

使用器材と固定範囲

使用器材は CCD cervical system (ソフオモア・ダネック社) が 8 例, OASYS Occipit-Cervico-Thoracic System (ストライカー社, 以下 OASYS) を 3 例に使用した。固定範囲は O-C 2 が 2 例, O-C 3 が 3 例, O-C 6 が 2 例, O-C 7 が 1 例, O-T 1 が 2 例, O-T 2 が 2 例であった。頸椎アンカーとしては Hook のみ使用したものが 8 例, lateral mass screw と Hook と併用したものが 1 例, lateral mass screw のみが 1 例で sublaminar wire を 1 例に使用した。

症状・神経学的所見の予後, 合併症

術前に 6 例が頸部痛を訴えており術後 3 例 (50%) に頸部痛が残存していた。術前に神経障害を呈したのは 10 例で術後に改善したものが 5 例 (50%), 不変が 3 例 (30%), 悪化が 2 例 (20%) あった。経過中 2 例 (軸椎脊索腫 1 例, 歯突起偽関節 1 例) が死亡していた。

1 例に呼吸性四肢麻痺を認めレスピレーター管理を要した。呼吸性四肢麻痺は改善せずレスピレーターからは離脱できなかった。Instrument failure を 3 例に認め頸椎アンカーの脱転を 1 例, 後頭骨スクリューの脱転を 2 例に認めた。

症 例

症例 1 75歳 男性

側溝に転落後, 前医で頸髄不全損傷の診断で加療されていた。前医に入院後, 四肢麻痺が進

行したため当科に紹介された。立位, 歩行が不可能であり Frankel C であった。初診時単純レントゲン写真で軸椎の偽関節, 環軸椎亜脱臼を認めたが (図 1 a,b), 後屈すると亜脱臼は整復されていた (図 1 c)。術前の MRI では矢状断で C 1 レベルの頸髄の圧迫, 矢状断の T 2 条件で頸髄の同レベルで高信号域を認めた (図 2 a)。亜脱臼が後屈で整復されるため Mageal 法や環椎外側塊スクリューを使用した環軸椎固定術を検討した。しかし術前の CT 検査で high riding vertebral artery を疑う所見 (図 2 b,c), C 2 横断面で椎弓根スクリューを刺入するスペースが少なかったこと (図 2 d) により後頭頸椎再建術を予定した。手術は後頭下減圧術, 環椎後弓切除, O-C 6 固定を OASYS で施行し腸骨から骨移植を施行した (図 3 a)。環軸椎亜脱臼の整復に固執し頸椎が軽度後屈位になっていた。術後 3 週で亜脱臼が再発し (図 3 b), 術後 8 か月で後頭骨スクリューがすべて脱転した (図 3 c)。術後は頸部の疼痛の訴えもなく支持歩行が可能となり神経学的には Frankel D に改善していた。現在外来にて経過観察中である。

症例 2 15歳 女性

ダウン症に合併した環軸椎亜脱臼である。5 歳時に転倒して四肢不全麻痺を生じたため当院に紹介され入院した (図 4 a)。環椎後弓切除術, 後頭頸椎固定術をワイヤーで施行されていた (図

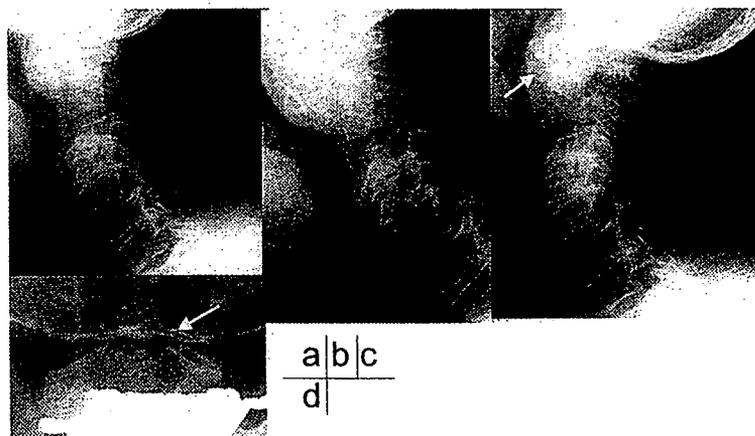


図 1 a 初診時単純レントゲン側面中間位 b 初診時単純レントゲン側面前屈位
c 初診時単純レントゲン側面後屈位。亜脱臼は整復されている。
d 初診時開口位。歯突起偽関節を認める。

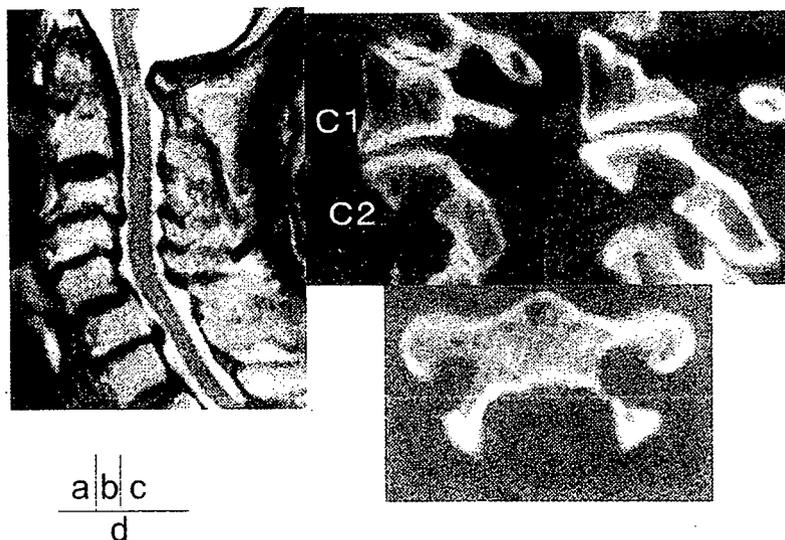


図2 a 前医搬入時 MRI 矢状断T2 条件 b 術前 CT 矢状断面 (右)
c 術前 CT 矢状断面 (左) d 術前 CT 横断面

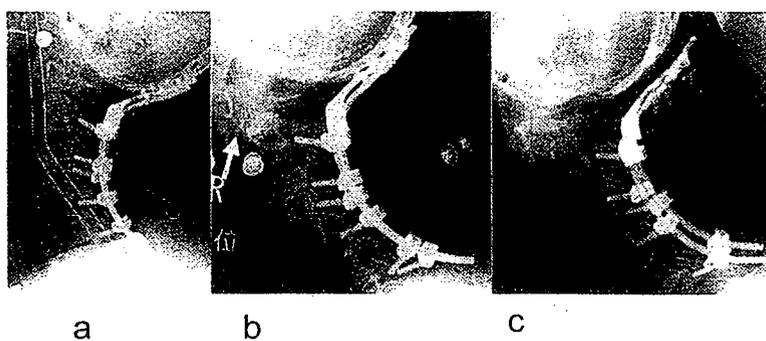


図3 a 単純レントゲン側面 (術後) b 単純レントゲン側面 (術後3週)
c 単純レントゲン側面 (術後8か月)



図4 a 5歳時 単純レントゲン側面中間位 b 5歳時 単純レントゲン側面 (術直後)
c 15歳時再診時 単純レントゲン側面中間位
d 15歳時再診時 単純レントゲン側面後屈位。亜脱臼は整復されていない。

4 b)。術後は歩行が可能となっていた。術後経過観察していたが、外来受診を自己中止されていた。15歳になり歩行不能、箸で食事をすることもできなくなり再診した(図 4 c)。環軸椎亜脱臼を認め後屈でも整復されていなかった(図 4 d)。固定ワイヤーは破損していた。術前の MRI にて延髄頸髄移行部が歯突起と後頭骨で著明に圧迫されており、矢状断の T2 条件で高信号域を認めた(図 6 a)。手術は後頭下減圧術を施行し硬膜上を索状に絞扼していた癒痕組織を切除した。癒痕組織の切除により硬膜の拍動が得られた。OASYS を使用し、C6 を lateral mass screw で固定して後頭骨プレートとロッドを接続して整復を試みたが不可能であった。最終的に無理

な整復操作は避け O-C5 固定を行い腸骨より骨移植を行った(図 5 b)。術直後より呼吸性四肢麻痺を認め、抜管が不可能となった。救命センター ICU での呼吸管理を要した。術直後の MRI では歯突起の前方からの圧迫は残存していた(図 6 b)。術後 1 ヶ月の CT では C2 レベルの Hook による脊柱管の狭窄も疑われた(図 6 c,d)。術後 2 か月で lateral mass screw の脱転を認めた(図 5 c)。呼吸性四肢麻痺は改善せずレスピレーターからの離脱はできなかった。

考 察

後頭頸椎再建術では後頭上位頸椎高位での屈曲変形が強い例では本法は困難であることや instrument に関連する問題、術中の体位(頸椎

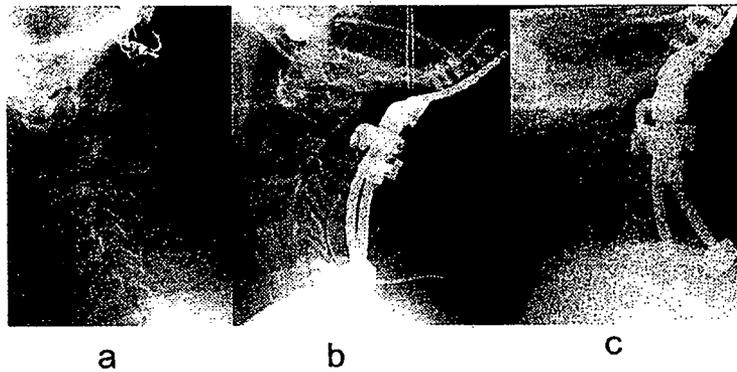


図 5 a 単純レントゲン側面(術前) b 単純レントゲン側面(術直後)
 単純レントゲン側面(術後2か月)

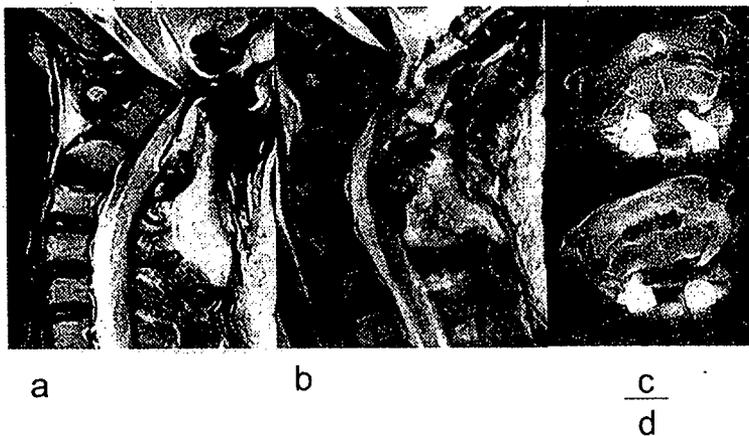


図 6 a 術前 MRI 矢状断面 T2 条件 b 術直後 MRI 矢状断面 T2 条件
 c,d 術後1か月 CT 横断面: C2 レベル

の position) が挙げられる。

後頭上位頸椎高位での屈曲変形が強い例での問題点

後頭骨上位頸椎高位で屈曲変形が強く整復が不可能な症例では以下の問題点がある。1) 後方からの整復が困難であること, 2) 除圧が十分得られないこと, 3) 整復操作で神経障害の危険性があることである。後頭上位頸椎の整復不可能な屈曲変形例に対し緒家はさまざまな工夫を行っている。金ら²⁾は Klippel-Feil 症候群の頭蓋底陥入の 1 例でわれわれの様に後頭骨スクリューと Hook で整復固定が可能であったと報告している。鏡³⁾は頸椎椎弓根スクリューを使用し屈曲変形を矯正し除圧が得られると述べている。Deutsch ら⁴⁾は後頭頸椎固定術を施行した 58 例中 25 例に経口的前方除圧術を併用し, 前方除圧術を併用した方が神経学的な改善が良い傾向にあったと報告している。逆に来嶋ら⁵⁾はダウン症に伴う環軸椎亜脱臼の整復不能例での治療経験を報告し前方除圧では解剖学的に除圧が不十分になりやすく側方進入による歯突起切除術が有効であったと報告している。従って屈曲変形が強く整復不能例は経口的前方除圧術ないし側方進入法による歯突起切除術あるいは椎弓根スクリューを併用した変形矯正を検討することが必要と考えられた。

Instrument に関連する問題点

Hook は椎弓に強固に固定され椎骨動脈の損傷の危険性もなくアンカーとして有用である。しかしそのブレードの幅や使用する頸椎の行為によっては脊髄圧迫の危険性もある⁶⁾。和泉らは固定アンカーとして使用したフック 20 個のうち 7 個が脊髄圧迫を認め 2 例に脊髄症を認めたと報告している⁷⁾。さらに和泉らは脊柱管前後径 14mm 以下, 脊髄椎弓間距離が 2 mm 以下は Hook を避けるべきと警告している。今後脊柱管前後径 14mm 以下は Hook 以外のアンカーを使用することが必要である。

本研究では long fusion となった例で後頭骨スクリューや頸椎アンカーの脱転を経験した。他施設でも instrument の脱転は報告があり, 平川ら⁸⁾は後頭骨ワイヤーのカットアウト症例に対

してテロンテープで再固定している。アンカーの脱転に対して Lee ら⁹⁾は後頭骨のスクリューは bicortical に固定すべきと述べている。また刺入位置について清水ら¹⁰⁾は後頭骨の正中は分厚く側方は薄いため正中にスクリューは刺入しないと強度に信頼が置けないと述べ, 正中部へのスクリューの刺入を推奨している。頸椎アンカーとしては引き抜きに強い椎弓根スクリューが鏡³⁾に推奨されている。したがって今後の後頭骨プレートはできるだけ正中の方向に合わせて bicortical にスクリューを刺入し, より強固な固定, 矯正を要する場合には頸椎には椎弓根スクリューの使用も検討するべきであろう。

結 語

1. 当科で後頭頸椎再建術を施行した 11 例について検討した。
2. 後頭骨プレートはできるだけ正中の方向に合わせて bicortical にスクリューを刺入する。
3. 脊柱管前後径 14mm 以下は Hook 以外のアンカーを使用する。
4. 屈曲変形が強く整復不能例は経口的前方除圧術ないし側方進入法による歯突起切除術あるいは椎弓根スクリューを併用した変形矯正を検討する。

参考文献

- 1) 朴 珍守, 横須賀公章, 神保幸太郎他, インストルメンテーションを用いた後頭頸椎固定術の検討. 西日本脊椎研究会誌 2005; 31: 89-92.
- 2) 金昭 博, 納田真也, 山田将雄他, Klippel-Feil 症候群に伴う頭蓋陥入に対し後方除圧・整復固定術を施行した 1 症例. 2000; 35: 1289-1293.
- 3) 鏡 邦芳. 後頭頸椎再建術の歴史. 脊椎脊髄 2005; 18: 672-676.
- 4) Hard Deutsch, MD, Ragis W. Haid, Jr., MD, Gerald E Rodts, Jr. MD et al. Occitocervical Fixation: Long-Term Results. Spine 2005; 30: 530-535.7
- 5) 来嶋也寸無, 藤本吉範, 金沢敏勝他, 環軸椎亜脱臼を合併するダウン症候群に対する手術法. 西日本脊椎研究会誌 2005; 31: 125-130.
- 6) 熊野 潔, 夏山元伸, 内田毅他, 頸椎に対する instrumentation Hook-rod system による後頭頸

- 椎固定術10例の報告. 脊椎脊髄 1998 ; 11 : 197-202.
- 7) 和泉智博, 佐藤慎二, 田西信睦他, 後頭骨頸椎固定における頸椎椎弓フックの検討. 整形外科 2006 ; 57 : 89-94.
- 8) 平川 敬, 栄 輝巳, 内田仁他, RA 頸椎後方固定術後, 後頭骨固定 wire のカットアウト及びゆるみを生じた2症例. 整形外科と災害外科 2004 ; 53 : 269-273.
- 9) S.C.LEE, J.F.CHEN, S.T.LEE. Complication of fixation to the occiput-anatomical and design implications. British Journal of Neurosurgery 2004;18:590-597.
- 10) 清水敬親, 枝国英夫, 島田晴彦他, 頸椎に対する instrumentation 後頭骨・頸椎(胸椎)間固定術(rod & wire or hook system) 1998 ; 11 : 189-195.

2-P1-1-2

脊柱靱帯骨化の発生メカニズムの解明 —後期糖化産物 (AGEs : Advanced Glycation End-Products)—

横須賀 公章, 朴 珍守, 吉田 龍弘, 神保 幸太郎, 山田 圭, 佐藤 公昭, 永田 見生
久留米大学医学部整形外科

【目的】

後縦靱帯骨化症の原因については、糖尿病、物理的ストレス、遺伝との関連が報告されており、また、BMPsとその受容体の関連が示唆されている。しかし、靱帯骨化を起こすメカニズムは未だ明らかにされていない。後期糖化産物 (AGEs) は糖尿病関連物質であり、代謝回転の遅い軟骨細胞や靱帯細胞などによく蓄積する。また、ヒト間葉系細胞や血管内皮細胞において、骨への分化を誘導するとの報告がある。その受容体であるRAGE (AGEsレセプター) と結合することにより、様々な細胞応答が引き起こされる。そこで、今回我々は、临床上、糖尿病との合併が高率に認められる後縦靱帯骨化症に着目し、AGEsとの関連について検討し、脊柱靱帯骨化の発症メカニズムとして、靱帯組織へのAGEsの蓄積が、靱帯骨化へと導くのではないかと仮定した。

子を介して、骨化を促進する事が示唆された。

【方法】

(1) 後縦靱帯骨化症患者より後縦靱帯組織を採取し、パラフィン切片を作成、抗AGE抗体、抗RAGE抗体にて免疫染色を行い、その局在について検討した。(2) 後縦靱帯骨化症患者より採取した黄色靱帯細胞を分離・単層培養し、1ug/ml濃度のAGEsにて6日間刺激したのち、real-time PCRにて各遺伝子:BMP-2, -7 (Bone morphogenetic protein-2, -7), Osteocalcin, Cbfa1 (an osteoblast-specific transcription factor), ALP (alkaline phosphatase) の発現量を半定量化し、比較検討した。

【結果】

(1) ヒト後縦靱帯組織および黄色靱帯組織の免疫染色にて、AGEの蓄積とRAGEの発現を認めた。(2) 1ug/ml濃度のAGEs刺激により、ヒト黄色靱帯細胞のBMP-2, BMP-7, Cbfa1, Osteocalcinの遺伝子発現量は、137.1% (p<0.01)、172.7% (p<0.01)、135.3% (p<0.01)、172.4% (p<0.05)と有意差をもって増加した。

【考察】

今回の研究にて、(1) ヒト後縦靱帯組織にAGEの蓄積とRAGEの発現を認めた。このことからAGEsは直接的に後縦靱帯組織に作用することが可能であると考えられる。(2) AGEs刺激により、ヒト黄色靱帯細胞のBMP-2, BMP-7, Osteocalcin, Cbfa1 mRNAの発現が優位に増加したことから、AGEは靱帯細胞に作用し、骨形成因

Immunohistochemical Demonstration of Advanced Glycation End-Products (AGEs) and the Effects of AGEs in Ossified Ligament Tissues in vitro

K. Yokosuka, et al.

Key words : AGEs (Advanced Glycation End-Products), RAGE (receptor of AGEs), OPLL

1-A-S3-1

胸椎後縦靱帯骨化症に対する手術成績に影響を与える因子の検討 —多施設後ろ向き研究—

松本 守雄, 千葉 一裕, 戸山 芳昭, 西脇 祐司*, 竹下 克志**, 星地 亜都司**, 中村 耕三**,
有水 淳 (所属は※以下と同順),

藤林 俊介, 平林 茂, 平野 徹, 岩崎 幹季, 金岡 恒治, 川口 善治,
小宮 節郎, 前田 健, 松山 幸弘, 三上 靖夫, 村上 英樹, 永島 英樹,
永田 見生, 中原 進之介, 野原 裕, 岡 史朗, 阪本 桂造, 猿橋 康雄,
笹生 豊, 清水 克時, 田口 敏彦, 高橋 誠, 田中 靖久, 谷 俊一,
徳橋 泰明, 内田 研造, 山本 謙吾, 山崎 正志, 横山 徹, 吉田 宗人
慶應義塾大学整形外科, *慶應義塾大学公衆衛生学,

**東京大学整形外科, ※福岡大学 (以下所属は整形外科),

京都大学, 埼玉医科大学総合医療センター, 新潟大学, 大阪大学, 筑波大学, 富山大学,
鹿児島大学, 九州大学, 名古屋大学, 京都府立医科大学, 金沢大学, 鳥取大学,
久留米大学, 国立病院機構岡山医療センター, 獨協医科大学, 香川大学, 昭和大学, 滋賀医科大学,
聖マリアンナ医科大学, 岐阜大学, 山口大学, 東京医科歯科大学, 東北大学, 高知大学,
日本大学, 福井大学, 東京医科大学, 千葉大学, 弘前大学, 和歌山県立医科大学

【目的】胸椎後縦靱帯骨化症(T-OPLL)は手術技術が進歩した現在においても、治療困難な疾患の一つである。本疾患が稀であり単一施設での症例数が限られていることから、手術例の詳細な分析は困難であった。今回、厚生労働省脊柱靱帯骨化症に関する調査研究班が主体となり、T-OPLLの手術例に関する多施設後ろ向き調査を行い、手術成績および合併症について検討したので報告する。

【方法】対象は1998—2002年の5年間に34施設で手術が行われたT-OPLL患者で術後1年以上の追跡調査が可能であった154例(男62例、女92例、平均年齢56.8歳、調査期間3.0年)である。T-OPLLの分類は線型上型10例、嚙型67例、連続波状型63例、連続棒状37例、最大骨化巣の高位はT1-T4 68例、T5-T8 61例、T9-T12 22例であった。手術法は椎弓切除37例、椎弓形成術36例、前方進入前方除圧固定術25例、後方進入前方除圧術29例、前後合併除圧固定術8例、胸骨縦剖式前方固定術 5例であった。52例(33%)にinstrumentationの併用が行われた。骨化巣の処置は摘出48例(31.2%)、浮上25例(16.2%)、未処置81例(52.6%)であった。10例に胸椎除圧術の既往があり、また5例に追加の除圧術が行われていた。検討項目は1)術前後のJOA scoreと改善率, Modified Frankel分類 2)手術成績に関連する因子 3)合併症とその転帰とした。

【結果】1)JOA scoreは術前平均4.6±2.0点,術後7.1±2.5点,平均改善率は36.8±47.4%であった。改善率がマイナスの悪化例は13例(8.4%)であった。Modified Frankel分類では術前A 2,B 8,C 33,D1 40,D2 44,D3

24,E 3が術後A 1,B 4, C 7, D1 13, D2 38, D3 67, E 24であり、一段階以上の改善が得られた症例は 107例(69.5%)、不変38例(24.7%)、悪化 9例(5.8%)であった。

3) JOA score改善率が25%以上の症例は104例(67.5%)であり、これに有意に関連する因子は、最大骨化層高位が上位(T1-4) (年齢、性別調整odds ratio: 2.43-4.17)、instrumentationの併用(同3.37)であった。罹病期間、術前JOA score,骨化層前後径、手術術式などの因子は統計学的に有意な因子ではなかった。3) 合併症は術直後脊髄症状の悪化を来した患者が18例(11.7%)、硬膜外血腫3例(1.9%)、硬膜損傷34例(22.1%)などであった。麻痺悪化例のうち12例(66.7%)は術後平均5.6日(1-30日)で麻痺の自然回復を認めた。Frankel Aの麻痺を生じた3例中1例、同Bの7例中6例で麻痺の改善を認めた。

【考察】 今回の検討では平均改善率が36.8%であり、頸椎OPLLと比較すると改善率は悪く、調査時悪化例も認められた。良好な手術成績に関与する因子として、骨化高位が上位胸椎であることとinstrumentationの併用であった。上位胸椎は後弯も強くないことから比較的神経合併症の少ない椎弓形成術で対応できる症例も少なくなかったためと考えられる。また、instrumentationの併用を行うことで後弯の矯正あるいは進行防止、脊椎の安定化が得られることから、特に後方から除圧を行う場合にはその使用が考慮されてもよい。本症では術直後の麻痺悪化例も少なくないが、Frankel Aを来した症例を除いて麻痺の自然回復がある程度期待できる。

Surgical Outcomes and Prognostic Factors of Ossification of Longitudinal Ligament in Thoracic Spine. -Retrospective Multicenter Study-

M. Matsumoto, et al.

Key words : thoracic spine, ossification of longitudinal ligament, surgical outcome

椎間板変性の生化学^{*1}

終末糖化産物 (AGEs) と椎間板変性

横須賀公章^{*2} 永田 見生^{*2} 朴 珍守^{*2}
 神保幸太郎^{*2} 佐藤 公昭^{*2} 山岸 昌一^{*3}

はじめに

哺乳類唯一の二足歩行動物であるヒト (脊椎動物門哺乳綱霊長目ヒト科) は、同一鉛直線上に、頭蓋、脊柱、骨盤、下肢が並んでおり、進化の末に獲得した巨大な脳を保持することができる。そのため、椎間板に多大な負荷が生じることはヒトの宿命とも言える。しかしながら、単純な線維軟骨であり生理活性の低い組織と考えられていた椎間板は、その研究の歴史は約半世紀と浅く、その重要性にもかかわらず現在でも明確に整理されていない。近年の加速する高齢社会において、椎間板変性の発症機序を解明、整理することはますます重要となり、臨床および基礎分野でさまざまな研究が行われている。そこで本稿では、まず、椎間板の機能、構造について現在の知見を整理し、椎間板変性における生化学的特徴を解説する。さらに、最近注目されている終末糖化産物 (AGEs; advanced glycation end-products) との関係について述べる。

Key words

椎間板変性 (intervertebral disc degeneration)
 終末糖化産物 (AGEs; advanced glycation
 end-products)
 AGE レセプター (RAGE; receptor of AGEs)

椎間板の機能

体幹の支持性と運動性を併せ持つ脊柱は、左右の椎間関節 (diarthrosis) と椎間板 (synchondrosis) が形成する three joint complex と靭帯 (syndesmosis) で連結された複合関節、すなわち脊椎機能単位 (functional spine unit; FSU) が充積して構成されている⁵⁾。その構成成分の一つである椎間板は、脊椎の長さの 20~30% を占める。また、衝撃緩衝作用および支持性と運動性を併せ持つが、その重要性にもかかわらず、再生機序を持たない無血管組織である。

椎間板の構造

椎間板は線維軟骨から成り、白色光沢を有する酸性の円板状組織である。コラーゲン (膠原線維) の層状構造から成る線維輪と主にプロテオグリカン (ムコ多糖蛋白複合体) から成るゲル状の髓核から成っている。無血管組織であるため、嫌気性代謝による乳酸の蓄積により酸性を示す。また、上下を硝子軟骨である軟骨終板で挟むような構造で構成され、一定の内圧下に封入された構造をとる。ほかの関節軟骨と類似した成分で構成されているが、髓核、線維輪、軟骨終板が独自の特性を持つ異なる機能を分担しており、特異的かつ複雑

^{*1} Biochemistry of Intervertebral Disc Degeneration: AGEs (Advanced Glycation End-products)

^{*2} 久留米大学医学部整形外科 [〒830-0011 久留米市旭町 67] / Kimiaki YOKOSUKA, Kensei NAGATA, Jin Soo PARK, Kotaro JINBO, Kimiaki SATO: Department of Orthopaedic Surgery, Kurume University School of Medicine

^{*3} 久留米大学医学部第三内科学 / Shoichi YAMAGISHI

な構造をとっている。

① 髄核 (nucleus pulposus)

髄核は椎間板のほぼ中央部に位置し、肉眼的には、やや白色がかったゼリー状(粘弾性体)の組織である。髄核は髄核細胞と呼ばれる不均質な細胞集団より構成されている。脊索細胞(notochordal cells), 軟骨様細胞(chondrocyte-like cells), 線維芽細胞様細胞(fibroblast-like cells)などで構成され、水や栄養は軟骨終板や線維輪からの拡散により供給されている¹⁹⁾。また、髄核細胞が産生する細胞外基質の主成分はプロテオグリカン(主に大分子のアグリカン)とII型コラーゲンであり、その含水率は正常で70~90%に達する。コラーゲン含量は髄核部より外側線維輪にいくにしたがい徐々に増加する。頸部と腰部を比較してみると、コラーゲン含量は頸部に多く、プロテオグリカン含量は逆に腰部に多い²⁰⁾。プロテオグリカンの持つきわめて高い水親和性と膠原線維の持つ強靱な支持性、この2つの基質成分の相互作用により強力な粘性が発揮され、圧縮力に対する抵抗となっている。

② 線維輪 (annulus fibrosus)

線維輪は髄核を中心に層状構造を形成し、肉眼的には、髄核と明確に区別するようなものはなく、外側に移行するに伴い水分が徐々になくなり線維様に見える。各層は同心円状に配列しており、外層、中間層および内層に区別される。外層は上下の椎体縁に直接付着してSharpey線維を形成し、中間層および内層は線維軟骨板に付着している。細胞組成は内層では髄核に類似するが、外層にいくにしたがい線維性基質が密で細胞密度が疎となり、線維芽細胞様細胞が主体となる。線維性基質は髄核と同様、ムコ多糖蛋白複合体(主にプロテオグリカン)を有し、膠原線維は内層では髄核と類似してII型コラーゲンが多く、外層に向かうほどより弾力性のあるI型コラーゲンの比率が増加する。また、各層での線維方向は一定の角度で走行し、交差(互いに±30度)しており、前方で厚く、後方で薄い構造になっている。そのため、頸椎、腰椎において生理的前弯となり、張力や回旋力に

対する抵抗を生み出している²⁵⁾。

③ 軟骨終板 (cartilage endplate)

軟骨終板は線維輪Sharpey線維のアンカーであり、無血管組織である椎間板への栄養補給経路でもある。腰椎分節動脈の分枝より栄養され、軟骨下静脈叢より老廃物を排除する。10歳ころまでは、軟骨終板を穿通する細小動脈により椎間板は栄養されるが、その後血流は完全に閉鎖し、軟骨終板からの拡散により供給されるようになる。

椎間板変性 (intervertebral disc degeneration)

椎間板変性とは、椎間板の退行性変化の過程あるいは退行性変化をきたした状態をいう。その病態生理は数多くの因子が複雑に絡み合っており、明確に整理されていないのが現状である。また、変性機序は個体差が大きく、一様に整理することは困難であるが、本稿では、椎間板の組織学的、分子生物学的な変性機序とその要因について述べる。

① 組織学的変性

髄核の褐色変性 (Coventry, et al : 1945, 図1) および線維化、線維輪の粘液変性 (Bijlsma, Peereboom : 1972), 軟骨終板の菲薄化などにより、亀裂、断裂を呈する。結果として、線維輪断裂部に髄核が入り込むヘルニア、軟骨終板断裂部に椎間板組織が脱出するSchmorl's nodeなどが起こる。髄核の褐色変性の本態については以前より、出血によるヘモジデリンの沈着 (Harris, Macnab : 1954), 髄核の壊死 (Bijlsma, Peereboom : 1972), PAS陽性細胞外顆粒状物質 (Pritzker : 1977) などが言われていた²⁸⁾。また、1991年にHormelら⁸⁾は、変性椎間板の髄核細胞が起こす褐色変性は、特異的蛍光性のある蛋白糖化産物、すなわちAGEsの蓄積(後述)であるとする説を提唱している。

② 分子生物学的変性

主として、髄核における構成細胞変化による基質変化と、その結果として起こる水分保持能力の低下である。軟骨終板からの拡散供給経路の遮断、

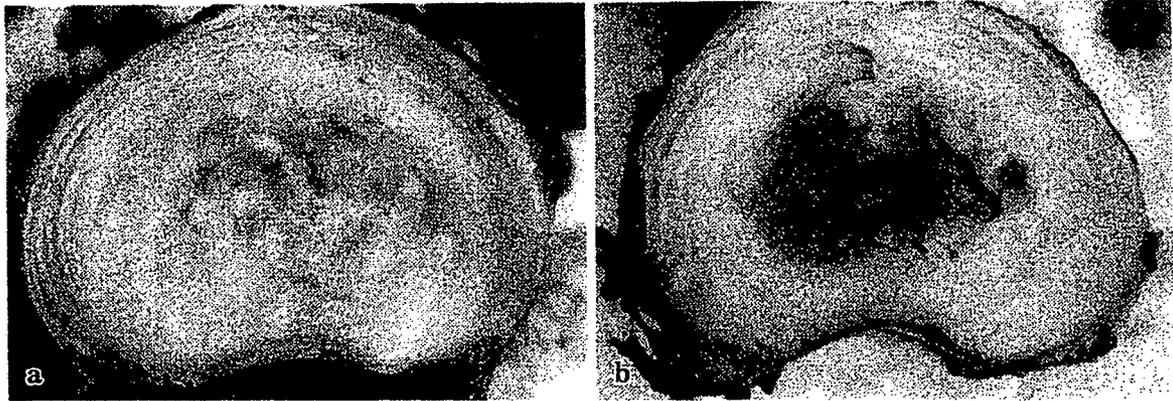


図 1 髄核の褐色変性
L4/5 椎間板の横断面。
a：正常髄核（21歳，男性），b：髄核変性（65歳，男性）。

脊索細胞優位から軟骨様細胞，線維芽細胞の増加，また，プロテオグリカン含有量は中高年期では30%程度に減少，それに伴って水分含有量も極度に減少する。基質コラーゲン組成も主体であるII型からI型やIV，VI型が増加する。生下時に90%あった水分量は，若年者では85%に，さらに成人では70～75%に減少，70歳代では60%になる。もちろん，線維輪や軟骨終板でも構成細胞による変化は起こるが，髄核ほど顕著ではない。

椎間板変性因子

分子生物学的解析の進む中，さまざまな関連因子が報告されている。TGF- β (transforming growth factor-beta)，IGF-1 (insulin-like growth factor-1)，FGF (fibroblast growth factor)，BMPs (bone morphologic proteins) などの増殖因子や細胞調節蛋白，MMPs (matrix metalloproteinases)，ADAMTS (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs) family などの分解酵素が椎間板のECM (extracellular matrix) 合成を調節していることは周知の事実である。筆者ら³⁰⁾は，家兎椎間板細胞において，アデノウイルスを用いたLMP-1 (LIM mineralization protein-1) 遺伝子導入実験を行い，BMP-2とBMP-7遺伝子の発現を増加させることで，プロテオグリカン分泌が増強されることを明らかにした。一方，MMPsの産生はTGF-

β やIL-1 (interleukin-1) などのサイトカインによって調整されると考えられており^{17,27)}，外因性IL-1 β の刺激を受けた椎間板ヘルニア細胞が内在性IL-1 β 分泌を促し (positive feedback loop of IL-1 β)，ヘルニア細胞からのMMP-1とMMP-3の分泌を増強させることを報告した⁹⁾。

近年の遺伝子解析の進歩により，椎間板変性の原因遺伝子の研究が進んでいる。Type IX collagen, aggrecan, MMP-3, CILP (cartilage intermediate layer protein) などのさまざまな遺伝子多型性が報告されており，中でも椎間板に発現されるIX型コラーゲン・ペプチド鎖の1つをコードするCOL9A2, A3遺伝子の配列変異が注目されている。さらには，IL-1 β の遺伝子多型性がCOL9A3遺伝子に影響しているとの報告もある^{2,15,23)}。また，軟骨特異の細胞外基質蛋白であるCILPは，椎間板細胞においてTGF- β を抑制すると考えられており，変性椎間板ではCILP遺伝子が強く発現し，その遺伝子多型は椎間板ヘルニアの原因遺伝子の一つと報告されている²¹⁾。

喫煙，肥満についてもさまざまな見解がある。喫煙により蓄積されるニコチンは，椎間板の細胞増殖能や細胞外マトリックス合成を抑制する重大な因子であり，また，椎間板内のIL-1 β は喫煙により誘発され変性が進行し，禁煙により喫煙で誘発された椎間板変性が修復されるとの報告がある^{12,14)}。肥満との関係を明確に示した報告はない

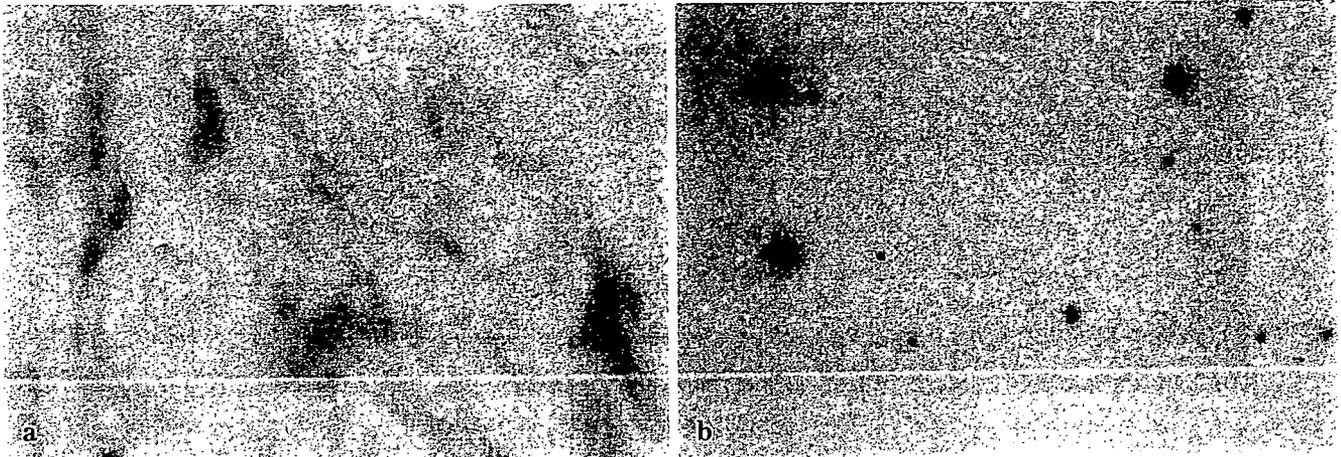


図 2 髄核組織における AGEs, RAGE の免疫染色像
a : AGEs (400 倍), b : RAGE (100 倍).

が、BMI (body mass index) が 25 kg/m^2 以上は椎間板変性のリスクが増加し、また、collagen IX gene 多型 (trp-3 allele) との関連も報告されている¹⁰⁾。アポトーシス (programmed cell death ; 能動的細胞死) との関連についても、Fas ligand や Fas receptor の発現についてさまざまな報告があり、Ariga ら³⁾は、軟骨終板における軟骨細胞のアポトーシスは物理的ストレスにより強く発現することを報告し、また、Park ら¹⁶⁾は、ラットの線維輪細胞培養モデルにおいて、caspase inhibitor が椎間板細胞のアポトーシスを抑制すると述べている。

終末糖化産物 ; AGEs

近年、老化関連物質と言われる AGEs が変性疾患の原因の一つであると注目されている。本稿では、AGEs と椎間板変性について最新の知見を含めて概説する。

1912 年に、アミノ酸と還元糖の混合溶液を加熱すると褐色化することを Maillard が発見したことから、アミノ基とカルボニル基との非酵素的反応は Maillard 反応と呼ばれている。そして、グルコースと蛋白質の Maillard 反応を糖化 (glycation) と呼び、その最終段階 (advanced stage) に生成した修飾産物の総称が AGEs である。AGEs は、糖尿病や加齢などによって体内のさまざまな臓器に蓄積し、特に代謝回転の遅い組織に

蓄積する。さらに、その受容体である RAGE (receptor of AGEs) と結合することにより、さまざまな細胞応答が引き起こされると言われている。近年、AGEs が生体内でさまざまな生理作用を示すことが明らかになり、整形外科領域においては軟骨変性に関する研究が進んでいる^{11,24)}。関節軟骨には、ほかの人体組織に比べ AGEs の蓄積が多く、また加齢によってその蓄積量が増加することが知られている²⁶⁾。さらに、AGEs の蓄積は、コラーゲンやプロテオグリカンの生成を抑制し、また代表的なマトリックス分解酵素である MMP を介し、軟骨基質の分解に作用すると報告されている^{6,7)}。

このように変形性骨関節症と AGEs との関係が明らかになるに伴い、椎間板細胞の性状が関節軟骨細胞と類似していることから、椎間板変性と AGEs の関係にも注目されるようになった。Nerlich ら¹³⁾は、AGEs を加齢性変化の一つのマーカーとして考え、N-(carboxymethyl) lysine (以下、CML) の椎間板への沈着が椎間板の加齢性変化を表す最も良いマーカーであると報告している。Sivan ら²²⁾は、ヒト椎間板細胞への pentosidine の沈着は、関節軟骨細胞同様、protein turnover の重要な決定要素であるとしている。AGEs の中でも pentosidine と CML は、その生成に糖化と酸化が関与しているため、Baynes⁴⁾は、これらの AGEs を glyoxidation products と称し、生体

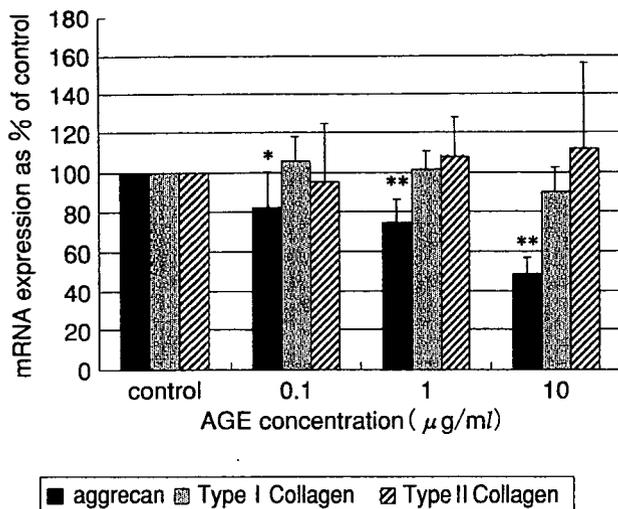


図3 AGEsの髄核細胞への影響

内の酸化ストレスマーカーであるとしている¹⁹⁾。またわれわれは、椎間板細胞へのAGEsの蓄積が、関節軟骨同様、プロテオグリカン生成を抑制し、コラーゲンの分解を促進させ変性へと導くのではないかと仮定し、ヒト椎間板髄核培養細胞モデルにおいて、椎間板細胞とAGEsの関係について検討した。その結果、免疫染色にて、ヒト椎間板髄核細胞にAGEsとRAGEが存在することを確認し(図2)、髄核におけるaggrecan分泌がAGEsの濃度かつ作用時間依存性に減少することを初めて報告した(図3)²⁹⁾。このことより、AGEsがレセプターを介して椎間板細胞からのaggrecan分泌を減少させる可能性が示唆された。

このように加齢に伴うAGEsの蓄積は、髄核基質の代謝に悪影響をもたらし、あるいは直接的に髄核細胞機能に影響することにより、変性の発症や進行に関与しているものと考えられる。現在のところ、この機序がAGE化蛋白による直接的な作用なのかRAGEを介する作用なのかは明確にされていないが、いずれにせよ、AGEsの蓄積が生体内のさまざまな場所で、加齢性疾患の原因となっている可能性は大きい。今後、椎間板を含め、変性疾患を考えるうえでAGEsとの関係が重要になってくる可能性がある。

おわりに

以上のように、椎間板変性の発生機序にはさまざまな見解があり、それぞれが複雑に絡み合っていると思われる。現在、分子生物学的手法などを用い椎間板細胞からのプロテオグリカン分泌を増強させ、椎間板変性を予防し、さらに治療に利用するという企てが盛んに行われているが、なぜ椎間板が変性し、椎間板細胞のプロテオグリカン分泌が低下するかといった根本的問題を後回しにしている感が否めない。われわれは、まず椎間板変性の発生機序を解明することが重要と考え、変性機序を明らかにしていくことが、今後の変性疾患の治療に生かされるものと考えている。

引用文献 (太字番号は重要文献)

- 1) Ala-Kokko L: Genetic risk factors for lumbar disc disease. *Ann Med* 34: 42-47, 2002
- 2) Annunen S, Paassilta P, Lohiniva J, et al: An allele of COL9A2 associated with intervertebral disc disease. *Science* 285: 409-412, 1999
- 3) Ariga K, Yonenobu K, Nakase T, et al: Mechanical stress-induced apoptosis of endplate chondrocytes in organ-cultured mouse intervertebral discs: an ex vivo study. *Spine* 28: 1528-1533, 2003
- 4) Baynes JW: Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40: 405-412, 1991
- 5) 千葉一裕: 脊椎・椎間板変性の病態生理. 戸山芳昭(編): 図説 腰椎の臨床. メジカルビュー社, 2001, pp 43-46
- 6) DeGroot J, Verzijl N, Budde M, et al: Accumulation of advanced glycation end products decreases collagen turnover by bovine chondrocytes. *Exp Cell Res* 266: 303-310, 2001
- 7) DeGroot J, Verzijl N, Jacobs KM, et al: Accumulation of advanced glycation end products reduces chondrocyte-mediated extracellular matrix turnover in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 9: 720-726, 2001
- 8) Hormel SE, Eyre DR: Collagen in the ageing human intervertebral disc: an increase in covalently bound fluorophores and chromophores. *Biochim Biophys Acta* 1078: 243-250, 1991
- 9) Jimbo K, Park JS, Yokosuka K, et al: Positive feedback loop of interleukin-1 beta upregulating production of inflammatory mediators in human intervertebral disc cells in vitro. *J Neurosurg Spine*

- 2 : 589-595, 2005
- 10) Liuke M, Solovieva S, Lamminen A, et al : Disc degeneration of the lumbar spine in relation to overweight. *Int J Obes (Lond)* 29 : 903-908, 2005
 - 11) Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS, et al : Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products : potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 52 : 2376-2385, 2005
 - 12) Nemoto Y, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al : Histological changes in intervertebral discs after smoking and cessation : experimental study using a rat passive smoking model. *J Orthop Sci* 11 : 191-197, 2006
 - 13) Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N : 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine* 22 : 2781-2795, 1997
 - 14) Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y, et al : Degeneration of intervertebral discs due to smoking : experimental assessment in a rat-smoking model. *J Orthop Sci* 9 : 135-141, 2004
 - 15) Paassilta P, Lohiniva J, Goring HH, et al : Identification of a novel common genetic risk factor for lumbar disk disease. *JAMA* 285 : 1843-1849, 2001
 - 16) Park JB, Park IC, Park SJ, et al : Anti-apoptotic effects of caspase inhibitors on rat intervertebral disc cells. *J Bone Joint Surg* 88 A : 771-779, 2006
 - 17) Saito S, Katoh M, Masumoto M, et al : Involvement of MMP-1 and MMP-3 in collagen degradation induced by IL-1 in rabbit cartilage explant culture. *Life Sci* 62 : 359-365, 1998
 - 18) 酒井大輔, 持田讓治 : 椎間板の発生・構造・機能・加齢による変性. *脊椎脊髄* 17 : 351-357, 2004
 - 19) Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG : Increased accumulation of the glycoxidation product N (epsilon)-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 99 : 457-468, 1997
 - 20) Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM, et al : The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus. *J Anat* 184 : 73-82, 1994
 - 21) Seki S, Kawaguchi Y, Chiba K, et al : A functional SNP in CILP, encoding cartilage intermediate layer protein, is associated with susceptibility to lumbar disc disease. *Nat Genet* 37 : 607-612, 2005
 - 22) Sivan SS, Tsitron E, Wachtel E, et al : Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs. *Biochem J* 399 : 29-35, 2006
 - 23) Solovieva S, Lohiniva J, Leino-Arjas P, et al : Intervertebral disc degeneration in relation to the COL9A3 and the IL-1 ss gene polymorphisms. *Eur Spine J* 15 : 613-619, 2006
 - 24) Thorpe SR, Baynes JW : Role of the Maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. *Drugs Aging* 9 : 69-77, 1996
 - 25) 戸山芳昭 : 腰椎の解剖/椎間板・靭帯. 戸山芳昭(編) : 図説 腰椎の臨床. メジカルビュー社, 2001, pp 17-21
 - 26) Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, et al : Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J* 350 : 381-387, 2000
 - 27) Weiler C, Nerlich AG, Zipperer J, et al : 2002 SSE Award Competition in Basic Science : expression of major matrix metalloproteinases is associated with intervertebral disc degradation and resorption. *Eur Spine J* 11 : 308-320, 2002
 - 28) 安間嗣郎 : 腰椎椎間板障害. 齊藤 脩, 安間嗣郎, 遠藤昭彦(訳・編) : 整形外科病理 : 対比臨床・X線所見・組織像鑑別診断. 医学書院サウンダース, 1987, pp 280-320
 - 29) Yokosuka K, Park JS, Jimbo K, et al : Advanced glycation end-products downregulate intervertebral disc cell production of proteoglycans in vitro. *J Neurosurg Spine* 5 : 324-329, 2006
 - 30) Yoon ST, Park JS, Kim KS, et al : ISSLS prize winner : LMP-1 upregulates intervertebral disc cell production of proteoglycans and BMPs in vitro and in vivo. *Spine* 29 : 2603-2611, 2004

参考文献

- 1) 今泉 勉(監), 山岸昌一(編) : AGEs 研究の最前線—糖化蛋白関連疾患研究の現状. メディカルレビュー社, 2004

特集

グリケーション(糖化)

AGEs による間葉系幹細胞の分化の抑制

久米慎一郎 永田見生

蛋白後期糖化生成物 AGEs(advanced glycation end-products)の増加は、糖尿病、加齢、尿毒症などでよく知られ、AGE 化蛋白の機能障害、蓄積による組織脆弱化、種々の細胞機能変化をもたらす。結合組織の修復過程では間葉系幹細胞(MSCs; mesenchymal stem cells)の増殖と分化が重要であるが、AGEs による MSCs の細胞機能への影響は不明である。また、MSCs は結合組織のみならず骨、軟骨、脂肪、筋肉などの間葉系細胞に分化しうる未分化な細胞であり、MSCs をターゲットとした研究は数多く報告され、臨床応用としてもすでに用いられている細胞である。

この稿では、AGEs の MSCs に対する影響を細胞増殖および分化の抑制(特に脂肪、軟骨、骨)の観点から検討したので、報告する¹⁾。

1 AGEs による間葉系幹細胞の増殖に対する影響

非分離骨細胞の培養系では、骨髄由来の造血系幹細胞と間葉系幹細胞が含まれている。これらの幹細胞の増殖や分化に対する AGEs の影響についてはよくわかっていない。最近われわれは、培養ヒト間葉系幹細胞に RAGE(receptor for AGE)の発現、BSA-AGE による増殖抑制とアポトーシスの増加さらに酸化ストレス(ROS; reactive oxygen species)の増加を認めた。AGEs はグルコース、グリセルアルデヒド、グリコールアルデヒドとウサギ血清アルブミンを無菌的条件下において一定期間反応させ²⁾、おのおのグル

コース由来 AGEs を AGE-1、グリセルアルデヒド由来 AGEs を AGE-2、グリコールアルデヒド由来 AGEs を AGE-3 と命名し、ウシアルブミンを対照に実験を行った¹⁾(以下、分化実験に関しても同じ細胞、AGEs を使用した)。

AGEs による細胞生物学的イベントは血管内皮細胞³⁾や腎周皮細胞⁴⁾、腎メザンギウム細胞⁵⁾ですすでに報告されているが、MSCs でも一定濃度(100 $\mu\text{g}/\text{mg}$)の各種 AGEs およびウシアルブミン(対照)共存下で、培養5日目に AGE-2 は約45%、AGE-3 は約41%の細胞増殖低下を示し(図1 A)、BrdU uptake でも AGE-2, 3 において濃度依存性に取り込みを低下させた(図1 B)。また、アポトーシスを半定量的 TUNEL 法で測定すると、AGE-2, 3 群で濃度依存性にアポトーシス増加を示した(図2)。さらに、AGE-2, 3 は細胞内酸化ストレス(ROS)^{3,4)}の増加を認めた(図3)。しかし、これらのイベントは AGE-1 では認めなかった。

RAGE は種々の細胞に存在するが、MSCs での発現を蛍光染色(図4 A)、免疫電顕(図4 B)、Western blotting 法(図3 C)で確認した。Western blotting 法では AGE-2, 3 共存下で約1.5倍 RAGE の up-regulation を認めた。前述した細胞増殖や酸化ストレスの発生は抗 RAGE 中和抗体にて一部抑制を示した(図5 A, B)。AGEs は MSCs に対して直接的あるいは RAGE を介して細胞増殖に影響し、結果的には糖尿病患者の創傷治癒の遅延に関与しているのではないかと想像できる。

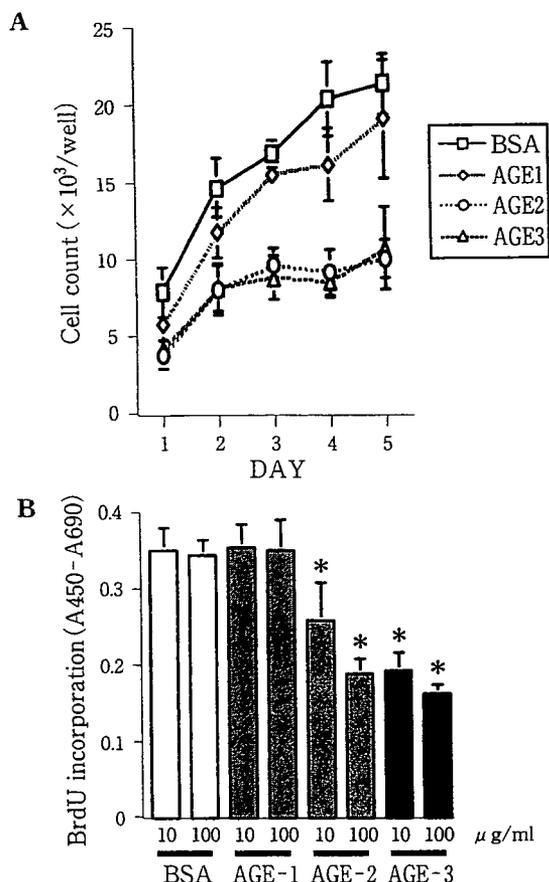


図1 AGEs共存下でのヒトMSCsの細胞増殖曲線(A)およびBrdU incorporation(B)

(A)各種AGEsおよび対照(non-glycated BSA)を100 µg/mlの濃度で添加し、MSCs(0日目 1×10³ cells/cm²)の増殖を調べた。培養5日目にはAGE-2, 3添加群で約50%の細胞増殖低下を示した。the mean±SD(n=3)。(B)AGEs-BSA(10 µg/ml, 100 µg/ml)添加によるMSCsのBrdU incorporation(培養24時間後測定)はAGE-2, 3群で濃度依存性に低下を認めた。the mean±SD(n=6), p<0.05。

2 AGEsによる間葉系幹細胞の分化に対する影響

全能細胞と称されるES(embryonic stem)細胞におけるAGEsの影響は、マウスES細胞を用いて検討され、AGEsはES細胞内蛋白にダメージをあたえ、正常な分化機構の破綻をきたす⁶⁾。間葉系幹細胞のAGEsによる分化誘導の抑制は、ヒトMSCsを脂肪、軟骨、骨分化誘導培地(BioWhittaker)を用いて行い、AGEsの影響を分化特異的マーカーのELISA(LPL, type II collagen), Caおよび骨型ALP, 特殊染色(Oil red染色, SafraninO染色, Kossa染色)で評価した。AGEsはMSCsの細胞生物学的抑制の強かったAGE-2および

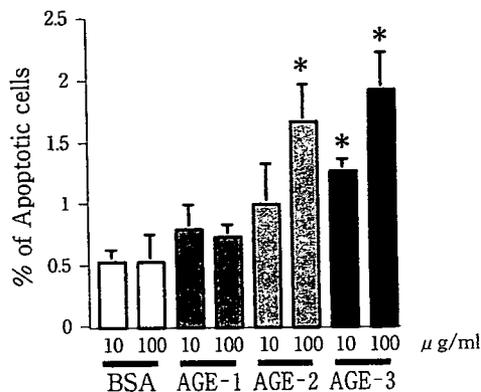


図2 AGEs-BSA共存下でのヒトMSCsにおけるアポトーシス細胞の推移

アポトーシス細胞はTUNEL assay(培養24時間後測定)を用いてランダムにカウントし、AGE-2では約1.7倍、AGE-3では約1.9倍(100 µg/ml添加群)のアポトーシス細胞増加を示した。これらは濃度依存性であった。the mean±SD(n=3), p<0.05。

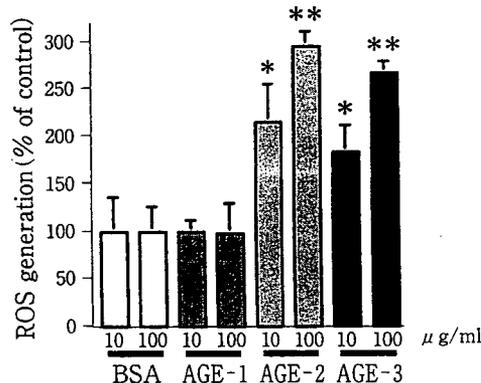


図3 AGEs-BSA共存下でのヒトMSCsにおける細胞外酸化ストレス(ROS: reactive oxygen species)の発生

AGEs-BSA添加による細胞外ROS(培養24時間後測定)の発生は、AGE-2, 3群で濃度依存性に増加し、AGE-2では約2.9倍、AGE-3では約2.7倍(100 µg/ml添加群)の発生増加を示した。the mean±SD(n=6), *p<0.05, **p<0.01。

及びAGE-3において検討した⁷⁾。

1. AGEsによるMSCsの脂肪分化への影響

AGEsは3T3-L1線維芽細胞から脂肪細胞への分化を阻害し、細胞内トリグリセライド含有量を減少させる。また、脂肪細胞へは細胞内へのグルコース取込み量を濃度依存的に減少させ、AGEs/RAGEシステムにより細胞内酸化ストレスを増加させ、MCP-1などのアディポサイトカインの発現亢進を介して糖輸送の障害をはじめとするインスリン抵抗性を引き起こすとされている⁷⁾。

MSCsの脂肪分化におけるAGEsの影響は、

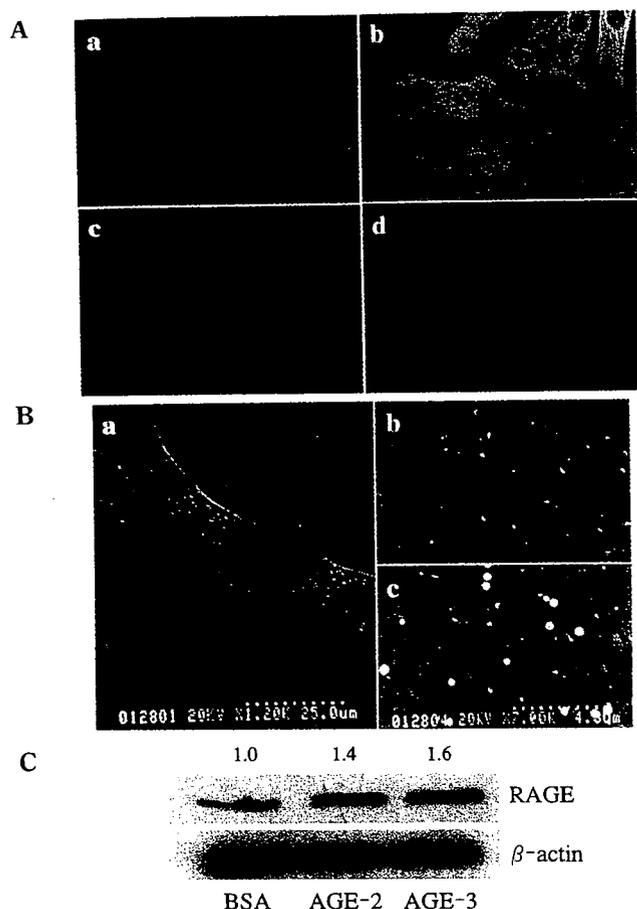


図 4 ヒト MSCs の RAGE の発現

(A)免疫蛍光染色にて抗 RAGE 抗体により染色されている。a: negative control, b: vimentin, c: CD 34, d: RAGE。(B)免疫電顕像(走査電顕像)では細胞表面の抗 RAGE 抗体部に金コロイド(▲)が存在する。a, c: 2 次電子, b: 反射光。(C)Wester blottingにて AGE-2, 3 添加群(100 μg/ml)では 48 時間後に約 1.5 倍の RAGE up regulation を示した。

Oil red 染色を用いて組織を評価し, AGE-2, 3 添加群で有意に脂肪滴の減少がみられた(図 6 A)。ELISA 法を用いた検討では LPL(lipoprotein lipase)や細胞内 TG(triglyceride)の合成を調べたが, いずれも合成を阻害した(図 6 B, C)。しかし, これらは AGEs/RAGE システムにより有意な減少はみられなかった。

以上より, AGEs は MSCs に AGEs/RAGE システム以外のシステムあるいは直接的なダメージをあたえ, 脂肪分化を抑制し, インスリン抵抗性肥満の一因になっている可能性が示唆された。

2. AGEs による MSCs の軟骨分化への影響

軟骨組織は軟骨細胞と周囲の軟骨基質から形成され, 基質の多くはプロテオグリカンからなり, ほかの組織と比べ type II コラーゲンも多く合成

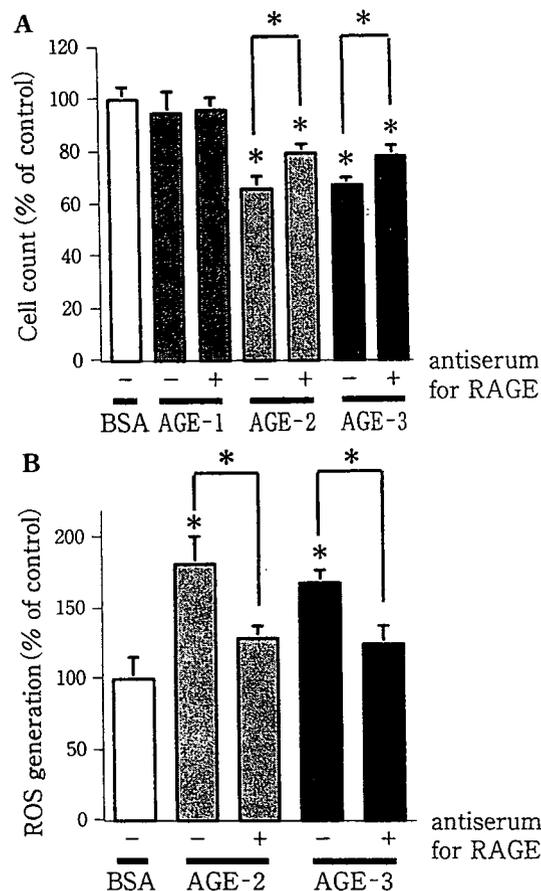


図 5 AGEs/RAGE システムによる MSCs 細胞機能への影響

(A)AGE-2, 3 添加群(図 1 と同じ条件, 培養 3 日後測定)による細胞増殖の抑制は抗 RAGE 中和抗体共存下で一部改善を認めた。the mean±SD(n=3), p<0.05。(B)AGE-2, 3 添加群(図 3 と同じ条件, 培養 24 時間後測定)による ROS 産生量は抗 RAGE 中和抗体共存下で約 1/3 に抑えられた。the mean±SD(n=6), p<0.05。

されている。

プロテオグリカン含有量の増加により SafraninO 染色では赤色を呈するが, 図 7 A では AGE-2, 3 共存下でそのような染色はみられず, type II コラーゲン含有量を ELISA 法で調べると, AGE-2, 3 共存下では有意に低下し, 抗 RAGE 中和抗体でそれぞれ 20%, 30%の回復を示した(図 7 B)。

古くから関節軟骨は再生能力を有さない組織とされていたが, MSCs は骨髄組織以外にも関節軟骨の肥大細胞層に存在することが示されている⁸⁾。AGEs による MSCs の分化抑制の結果は, OA(osteoarthritis)患者に代表される軟骨変性やプロテオグリカン合成能低下の一端を担っている可能性が予想され, 今後, さらなる検討が待たれる。

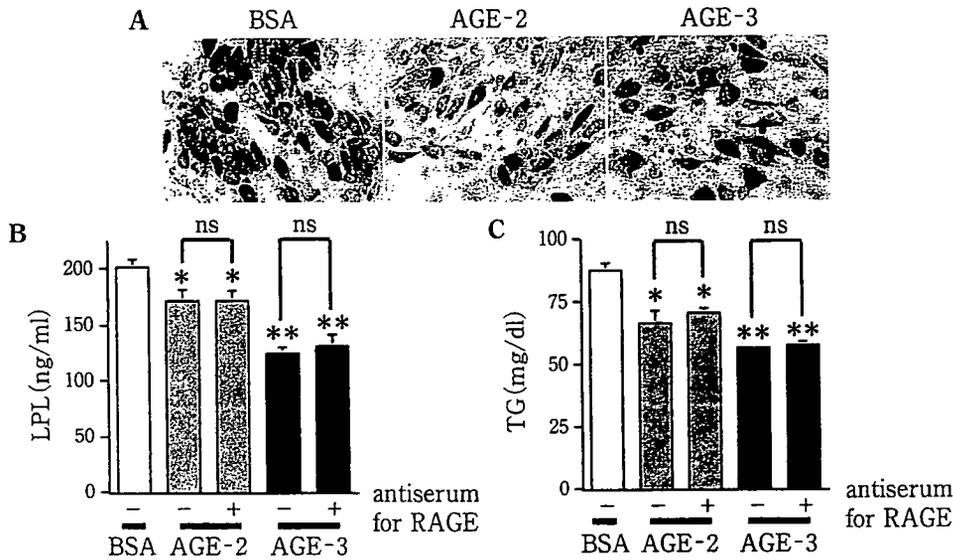


図 6 AGEs による MSCs の脂肪分化への影響

(A) Oil red 染色。AGE-2, 3 添加群で細胞内脂肪滴の減少を認める。(B) LPL 含有量, (C) 細胞内 TG 含有量を ELISA 法にて測定 (AGEs-BSA; 100 μ g/ml, 脂肪分化誘導培地 2 週間培養後測定)。AGE-2, 3 添加群で LPL, TG 産生は抑制され, 抗 RAGE 抗体にて緩和されなかった。the mean \pm SD (n=6), *p<0.05, **p<0.01, ns: not statistically significant.

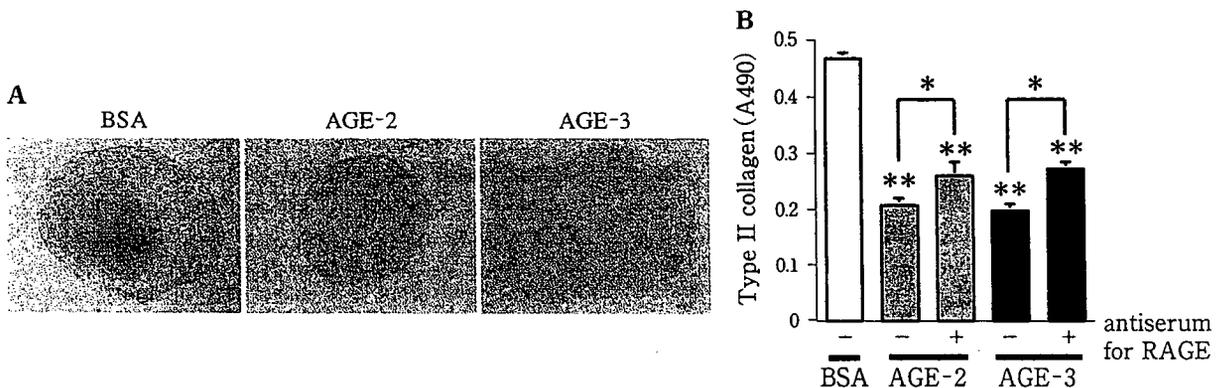


図 7 AGEs による MSCs の軟骨分化への影響

(A) Safranin O 染色。BSA 添加群では一部赤色 (プロテオグリカン) を示し, AGE-2, 3 添加群では認めない。(B) Type II コラーゲン含有量を ELISA 法にて測定 (AGEs-BSA; 100 μ g/ml, 軟骨分化誘導培地; 3 次元培養, 3 週間培養後測定)。AGE-2, 3 添加群で Type II コラーゲン産生低下を認め, 抗 RAGE 抗体にて一部緩和された。the mean \pm SD (n=6), *p<0.05, **p<0.01.

3. AGEs による MSCs の骨分化への影響

骨への AGEs の蓄積は骨を脆弱化するが, その機序の詳細は明らかではない⁹⁾。AGEs 化したコラーゲンは骨の剛性 (stiffness) を増加させる¹⁰⁾。近年, 斉藤ら¹¹⁾は AGEs 化したコラーゲン架橋が骨質低下の一因であると述べている。

AGEs の骨細胞機能への影響は, 骨芽細胞の培養系で検討されている。骨芽細胞は MSCs から分化する単核細胞であり, 自身も前骨芽細胞, 成熟骨芽細胞, そして骨細胞へと分化する。マウスの培養骨芽細胞分化モデルにおいて, 骨芽細胞自身

に AGEs に親和性を示す受容体が存在し¹²⁾, AGE-BSA の添加は成熟骨芽細胞で最も高い RAGE の誘導能を示し, その分化過程に重視されている ERK (extracellular signal-regulated kinase) の活性を伴っていた。また, 増殖期ではむしろ RAGE 非依存性に AGEs 親和性の上昇も示されている¹³⁾。これらは, AGEs が骨芽細胞の増殖, 分化に影響し, 骨形成過程を修復する可能性を示唆しているが, 骨芽細胞への AGEs の影響は用量だけでなく作用時間依存性でもあり, 一過性に細胞機能を亢進することはあっても, 長期暴露

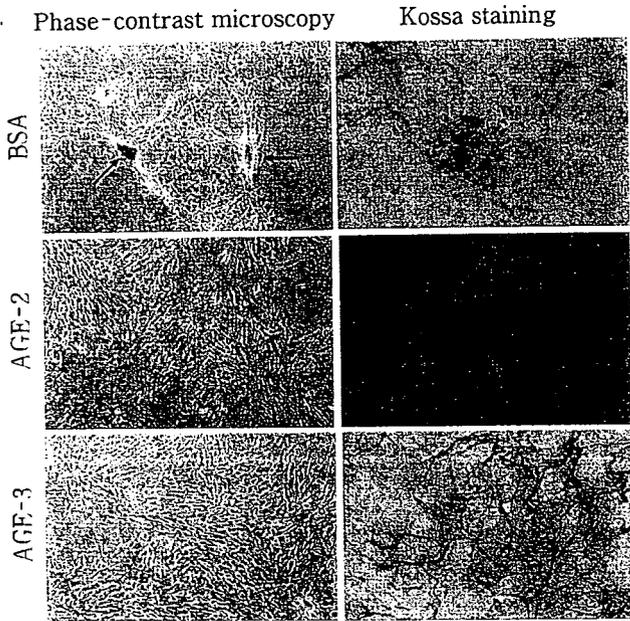


図 8 AGEs による MSCs の骨分化への影響(その 1) 蛍光顕微鏡(左) Von Kossa 染色(右)。BSA 群では bone nodule formation を認めるが、AGE-2, 3 添加群では認めない。

は結果的に細胞の増殖、生存、分化に悪影響を及ぼすと考えてよさそうである¹⁴⁾。

骨芽細胞の前駆細胞である骨髄間葉系幹細胞での AGEs による骨分化への影響は不明であったが、ヒト MSCs を 3 週間骨誘導培地で培養し、AGE-2, 3 共存下で骨形成像の減少(Kossa 染色：図 8)を認めた。また、骨分化マーカーである type I コラーゲン産生も低下を示した(図 9 C)。しかしながら、ALP や細胞内カルシウム含有量は AGE-2, 3 添加群において有意な上昇を示した(図 9 A, B)。通常、MSCs の骨分化は細胞増殖とともに細胞外マトリックスの産生を経て mineralization を起こし、骨細胞と成長する¹⁵⁾。分化初期には type I コラーゲンや fibronectin などが産生され、ALP の発現、カルシウム沈着を励起するとされている¹⁶⁾。しかし今回の検討では、AGEs により bone formation や Type I コラーゲン産生の減少は認められたが、ALP や細胞内カルシウムは上昇していた。また、これらの現象は抗 RAGE 中和抗体にて有意に緩和された。

以上より、AGE-2, 3 による骨分化への影響は dystrophic mineralization (calcification) に似た現象が起こっている可能性が示唆された。さらに、山本らは、糖尿病による末期腎不全患者で

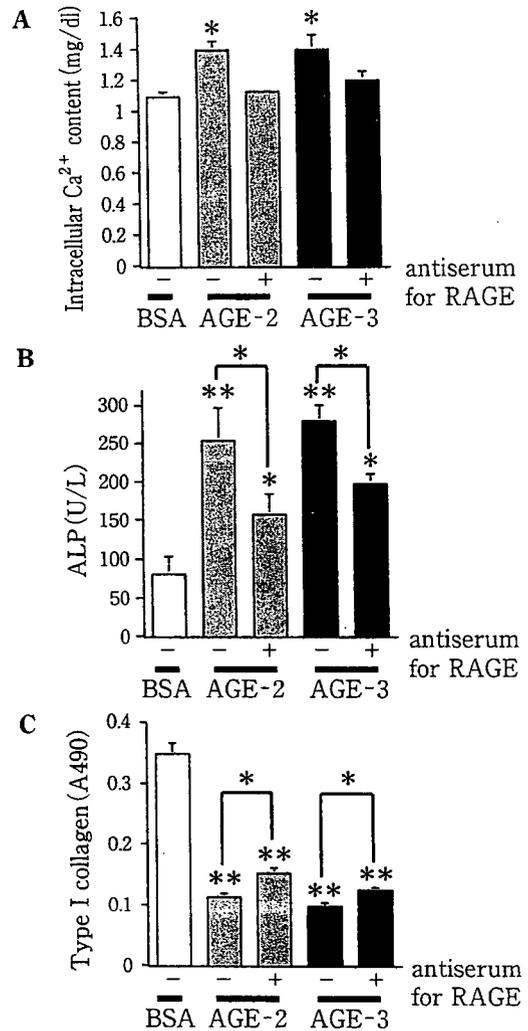


図 9 AGEs による MSCs の骨分化への影響(その 2) (A)細胞内 Ca 濃度、(B)骨型 ALP 活性、(C)Type I コラーゲン産生量(AGEs-BSA : 100 μg/ml, 骨分化誘導培地にて 3 週間培養後測定)。AGE-2, 3 添加群では細胞内 Ca 濃度および骨型 ALP は増加しているが、Type I コラーゲン産生は低下している。いずれも抗 RAGE 抗体にて一部中和された。the mean ± SD (n = 6), *p < 0.05, **p < 0.01。

AGEs による時間依存性の細胞内カルシウム濃度上昇効果が関与し、無形成骨の病因の一つであることを述べている¹⁷⁾。

さいごに

AGE-2, 3 は間葉系幹細胞の増殖、アポトーシス、脂肪、軟骨、骨分化に影響し、糖尿病患者や高齢者における組織修復の遅延や過剰な骨石灰化に関与する可能性がある。また、AGEs の MSCs への作用の一部は RAGE を介すると考えられた。

●文 献

- 1) Kume S, Kato S, Yamagishi S et al : *J Bone Miner Res* **20** : 1647-1658, 2005
 - 2) Takeuchi M, Makita Z, Bucala R et al : *Mol Med* **6** : 114-125, 2000
 - 3) Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H et al : *Diabetologia* **41** : 1435-1441, 1998
 - 4) Yamagishi S, Fujimori H, Yonekura H et al : *Biochem Biophys Res Commun* **258** : 353-357, 1999
 - 5) Fukami K, Ueda S, Yamagishi S et al : *Kidney Int* (in print)
 - 6) Malin H et al : *PNAS* **103** : 7700-7705, 2006
 - 7) 卯木浩之, 山岸昌一 : *血管医学* **6** : 481-488, 2005
 - 8) Alsalameh S, Amin R, Gemba T, Lotz M : *Arthritis Rheum* **50** : 1522-1532, 2004
 - 9) Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM : *Bone* **31** : 1-7, 2002
 - 10) Vashishth D, Gibson GJ, Khoury JI et al : *Bone* **31** : 195-201, 2001
 - 11) 齊藤充 : *Clin calcium* **16** : 1287-1295, 2006
 - 12) McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM : *Acta Diabetol* **36** : 45-52, 1999
 - 13) Cortizo AM, Lettieri MG, Barrio DA et al : *Mol Cell Biochem* **250** : 1-10, 2003
 - 14) McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM : *Acta Diabetol* **38** : 113-122, 2001
 - 15) Long MW : *Blood Cells Mol Dis* **27** : 677-690, 2001
 - 16) Siggelkow H, Rebenstorff K, Kurre W et al : *J Cell Biochem* **75** : 22-35, 1999
 - 17) 山本威久 : *Kidney Metab Bone Dis* **19** : 23-28, 2006
-

黄色靱帯石灰化症*

山室 健一** 吉川 一郎 中間 季雄
星野 雄一

はじめに

黄色靱帯石灰化症は、変性した黄色靱帯の弾性線維内にピロリン酸カルシウムやハイドロキシアパタイトの結晶が腫瘤状に沈着して、脊髄、馬尾、神経根障害を生じる病態である。1920年に Polgar¹⁾が初めて報告して以来、現在のところ日本での報告が大部分である。発生部位は頸椎部が多く、本邦では1976年に南光¹⁵⁾が初めて報告して以来150例以上の報告があり、無症候性のものを含めると、もはやまれな疾患とはいいがたい。報告数としては次いで腰椎部が多く、胸椎部ではほとんど報告がない。

成 因

石灰化の発生要因に関しては、現在のところ推測の域を出ない。1990年以後、頸椎手術例において沈着物質の成分分析がなされ、ピロリン酸カルシウム例が最も多いことから、本症と calcium

pyrophosphate dehydrate crystal deposition disease (CPPDD) の関連性が示唆されており、本症を1962年に MacCarty⁷⁾が提唱した CPPDD の局所型と考察する報告が数多くある^{1-3,6,8,11,19,24,26)}。しかし、本症における石灰沈着は、一般的な CPPDD と異なり、関節部や関節周囲ではなく、椎間関節から離れた椎弓中央部に生じるなど、不明な点も多い。また、沈着物質としてはハイドロキシアパタイト例も多く、現在のところ、本症はさまざまなリン酸カルシウム結晶が、全身の疾患の一部分症として黄色靱帯に沈着する病態と考えられている。

また、高齢女性に多く、エストロゲンの低下を指摘する報告^{6,11)}がある。安川²⁷⁾は、頸椎例4例の血中エストロゲン値を測定し、全例低値であったと報告している。中下位頸椎に好発することから、機能的、動的ストレスの関与を指摘する報告も多い。中間らは、C4/5より下位頸椎では弾性線維のアポトーシスの頻度が低いため頸椎黄色靱帯の変性につながりやすいことを示唆し¹⁴⁾、黄色靱帯石灰化は組織学的にはC3/4以下で40%前後の高頻度に見られたと報告している¹³⁾。中島¹²⁾は加齢によるエストロゲンの低下、機能的、動的ストレスから黄色靱帯の弾性線維の変性断裂が生じ、結合組織中のカルシウムが沈着し、石灰化が

Key words

黄色 帯石灰化

(calcification of ligamentum flavum ; CLF)

ピロリン酸カルシウム結晶沈着症

(calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease ; CPPDD)

脊椎 (spine)

* Calcification of Ligamentum Flavum

** 自治医科大学整形外科教室〔〒329-0498 下野市薬師寺3311-1〕/Kenichi YAMAMURO, Ichirou KIKKAWA, Nakama SUEO, Yuichi HOSHINO : Department of Orthopaedic Surgery, Jichi Medical School