

平成21年 6月 9日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19791041  
 研究課題名 (和文) GFP 骨髄キメララットを用いた椎間板の変性および再生過程における細胞動態の解明  
 研究課題名 (英文) kinetic analyses of GFP derived bone marrow cells in intervertebral disc degeneration and regeneration  
 研究代表者  
 大久保 直規 (OKUBO NAOKI)  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号： 50448726

研究成果の概要：骨髄由来細胞の椎間板内における細胞動態を観察するために、Green Fluorescent Protein (GFP) 骨髄キメララットの腰椎椎間板を一定の針で穿刺し、椎間板変性モデルを作製した。椎間板変性過程では、GFP 陽性骨髄由来細胞が終板および内層線維輪の血管周囲に出現したが、穿刺後 24 週にわたり髄核内に GFP 信号を認めなかった。変性椎間板に変性抑制効果が証明されている多血小板血漿を注入したが、髄核内に明らかな GFP 信号を認めなかった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学

## 1. 研究開始当初の背景

椎間板変性とは椎間板の特性である荷重負担能力と変形能力が破綻した状態であり、腰痛の原因となる。椎間板変性が進行し、不安定性が生じた場合、固定術などの外科的治療が行われているが、侵襲性や隣接椎間障害

の問題がある。近年では、人工椎間板が開発され、欧米で臨床応用が始まっているが、椎間板の本来の動きである荷重負担能力と変形能力などの力学的特性を回復させる治療法はいまだ確立されておらず、椎間板変性のメカニズムについても不明な点が多い。

椎間板変性に伴い、椎間板を構成する髄核および線維輪の細胞が減少し、基質であるプロテオグリカンも減少することが明らかとなっている。椎間板は人体内で最大の無血管組織であり、再生能力は乏しく自己修復は期待出来ないと考えられている。近年の動物実験では、椎間板の変性に伴う髄核内での軟骨様細胞の出現が報告されている

この軟骨様細胞出現のメカニズムおよび変性椎間板内における役割はいまだ明らかではないが、自己修復に関与している可能性が示唆されている。*in vitro*で未分化間葉系幹細胞から髄核細胞様細胞への分化誘導が可能であったとの報告や、*in vivo*で髄核を部分吸引した家兎の椎間板に未分化間葉系幹細胞を移植すると、髄核細胞様細胞へ分化し、II型コラーゲン、keratin sulfate、chondroitin-4-sulfateを発現したとの報告があり、軟骨様細胞の出現には骨髄由来の未分化間葉系幹細胞が関与していると考えられている。

椎間板の生物学的機能を回復する方法として、成長因子治療が注目されている。われわれは drug delivery system として、血小板内成長因子の徐放が可能なゼラチンハイドロゲル粒子を作製し、自己血から精製した多血小板血漿 (platelet-rich plasma: PRP) を含浸させて家兎椎間板変性モデルの椎間板内に注入し、血小板内成長因子の徐放による椎間板再生効果を明らかにした (Nagae M, et al: Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres: Tissue Engineering, Volume 13, 2007.)。この結果から、初期の椎間板変性に対する再生法の確立と臨床応用への可能性が示されたが、PRPの骨髄由来細胞に対する効果は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨髄キメララットの椎間板変性および再生モデルを作製し、画像評価、組織学的評価、生化学的評価、およびバイオイメージング手法を用いることで、椎間板変性過程における細胞動態のメカニズムを解析することである。

## 3. 研究の方法

(1) キメラ率の計測: GFP ラットの骨髄細胞をガンマ線で骨髄抑制した SD ラットに移植することにより、骨髄由来細胞の追跡が可能な骨髄キメララットを作製した。フローサイトメトリー法で、骨髄キメララットにおける末梢血中の GFP 陽性細胞の割合を測定した。

(2) 椎間板変性モデルの作製: 全身麻酔下に、骨髄キメララットの腰椎椎間板 (L2/3、4/5) に対して、経腹膜外経路で腰椎前方を展開し、髄核穿刺による椎間板変性モデルを作製した。麻酔薬の大量投与による安楽死を行い、腰椎椎間板 (L2/3、3/4、4/5) を摘出した。摘出後、ホルマリン溶液を用いて組織浸漬固定を行い、遮光下で EDTA 溶液を用いて脱灰操作後、凍結組織切片を作製した。変性椎間板 (L2/3、4/5) と無処置椎間板 (L3/4) を以下①～③の方法を用いて、椎間板変性の評価と骨髄由来細胞の動態および細胞形態を観察した。

### ① 組織学的評価: grading score

椎間板変性後に 1、3、7、14、28 日目に椎間板組織を摘出し、組織切片を作製した。HE 染色により、髄核、線維輪、終板について組織変性像を評価した。

② 共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察：PI による核染色で細胞形態を観察した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて、椎間板変性過程の骨髄由来細胞の動態を観察した。

③ 免疫組織化学染色：抗 HSP47 抗体を用いて変性椎間板に出現するコラーゲン産生細胞について評価した。

(3)

骨髄キメララット変性椎間板に対して、PRP を注入後 4 週の時点で椎間板組織を摘出し、組織切片を作製し、組織構造と骨髄由来細胞の動態を観察した。

#### 4. 研究成果

(1)

骨髄キメララットの末梢血液のキメラ率は、移植後 2 週で 69.5% (n=25)、移植後 4 週で 78.9% (n=15) であった。

(2)

① 穿刺後、経時的に線維輪および髄核の変性は進行した (図 1)。穿刺後 4 週から髄核に軟骨様細胞が出現した。

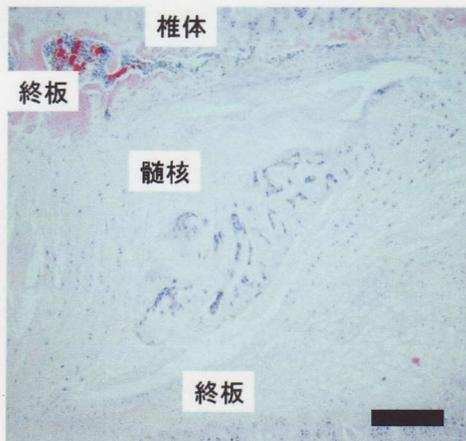


図 1 穿刺後 4 週 腰椎椎間板 (HE 染色)  
(scale bar : 200  $\mu$ m)

② GFP 陽性骨髄由来細胞は穿刺後早期から穿刺部の前縦靭帯周囲に出現し、穿刺後 4 週から終板と内層線維輪の血管周囲に出現した (図 2)。

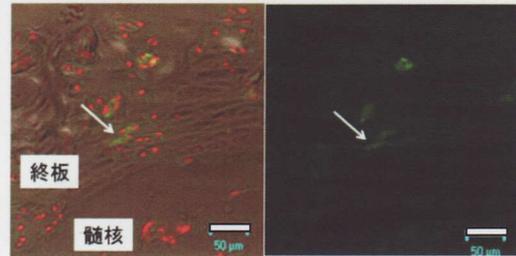


図 2 穿刺後 4 週 腰椎椎間板 (PI 核染色)  
白矢印：GFP 陽性骨髄由来細胞  
(scale bar : 50  $\mu$ m)

穿刺後 24 週にわたり髄核内に GFP 信号を認めなかった (図 3)。

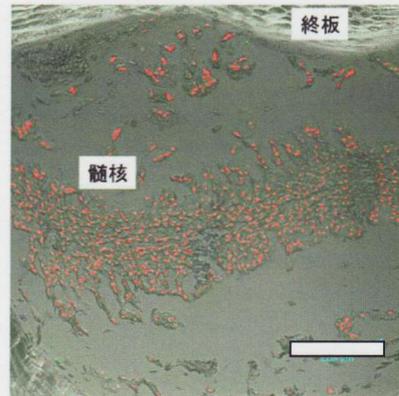


図 3 穿刺後 24 週 腰椎椎間板 (PI 核染色)  
(scale bar : 200  $\mu$ m)

骨髄由来細胞は有核細胞で、HSP47 陽性であった。無処置骨髄キメラは椎間板の変性を認めず、終板と内層線維輪の血管周囲に GFP 陽性骨髄由来細胞を認めなかった。

(3)

骨髄キメララットの変性椎間板に PRP 含浸粒子を注入後 4 週経過の椎間板は髄核および線維輪の組織構造は保持されていたが、髄核内に GFP 陽性骨髄由来細胞を認めなかった (図 4)。

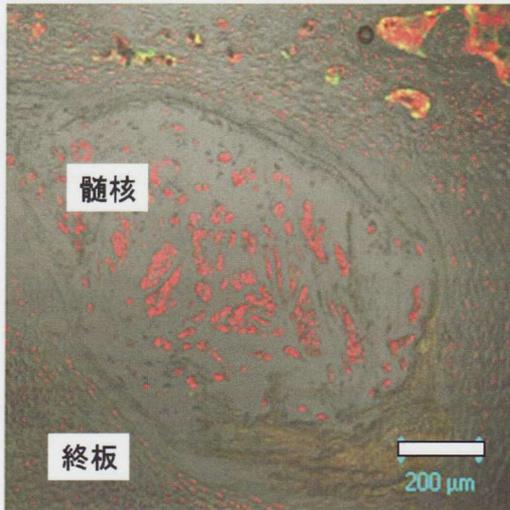


図4 PRP 含浸粒子注入後椎間板 (PI 核染色)  
(scale bar : 200  $\mu$ m)

椎間板変性の進行に伴い、骨髄由来細胞は終板と内層線維輪の血管周囲に出現した。骨髄由来細胞は椎間板変性の刺激に反応し、終板および内層線維輪の血管周囲に遊走したと考えた。髄核内は 24 週にわたる変性過程で骨髄由来細胞は出現しなかった。

ラット変性椎間板は髄核に軟骨様細胞が出現するが、その起源は髄核に存在する細胞あるいは髄核周囲の細胞由来との報告がある。椎間板変性に伴い出現する軟骨様細胞は骨髄由来細胞である可能性は低いと考えた。

PRP 含浸粒子を注入することにより、髄核および線維輪の組織構造は保持されていたが、髄核内に GFP 陽性骨髄由来細胞を認めなかったことから、PRP 含浸粒子は残存する髄核および線維輪に作用し、椎間板変性を抑制した可能性を考えた。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大久保 直規 (OKUBO NAOKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 50448726