

原 著

脊柱靱帯におけるインテグリンの発現に対する加齢による影響 —免疫組織化学およびウエスタンブロット法による検討—

森信謙一

山口大学医学部高次統御系・整形外科学 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 脊柱靱帯, インテグリン, 黄色靱帯骨化

緒 言

多細胞生物である個体が生命活動を行っていくためには、細胞とその周囲の組織、細胞外マトリックスとの接着や情報伝達が必要である。細胞と細胞外マトリックス間との接着部位は接着斑と呼ばれ、その中心的役割を示すものが細胞接着分子であるインテグリンである。インテグリンは、赤血球以外の細胞膜上に発現し、 α と β の2つのサブユニットが1対1で会合している膜貫通型糖蛋白質である。 α は16種類、 β は8種類が知られており、インテグリンとしては22種類が報告されている。 α 鎖と β 鎖の立体構造が変化することにより、活性型と非活性型が存在する。 α 鎖はインテグリンの活性化に必要な2価の陽イオンの結合部位であるといわれており、 β 1は細胞膜上での接着斑の形成に必要だといわれている。一種類のインテグリンには多数のリガンドが結合し、単一の細胞が複数のインテグリンを発現している。機能としては、細胞と細胞外マトリックスの間で情報伝達を行うことにより細胞の分化、増殖、遊走等に関与し、免疫反応、炎症、創傷治癒等、様々な生体反応において重要な役割を演じている¹⁻³⁾。

一方、生体内の組織である脊柱靱帯は、脊柱の椎体間を連結する密性規則性結合組織であり、単一の方向に引っ張る力に対し強い抵抗を示し、脊柱の安定性に寄与している⁴⁾。組織学的形態は、線維成分が緻密に一方方向に配列する構造であり、コラーゲン

やエラスチンなどの細胞外マトリックス及び線維芽細胞である靱帯細胞により構成されている。この脊柱靱帯は、加齢やさまざまな疾患により、マトリックスの変化を生じる。その疾患のひとつとして脊柱靱帯骨化症がある。脊柱靱帯骨化症は、脊柱靱帯が肥厚、内軟骨性骨化を起こすことにより、圧迫による脊髄麻痺を生じることもある疾患である。靱帯組織である脊柱靱帯が内軟骨性骨化を生じる原因としては、遺伝的素因に加齢などの後天的要素が加わり、未分化の間葉系細胞が線維芽細胞ではなく骨芽細胞へと分化していくことにより生じていると推測されている^{5, 6)}。以上の事実より、脊柱靱帯骨化の原因のひとつとして脊柱靱帯の細胞外マトリックスの変化がインテグリンを介して骨芽細胞の分化をコントロールしている可能性が考えられる。そこで、脊柱靱帯細胞の分化・増殖を制御する因子のひとつであるインテグリンに注目し、脊柱靱帯骨化の素因としての靱帯の加齢的变化におけるインテグリンの関与について検討することを研究目的とした。本研究では、手術時に採取した各年齢層の脊柱靱帯を用い、インテグリンの発現様式について免疫組織学および生化学的に解析し、加齢による影響について比較検討した。

平成15年10月29日受理

年齢	性別	病名	採取部位	方法
17才	M	LDH	第4腰椎	IHC
23才	F	LDH	第4腰椎	WB
29才	M	LDH	第5腰椎	WB
29才	M	LDH	第4腰椎	IHC
36才	F	LDH	第4腰椎	IHC
37才	M	LDH	第3腰椎	IHC
39才	F	LDH	第4腰椎	WB
39才	M	LDH	第4腰椎	WB
46才	M	LDH	第4腰椎	IHC
56才	M	LCS	第5腰椎	IHC
56才	M	LCS	第5腰椎	IHC
56才	M	LCS	第4腰椎	WB
63才	F	LCS	第5腰椎	WB
64才	F	LCS	第4腰椎	IHC
65才	M	LCS	第4腰椎	WB
65才	F	LCS	第4腰椎	IHC
66才	M	LCS	第5腰椎	IHC
66才	F	LCS	第5腰椎	IHC, WB
68才	M	LCS	第5腰椎	IHC
68才	F	LCS	第5腰椎	IHC, WB
70才	M	LCS	第5腰椎	IHC
74才	F	LCS	第4腰椎	IHC, WB

LDH:Lumbar Disc Herniation

LCS:Lumbar Canal Stenosis

IHC:免疫染色

WB:ウエスタンブロット

表1. 標本の患者プロフィール

対象と方法

対象は、脊椎手術時に採取しえた22例の腰椎部黄色靭帯であり、いずれも術前の単純X線写真、CTおよび肉眼的に靭帯内に骨化を生じていないことを確認した。対象症例は(表1)、男性13例、女性9例で、年齢は17-74歳(平均51歳)である。46歳未満の9例は腰椎椎間板ヘルニアであり、56歳以上の13例は腰部脊柱管狭窄症である。採取した靭帯は、いずれもH.E.染色を行うと共に、免疫組織学検討を15例に、ウエスタンブロット法を10例に行った。

免疫組織学的検討

各標本をホルマリン固定、パラフィン包埋を行い、薄切片を作成した後、脱パラフィンし、蒸留水にて5分間洗浄の後、0.1%トリプシン溶液で30分処理を行った。Avidin-labeled Biotin Complex (ABC)法はVectastain Elite ABCkit (Vector社)を使用し、プロトコールに従って行った。0.01MPBS (phosphate buffered saline) 溶液にて20分間洗浄の後、0.3% H_2O_2 メタノール溶液にて30分間ブロッ

キングを行い、PBSにて3回洗浄後、100倍希釈一次抗体と室温で一晩反応させた。一次抗体はマウス抗人インテグリン α_2 , α_3 , α_4 , α_v (CHEMICON社), β_1 抗体 (BIOHIT社)を用いた。PBSにて3回洗浄後、ビオチン化ラビット抗マウス2次抗体と一時間反応させた。PBSにて3回洗浄後、ABCcomplexを30分間反応させた後、PBSにて3回洗浄した。True Blue Peroxidase substrate溶液 (KPL社)を加え、約5分反応させた後、顕微鏡にて観察した。各標本におけるインテグリンの発現を比較するために、独自の5段階評価を行い半定量化した。

Western-blot法

標本の採取後、液体窒素にて凍結し、粉碎した。標本100mg (Wet weight) を1mlの2%SDS (sodium dodecyl sulfate) サンプルバッファー (還元剤を加えないもの)、0.5M Tris-HCl (pH6.8)、10%SDS、グリセロール、蒸留水、1%BPB (bromophenol blue) に溶解し、3分間煮沸した後、10,000gにて30分間遠沈し、上清を用い7.5%SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。分子量マーカーは、High molecular weight range (Amersham社)を使用した。泳動したゲルはPVDFメンブランにWestern-blot法にて転写した。ABC法はVectastain Elite ABCkitを使用し、プロトコールに従って行った。メンブランに対し5%Skim milk 加PBT (0.01MPBS, 0.05%Triton X)にてブロッキングを行い、PBTにて3回洗浄後、一次抗体としてマウス抗人インテグリン α_2 (CHEMICON社), β_1 (BIOHIT社)を用い、一晩反応させた。さらに、PBTにて3回洗浄後、ビオチン化ラビット抗マウス2次抗体と1時間反応させ、PBTにて3回洗浄、ABCcomplexと30分間反応、PBTにて3回洗浄したのち、DABtablet (Sigma社)にて発色させた。

結果

脊柱靭帯のH.E.染色では、太い線維が緻密に一方方向に並んで線維束を形成しているのが認められた。線維束の間にはうすい疎性結合組織があり、線維芽細胞の列が平行に走っていた。脊柱靭帯におけるイ

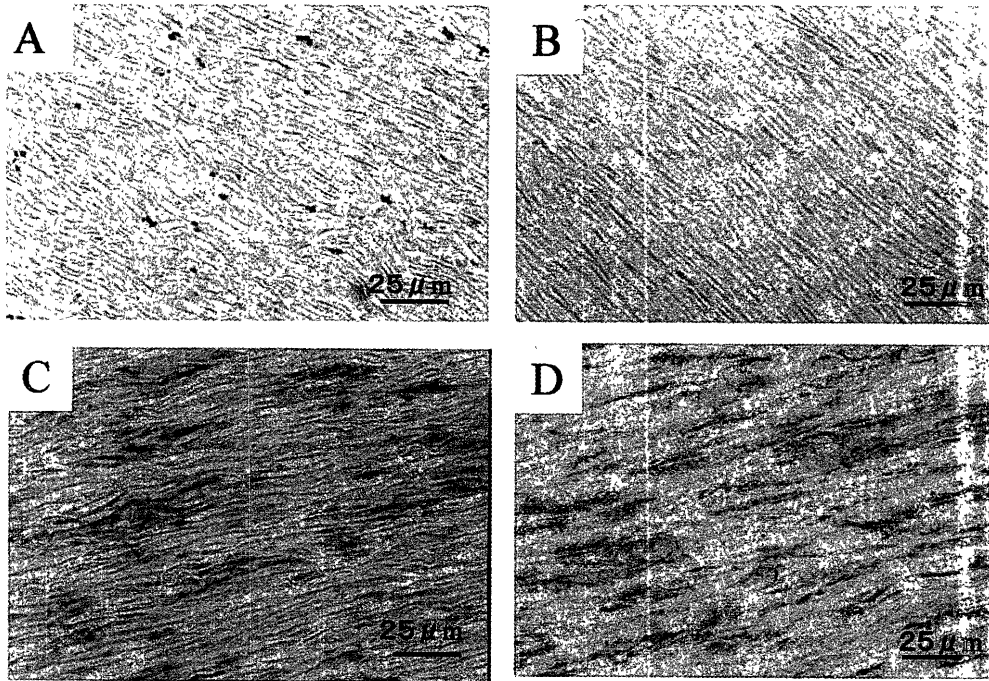


図1. 免疫組織化学による脊柱靱帯におけるインテグリンの発現

17才 (A, C) 又は70才 (B, D) の腰椎黄色靱帯における α_2 インテグリン (A, B) および β_1 インテグリン (C, D) の発現を免疫組織化学により検索した。

Age	α_2	α_3	α_4	α_v	β_1
17	3+	±	+	2+	+
29	2+	±	+	2+	+
36	2+	±	+	2+	+
37	2+	±	+	+	+
46	+	±	+	+	+
56	+	±	+	2+	+
56	2+	±	+	2+	+
64	+	±	+	+	+
65	+	±	+	+	+
66	+	±	+	+	+
66	+	±	+	+	+
68	±	±	+	+	+
68	+	±	+	+	+
70	±	±	+	+	+
74	±	±	+	+	+

±~++++は免疫組織化学により判定した各標本における独自の基準による発現量を示す

表2. 各症例におけるインテグリンの発現

インテグリンの発現を免疫組織化学により観察した。腰椎黄色靱帯には、今回検討したインテグリン α_2 , α_3 , α_4 , α_v , β_1 すべてが発現していた。 α 鎖インテグリンを染色した標本を、発現を認めないものを-, 標本の部分的に発現したものを±, 標本全面にわたり均一に発現したもののうち、最も発現細胞を多く認めたものを3+, 最も少ないものを1+と

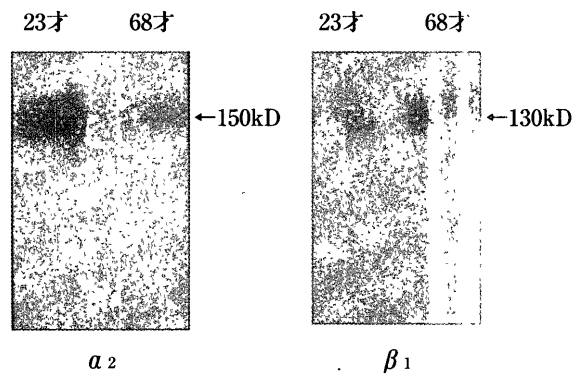


図2. Western-blot法による若年者と高齢者のインテグリンの発現量の比較

し独自に5段階評価をおこない半定量化した。 β_1 インテグリンは、 α に比し、はるかに発現量が多く、各標本間の差がほとんどないため、すべて1+とした。

その結果、インテグリン α_2 で年齢とともに発現量が低下する傾向がみとめられた (表2)。インテグリン α_v でも若干加齢により発現の低下する傾向

をみとめたが、 a_3 、 a_4 、 β_1 では明らかな年齢による変化はなかった。代表例として17才と70才の腰椎黄色靭帯におけるインテグリンの発現を示すと(図1)、17才例では、抗 a_2 インテグリン抗体を用い免疫染色を行うと、紡錘状で線維芽細胞と思われる a_2 インテグリン陽性細胞が靭帯全面にわたりほぼ均一に分布していた。これに対し70才の黄色靭帯では、 a_2 インテグリン陽性細胞の数は17才に比べ明らかに減少していた。抗 β_1 インテグリン抗体を用いた染色標本では、靭帯全面にわたって発現がみられるのは a_2 インテグリンと同様であるが、17才及び70才例で特に染色性に差を認めなかった。

若年者と高齢者における a_2 インテグリンの発現量に差があることを確認するためにWestern-blot法をおこなった。Western-blot法では、インテグリン a_2 は150kDの位置に、 β_1 は130kDの位置にバンドを認めた。高齢者では若年者に比しインテグリン a_2 が減少する傾向にあったが、インテグリン β_1 では差をみとめなかった。代表例として23才と68才例の腰椎黄色靭帯を用いたWestern-blot法の結果を示した(図2)。

考 察

本研究では、脊柱靭帯におけるインテグリンの加齢による変化が靭帯骨化発生に影響を与えるという仮説を検証するためのひとつの手段として、各年齢層由来の脊柱靭帯におけるインテグリンの発現様式について免疫組織学および生化学的に解析した。今回の免疫組織化学による検討では脊柱靭帯においてインテグリン a_2 、 a_4 、 a_v 、 β_1 の発現を認めた。脊柱靭帯におけるインテグリンの発現に関する報告は、渉猟した限りでは認めなかったが、他の部位の結合組織における発現に関しては報告が散見されている。SchreckやAbiezziらは、膝の靭帯にはインテグリン a_1 、 a_5 、 a_v 、 β_1 が発現しており、 a_2 、 a_3 、 a_4 、 a_6 は発現していなかったと報告している^{7, 8)}。また、皮膚由来の線維芽細胞にはインテグリン a_1 、 a_2 、 a_3 、 a_4 、 a_5 、 a_6 、 β_1 の発現が確認されている⁹⁾。本研究による結果も含め、これらのインテグリンの発現の違いは、同じ線維芽細胞ではあるが、細胞外マトリックスや成長因子などの周囲の環境や組織にかかる力学的負荷の相違、などによるものか

もしれないが、染色法や使用した抗体の反応性の違いによるという可能性も否定できない¹⁰⁾。

次にインテグリンの発現の加齢による影響について検討した。靭帯部に存在している細胞は、ほとんどが β_1 グループであるが^{7, 8)}、 β_1 サブユニットの染色パターンに加齢による差は認めず、インテグリン発現細胞数に加齢による差はないと思われる。 a サブユニットに関しては、インテグリン a_3 、 a_4 では加齢による明らかな差は認めなかった。 a_2 インテグリンは、高齢者由来の脊柱靭帯で発現が低下する傾向がみられた。インテグリン a_v に関しては、もっとも発現の多い標本と、もっとも発現の少ない標本の差が a_2 に比しわずかであるため、今回は、 a_2 のみ加齢による変化を、さらに検討することとした。この a_2 インテグリンの発現低下は、Western-blot法によっても確認された。インテグリンの加齢による変化に関する報告は、検索する限り、これまで1篇をかぞえるのみであり、ラットの末梢血単核球で、インテグリン $a_4\beta_7$ の発現が、加齢とともに低下していることが報告されている¹¹⁾。

脊柱靭帯の加齢による影響に関する報告は散見される。病理学的所見より、腰椎黄色靭帯では加齢に伴い弾性線維の減少、膠原線維の膨化、線維軟骨様細胞の出現、靭帯内石灰化等を生じると報告されている¹²⁾。また、黄色靭帯より抽出した細胞外マトリックスの生化学的分析により、高齢者由来の脊柱靭帯ではV型コラーゲン¹³⁾やコンドロイチン6-硫酸¹⁴⁾が増加していることが確認されている。さらに免疫組織化学による分析にて、テネシンの出現率が増加していることが加齢による変化として報告されている¹⁵⁾。すなわち以上のような事実から、加齢により脊柱靭帯の細胞外マトリックスは変化しており、これらの環境の変化が細胞のインテグリンの発現に影響を与えている可能性も考えられる¹⁶⁻²³⁾。又、加齢により、ホルモンまたはサイトカインの変化など細胞外マトリックスを介さない機序により、インテグリンが変化している可能性もある。最近では、インテグリンが、細胞内骨格であるタリンやビンキュリンに直接結合していることより、一種のメカノレセプターとして作用しているとの報告もあり^{24, 25)}、加齢により、靭帯にかかるストレスが変化を生じ、それによりインテグリンの発現が影響を受けている可能性も考えられる。

今回の研究では、 α_2 インテグリンのみが加齢により低下していた。 α_2 インテグリンは、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリンのサブユニットであり、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリンはコラーゲンとラミニンをリガンドとしている¹⁾。 $\alpha_2\beta_1$ インテグリンに関して、結合組織において、I型コラーゲン、III型コラーゲン²⁶⁾、V型コラーゲン²⁷⁾の線維束形成に重要であることが報告されている。また、in vitroでの細胞外マトリックスの組織再生のモデルであるコラーゲンゲルの収縮に必要なとの報告であることが確認されている^{28, 29)}。さらに $\alpha_2\beta_1$ インテグリンは、コラーゲンの生成に関与するだけではなく、コラーゲンの分解を行う collagenase/MMP (Matrix Metalloproteinase) -1 の遺伝子発現調節に関与すると報告されている³⁰⁾。これらの事実より、 $\alpha_2\beta_1$ インテグリンを介する線維芽細胞とコラーゲンの接着は、成熟した結合組織としての環境を維持するために必要であると考えられる。 α_2 インテグリンが低下していることは、線維芽細胞によるマトリックスの代謝が障害され、または線維芽細胞としての状態を維持することが障害される可能性が考えられ、これらの変化が、高齢者における脊柱靱帯の変性、石灰化や骨化に関与しているかもしれない。

結 語

脊柱靱帯において、インテグリン α_1 、 α_2 、 α_4 、 α_v 、 β_1 の発現をみとめた。加齢によりインテグリン α_2 の発現が減少していた。 α_2 インテグリンが靱帯の加齢的变化に伴う脊柱靱帯骨化の発生に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し終始暖かくご指導いただいた山口大学医学部整形外科学教授河合伸也先生に深く感謝の意を表すとともに、貴重なご助言とご指導をいただいた田中浩講師に深く感謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Richard O. Hynes. Integrins : Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992 ; 69 : 11-25.
- 2) Erkki Ruoslahti. Integrins. *J. Clin. Invest.* 1991 ; 87 : 1-5.
- 3) Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.* 1990 ; 4 : 2868-2880.
- 4) Victor P. Eroschenko. di Fiore's atlas of histology with functional correlations. 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2000, p.36-37.
- 5) K. Yonenobu, T. Sakou, K. Ono. OPLL ossification of the posterior longitudinal ligament. Springer-Verlag, Tokyo, 1997, p.29-77.
- 6) Sakou T, Matsunaga S, Koga H. Recent progress in the study of pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Orthop Sci* 2000 ; 5 : 310-315.
- 7) Paul j. Schreck, Linda R. Kitabayashi, David Amiel, Wayne H. Akeson, Virgil L. Woods, Jr. Integrin display increases in the wounded rabbit medial collateral ligament but not the wounded anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 1995 ; 13 : 174-183.
- 8) Salwan S. AbiEzzi, Dirk S. Gesink, Paul J. Schreck, David Amiel, Wayne H. Akeson, Virgil L. Woods, Jr. Increased Expression of the β_1 , α_5 , and α_v integrin adhesion receptor subunits occurs coincident with remodeling of stress-deprived rabbit anterior cruciate and medial collateral ligaments. *J Orthop Res* 1995 ; 13 : 594-601.
- 9) Thilo S Lange, Anja K Bielinsky, Katja Kirchberg, Ilan Bank, Konrad Herrmann, Thomas Krieg, Karin Scharffetter-Kochanek. Mg^{2+} and Ca^{2+} differentially regulate β_1 integrin-mediated adhesion of dermal fibroblasts and keratinocytes to various extracellular matrix proteins. *Exp Cell Res*

- 1994 ; 214 : 381-388.
- 10) D. E. Hughes, D. M. Salter, S. Dedhar, R. Simpson. Integrin expression in human bone. *J Bone Miner Res* 1993 ; 8 : 527-533.
 - 11) Schmucker DL, Owen TM, Issekutz TB, Gonzales L, Wang RK. Expression of lymphocyte homing receptors alpha4beta7 and MAdCAM-1 in young and old rats. *Exp Gerontol* 2002 ; 37 : 1089-1095.
 - 12) Yoshihiko Hotta. Anatomical study of the yellow ligament of spine with special reference to its ossification. *J. Jpn. Orthop. Ass.* 1985 ; 59 : 311-325.
 - 13) 島 欽也, 玉置哲也, 吉田宗人, 大島 章. 脊柱黄色靭帯の加齢的变化と肥厚のコラーゲン分析による研究. 厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成4年度研究報告書 68-71.
 - 14) 岡田晶博, 原田征行, 植山和正, 岡村良久, 市川司朗, 伊藤淳二, 岡本佳隆, 新戸部泰輔, 武田祐介. 年代別黄色靭帯の生化学的分析—加齢に伴うプロテオグリカンの変化—厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成2年度研究報告書 : 124-132.
 - 15) 酒匂 崇, 藤井康成, 武富栄二, 増田明敏, 今村健志, 吉田浩巳. 黄色靭帯軟骨靭帯移行部の加齢に伴う変化—テネイシン免疫染色による染色性の検討—厚生省特定疾患脊柱靭帯骨化症調査研究班平成3年度研究報告書 : 149-153.
 - 16) Saadiq F. El-Amin, Mohamed Attawia, Helen H. Lu, Asist K. Shah, Richard Chang, Noreen J. Hickok, Rocky S. Tuan, Cato T. Laurecin. Integrin expression by human osteoblasts cultured on degradable polymeric materials applicable for tissue engineered bone. *J Orthop Res* 2002 ; 20 : 20-28.
 - 17) Yasuhiro Takeuchi, Miyuki Suzawa, Tomoko Kikuchi, Eisuke Nishida, Toshiro Fujita, Toshio Matsumoto. Differentiation and transforming growth factor- β receptor down-regulation by collagen- $\alpha 2 \beta 1$ integrin interaction is mediated by focal adhesion kinase and its downstream signals in murine osteoblastic cells. *J. Biol. Chem* 1997 ; 272 : 29309-29316.
 - 18) Guozhi Xiao, Dian Wang, M. Douglas Benson, Gerard Karsenty, Renny T. Franceschi. Role of the $\alpha 2$ -integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J Biol Chem* 1998 ; 273 : 32988-32994.
 - 19) David L. Reid, Margaret B. Aydelotte, Jurgen Mollenhauer. Cell attachment, collagen binding, and receptor analysis on bovine articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2000 ; 18 : 364-373.
 - 20) D. R. Sumner, T. M. Turner, R. M. Urban, R. M. Leven, M. Hawkins, E. H. Nichols, J. M. McPherson, J. O. Galante. Locally delivered rhTGF- β_2 enhances bone ingrowth and bone regeneration at local and remote sites of skeletal injury. *J Orthop Res* 2001 ; 19 : 85-94.
 - 21) Deepica R. Ganta, Mary-Beth Mccarthy, Gloria A.Gronowicz. Ascorbic acid alters collagen integrins in bone culture. *Endocrinology* 1997 ; 138 : 3606-3612.
 - 22) Taichi Saito, Steven M.Albelda,Carl T. Brighton. Identification of integrin receptors on cultured human bone cells. *J Orthop Res* 1994 ; 12 : 384-394.
 - 23) Shingo Miyamoto, Hidemi Teramoto, Omar A. Coso, J. Silvio Gutkind, Peter D. Burbelo, Steven K. Akiyama, Kenneth M. Yamada. Integrin function : Molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *J Cell Biol* 1995 ; 131 : 791-805.
 - 24) Ning Wang, James P. Butler, Donald E. Ingber. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993 ; 260 : 1124-1127.
 - 25) Matthias Chiquet, Mark Matthisson, Manuel Koch, Michael Tannheimer, Ruth Chiquet-Ehrismann. Regulation of extracellular matrix synthesis by mechanical stress. *Biochem. Cell Biol.* 1996 ; 74 : 737-744.
 - 26) Teet Velling, Juha Risteli, Krister Wennerberg, Deane F. Mosher, Steffan

- Johansson. Polymerization of Type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins $\alpha_{11}\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$. *J. Biol. Chem.* 2002 ; 37377-37381.
- 27) Florence Ruggiero, Jane Comte, Carlos Cabanas, Robert Garrone. Structural requirements for $\alpha_1\beta_1$ and $\alpha_2\beta_1$ integrin mediated cell adhesion to collagen V. *J. Cell Sci.* 1996 ; 109 : 1865-1874.
- 28) Chan B. M. C., Kassner P. D., Schiro J. A. Byers H. R. Kupper T. S., Hemler M. E. Distinct cellular functions mediated by different VLA integrin alpha subunit cytoplasmic domains. *Cell* 1992 ; 68 : 1051-61.
- 29) Kassner P. D., Alon R, Springer T. A., Hemler M. E. Specialized functional properties of the integrin alpha 4 cytoplasmic domain. *Mol. Biol. Cell* 1995 ; 6 : 661-674.
- 30) Terhi Riikonen, Leeni Koivisto, Pia Vihinen, Jyrki Heino. Transforming growth factor- β regulates collagen gel contraction by increasing $\alpha_2\beta_1$ integrin expression in osteogenic cells. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 376-382.

The Effect of Aging in the Integrin Expression of Spinal Ligaments : Assessment with Immunohistochemistry and Western-blotting Analyses

Kenichi MORINOBU

*Dept of Orthopedics. and. Human Science
Yamaguchi University School of Medicine,
1-1-1 Minami kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan*

SUMMARY

The integrins are cell-surface extracellular matrix adhesion receptors and are known to play an important role in cell proliferation and differentiation. In this study we examined the effect of aging in the integrin expression in spinal ligaments using immunohistochemistry and Western-blotting. Human lumbar ligamentum flavum obtained in surgery were used for this study. Immunohistochemistry was performed using monoclonal antibodies specific for the $\alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_v$ and β_1 subunits and Western-blotting was performed using monoclonal antibodies specific for the α_2 and β_1 subunits. $\alpha_2, \alpha_3, \alpha_4, \alpha_v$ and β_1 were expressed in spinal ligaments. The density of staining for the α_2 subunit seemed to decrease with aging in spinal ligaments. Expression of β_1 subunits showed no difference between young and old. Western-blot analysis demonstrated that the staining density for α_2 subunits decreased with aging in human lumbar ligamentum flavum, while β_1 subunits did not show any significant change with aging. Considering the functions of integrins, these findings suggest that integrins may be involved in the age-related pathogenesis of the spinal ligaments, such as degeneration, calcification, or ossification of the spinal ligaments.