

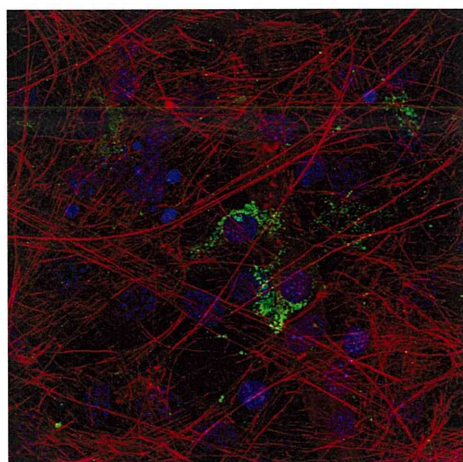
幹細胞由来靭帯様組織



幹細胞由来靭帯細胞蛍光組織レーザー顕微鏡像

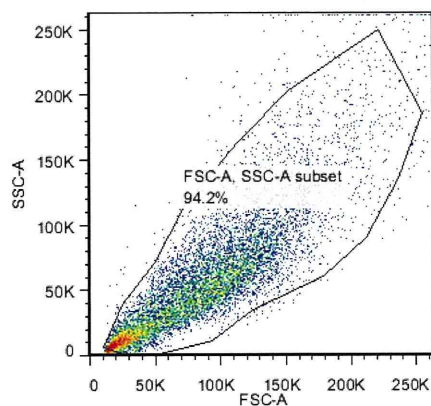
GFP: I型コラーゲン

DAPI:核

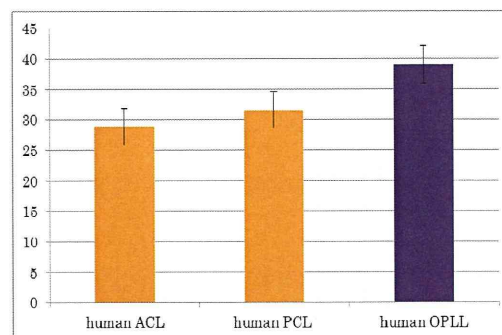


FACS像

幹細胞由来靭帯組織のI型コラーゲン解析



ヒト組織ターゲット靭帯遺伝子q-PCR解析



幹細胞由来靭帯組織は、I型コラーゲンタンパク質の発現が確認でき、ヒトACL、PCL、OPLLの組織の靭帯遺伝子の発現が定量できた。

この靭帯様組織に脊柱靭帯骨化症血液中の欠損タンパク質をノックダウンするとアルカリフォスファターゼを分泌する。また、靭帯トランスジェニックマウスの発現型は脊柱靭帯骨化症の発症に類似していることが判明した。現在、欠損タンパク質のノックアウトマウスの発現型を詳細に検証している。

我々の研究結果から、脊柱靭帯骨化症における発現タンパク質とその働きを追究することで、全メカニズム解明とそこからの治療開発へ展開する意義がある。

D. 健康危険情報
なし

E. 研究発表
1. 論文発表

1. Hyperadiponectinemia enhances bone formation in mice. Mitsui Y, Gotoh M, Fukushima N, Shirachi I, Otabe S, Yuan X, Hashinaga T, Wada N, Mitsui A, Yoshida T, Yoshida S, Yamada K, Nagata K*. BMC Musculoskelet Disord. 2011 Jan 17;12:18.

2. 学会発表

1. 後縦靭帯骨化症の疾患特異的タンパ

- ク質の発見による iPS 創薬研究 津留美智代 佐藤公昭 戸山芳昭 永田見生 日本整形外科学会誌 第 85 巻 第 2 号 査読有 S90 1-8-2. 2011.
2. 第 40 回日本臨床神経生理学会学術大会 (2010. 11. 2、神戸) シンポジウム「圧迫性脊髄・末梢神経障害の機能診断」山田 圭 佐藤公昭、密川 守、渡邊琢也、佐々木威治、猿渡敦子、永田見生 圧迫性脊髄障害の術中脊髄モニタリングー当科の現状と問題点ー
 3. 16th Triennial Congress of Asia Pacific Orthopaedic Association (2010. 11. 4-7、Taiwan) Mitsui Y, Gotoh M, Yagi M, Okawa T, Higuchi F, Nagata K. Hyaluronan Modulates Cell Proliferation and Migration in Rabbit Flexor Tendon Epitenon and Endotenon-derived Fibroblasts
 4. 第 74 回西日本脊椎研究会 (2010. 11. 12、福岡) 吉松弘喜、吉田健治、山下 寿、神保幸太郎、石岡久和、鳥井芳邦、山田 圭、密川 守、佐藤公昭、永田見生 頸椎後縦靭帯骨化を伴う高齢者頸椎外傷の検討 渡邊琢也、山田 圭、佐藤公昭、密川 守、山下 勝、佐々木威治、猿渡敦子、永田見生 胸椎後縦靭帯骨化症に対する手術治療方針の検討
 5. 第 74 回西日本脊椎研究会 (2010. 11. 22、福岡) 渡邊琢也、山田 圭、佐藤公昭、密川 守、山下勝、佐々木威治、猿渡敦子、永田見生 胸椎後縦靭帯骨化症に対する手術治療方針の検討
 6. 第 33 回脊髄機能診断研究会 (2011. 2. 5、東京) 猿渡敦子、山田 圭、佐藤公昭、密川 守、脇田 瞳、渡邊琢也、中村秀裕、佐々木威治、猿渡敦子、永田見生、原田秀樹、津田勝哉、井上英豪 脊髄脊髄疾患における Br (E)-MsEP のアラームポイントの意義の検討
 7. 第 40 回日本脊椎脊髄病学会 (2011. 4. 21-23 : Web 開催) 吉松弘喜、吉田健治、山下 寿、神保幸太郎、西田俊晴、山田 圭、密川 守、佐藤公昭、永田見生 受傷原因からみた頸部外傷の特徴
 8. 第 73 回西日本脊椎研究会 (2011. 6. 4、福岡) 山田 圭、佐藤公昭、密川 守、脇岡 徹、吉田龍弘、佐々木威治、猿渡敦子、永田見生 当院における頸髄損傷の現状と問題点
 9. 第 75 回西日本脊椎研究会 (2011. 6. 10、福岡) 吉松弘喜、吉田健治、山下 寿、神保幸太郎、石岡久和、鳥井芳邦、渡邊琢也、山田 圭、密川 守、佐藤公昭、永田見生 超高齢者における頸部外傷の検討
 10. 第 75 回西日本脊椎研究会 (2011. 6. 10、福岡) 山田 圭、佐藤公昭、密川 守、吉松弘喜、佐々木威治、猿渡敦子、永田見生 80 歳以上の頸髄症に対する治療戦略
 11. 第 121 回西日本整形・災害外科学会学術集会 (2011. 6. 11-12、福岡) 猿渡敦子、山田 圭、佐藤公昭、密川 守、吉松弘喜、渡邊琢也、佐々木威治、中村 翠、松田光太郎、脇田 瞳、

永田見生、原田秀樹、津田勝哉、牛島一男
圧迫性脊髄障害症例の術中モニタリングにおける経頭蓋電気刺激筋活動電位 (Br[E]-MsEP) の問題点

12. 第6回佐賀手術侵襲・疼痛研究会
(2011.8.6、佐賀) 山田 圭、佐藤公昭、密川 守、吉松弘喜、松田光太郎、大本将之、佐々木威治、猿渡敦子、永田見生 脊椎外科における慢性疼痛の治療経験
13. SICOT 2011 XXV Triennial World Congress (2011.9.6-9、Prague)
Yoshimatsu H, Yoshida K, Yamashita H, Sato K, Nagata K Problems in diagnosing cervical spine injury, spinal cord injury, or both and related measures: A study of 9468 cases of cervical spine trauma

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
出願番号：特願 2011-239140
発明者：津留美智代、永田見生
特許名称：平行線維性結合組織の製造方法
出願人：津留美智代、永田見生
出願日：2011/10/31
2. 実用新案登録
なし
3. その他

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

後縦靭帯骨化症（OPLL）細胞における、PGE2/EP4 経路と SOX9 についての研究

研究分担者 小坂泰一 澤地恭昇 木村大 遠藤健司 山本謙吾
東京医科大学整形外科

研究要旨 先行研究にて OPLL 細胞、非 OPLL 細胞を培養細胞伸展装置で 24 時間培養、PGE2 またはプロスタノイド受容体 EP4 agonist を添加し転写因子 SOX9 をパラメーターとして mRNA レベルで検討したところ、PGE2、EP4 agonist 添加で SOX9 の発現は上昇した。ところがメカニカルストレスをかけない培養系では、PGE2、EP4 agonist 単独、あるいは BMP2 との併用においても、Alkaline phosphatase、Aggrecan は EP4 agonist により抑制される傾向にあり、PGE2/EP4 経路は最終的な骨軟骨化を抑制する可能性があると考えられた。そこで今回は SOX9 に注目して、細胞を 0, 50, 100 μ g/ml の BMP2 (PeproTech 社製) 単独または 1 μ M の EP4 agonist、100 μ M の PGE2 と同時処理し、2 日間培養し、total RNA を採取、転写因子 SOX9 をパラメーターとして real time PCR を用いて mRNA レベルで検討したところ、SOX9 は抑制される傾向にあった。今回の結果と先行研究を比較し、メカニカルストレスの有無により、OPLL 細胞における PGE2/EP4 経路の応答性に変化が生じる可能性が示唆された。

A. 研究目的

OPLL 細胞において、メカニカルストレスの有無により、PGE2/EP4 経路の影響が変化する可能性を、BMP2 と PGE2 または EP4 agonist をもちいて、SOX9 に注目し、これまでのデータと比較し、検討した。

B. 研究方法

I 術中に摘出した OPLL 患者 4 例、非 OPLL 患者 3 例の脊柱靭帯組織より、outgrowth 法により靭帯細胞を単離し、10%FBS を添加した DMEM 培地中で 37°C、5%CO₂ にて継代培養し 4-5 代目の細胞を使用した。

II コンフルエントまで培養した細胞をトリプシン/EDTA で剥離し、48 well plate

(BD falcon 社製)に 1 ウェル当り 20,000 個になるように播種し、一晚培養した。

翌日、細胞を 0, 50, 100 μ g/ml の BMP2 (PeproTech 社製) 単独または 1 μ M の EP4 agonist、100 μ M PGE2 と同時処理し、2 日間培養した。

total RNA を採取、転写因子 Sox9 をパラメーターとして real time PCR を用いて mRNA レベルで検討した。

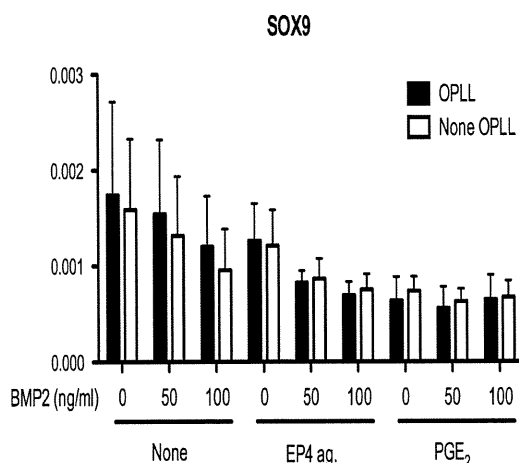
(倫理面での配慮)

人権の擁護には個人情報保護が必要であり、検体は匿名化して用いる。また、今回は手術の際に切除した組織から検体を取り出す為、手術時に発生する手術自体の危険

性以外に、新たに発生する危険性は無い旨を十分説明した。

C. 研究結果

- ・SOX9 発現は、OPLL 群、非 OPLL 群ともに、BMP2 単独で濃度依存的に抑制される傾向にあった。
- ・EP4 agonist は単独で SOX9 発現を抑制する傾向にあり、BMP2 併用でその傾向はより強くなった。
- ・PGE2 は単独で SOX9 発現を抑制した。BMP2 併用でその傾向に変化は見られなかった。



D. 考察

OPLL 組織において転写因子 SOX9 は増殖軟骨細胞、間葉系細胞で発現する。先行研究で、培養細胞伸展装置にてメカニカルストレスを加えつつ 24 時間刺激した OPLL 細胞において、低濃度の PGE2 および EP4agonist が OPLL 細胞の SOX9 を mRNA レベルで上昇させることにより、メカニカルストレスが OPLL の発症機序に関与している可能性があると考えた (平成 20 年度・研究班報告書)。ところがメカニカルストレスをかけない培養系では、FGF18 は EP4 agonist により明

らかに上昇したが、ALP、Aggrecan は EP4agonist が抑制される傾向にあり、またアルカリホスファターゼ染色においても EP4 agonist の併用が陽性細胞の数に変化を及ぼさなかったことから、負荷のかからない状況下では PGE2/EP4 経路は最終的な骨軟骨化には関与しない可能性があると考えられた (平成 21 年度・研究班報告書)。よって今回は SOX9 について検討を行ったところ、SOX9 は PGE2 または EP4 agonist 添加により抑制される傾向にあった。この結果は、生体内において PGE2/EP4 経路は靭帯の骨軟骨化を抑制する傾向にあるも、メカニカルストレスによって靭帯細胞の応答が変化する可能性が残り、今後の検討課題である。

E. 結論

SOX9 は PGE2 または EP4 agonist 添加により抑制された。この結果は、生体内において PGE2/EP4 経路は靭帯の骨軟骨化を抑制する傾向にあるが、先行研究の結果と比較検討し、メカニカルストレスにおいて靭帯細胞の応答性が変化する可能性が残された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

特記すべきことなし

2. 実用新案登録

特記すべきことなし

3. その他

特記すべきことなし

胸椎黄色靭帯骨化の内軟骨性骨化における Wnt/ β -catenin signaling と細胞分化制御

福井大学医学部器官制御医学講座整形外科学領域

彌山峰史、内田研造、杉田大輔、中嶋秀明、吉田 藍、馬場久敏

研究要旨

胸椎黄色靭帯骨化症（OLF）由来の培養靭帯細胞を用いて、骨化形成過程における Wnt/ β -catenin signaling の役割について検討した。OLF 由来細胞では β -catenin、Runx2、Osterix の mRNA 発現量が上昇しており、さらに cyclic tensile strain を加えると各因子の mRNA の発現は有意に増加した。免疫組織化学的局在では Wnt 5a、Wnt 7a は未分化間葉系細胞、 β -catenin は増殖期軟骨細胞、Runx2、Osterix は肥大軟骨細胞に強く発現していた。Cyclic tensile strain によって Wnt/ β -catenin signaling が過剰発現状態になることは骨形成因子の発現を促進させ、骨化形成の病態に関与すると考えられた。

A. 研究目的

脊柱靭帯骨化症の病態・成因には遺伝学的因子を中心として種々の要因が複合すると考えられる^{1,2)}。骨化形成・伸展は病理組織学的には内軟骨性骨化であり³⁾、骨化巣と靭帯組織の移行部に存在する骨化前線部には軟骨細胞が様々な形態を呈している。我々のこれまでの研究では、頸椎後縦靭帯骨化症（OPLL）、胸椎黄色靭帯骨化症（OLF）において、骨化形態によって骨化前線部における層構造、軟骨細胞分化の性質、靭帯基質の変性程度が異なることを報告した⁴⁾。また、骨化靭帯細胞から得た培養細胞では、軟骨分化や骨形成に関与する転写因子の発現が増加していることを観察した⁵⁾。しかし、骨化巣の形態は個々の症例により多種多様であり、骨化形成や骨化進展を調節する因子について、未だ不明な点も残されている。

今回、胸椎 OLF 由来の培養靭帯細胞に対して、内軟骨性骨化過程に関与する因子である Wnt/ β -catenin signaling の発現と

mechanical tensile strain が与える影響について検討した。

B. 研究方法

胸椎 OLF に対して後方手術時を行った際に採取した骨化靭帯 10 例（OLF 群：男性 6 例、女性 4 例、手術時平均 69.8 歳）を対象とした。採取した黄色靭帯は骨組織を切除した後に細切し、explant 法にて細胞を遊走させ、5 継代培養して実験を行った。Cyclic tensile strain は Flexercell FX-3000 を用いて行い、ストレス反応時間は 0、6、12、24 時間とした。この際の Wnt 5a、Wnt 7a、 β -catenin、Runx2、Osterix の発現を免疫組織化学的染色、Real-time RT-PCR、Western blotting 法にて評価した。

また骨化靭帯の一部は脱灰固定して薄切標本作製し、上記の因子について免疫組織化学染色を行った。

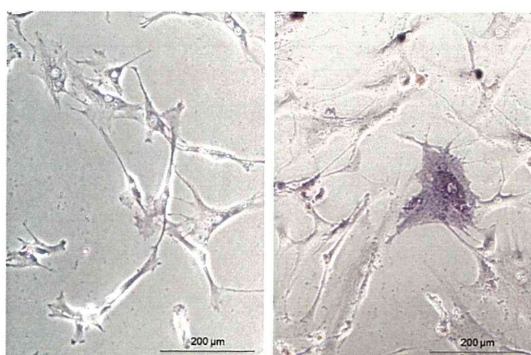
比較対象には非骨化黄色靭帯 5 例（NON-OLF 群：男性 3 例、女性 2 例、手術時平均 69.1 歳）を用いた。

(倫理面での配慮)

本研究を遂行するにあたり、研究対象者の人権擁護を最大限に配慮し、研究内容が苦痛を伴うものではなく、社会的不利益を蒙るものではなく、危険性を完全に排除し、疾患の病態解析のみが目的であることを説明及び同意を得ている。

C. 研究結果

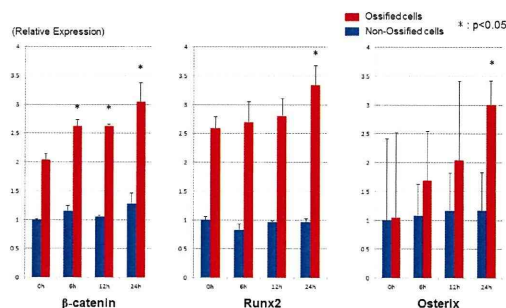
培養靭帯細胞は細長い紡錘形を呈しており、OLF 由来細胞では細胞同士で重層化する傾向にあり、また Alkaline Phosphatase 活性は高値となっていた (figure)。



左：NON-OLF 由来細胞、右：OLF 由来細胞
OLF 由来の靭帯細胞では Alkaline Phosphatase 活性が上昇している。

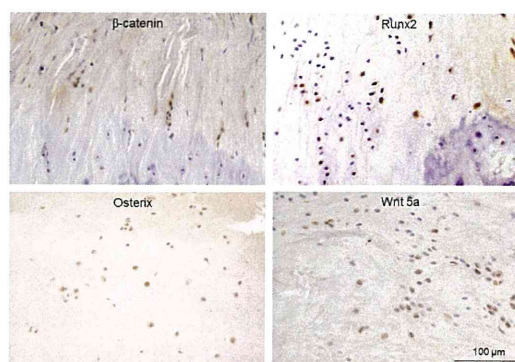
OLF 由来細胞と NON-OLF 由来細胞に対する real time RT-PCR による mRNA 発現の比較では、OLF 由来細胞において β -catenin、Runx2 の mRNA の発現が有意に上昇しており、cyclic tensile strain を加えると β -catenin の mRNA 発現は 6 時間後から、Runx2、Osterix は 24 時間後から有意な上昇を認めた (figure)。

培養細胞に対する免疫組織化学染色では、Wnt 5a、Wnt 7a の発現は細胞質を中心に陽性であり、また Western blotting では Wnt 5a の発現は有意に上昇しており、Wnt 7a の発現も高値となる傾向にあった。



Cyclic tensile strain を加えた際の real-time RT-PCR による各因子の mRNA 発現

脱灰薄切標本について、免疫組織化学的染色による各因子の局在を観察すると、 β -catenin は骨化前線の増殖期軟骨細胞に強く陽性であり、Runx2、Osterix は骨層近傍の成熟軟骨細胞、肥大軟骨細胞に強く発現していた。また Wnt 5a、Wnt 7a の発現は、骨化前線部に誘導された新生血管周囲の未分化間葉系細胞に陽性であった (figure)。



β -catenin、Runx2、Osterix、Wnt 5a の免疫組織化学的局在

D. 考察

Wnt/ β -catenin signaling は内軟骨性骨化における軟骨細胞と骨芽細胞の分化に関連しており、この signaling の異常活性により骨端線閉鎖に異常をもたらすことが指摘されている⁶⁾。今回の結果から、Wnt/ β -catenin signaling が骨化前線部の細胞分化に関連しており、特にストレス条件下では β -catenin の発現が異常上昇し、それに伴い骨芽細胞

の分化を促進させる転写因子の発現が亢進することが推測された。

骨化前線部では、成長因子や転写因子を介して autocrine/paracrine に細胞が分化・成熟して層構造を形成するが、石灰化前線周囲の軟骨細胞は活性が非常に高く、この軟骨細胞はサイトカインや転写因子を介して血管新生、石灰化の促進、骨芽細胞の分化誘導をもたらすと考えられた⁴⁾。さらに Wnt/ β -catenin signaling の持続的かつ過剰発現はこれらの系を異常促進させ、このことは骨化形成・伸展に関する1つの要因であることが示唆された。

E. 結論

胸椎黄色靭帯骨化症の骨化進展において、Wnt/ β -catenin signaling は骨化前線の軟骨細胞分化、骨芽細胞誘導に寄与していることが示唆された。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

H. 知的財産権の出願・登録状況

特記することなし。

発表論文、参考論文

- 1) Sakou T, Taketomi E, Matsunaga S, Yamaguchi M, Sonoda S, Yashiki S. Genetic study of ossification of the posterior longitudinal ligament in the cervical spine with human leucocyte antigen haplotype. *Spine* 16: 1249-1252, 1991.
- 2) Inamasu J, Guiot BH, Sachs DC. Ossification of the posterior longitudinal ligament: an update on its biology, epidemiology, and natural history. *Neurosurgery* 58: 1027-1039, 2006.
- 3) Miyasaka K, Kaneda K, Sato S, Iwasaki Y, Abe S, Takei H, et al. Myelopathy due to ossification or calcification of the ligamentum flavum: radiologic and histologic evaluations. *AJNR Am J Neuroradiol* 4: 629-632, 1983.
- 4) Yayama T, Uchida K, Kobayashi S, Kokubo Y, Sato R, Nakajima H, et al. Thoracic ossification of the human ligamentum flavum: histopathological and immunohistochemical findings around the ossified lesion. *J Neurosurg Spine* 7: 184-193, 2007.
- 5) Sato R, Uchida K, Kobayashi S, Yayama T, Kokubo Y, Nakajima H, et al. Ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine: histopathological findings around the calcification and ossification front. *J Neurosurg Spine* 7: 174-183, 2007.
- 6) Uchida K, Yayama T, Cai HX, Nakajima H, Sugita D, Guerrero AR, et al. Ossification process involving the human thoracic ligamentum flavum: role of transcription factors. *Arthritis Res Ther* 13: R144, 2011.
- 7) Yuasa T, Kondo N, Yasuhara R, Shimono K, Mackem S, Pacifici M, et al. Transient activation of Wnt/ β -catenin signaling induces abnormal growth plate closure and articular cartilage thickening in postnatal mice. *Am J Pathol* 175: 1993-2003, 2009.

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

慢性脊髄圧迫モデル(*twy/twy*)における microglia・macrophage の役割
—急性損傷との相違と生理的意義—

中嶋秀明 内田研造 彌山峰史 平井貴之 渡邊修司 竹浦直人 馬場久敏
福井大学医学部 器官制御医学講座 整形外科学領域
研究分担者 内田 研造 福井大学整形外科准教授

研究要旨 慢性脊髄圧迫モデル (*twy/twy*) における microglia, macrophage の動態を調べ、急性脊髄損傷の場合との相違について検討した。圧迫が高度になるに従って、microglia の発現は減少し、macrophage の発現が増加した。iNOS もしくは CD16/32, arginase-1 もしくは CD206 の発現は圧迫に応じて増加したが、圧迫が高度な状態であっても、arginase-1, CD206 の発現が優位な状態が保たれていた。圧迫に応じた microglia, macrophage の subtype の変化は、急性脊髄損傷における変化とは異なっており、慢性圧迫脊髄における神経細胞の生存・維持にも関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

脊髄が慢性的な圧迫を受けた場合、圧迫高位の脊髄では、灰白質での神経細胞の脱落、白質全域の著しい脱髄と海綿状変性が観察される。しかし、慢性圧迫脊髄には急性脊髄損傷とは大きく異なり、組織構造の破綻にもかかわらず機能を維持する機構、すなわち脊髄の可塑性が存在することが推測される。

急性脊髄損傷では、近年特に macrophage/microglia の動態や役割が注目されている。macrophage にはいくつかの phenotype が報告されているが、脊髄・神経領域では、炎症反応惹起などの組織障害性作用をもつ classically activated macrophage (M1 type)と、血管新生や glial scar resolution などの組織修復作用をもつ alternatively activated macrophage (M2 type)が重要な役割を果たしていることが示されている。

本研究では、慢性脊髄圧迫における macrophage/microglia の動態とその役割について調べ、急性損傷との相違や生理的意義について検討することを目的とした。

B. 研究方法

animal model には、後環軸膜に経時的に石灰沈着が生じる脊髄慢性圧迫モデルである *twy* マウスを用いた。本研究では、圧迫の指標として最大圧迫部脊髄残余面積が 50% から 70%を中等度圧迫群、残余面積が 50% 以下を高度圧迫群とし、圧迫の程度に応じた変化を観察した。

評価項目は、① 圧迫程度に応じた macrophage/microglia の動態を flowcytometry を用いて評価、② M1 type, M2 type macrophage の動態を flowcytometry を用いて評価、③ M1 type macrophage の抗体として iNOS, CD16/32 を、M2 type macrophage の抗体として arginase-1,

CD206 を用いて、OX-42 との蛍光二重染色を行い、圧迫に応じたそれぞれの発現数を評価、④ 炎症性サイトカインとして IFN- γ 、TNF- α 、IL-6 を、抗炎症性サイトカインとして IL-4、IL-13 について、その圧迫程度による発現の変化を western blotting で評価した。

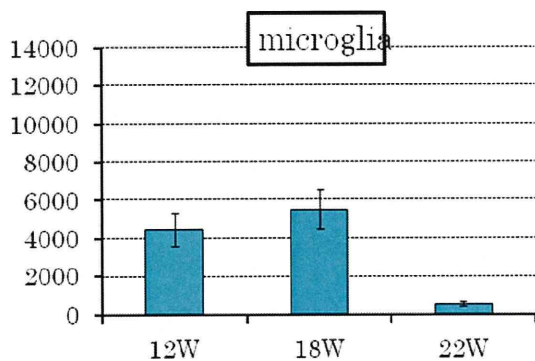
(倫理面での配慮)

実験動物に対する処置などの際の取り扱い方法、除痛処置については、学内の委員会に了承済みである。

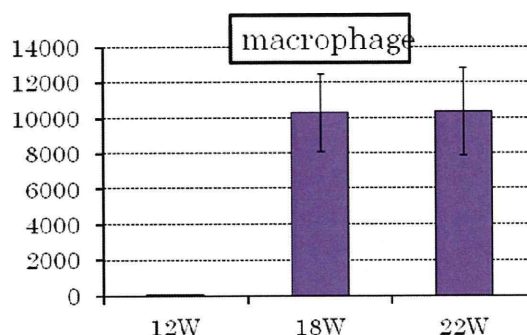
C. 研究結果

①macrophage/microglia の動態

microglia(CD45^{moderate}/CD11b^{high}/GR-1^{negative})は、高度圧迫群では有意に発現数が減少しており、macrophage (CD45^{high}/CD11b^{high}/GR-1^{negative})は、中等度圧迫～高度圧迫にかけて有意に発現が上昇していた。



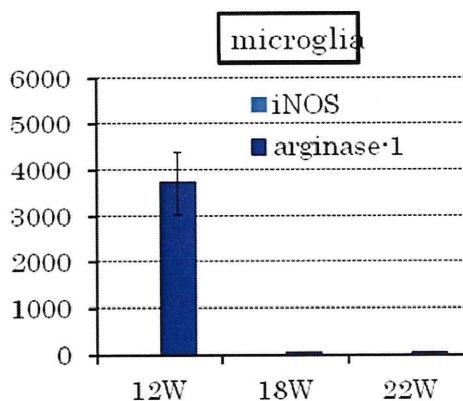
microglia 発現の変化



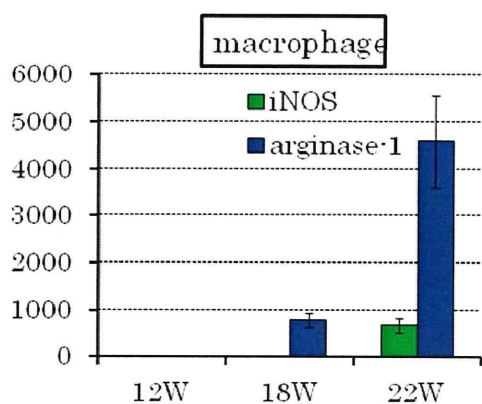
macrophage 発現の変化

②iNOS, arginase-1 陽性細胞の動態

arginase-1 の main source は、軽度圧迫では microglia であったが、中等度～高度圧迫になるにつれて、macrophage 分画からの arginase-1 陽性細胞の発現が確認された。iNOS は圧迫が高度になると発現がみられたが、今回研究した圧迫の範囲内では、arginase-1 の発現を上回ることはなかった。



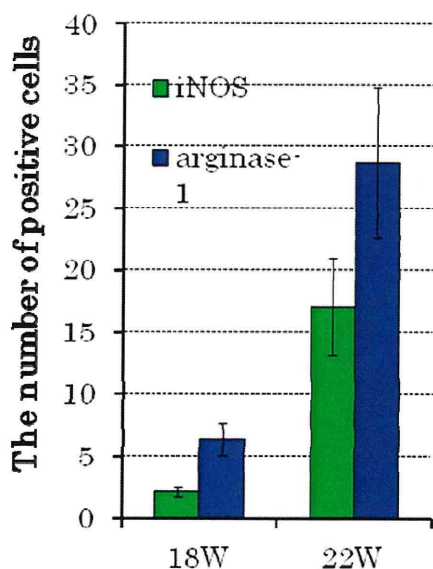
microglia 分画からの arginase-1, iNOS 発現



macrophage 分画からの arginase-1, iNOS 発現

③免疫染色

M1 type macrophage の代表的抗体とされる iNOS, CD16/32 および M2 type macrophage の代表的抗体とされる arginase-1, CD206 の発現数は、圧迫により急速に増加していたが、発現数は M2 macrophage が有意であった。



免疫染色における iNOS, arginase-1 発現数の変化

④サイトカインの変化

Western blotting で調べた IFN- γ の発現は、

圧迫程度に関わらずみられなかった。TNF- α , IL-6 は、圧迫に応じて発現が増強した。IL-4, IL-13 の発現は、中等度圧迫群で有意に高く、高度圧迫群では中等度圧迫群よりやや発現が低下していた。

D. 考察

急性脊髄損傷においては、損傷後 1-3 日目の急性期において M1 および M2 type macrophage の発現は上昇し、損傷後 1 週以降では特に M1 type macrophage の発現が有意な状態になることが報告されている。一方、今回の慢性圧迫脊髄の結果では、脊髄残余面積が 50%以下となった高度圧迫群においても組織修復に働く M2 type macrophage の発現が維持されており、この macrophage の動態が神経細胞の生存・維持に関与している可能性が考えられた。

急性脊髄損傷では、損傷後、血行性に遊走してきた macrophage が、好中球などからの炎症性サイトカインの影響を受けて主に M1 type macrophage として働いていると考えられるが、慢性圧迫では、血行性に macrophage が遊走してくることは少ないとも考えられる。慢性圧迫では、resident microglia が圧迫により活性化され、IL-4 や IL-13 の働きによって主に M2 type macrophage に変換されることが予想される。圧迫が高度になると、TNF- α や IL-6 の発現が増強し、M1 type macrophage への変換もみられるものと推測される。

E. 結論

慢性圧迫脊髄では、組織修復に働く M2 type macrophage が、neurotoxic に働く M1 macrophage より有意に発現していた。慢性

圧迫脊髄における神経細胞の生存・維持に、macrophage の subtype の変化が関与している可能性が示唆された。

reduces apoptosis of neurons and oligodendroglia in rat spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)* 36: 1350-1358, 2011

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Uchida K, Nakajima H, Watanabe S, Yayama T, Guerrero AR, Inukai T, Hirai T, Sugita D, Johnson WE, Baba H. Apoptosis of neurons and oligodendrocytes in the spinal cord of spinal hyperostotic mouse (twy/twy): possible pathomechanism of human cervical compressive myelopathy. *Eur Spine J*, in press
- ② Uchida K, Yayama T, Sugita D, Nakajima H, Rodriguez Guerrero A, Watanabe S, Roberts S, Johnson WE, Baba H. Initiation and progression of ossification of the posterior longitudinal ligament of the cervical spine in the hereditary spinal hyperostotic mouse (twy/twy). *Eur Spine J* 21: 149-155, 2012
- ③ Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Rodriguez Guerrero A, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Zhu P, Baba H. High-mobility group box-1 and its receptors contribute to proinflammatory response in the acute phase of spinal cord injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 36: 2122-2129, 2011
- ④ Chen KB, Uchida K, Nakajima H, Yayama T, Hirai T, Watanabe S, Guerrero AR, Kobayashi S, Ma WY, Liu SY, Baba H. Tumor necrosis factor- α antagonist

2. 学会発表

- ① 平井貴之、内田研造、中嶋秀明、他. 慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy) における phenotype 別にみた macrophage の免疫組織学的検討. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会. 日本整形外科学会雑誌 85: S1109, 2011
- ② 平井貴之、内田研造、中嶋秀明、他. 慢性脊髄圧迫モデル (twy/twy) における macrophage の動態と意義. 第117回中部日本整形外科災害外科学会学術集会. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌 55: 188, 2011
- ③ Nakajima H, Uchida K, Chen K, et al. Prevention of the development of inflammatory tissue damage and apoptosis of neurons and oligodendroglia after spinal cord injury by tumor necrosis factor- α antagonist. 27th Annual Meeting of Cervical Spine Research Society-European Section: 110, 2011
- ④ Guerrero AR, Uchida K, Nakajima H, et al. Blokade of Interleukin-6 Signaling Generates an Alternative Activating Environment in the Spinal Cord after Injury: Promoting a Neuroprotective Macrophage Population with Concurrent Locomotive Recovery in Mice. 39th Annual Meeting of Cervical Spine Research Society: 238-239, 2011

脊髄損傷後の機能的神経筋電気刺激治療動物モデルの確立に関する研究

研究分担者 寒竹 司

山口大学医学部整形外科

研究要旨

【目的】有効なリハビリテーションは脊髄再生治療後の神経機能の再構築を促す治療として期待されている。機能的神経筋電気刺激（FNS）治療の有効性は、臨床的にも報告されているが、詳細な機能改善メカニズムは不明である。私たちはその解析、さらに脊髄再生治療との併用療法の効果について検討するため、ラットFNS治療モデルの確立を目指している。今回は脊髄再生治療後に併用可能な低侵襲なモデルを考案し、三次元動作解析による評価を行った。【方法】成熟雌Fischerラット5匹を用いた。刺激電極には針電極を使用し、刺激筋には前脛骨筋と腓腹筋を選択した。針電極の至適位置確認のため、強さ時間曲線を作成して評価した。次に過去の実験データを基に左右各筋を歩行リズムで15分間刺激し、三次元動作解析（KinemaTracer：Kissei Comtec Co., Ltd）を行って関節可動域（ROM）を算出した。【結果と考察】強さ時間曲線から、刺激電極が適切な位置に挿入されていることが確認できた。三次元動作解析から、経時的なROM減少を認めしたが、FNS中のリズム的な足関節運動を確認できた。

A. 研究目的

脊髄不全損傷後約1年間は中枢神経の可塑性による部分的な感覚運動機能の改善が得られるとされている¹²⁾。しかしながら回復のパターンは様々であり、損傷の程度、さらに治療内容によっても影響を受ける¹³⁾。一方、脊髄完全損傷は運動機能の改善に乏しく、その機能改善には細胞移植等の再生治療が必要と考えられる。現在Neuroprotection（二次損傷の防止）、Stimulating Axonal Growth（軸索伸展促進）、Replacing Lost Tissue（細胞移植）、Enhancing Axonal Transmission（再髄鞘化促進）など様々な治療が研究されているが、これら単独の治療では限界があり、いくつかの有効な治療を組み合わせる併用療法が必要である¹³⁾。中でも

リハビリテーションは神経系の内因性の可塑性を促進することで、脊髄不全損傷後の機能回復を加速することが可能と考えられ、再生治療後の神経回路の再編成を促す治療として期待されている¹³⁾。臨床的にはロボット援助によるトレッドミル歩行、機能的電気刺激治療の併用による下肢の繰り返しのリズム運動は有効なリハビリと考えられている^{1,6,15)}。機能的神経筋電気刺激（FNS:Functional Neuromuscular Stimulation）治療は、臨床でもその有用性が認められており、麻痺筋の筋疲労減少、筋萎縮、骨密度の低下改善、さらに、運動機能の改善にも効果があるとされている。運動機能改善のメカニズムの一つとして、リハビリによる中枢神経系の神経回路の再編成があ

げられているが、詳細は不明である⁷⁾。詳細な機能改善のメカニズムの解明、脊髄再生治療との併用効果の有効性を検討するためには、動物実験を含めた基礎的な研究が必要である。しかし動物実験で脊髄再生治療との併用療法としてのリハビリテーションの効果を検討した報告は非常に少なく、適切な動物実験モデルの開発を含めて、今後検討が必要な領域である^{2,13)}。トレッドミル歩行訓練の動物モデルとしては、Edgerton, Roy らが詳細な報告をしおり⁴⁾、Courtine らはラット完全脊損モデルで、トレッドミルトレーニングとセロトニンアゴニスト、硬膜外電気刺激の併用により、トレッドミル上での荷重歩行が可能となったと報告した³⁾。一方、機能的神経筋刺激治療モデルとしては Jung R らが過去にラットを用いた電気刺激モデルを作成し、各下肢関節の主動筋のモーターポイントに埋め込んだ刺激電極を刺激して、歩行時の各関節の協同運動に必要な刺激条件の基礎的実験を行い^{8,10)}、脊髄不全損傷ラットの FNS 治療により、短期での有意なトレッドミル歩行での後肢共同運動の改善を報告している⁹⁾。しかし埋め込み型の電極であるため、手術侵襲が大きく、脊髄再生治療との併用療法の効果を検討するためにはより低侵襲なモデルが必要となる。我々の長期目標は脊髄再生治療後の併用療法として使用可能なより低侵襲な FNS 治療モデルを作成し、有効性の検討、機能改善のメカニズムの解明を行うことである。本研究では、埋め込み型の電極に比較してより低侵襲な針電極を用いた FNS 治療モデルを考案し、正常ラットでの三次元動作解析による評価を行った。

B. 研究方法

この研究は、山口大学動物管理使用委員会の審査を受け、「山口大学動物に関する規則」、「動物の愛護及び保管に関する法律」（法律第 105 号）、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」（環境省告示第 88 号）及び「研究機関における動物実験等の実施に関する基本指針」（文部科学省告示第 71）の規制に基づいて行われた。成熟雌 Fisher ラット 5 匹（体重 160～175g）を用いた。刺激電極には針電極を使用し、刺激筋には足関節の主動筋である前脛骨筋（Tibialis anterior: 以下 TA）と腓腹筋（Gastrocnemius: 以下 Gc）を選択した。麻酔は吸入麻酔（セボフルレン 2～3%）を使用した。

刺激電極挿入

刺激電極の挿入は吸入麻酔下で行った。ラットを専用のプラットフォーム上に固定し、両側の TA と Gc に経皮的に電極を挿入した（図 1）。各筋のモーターポイント近傍に挿入するため、解剖学的なモーターポイントを参考にして、刺激電極に低電流（周波数=75Hz, パルス幅=40 μ sec, 振幅=1mA, 持続時間=200msec）を流して、経皮的に刺激を行い、目的筋の最大収縮が得られる部位に挿入した。

強さ-時間 (strength-duration : 以下 SD)

曲線

刺激電極が目的筋のモーターポイント近傍の適切な位置に挿入されているか否かについて評価するため、刺激電極挿入直後に各筋の SD 曲線を作成した。SD 曲線とは活動電位を生み出すための閾値刺激をもたらすのに必要な最小電流とパルス幅の関係をみたも

ので、本研究ではパルス幅を 20, 40, 60, 100, 200, 500 μ sec と変化させた時の筋の Visual twitch の最小電流をプロットして作成した。

FNS 刺激条件

刺激装置にはアイソレーテッド 4ch 刺激装置[®] (STG2004, Multi Channel Systems, Cytocentrics) を使用した。刺激条件は過去の報告を参考にして設定した (パルス幅=40 μ sec, 周波数=75Hz, 振幅=パルス幅 40 μ sec での Visual twitch 最小閾値電流の 1.5 倍) とした (図 2)⁸⁾。各筋の刺激のタイミングは正常ラットのトレッドミル歩行の筋電図データから、左右の足関節主動筋を歩行のリズムで刺激した¹⁴⁾。刺激は麻酔下で 15 分間行った。

三次元動作解析

刺激中の足関節の関節可動域 (以下 ROM) の経時的変化を評価するため、三次元動作解析を行った。三次元動作解析システムは KinemaTracer[®](KISSEI COMTEC CO., LTD.) を使用した。両側後肢の関節に設置したカラーマーカー (マーカーは両側の腸骨部, 股関節部, 膝関節部, 足関節部, 足部 MP 関節部皮膚上に設置) を 4 つの CCD カメラで撮影し, 動作解析ソフトを用いて足関節の ROM を算出し, 刺激直後, 5 分後, 10 分後, 15 分後の経時的な変化を評価した (図 3)。

統計学的解析

足関節 ROM の経時的変化の比較には対応のある t 検定 (paired t-test) を用い, 危険率 5% で有意差を検討した (Excel 統計使用)。

C. 研究結果

1. SD 曲線

各筋の SD 曲線は何れも滑らかで non-linear 曲線を描き, 電流閾値も低値を示している (図 4)。以上から刺激電極は何れもモーターポイント近傍の適切な位置に挿入されていることが確認できた。

2. 三次元動作解析

図 5 は両側足関節の平均 ROM の経時変化をみたグラフである。刺激直後には良好な ROM が得られているが, 5 分後には有意な ROM 減少を認めている ($P=0.001$)。

D. 考察

過去に針電極を使用したラット FNS 治療モデルの報告はなく, 本報告が最初である。針電極による FNS を行う場合にまず問題となるのは, 電極を刺激筋のモーターポイントの近傍に設置することである。足関節の主動筋である TA と Gc のモーターポイントは比較的針電極で刺激し易い部位にあり, 刺激筋として選択した。SD 曲線による評価では何れの筋も低電流で non-linear な曲線が得られており, 刺激電極がモーターポイント近傍の良好な位置に挿入されていることが確認できた (図 4)。FNS による歩行リズム刺激を行う場合の問題点として, 筋疲労の問題があげられる。Jung らの股関節主動筋の埋め込み型電極を使用した報告では, 刺激開始後 1 分以内に有意な ROM の減少を認めたと報告している⁹⁾。一方, 本研究では, 刺激筋は異なるが針電極を使用した FNS により, 歩行リズム刺激には成功したが, 刺激開始後 5 分後には有意な ROM 減少を認めた (図 5)。これは Open-loop 刺激であるため, 刺激筋の筋疲労によるものと推察される。筋疲労の抑制には低周波よりも高周波刺激が有用であるとの

報告もあり¹¹⁾、今後検討する必要がある。
また、Fairchildらは股関節埋め込み型電極を使用したラットFNS治療モデルで、脊髄圧挫損傷ラットでのadaptive neuromuscular electrical stimulationに成功したと報告している⁵⁾。これは刺激中の股関節の角度をリアルタイムでフィードバックし、予め理想とする関節運動の軌跡を設定して、エラーを補正するように電流を自動的に調節することでROMを維持するPattern generator/Pattern shaper (PG/PS)タイプのClosed-loop刺激装置を使用している。今後はこのような装置の導入により、筋疲労の問題も解決可能と考えられる。

E. 結論

- 1) 針電極を使用した低侵襲なFNS治療モデルを考案した。
- 2) SD曲線から刺激電極が良好な位置に挿入されていることが確認できた。
- 3) 針電極によるFNSで足関節の歩行リズム刺激に成功したが、三次元動作解析による経時的ROMの評価では、5分後に有意なROMの減少を認めた。

【文献】

- 1) Barbeau H, McCreary DA, ODonovan MJ, Rossignol S, Grill WM, and Lemay MA: Tapping into spinal circuits to restore motor function. *Brain Res Brain Res Rev* 1999;30:27-51.
- 2) Bouyer LJ, "Animal models for studying potential training strategies in persons with spinal cord injury," *Journal of Neurological Physical Therapy*, vol. 29, no.

3, 2005

- 3) Transformation of non-functional spinal circuits into functional states after the loss of brain input. *Nat Neurosci* 12(10):1333-1342, 2009. Fairchild MD, Kim SJ, Iarkov A, et al: Repetitive hindlimb movement using intermittent adaptive neuromuscular electrical stimulation in an incomplete spinal cord injury rodent model. *Experimental Neurology* 223:623-633, 2010.
- 6) Field-Fote EC: Combined use of body weight support, functional electric stimulation, and treadmill training to improve walking ability in individuals with chronic incomplete spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil* 2001;82:818-824. Field-Fote EC: Electrical stimulation modifies spinal and cortical neural circuitry. *Exercise and Sports Sciences Review*. 2004;32:155-160.
- 8) Ichihara K, Venkatasubramanian G, Abbas JJ and Jung R. Neuromuscular electrical stimulation of the hindlimb muscles for movement therapy in a rodent model. *J Neurosci Methods* 2009;176:213-224.
- 9) Jung R, Belanger A, Kanchiku T, et al: Neuromuscular stimulation therapy after incomplete spinal cord injury promotes recovery of interlimb coordination during locomotion. *J Neural Eng* 6(5):055010. Epub, 2009.
- 10) Kanchiku T, Lynskey JV, Protas D, Abbas JJ and Jung R. Neuromuscular electrical stimulation induced forelimb movement in a rodent model. *J Neurosci*

Methods 2008;167:317-26.

1 1) Matsunaga T, Shimada Y, Sato K :
Muscle fatigue from intermittent
stimulation with low and high frequency
electrical pulses. Arch Phys Med Rehabil
80 : 48-53. 1999.

1 2) Raineteau O and Schwab M:
Plasticity of motor systems after
incomplete spinal cord injury. Nature
Reviews Neuroscience. 2001;2:263-273.

1 3) Ramer LM, Ramer MS, and Steeves JD:
Setting the stage for functional repair of
spinal cord injuries: a cast of thousands:
Spinal Cord. 2005;43:134-161.

1 4) Thota AK, Watson SC, Knapp E,
Thompson B, Jung R: Neuromechanical control
of locomotion in the rat. J Neurotrauma
2005;Apr 22(4):442-465.

1 5) Wirz M, Zemon DH, Rupp R, Scheel A,
Colombo G, Dietz V, and Hornby TG:
Effectiveness of automated locomotor
training in patients with chronic
incomplete spinal cord injury: a
multicenter trial. Arch Phys Med Rehabil.
2005;86:672-680.

VII. 画像・電気生理・コンピューター解析

頰椎後縦靱帯骨化症における骨化巣体積増加量計測

研究分担者 藤森孝人 岩崎幹季 長本行隆 柏井将文 吉川秀樹 大阪大学整形外科

研究要旨 頰椎後縦靱帯骨化症（以下 OPLL）における骨化巣進展については、単純 X 線評価でしか報告がなかった。今回、我々は CT と voxel-based registration を使用した骨化巣体積増加量計測方法を考案したため報告する。

A. 研究目的

頰椎 OPLL における骨化巣の増加を 3 次元元的また、体積で評価すること。

B. 研究方法

過去に OPLL に対して椎弓形成術を施行した 5 例（平均年齢 63 歳 追跡期間 3.1 年）を対象とした。Thin slice の volume data を DICOM データとして、取得し、Viewer 上で 3 次元骨モデルを作成した。術前モデルと術後モデルを Voxel-based registration にて重ね合わせ、骨化巣を同じ境界で切り取り、体積を比較した。また、骨化巣進展をカラー等高線で表示し、視覚化した。

（倫理面での配慮）

Retrospective study として倫理委員会の承認を得た。

C. 研究結果

平均最大骨化巣進展長は 4.7mm、平均体積増加量は 1622mm³であった。追跡期間で割った年あたりでは 1.5mm/年、484mm³/年であった。増加量を術前体積で割った Expansion rate は平均 37%であった。

D. 考察

CT を使用した骨化巣体積増加量計測方法は高い精度で計測が可能であり、今後の骨化

進展計測の有用な方法となりうると考えられた。

E. 結論

CT と digital viewer を使用した骨化巣体積計測法は、骨化巣増加量を評価する有用な方法である。

F. 健康危険情報

総括研究報告書にまとめて記載。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwasaki M, Fujimori T, Kashii M, Yoshikawa H, Okuda S, Oda T. Surgical outcomes and complications of massive OPLLs with occupying ratios of greater than 60%. *J Spine Research* 2 : 227-230, 2011
2. Nagamoto Y, Ishii T, Sakaura H, Iwasaki M, Morimoto H, Kashii M, Yoshikawa H, Sugamoto K. In vivo three-dimensional kinematics of the cervical spine during head rotation in patients with cervical spondylosis. *Spine (Phila Pa 1976)* 36: 778-783, 2011
3. Sakaura H, Hosono N, Mukai Y, Iwasaki M, Yoshikawa H. Medium-term outcomes of C3-6 laminoplasty for cervical