

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10947

研究課題名(和文) ラット受動喫煙モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)の治療効果

研究課題名(英文) Effect of intravenous DFAT for rat degenerative intervertebral disc induced by passive cigarette smoking

研究代表者

上井 浩(UEI, Hiroshi)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：50451373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：受動喫煙によるラット椎間板変性モデルの作製をし、再生医療用細胞ソースとして成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)を静脈内に注入した。組織学的検討では、HE染色では髄核組織構造は保たれており細胞密度の減少も軽度であった。線維輪や軟骨終板には明らかな異常は認められなかった。髄核組織のRT-PCRではSox9は遺伝子発現量の低下が抑制された。アグリカンの遺伝子発現量の減少が有意に抑制されていた。DFATの全身投与は、受動喫煙による髄核組織の変性やプロテオグリカン量の減少を抑制し、軟骨関連遺伝子の発現低下を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国民の腰痛の有訴者率は男性1位、女性2位であり、その割合も年齢が上がるにしたがって増加しており、生活の質低下の主要な原因である。腰痛の原因である椎間板変性に対して、DFAT静脈内投与は組織学的には椎間板変性を抑制することが明らかになった。遺伝子発現では、DFAT静脈内投与により髄核組織の変性を促進することを抑制することが明らかになった。DFATは高齢者からも低侵襲性に採取・調製が可能であり、また外来での施行も可能であることから、椎間板変性症に対する有望な治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined whether dedifferentiated fat (DFAT) cell transplantation by intravenous administration could contribute to intervertebral disc regeneration using a rat intervertebral disc degeneration (IDD) model by passive cigarette smoking. The results suggested that intravenous DFAT cell transplantation suppressed down-regulated expression of Sox9 and aggrecan and promoted the regeneration of intervertebral disc.

研究分野：脊椎脊髄病学

キーワード：椎間板変性 喫煙 DFAT 腰痛 脊椎脊髄病学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動器機能の低下により寝たきりや、要介護が必要になる手前の状態であるロコモティブシンドローム(ロコモ)という概念が2007年に提唱された。超高齢社会である日本においてロコモを克服することが、健康寿命を伸ばし、国民医療費を抑制する上で不可欠である。平成25年度の国民生活基礎調査において、腰痛の有訴者率は男性1位、女性2位であり、その割合も年齢が上がるにしたがって増加しており、ロコモの主要な原因として明らかである。腰痛を起こす原因は大変多いが、そのうち椎間板の変性によって起こる腰椎椎間板ヘルニア、腰椎椎間板変性症がある。さらにこの病状が進行すると変形性脊椎症、腰部脊柱管狭窄症、脊柱後側弯症などに代表される脊椎変性疾患に至る。しかし、原因の端緒である椎間板変性に対する根治的治療は現在のところ存在せず、主に疼痛に対する対症療法が行われている。脊椎変性疾患に対する脊椎内固定材料や手術手技の進歩は著しく、脊椎固定術の適応も拡大した。我が国の高齢者の健康寿命の延長という点で、脊椎固定術の果たした役割は非常に大きい。一方では固定した隣接椎間に負荷が増大し、隣接椎間障害や隣接椎体の骨折もしばしば経験しており、脊椎固定術の限界ともいえる。脊椎変性疾患に至るまで椎間板変性を進行させないことが健康寿命の維持や増大する医療費の抑制にもつながる。

椎間板変性のメカニズムについては、重量負荷、喫煙などのストレスが加わった後、変性を起こす何らかの物質が椎間板に作用して起こると考えられている。当教室においてラット喫煙モデルを作製しその椎間板変性を病理組織学的に確認できた。また、微量な喫煙ラット椎間板組織を用いてmRNAレベルでの発現定量解析を行い、コラーゲンなど主要な構成成分遺伝子の発現低下をもたらす反応が起こっていることが明らかにした。しかし、椎間板変性をおこすメカニズムの詳細について明らかにしてきたが、治療法の確立にまでは至っていない。

最近新たな再生医療用細胞ソースとして成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞

(Dedifferentiated fat cell: DFAT)が注目されている。DFATはドナーの年齢、基礎疾患に影響されず、少量の脂肪組織から短期間に大量調整が可能であることが明らかにされ、種々の疾患に対する再生医療への応用が期待されている。当教室においても、骨欠損モデルウサギや卵巣摘出による骨粗鬆症モデルウサギにDFATを移植することにより、骨形成が促進することを報告している。

現在の細胞治療による椎間板変性症の治療戦略は、変性椎間板腔に細胞を直接注射する方法が主流である。椎間板変性モデル動物に対する間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)の椎間板腔投与による研究のメタ解析では、椎間板変性の進行が有意に抑制されることが報告されている。一方、椎間板は無血管領域であり、椎間板腔に移植された細胞が長期間生存し生着することは期待できないこと、また椎間板変性症は基本的に加齢に伴う変性疾患であるため、病変は複数の椎間板に及ぶことなどを考慮すると、椎間板腔への局所投与による細胞治療にはその有効性に限界があることが予想される。MSCを静脈内投与するとその大部分が肺にトラップされ、局所での細胞の相互作用により、免疫制御反応や組織再生を促すことが明らかにされている。DFATでも免疫性腎炎モデルラットに静脈内投与した結果、移植されたDFATが肺にトラップされ、抗炎症サイトカインであるTSG-6の放出を介して、腎組織における炎症性サイトカインIL-6やIL12-を減少させることにより腎炎改善効果を示した。

2. 研究の目的

椎間板変性に対するDFAT細胞の経静脈移植の効果については、今まで明らかにされていない。本研究の目的は、自動喫煙装置により椎間板の変性を誘導したラット椎間板変性モデルに対して、DFATを静脈内投与することで、椎間板変性の進行を抑制もしくは改善効果が認められ

るかを明らかにすることである。さらに、免疫性腎炎モデルラットと同様の抗炎症サイトカインが発現し、腎炎改善効果に類似した変性椎間板への抗炎症効果などの発現がみられるかを明らかにする。同様の機序で変性椎間板に対し、DFAT が治療効果を発揮する可能性があり、新たな治療法開発あるいは予防法の足掛かりをつかむことが目的である。

3. 研究の方法

(1) ラットDFAT の作製

SD ラット由来のDFAT は既報に従って作製する。凍結保存した細胞を解凍、培養し実験に使用する。増殖培地は、10% ウシ胎児血清(Fetal bovine serum:FBS)含有Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA)を用い、3 - 4 日毎に培地交換を行い、第5継代以内の細胞を実験に使用する。DFAT 調製方法の概略を図1に示す。

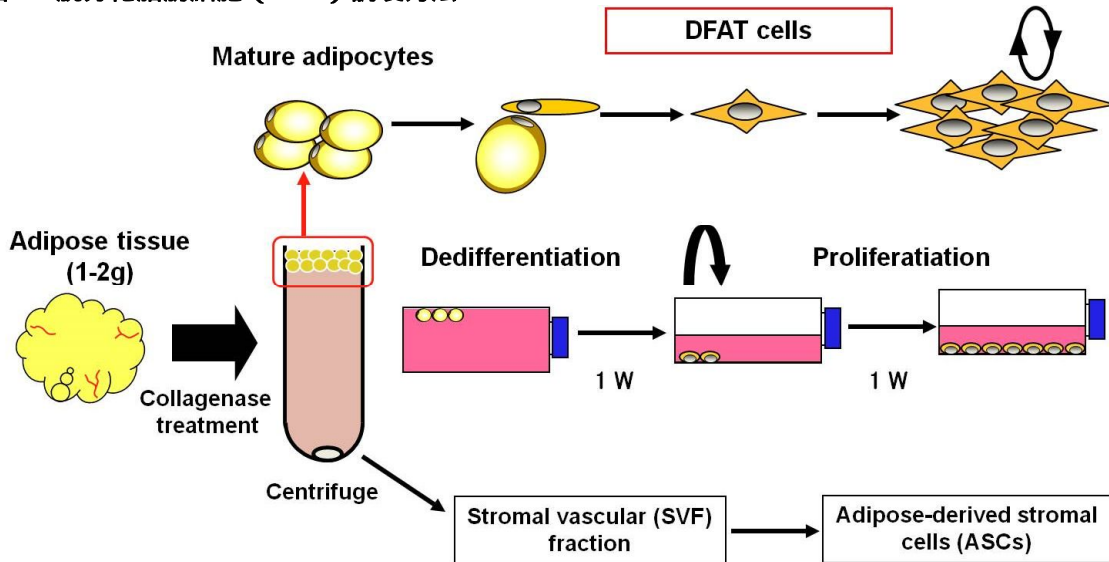
(2) 受動喫煙による椎間板変性ラットの作製

受動喫煙によるラット椎間板変性モデルは既報に従って作製する。自動受動喫煙装置はアクリル樹脂製のチャンパーと、そのチャンパー内にタバコ煙を送風できる自動喫煙装置から構成される(図1A,B)。装置は5 分間の喫煙送風と5 分間の室内換気を行い、1 時間のインターバルをおき、1 日に20 回繰り返し施行するよう設定する(Engineering System Co., Nagano, Japan)。酸素分圧連続測定装置(MT 技研社, Tokyo, Japan)にてボックス内は酸素濃度が20%、150mmHg を基準とし、明暗サイクルは12 時間に設定する。タバコは両切りショートピース(JT, Inc., Tokyo, Japan)を使用する。SD ラットを上記の自動受動喫煙装置内で8 週間飼育し椎間板変性を誘導する。また人道的エンドポイントとして脱毛、るいそう(体重の90%を切る場合)など過剰なストレスによる受動喫煙継続が困難な場合は直ちに後述と同様に安楽死をさせる。

18 頭のSD ラットをランダムに、DFAT 群、PBS 群、Control 群の3 群に群分けをする(各群n=6)。DFAT 群は8 週間の喫煙後に0 週、2 週、4 週、6 週の時点で0.5ml リン酸化緩衝液(Phosphate buffered saline: PBS)にラットDFAT (1×10^6 個)を溶解し、尾静脈から静脈内投与する。DFAT 移植細胞数は、既報に従い、静脈内投与しても肺塞栓などの副次作用を起こさず、全身性の免疫制御作用が期待できる細胞数として 1×10^6 個/頭とする。PBS 群は、8 週間の喫煙後に0 週、2 週、4 週、6 週の時点でPBS 0.5ml を尾静脈より投与する。Control 群は非喫煙後、非投与でDFAT 群、PBS 群と同様に8 週間飼育する。

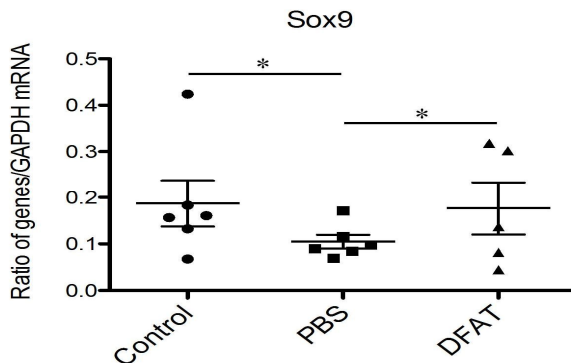
実験終了時にペントバルビタールナトリウムの腹腔内過剰投与にて深麻酔下に安楽死を施行する。直ちに背部脊椎直上より縦切開を加えて脊椎を露出し、尾椎を除く胸椎と腰椎を、胸骨正中切開後に肺を摘出して組織学的評価、免疫組織化学的評価、遺伝子発現解析、X 線学的評価を行う。

図1 脱分化脂肪細胞 (DFAT) 調製方法

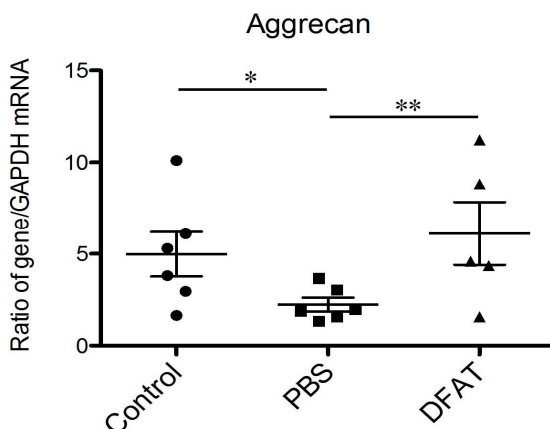


4. 研究成果

(1) 髄核組織のRT-PCRの結果を示す。軟骨の初期分化マーカーである Sox9 の遺伝子発現量は、Control 群と比較して PBS 群で有意に減少していた。さらに、DFAT 群は PBS 群と比較し Sox9 の遺伝子発現量が有意に上昇していた。DFAT 群の Sox9 は、PBS 群と比べ、その遺伝子発現量の低下が抑制される結果であった。

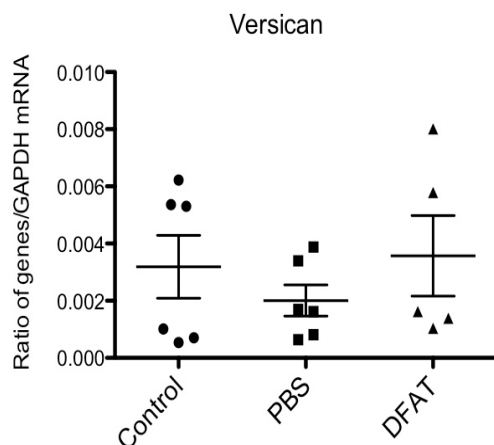


(2) 髄核組織の主要プロテオグリカンであるアグリカンの遺伝子発現量は、Control 群と比較して PBS 群で有意に減少していた。DFAT 群は PBS 群と比較して有意に高値であった。以上より、DFAT 群は PBS 群と比較し、アグリカンの遺伝子発現量の減少が有意に抑制されていた。



(3) 髄核内のバーシカンの遺伝子発現量は、各群間で有意差は認めなかったが、Control 群と比

較して PBS 群が低い傾向であった。また DFAT 群は PBS 群と比べ高い傾向であった。



8週間の受動喫煙により髄核組織中の細胞成分、プロテオグリカン、弾性線維の低下を主徴とする椎間板の変性が認められ、DFAT 静脈内投与によりこれらの病理学的変化の抑制と髄核プロテオグリカン減少の抑制が認められた。DFAT 移植により髄核組織における Sox9、Aggrecan の軟骨遺伝子の発現が増加した。DFAT 移植により肺組織における HGF、PGE2、TSG6 などの免疫制御関連遺伝子の発現が増加した。

以上のことより、受動喫煙ラットに DFAT を静脈内投与することで、椎間板変性が抑制されることが明らかになった。

<引用文献>

Oda H, Tokuhashi Y et al. Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model. J Orthop sci 2004

Ogawa T, Uei H, Tokuhashi Y et al. Alteration of gene expression in intervertebral disc degeneration of passive cigarette- smoking rats: separate quantitation in separated nucleus pulposus and annulus fibrosus. Pathobiology 2005

Uei H, Tokuhashi Y et al. Gene Expression Changes in an Early Stage of Intervertebral Disc Degeneration Induced by Passive Cigarette Smoking. Spine 2006

Matsumoto T et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. J Cell Physiol 2008

Kikuta S, Tokuhashi Y, Matsumoto T et al. Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. Tissue Engineering Part A 2013)

Maruyama T, Matsumoto T et al. Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. Stem Cell Res Ther 2015

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 上井 浩	4. 巻 34
2. 論文標題 椎間板変性メカニズムの解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 80-85
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上井 浩	4. 巻 2
2. 論文標題 椎間板変性メカニズムの解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 64-69
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	徳橋 泰明 (TOKUHASHI Yasuaki) (80188739)	日本大学・医学部・教授 (32665)	