaki K, Sakai Y. Investigation of the functional decline in proprioceptors for low back pain using the sweep frequency method. *Appl Sci* 9, 4988: 2019.
  - 9) Ito T, Sakai Y, Ito Y, Yamazaki K, Morita Y. Association between back muscle strength and proprioception or mechanoreceptor control strategy in postural balance in elderly adults with lumbar spondylosis. *Healthcare (Basel)* 8, E58, 2020.
  - 1 0) Ito T, Sakai Y, Nishio R, Ito Y, Yamazaki K, Morita Y. Relationship between postural stability and fall risk in elderly people with lumbar spondylosis during local vibratory stimulation for proprioception: a retrospective study. *Sensory Motor Res* 2020. in press.
  - 1 1) Ito S, Sakai Y, Harada A, Ando K, Kobayashi K, Machino M, Ota K, Morozumi M, Tanaka S, Kanbara S, Ishiguro N, Imagama S. Myelopathy caused by

intrathecal remnants of oil-based contrast medium. J Orthop Sci. pii: S0949-2658(20)30050-6, 2020.

- 1 2) Yamazaki K, Sakai Y, Yto T, Nishio R, Ito Y, Morita Y. Postural sway during local vibratory stimulation for proprioception in elderly individuals with pre-sarcopenia. Phys Ther Res 2020. in press
- 1 3) Ito T, Sakai Y, Nishio R, Ito Y, Yamazaki K, Morita Y. Postural sway in adults and elderly individuals during local vibratory stimulation of the somatosensory system. SN Comprehensive Clinical Medicine 2020. in press.
- 1 4) 整形外科からみたサルコペニアの臨床的病態 酒井義人、渡邊 剛、若尾典充、松井寛樹、富田桂介. 臨床整形外科 54, 241-247, 2019.
- 1 5) サルコペニア、サルコペニア肥満の診断、定量 酒井義人 脊椎脊髄ジャーナル 32, 443-448, 2019.
- 1 6) 老化と慢性疼痛 酒井義人 日本整形外科学会雑誌 93, 377-386, 2019
- 1 7) 老化のメカニズムと慢性疼痛との関連 酒井義人 日本臨床 77, 1929-1935, 2019.
- 1 8) 骨粗鬆症性椎体骨折の保存治療 酒井義人 整形外科 SURGICAL TECHNIQUE 10, 18-25, 2019.
- 1 9) 腰痛とサルコペニア 酒井義人 CLINICAL REHABILITATION 29, 441-448, 2020.

## 2. 学会発表

- 1) 馬 凌云、重水大智、秋山真太郎、尾崎浩一、渡辺 研 変形性関節症自然発症マウスのゲノム解析 日本人類遺伝学会第 64 会大会 2019.11.8 長崎
- 2) 馬 凌云、重水大智、秋山真太郎、定梶 嶺、中村博幸、尾崎浩一、渡辺 研 変形性関節症を自然発症する STR/ort マウスのゲノム解析による軟骨変性関連遺伝子の同定 第 42 回日本分子生物学会年会 2019.12.4 福岡
- 3) Ma L, Shigemizu D, Akiyama S, Jokaji R, Nakamura H, Ozaki K, Watanabe K. Identification of a gene mutation involved in cartilage degeneration in STR/ort, a mouse line developing spontaneous osteoarthritis. Orthopaedic Research Society 2020 annual meeting 2020.2.10、 Phoenix, AZ, USA.
- 4) 酒井義人、若尾典充、松井寛樹、富田桂介、森田良文 高齢者慢性腰痛と固有感覚機能 (主題) . 第 48 回日本脊椎脊髄病学会 2019.4.18. 横浜
- 5) 酒井義人、渡邊 剛、若尾典充、松井寛樹、富田桂介、飯田浩貴 腰椎変性疾患患者に

における老化マーカーとしての phase angle の有用性 第 92 回日本整形外科学会学術集会 2019.5.9. 横浜

6) 酒井義人、渡邊 剛、若尾典充、松井寛樹、富田桂介、飯田浩貴 高齢者脊椎疾患手術成績から考えるサルコペニアの定義について 第 61 回日本老年医学会 2019.6.17. 仙台

7) 酒井義人、若尾典充、松井寛樹、富田桂介、森田良文、伊藤 忠、山崎一徳 サルコペニアを伴う高齢者非特異的腰痛に対する固有感覚機能を標的とした新しい治療法の開発 (シンポジウム) 第 27 回日本腰痛学会 2019.9.14. 神戸

8) 酒井義人、渡邊 剛、若尾典充、松井寛樹、富田桂介、飯田浩貴、勝見 章 高齢者骨粗鬆症性椎体骨折における予後予測としての赤血球容積分布幅の有用性 第 21 回日本骨粗鬆症学会 2019.10.11. 神戸

9) 酒井義人 老化の制御と慢性疼痛 (教育研修講演) 第 46 回静岡リハビリテーション医学会 2019.9.28. 沼津

#### 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