

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10392

研究課題名(和文) 椎間板変性過程におけるマクロファージの動態と極性化の解明

研究課題名(英文) Dynamics and polarization of the macrophage in degenerative intervertebral discs

研究代表者

小久保 安朗 (Kokubo, Yasuo)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授

研究者番号：70377456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラット椎間板変性モデルにおいて、M1マクロファージは穿刺後1週から2週にかけて多く発現し、M2マクロファージは2週で最も多く、4週から減少し8週では消失した線維輪外層にわずかに存在していた。GFP陽性骨髄細胞移植キメララットにおいて、穿刺後1週目以降に観察されたマクロファージは骨髄由来で、極性変化後のM2マクロファージも骨髄由来の細胞であった。

ヒト頸椎椎間板の観察において、血管新生が旺盛な肉芽組織ではM1マクロファージの割合が高く、神経成長因子とそのレセプターを有する神経線維が観察されたが、M2マクロファージの割合が高い肉芽組織では、血管、神経線維共に少ない傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：In the rat with intervertebral disc degeneration model, M1 macrophages infiltrated from 1 to 2 weeks after injury, and M2 macrophages appeared 2 weeks after injury and gradually decreased. In the disc 8 weeks after injury, only M2 macrophages existed at the portion of outer layer of degenerated annulus fibrosus. The macrophages that appeared 1 week after injury including M2 macrophages at 8 weeks were demonstrated that were of marrow origin by the GFP positive chimeric rats.

In the degenerated human intervertebral discs that were harvested by anterior decompression surgery of cervical spine, the granulation tissue with rich newly developed blood vessels contained a lot of macrophages, and also included appearance of neurotrophic factors and nerve fibers with its receptors. On the other hand, the granulation tissue with a lot of M2 macrophages include less blood vessels and nerve fibers.

研究分野：椎間板病理

キーワード：椎間板 変性 マクロファージ 極性変化 キメララット ヒト

1. 研究開始当初の背景

椎間板変性を抑制し椎間板の修復を促進させる、あるいは椎間板変性を促進させ椎間板組織を吸収させる目的で、椎間板内への遺伝子導入 (Nishida K, et al. Eur Spine J 17, 2008)、幹細胞移植 (Hiyama A, et al. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 54, 2008)、炎症性サイトカインのインヒビターの投与 (Fujita K, et al. J Orthop Res 30, 2012) など様々な椎間板内療法が報告されているが、椎間板変性のメカニズムについては未だ不明な点も多く存在する。

椎間板変性の過程を観察するために、ラット椎間板変性モデルは安定した椎間板変性過程を観察できるモデルとして広く用いられている (Olmaker K. Open Orthop J 5, 2011, Zhang H, et al. J Neurosurg Spine 10, 2009, Keorochana G, et al. Spine J 10, 2010)。変性椎間板内へのマクロファージの浸潤に関して、近年マクロファージの活性化過程には、従来の古典的活性化経路に加えてオルタナティブ活性化経路が存在することが明らかとなっている (Gordon S. Nat Rev Immunol 3, 2003, Gordon S, et al. Immunity 32, 2010, Mantovani A, et al. Trends Immunol 25, 2004)。すなわち、Th1 タイプのサイトカインで刺激を受けた炎症惹起性の古典的活性化マクロファージ (M1) に加えて、Th2 タイプのサイトカインによって刺激され抗炎症性に働くオルタナティブ活性化マクロファージ (M2) が存在している。主として M1 マクロファージは感染・免疫疾患に、M2 マクロファージは組織修復に関連するとの報告も存在し、M1/M2 マクロファージの極性変化を制御して治療に結びつける研究が行われつつある (DePaoli F, et al. Circ J 78, 2014, Courties G, et al. J Am Coll Cardiol 63, 2014)。また、椎間板ヘルニアあるいは椎間板変性に伴う椎間板性疼痛の存在に関する報告 (Ohtori S, et al. Spine J 20, 2014, Orita S, Spine J 12, 2013) が散見されるが、マクロファージの浸潤により疼痛が惹起される可能性があるとの報告も存在している (Takada T, et al. Arthritis Rheum 64, 2012)。しかしながら、変性椎間板組織に存在するマクロファージの極性と、椎間板変性および椎間板性疼痛との関連については不明な点も多く存在している。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、手術時に採取したヒト頸椎症椎間板およびヘルニア椎間板の *semi-en bloc* 標本を用いて組織学的、免疫組織化学的観察を行い、椎間板変性に関与する MMP-3, TNF- α , IL-1, bFGF など様々なタンパク発現の局在を報告し、血管新生、マクロファージの浸潤 (図 1) が椎間板変性に関与する可能性、および変性椎間板組織への神経線維の進展メカニズムについても報告してきた (Baba H, et al. Eur J Histochem 41,

1997, Furusawa N, et al. Spine 26, 2001, Kokubo Y, et al, Acta Histochem Cytochem 37, 2004, Kokubo Y, et al. J Neurosurg Spine 9, 2008)。また、MRI での変性の程度 (Pfirrmann CWA, et al. Spine 26, 2001) と組織学的変性程度との間には関連があることを明らかにした (図 2: Kokubo Y, et al. J Neurosurg Spine 9, 2008)。さらに、これまでに行ったマクロファージの極性に関する予備実験において、ヒト変性椎間板内に存在するマクロファージの多くは CD32 陽性マクロファージ (M1) であることを確認している。しかしながら、マクロファージの動態及び極性変化について、手術時に採取した標本から知見を得ることは容易ではない。

以上の観点から本研究では、ラット椎間板変性モデルの椎間板変性過程における経時的なマクロファージの動態及び極性変化を調べること、GFP 陽性骨髄細胞移植キメララットを用いてマクロファージの起源及び極性変化を調べること、ヒト変性椎間板における血管侵入、神経伸長、マクロファージの極性、変性・疼痛関連タンパクの発現を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験 1 ラット椎間板変性モデルにおける M1/M2 マクロファージの発現解析

ラット尾椎椎間板変性モデルの作成

Sprague-Dawley (SD) ラットの尾椎 5/6, 7/8 椎間板に 20G 針を椎間板中央まで穿刺し、ラット椎間板変性モデルを作成する。針先が椎間板中央まで達していることを単純 X 線像で確認する。また、尾椎 6/7 椎間板はコントロールとする。

DNA マイクロアレイ法によるラット変性椎間板における発現遺伝子の網羅的解析

椎間板穿刺後 2 週、4 週、8 週で椎間板を摘出し、コントロール椎間板との遺伝子発現差を解析する。Gene Chip 解析には Agilent 社の Gene Chip 1 色法 Array を用いる。得られた結果の解析は Agilent 社の Gene Spring GX 12 を用いて行う。Fold 2.0 で発現変動のあった遺伝子のクラスター解析、pathway 解析を行い、遺伝子発現の変動について検討を行う。

ラット変性椎間板におけるマクロファージの局在と極性変化の観察

マクロファージの局在および極性変化を組織学的、免疫組織化学的に観察する。

(2) 実験 2 キメララットによる椎間板変性とマクロファージフェノタイプの動態解析

GFP 陽性骨髄細胞移植キメララットの作成

SD ラットへ 10Gy の放射線照射後、同週齢の CAG-EGFP transgenic ラット (SD-Tg(CAG-EGFP)40sb, 日本 SLC 社) の大腿骨および脛骨より採取した骨髄細胞 (5.0 × 10⁶ 個/ml) を尾静脈より移植し、3~4 週間の回復期を設けたラットを GFP 陽性骨髄細胞移

植キメララットとした。

キメララット尾椎椎間板変性モデルにおけるマクロファージの動態解析

で作成したキメララットで尾椎椎間板変性モデルを作成し、穿刺後 2 週、4 週、6 週、8 週、12 週後に灌流固定を行い椎間板を摘出する。マクロファージ極性マーカーを用いて、蛍光免疫染色によりマクロファージを同定する。

(3)実験 3 ヒト変性椎間板における血管進入、神経伸長およびマクロファージフェノタイプの観察

ヒト頸椎椎間板 709 椎間の *semi-en bloc* 標本を用いて、マクロファージの局在および極性を調査し、血管新生、神経伸長、に關与するタンパク (VEGF, NGF, BDNF, NT-3) および椎間板変性及び疼痛発現に關与するタンパクの発現を免疫組織化学的に観察し、椎間板変性の grade、あるいはヘルニア脱出の type と比較検討する。

4. 研究成果

(1)DNA マイクロアレイ法によるラット変性椎間板における発現遺伝子の網羅的解析

遺伝子の発現量は、2, 4 週で増加し、8 週ではコントロール椎間板のレベルに減少していた (図 1)。

MAプロット(Ovs2 Ovs4 Ovs8)

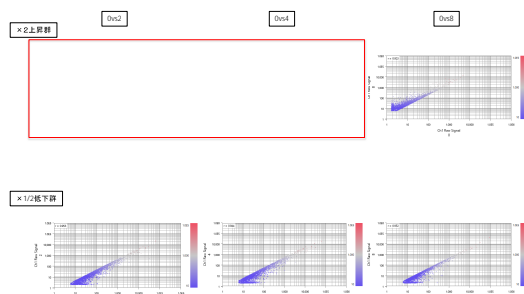
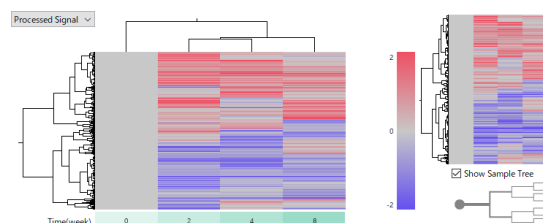


図 1. 2, 4, 8 週における遺伝子発現量の比較

Fold 2.0 で発現変動のあった遺伝子のクラスター解析 (図 2) において、コントロールと比較し 2 倍以上の発現量を示した遺伝子数は、2 週で 3738、4 週で 3180、8 週で 2778 であり、1/2 以下の発現量を示した遺伝子数は、2 週で 3008、4 週で 3034、8 週で 2239 であ



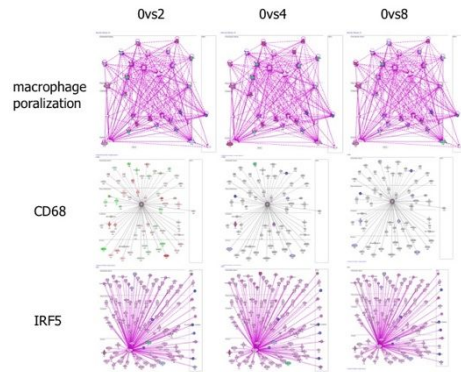
た。

図 2. クラスター解析

M1-M2 転換を抑制する転写因子である

interferon regulatory factor 5 (IRF5)の発現は、2 週および 4 週で上昇していたが、8 週では対照と同じレベルに低下していた。

また、pathway 解析 (図 3) により、マクロファージの極性変化に關連する 53 個の遺伝子のうち、IRF5 の關連遺伝子である、DNA のメチル化に關連する Dnmt3b の発現が 2 週と 4 週で増加していた。さらに、CD68 關連遺伝子である Ptgs2 の発現が 2 週で増加しており、炎症性サイトカインの発現が旺盛に行われ



ていると考えられた。

図 3. Pathway 解析

(2)ラット変性椎間板におけるマクロファージの局在と極性

組織学的には、穿刺後 3 日より外層線維輪への細胞浸潤を認め、1 週より新生血管構造が観察され、2 週から椎間板の線維輪構造が変化を起し、8 週では線維輪構造は完全に消失していた (図 4)。

CD68 陽性マクロファージは、穿刺後 1 日から 1 週にかけ線維輪周囲に存在していたが、2 週からは血管進入に伴い細胞数が増加し 4 週にかけ減少していた。8 週では椎間板周囲に陽性細胞を認めた (図 4)。

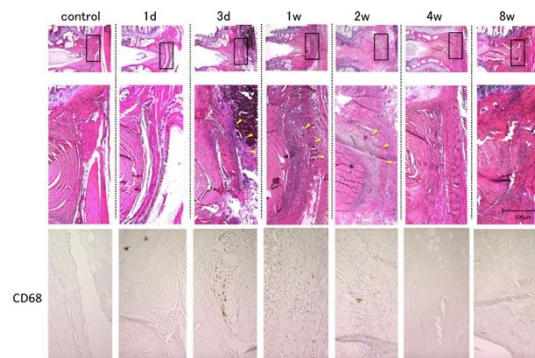


図 4. 椎間板組織の経時的変化

M1 マクロファージのマーカーとして CD16、CD32、M2 マクロファージのマーカーとして CD163、CD206 を用いて、M1 および M2 マクロファージの経時的変化を観察すると、M1 マクロファージは 1 週から 2 週にかけて多く発現

していたが、M2 マクロファージは 2 週で細胞数が最も多く、4 週では次第に減少し、8 週では線維輪外層に存在するのみであった (図 5)。

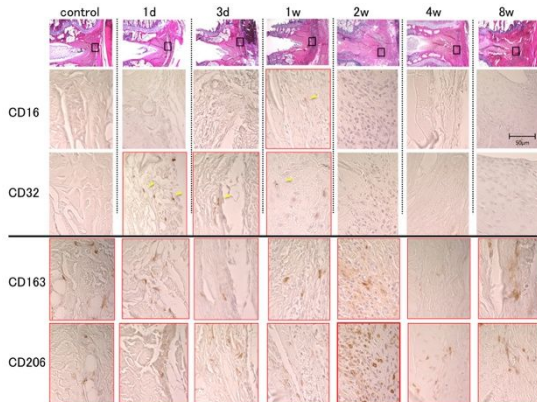


図 5. M1・M2 マクロファージの経時的変化

(3)キメララットによる椎間板変性とマクロファージフェノタイプの動態解析

GFP 陽性骨髄細胞移植キメララットにおいても、同様の椎間板変性変化を認め、マクロファージの極性変化も同様の結果であった。組織学的・免疫組織化学的観察で穿刺後 1 日目に存在していたマクロファージは、骨髄由来ではなく、穿刺後 1 週目から観察されたマクロファージは骨髄由来であり、その後極性が変化しても、骨髄由来の細胞であることが観察された (図 6)。

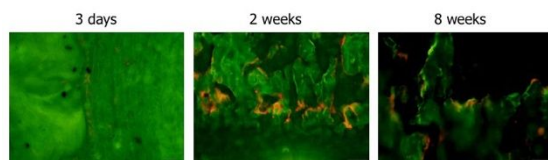


図 6. キメララットにおけるマクロファージの浸潤 (骨髄由来細胞は緑、マクロファージは赤)

(4)ヒト変性椎間板における血管進入、神経伸長およびマクロファージフェノタイプの観察

頸椎前方手術で摘出した 709 椎間板の内、椎間板ヘルニアは 344 椎間板、頸椎症は 365 椎間板であった。MRI による椎間板変性の評価 (Pfirrman CWA, et al. Spine 2001) は、ヘルニア椎間板では grade II が 56 椎間、III が 163 椎間、IV が 125 椎間であり、頸椎症椎間板では grade III が 76 椎間、IV が 168 椎間、V が 121 椎間であった。

組織学的には、脱出したヘルニア塊の周囲には血管新生と、神経線維の伸長が観察され、血管内皮細胞には VEGF、NGF、BDNF、NT-3 が

発現し、伸長した神経線維では Trk-A、Trk-B、Trk-C が発現していた (図 7)。Western Blotting においても、これら神経成長因子とそのレセプターが確認された (図 8)。

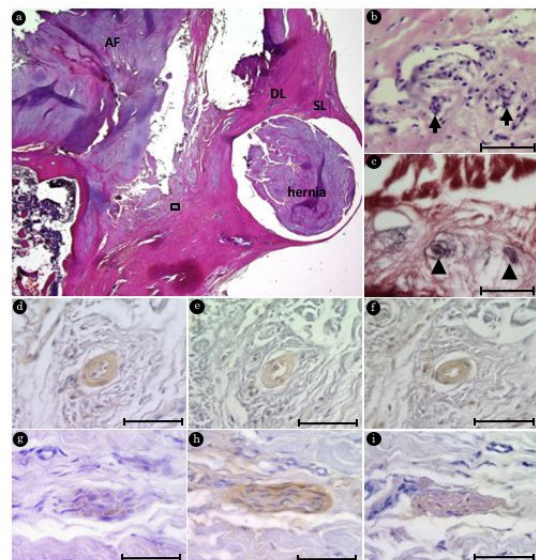


図 7. 脱出型ヘルニア椎間板での神経伸長. a.ルーペ像 (HE 染色) b.小血管近傍での線維組織 c. 鍍銀染色陽性線維 d.NGF e.BDNF f.NT-3 g.Trk-A h.Trk-B i.Trk-C

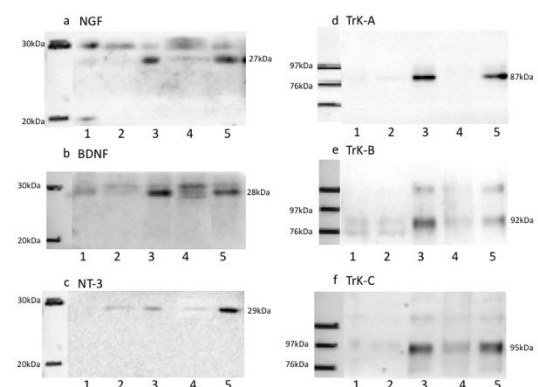


図 8. Western blotting. lane 1: cadaver disc lane 2,3: ヘルニア椎間板 lane 4,5: 頸椎症椎間板

椎間板内への新生血管周囲には CD68 陽性マクロファージの浸潤を認め、連続切片で CD68 陽性細胞は CD16 陽性細胞 (M1 マクロファージ) と CD206 陽性細胞 (M2 マクロファージ) が混在して構成され、その近傍には神経線維が存在していた (図 9)。

神経線維が存在する組織においては、旺盛な血管新生とマクロファージの浸潤が観察され、肉芽組織内のマクロファージの極性は M1 マクロファージの割合が高く (図 10)、一方で神経線維が観察されない組織においては、新生血管の数は少なく、M2 マクロファージが多く観察された (図 11)。

肉芽組織内での CD16 陽性 M1 マクロファージと CD206 陽性 M2 マクロファージの 40 倍で

の 1 視野あたりの陽性細胞数をカウントし、M1/M2 比を比較すると、contained type のヘルニア椎間板では 1.03 ± 0.10 、uncontained type のヘルニア椎間板では 1.27 ± 0.11 、頸椎症椎間板では 0.98 ± 0.09 であり、炎症反応が旺盛な椎間板組織においては M1 マクロファージの割合が優位に高い結果であった。

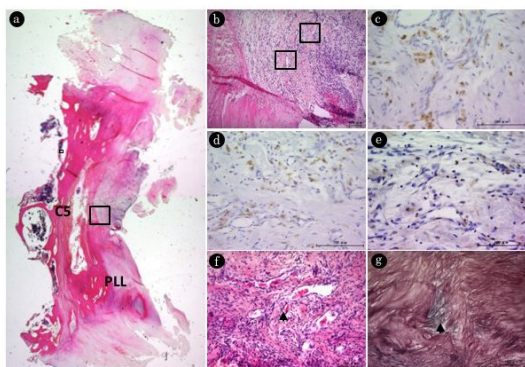


図 9. 脱出型椎間板ヘルニアの組織像 a.ルーペ像 b.脱出髄核周囲の肉芽組織 c.CD68 陽性細胞 (マクロファージ) d.CD16 陽性 M1 マクロファージ e.CD206 陽性 M2 マクロファージ f. 肉芽組織内の神経線維 g. 鍍銀染色陽性

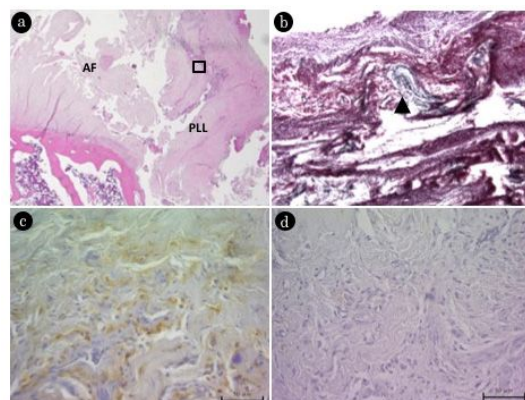


図 10. 脱出型椎間板ヘルニアの組織像 a.ルーペ像 b. 鍍銀染色陽性線維 c.CD16 陽性 M1 マクロファージ d.CD206 陽性 M2 マクロファージは観察されない

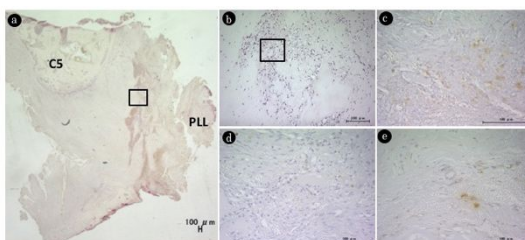


図 11. 非脱出型椎間板ヘルニアの組織像 a.ルーペ像 b. 肉芽組織 c.CD68 陽性細胞 (マクロファージ) d.CD16 陽性 M1 マクロファージ e.CD206 陽性 M2 マクロファージ

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)

[学会発表](計4件)

1) 山岸淳嗣, 小久保安朗, 中嶋秀明, 杉田大輔, 山本悠介, 松峯昭彦
ヒト頸椎椎間板ヘルニア・頸椎症椎間板におけるマクロファージ浸潤の免疫組織化学的観察

第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会
2017 年

2) 山本悠介, 小久保安朗, 山岸淳嗣, 出淵雄哉, 中嶋秀明, 松峯昭彦
ラット椎間板変性の継時的, および組織学的・免疫組織化学的評価

第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会
2017 年

3) 山岸淳嗣, 小久保安朗, 杉田大輔, 平井貴之, 山本悠介, 中嶋秀明

ヒト頸椎椎間板ヘルニア・頸椎症椎間板における組織学的観察・マクロファージ浸潤の免疫組織化学的観察

第 46 回日本脊椎脊髄病学会学術集会
2017 年

4) 山本悠介, 山岸淳嗣, 杉田大輔, 平井貴之, 中嶋秀明, 小久保安朗

ラット椎間板障害モデルにおける椎間板の組織学的・免疫組織化学的観察

第 46 回日本脊椎脊髄病学会学術集会
2017 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小久保 安朗 (KOKUBO Yasuo)

福井大学・学術研究院医学系部門・准教授
研究者番号：70377456

(2) 研究分担者

内田 研造 (UCHIDA Kenzo)

福井大学・医学部・教授

研究者番号：60273009

(平成 27 年度まで)