

Title	糖尿病を合併した腰部脊柱管狭窄症の病態解明
Sub Title	Exploration of the pathology of lumbar spinal canal stenosis associated with diabetes
Author	渡邊, 航太(Watanabe, Kota)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>糖尿病を合併した腰部脊柱管狭窄症(狭窄症), および非合併の狭窄症手術例における黄色靭帯のソルビトール濃度は, 有意に糖尿病群でソルビトールが上昇していた。通常のグルコース濃度, 高グルコース濃度で培養を行ったNTH3T3の細胞内のソルビトール含有量は, 高グルコース濃度で有意に高値であった。さらに, このソルビトール量はアルドース還元酵素阻害剤の添加により, 有意に減少した。炎症性サイトカインやpro-fibrotic factors1のmRNAsの発現は, 糖尿病を合併例の黄色靭帯で有意に上昇していた。NIH3T3細胞のWesternブロットによる解析でも同様の結果が出た。</p> <p>The pathomechanism of the ligamentum flavum (LF) hypertrophy in diabetic patients with lumbar spinal canal stenosis (LSCS) remains unclear. We found that the LF of diabetic patients exhibited significantly higher levels of sorbitol and pro-inflammatory cytokines. The high glucose-cultured fibroblasts exhibited significantly higher levels of sorbitol, pro-inflammatory factors, and TGF-<math>\beta</math>1 compared to the low glucose-cultured cells, and these levels were dose-dependently reduced by treatment with the aldose reductase inhibitor. Taken together, our data suggests that increased sorbitol levels in the LF of diabetic patients results in increased production of pro-inflammatory and fibrogenic factor, which contribute to LF hypertrophy, and could increase the susceptibility of diabetic patients to LSCS. Furthermore, aldose reductase inhibition effectively reduced the levels of sorbitol and sorbitol-induced pro-inflammatory factor expression in high glucose-cultured fibroblasts.</p>
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2014 ~ 2016 課題番号 : 26462251 研究分野 : 脊椎外科
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26462251seika">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26462251seika</a>

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462251

研究課題名(和文) 糖尿病を合併した腰部脊柱管狭窄症の病態解明

研究課題名(英文) Exploration of the pathology of lumbar spinal canal stenosis associated with Diabetes

研究代表者

渡邊 航太 (Watanabe, Kota)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60317170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病を合併した腰部脊柱管狭窄症(狭窄症)、および非合併の狭窄症手術例における黄色靭帯のソルビトール濃度は、有意に糖尿病群でソルビトールが上昇していた。通常のグルコース濃度、高グルコース濃度で培養を行ったNIH3T3の細胞内のソルビトール含有量は、高グルコース濃度で有意に高値であった。さらに、このソルビトール量はアルドース還元酵素阻害剤の添加により、有意に減少した。炎症性サイトカインやpro-fibrotic factorsのmRNAsの発現は、糖尿病を合併例の黄色靭帯で有意に上昇していた。NIH3T3細胞のWestern blotによる解析でも同様の結果が出た。

研究成果の概要(英文)：The pathomechanism of the ligamentum flavum (LF) hypertrophy in diabetic patients with lumbar spinal canal stenosis (LSCS) remains unclear. We found that the LF of diabetic patients exhibited significantly higher levels of sorbitol and pro-inflammatory cytokines. The high glucose-cultured fibroblasts exhibited significantly higher levels of sorbitol, pro-inflammatory factors, and TGF- $\beta$ 1 compared to the low glucose-cultured cells, and these levels were dose-dependently reduced by treatment with the aldose reductase inhibitor. Taken together, our data suggests that increased sorbitol levels in the LF of diabetic patients results in increased production of pro-inflammatory and fibrogenic factor, which contribute to LF hypertrophy, and could increase the susceptibility of diabetic patients to LSCS. Furthermore, aldose reductase inhibition effectively reduced the levels of sorbitol and sorbitol-induced pro-inflammatory factor expression in high glucose-cultured fibroblasts.

研究分野：脊椎外科

キーワード：糖尿病 腰部脊柱管狭窄症 アルドース還元酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

腰椎の脊柱管が加齢により狭窄して腰部脊柱管狭窄症では、様々な神経症状を惹起し、高齢者の活動性を低下させる。我々は糖尿病を合併した腰部脊柱管狭窄症においては、非合併例とは異なった病態が存在すると考えていた。

2. 研究の目的

Preliminary な研究において、糖尿病合併例の黄色靭帯では、非合併例と比較してMMP13の発現が有意に上昇していることや、黄色靭帯内での弾性繊維の減少と靭帯組織の肥厚が著しいことが分かっている。本研究では腰部脊柱管狭窄症の主原因である黄色靭帯の肥厚のメカニズムを、糖尿病合併例において検討することである。特に、今回はグルコースの代謝産物であるソルビトールの黄色靭帯内への沈着と、炎症反応に惹起、黄色靭帯肥厚との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 糖尿病を合併した腰部脊柱管狭窄症患者、および糖尿病合併のない腰部脊柱管狭窄症患者手術例における黄色靭帯内のソルビトール濃度の計測。黄色靭帯内のソルビトールの定量 D-Sorbitol/Xylitol test キット (Roche, Swiss) を用いて、ソルビトールの定量を行う。各サンプルの吸光度を492nmのmicroplate readerで計測する。
- (2) 人体内での黄色靭帯の厚さの計測。黄色靭帯の厚さの計測は黄色靭帯を採取した患者に対して行った術前CT上で、画像解析ソフト (Centricity EnterpriseWeb 3.0, GE, USA) を使用し黄色靭帯の厚さを計測。
- (3) 高血糖培養液内の繊維芽細胞の成長速度とそのサイクルを検討し、アルドース還元酵素添加後の変化について検討。
- (4) アルドース還元酵素阻害剤のソルビドール濃度抑制効果の検証 NIH 3T3(Mouse embryonic fibroblast cell line)を培養する。細胞を以下の4グループの培養条件に分割する
  - 通常のグルコース濃度(1000mg/l)
  - グルコース高濃度(5400mg/l)
  - グルコース高濃度(5400mg/l) + 0.1uM ADI
  - 高グルコース高濃度(5400mg/l) + 1.0uM ADI
 細胞は48時間後に採取する。そしてソルビトールの含有量を上記と同様の方法で計測する。
- (5) Realtime PCR 行い、黄色靭帯内の炎症性サイトカイン (IL-6, IL-1a, IL-1b, THF-a 等)の計測を行う。

4. 研究成果

- (1) 糖尿病を合併した腰部脊柱管狭窄症患者、および糖尿病を合併していない腰部脊柱管狭窄症患者手術例における黄色靭帯のソルビトール濃度を計測した結果、黄色靭帯内のソルビトールの量は糖尿病群で  $1.68 \pm 0.56 \text{ mg/L}$ 、非糖尿病群で  $0.42 \pm 0.69 \text{ mg/L}$  であり、有意差に糖尿病群でソルビトールが沈着していた (図1)。

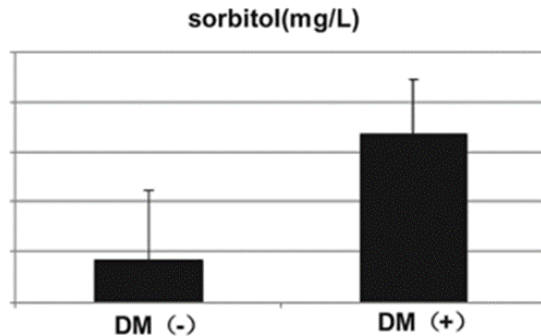


図1 腰部脊柱管狭窄症患者における黄色靭帯内のソルビトール含有量 (糖尿病なし群 対 糖尿病あり群)

- (2) 次に術前の脊髄造影後CTを用いて、生体内の黄色靭帯の厚さを測定した結果、黄色靭帯の厚さとは糖尿病群で平均  $5.17 \pm 1.09 \text{ mm}$ 、非糖尿病群で  $3.67 \pm 0.55 \text{ mm}$  と、有意に糖尿病群で肥厚していた。ソルビトールの濃度と黄色靭帯の厚みの間に相関関数0.776の有意な相関を認めた。(p=0.040) (図2)

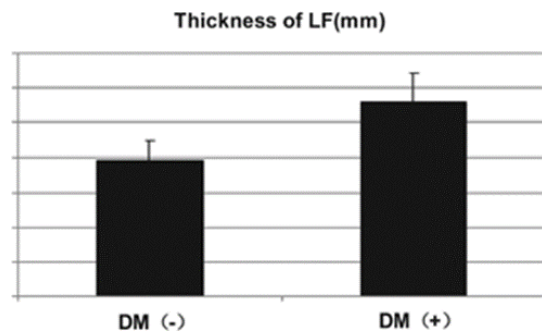


図2 腰部脊柱管狭窄症患者における黄色靭帯の厚さ (非糖尿病群 対 糖尿病群)

- (3) NTH3T3(Mouse embryonic fibroblast cell line)を通常のグルコース濃度(1000mg/l)、高グルコース濃度(5400mg/l)で48時間の培養を行った。その結果、NTH3T3細胞はグルコースの濃度依存性に増殖した。すなわち、高濃度グルコース濃度で培養した細胞の方が、通常のグルコース濃度と比較して良好に細胞が増殖した。さらに細胞サイクルもグルコース濃度によって異なっていた。(図3)

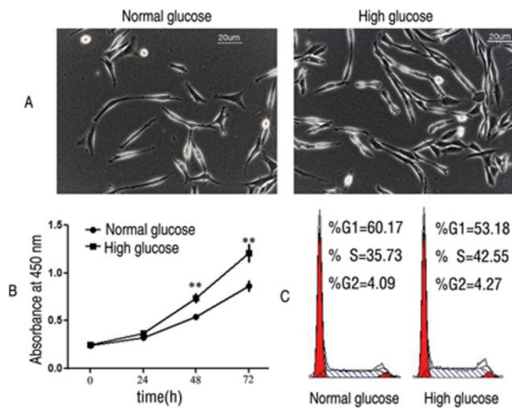


図3 NIH3T3 細胞の細胞成長サイクル (A: 正常のグルコース濃度で培養した細胞と、高グルコース下で細胞下細胞、B: 成長速度、C: 成長サイクル分析)

- (4) さらに、細胞内のソルビトール含有量は高グルコース濃度で  $1.68 \pm 0.37 \text{ mg/L}$ 、一方、通常濃度では  $0.83 \pm 0.28 \text{ mg/L}$  であった。さらに、このソルビトール量はアルドース還元酵素阻害剤  $0.1 \mu\text{M}$  の添加により、 $1.12 \pm 0.29 \text{ mg/L}$  ( $P < 0.01$ ) に有意に減少した。さらに、 $1.0 \mu\text{M}$  では  $0.84 \pm 0.11 \text{ mg/L}$  に減少した。(図4)

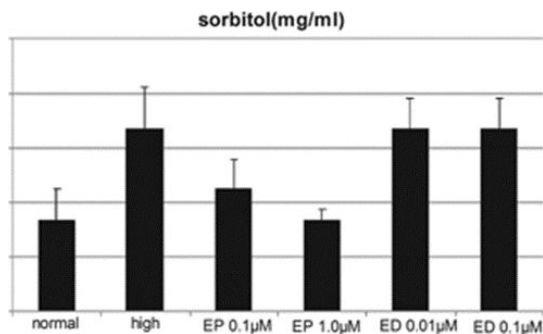


図4 NIH3T3 細胞内のソルビトール含有量 (高濃度グルコース下で 48 時間培養。その後、アルドース還元酵素阻害薬を各濃度で添加)(EP: アルドース還元酵素阻害薬)

- (5) Real-time PCR の結果、炎症性サイトカインを(IL-1a、IL-1b、IL-6、TNF-a)や pro-fibrotic factors である TGF-b1 と COL-1 の mRNAs の発現は、糖尿病を合併した腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯で有意に上昇していた(図5)同様の結果が NIH3T3 細胞でも確認された(図6)
- (6) これらの mRNA は高血糖下で培養された NIH3T3 細胞において有意に発現が上昇していた。さらにこの条件下で、アルドース還元酵素阻害剤の投与により容量依存的に mRNA の発現が低下した。これらの結果は、高血糖と通常の条件下で培養された NIH3T3 細胞の Western プロットによる解析でも同様の結果が出た。すなわち、IL-6、TNF-a、TGF-b1、COL-1 の蛋白発現は、高血糖下で培養された細胞において有意に上昇していた。そして、

アルドース還元酵素阻害剤の投与により容量依存的に蛋白の発現が低下した。(図7)

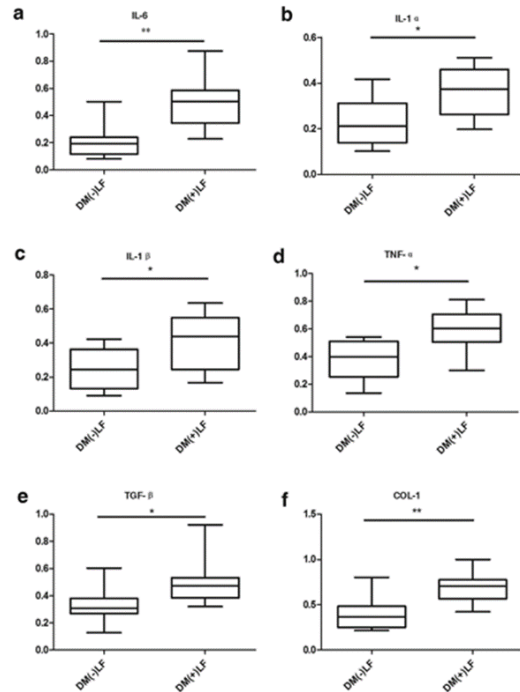


図5 腰部脊柱管狭窄症患者の黄色靭帯内の mRNA 量 (a:IL-6、b:IL-1α、c:IL-1β、d:TNF-α、e:TGF-β、f:COL-1)

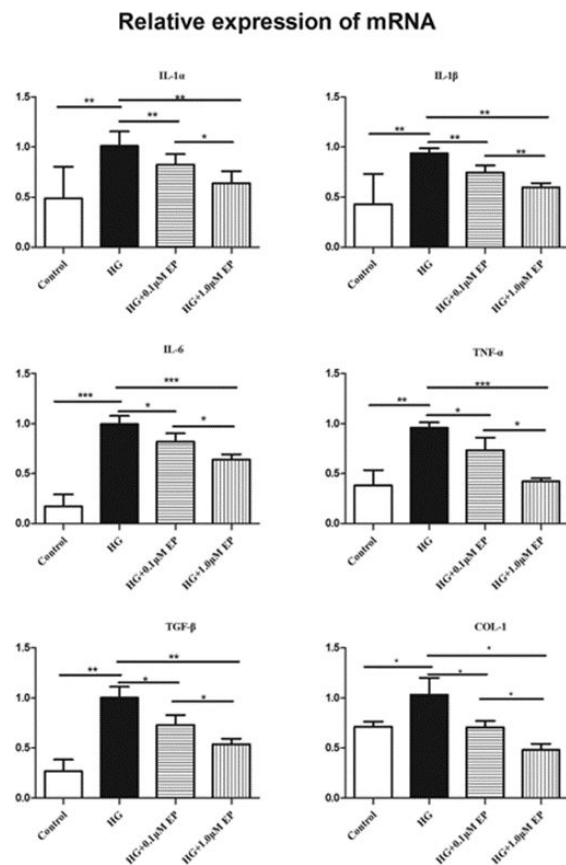


図6 NIH3T3 細胞内の mRNA 量 (a:IL-6、b:IL-1α、c:IL-1β、d:TNF-α、e:TGF-β、f:COL-1)(HG: 高グルコース下培養、EP: ア

ルドース還元酵素阻害薬)

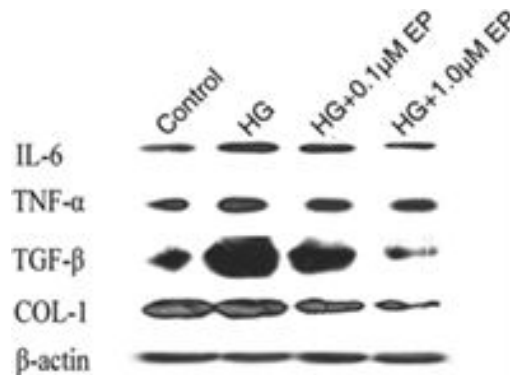


図7 IL-6、TNF- $\alpha$ 、TGF- $\beta$ 、COL-1の蛋白発現量 (HG:高グルコース下培養、EP:アルドース還元酵素阻害薬)

圧迫因子としての黄色靭帯の肥厚、そして将来的には被圧迫組織である抹消神経の両面から検討を行い、更なる病態の解明と新たな治療薬の開発などの可能性が考えられ、臨床へのフィードバックが期待できる研究であると考え。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Lou J, Huang L, Chen Z, Zeng Z, Miyamoto T, Wu H, Zhang Z, Pan Z, Fujita N, Hikata T, Iwanami A, Tsuji T, Ishii K, Nakamura M, Matsumoto M, Watanabe K, Cao K, Increased Sorbitol Levels in the Hypertrophic ligamentum flavum of diabetic patients with lumbar spinal canal stenosis, Journal of Orthopedic Research, 査読有り、35 巻 5 号、2017、1058-1066, doi: 10.1002/jor.23302.

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

渡邊 航太 (WATANABE, Kota)

慶應義塾大学・医学部・専任講師

研究者番号: 60317170

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

( )