

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791056
 研究課題名(和文) 椎間板内在性幹細胞の解析と変性への関与、治療への応用へ向けた基礎的研究
 研究課題名(英文) Identification of endogenous stem cells of the intervertebral disc in degeneration and treatment applications
 研究代表者
 酒井 大輔 (SAKAI DAISUKE)
 東海大学・医学部・講師
 研究者番号：10408007

研究成果の概要(和文)：大小動物およびヒト検体を用いた椎間板細胞を検討した結果、髄核細胞の”heterogeneity”とその特色を明らかにした。また椎間板内における組織内在性幹細胞とそのニッチにつき解析、椎間板内在性幹細胞やその未分化度、活性度について年齢と負の相関関係にあることを実証した。これは椎間板再生により適した細胞集団の選択に役立つものと考ええる。さらに他臓器では骨髄などの幹細胞プールより細胞が”mobilize”してくるが、椎間板においてそのような機構が存在するかにつき、GFPキメラマウスを用いて解析した。その結果、骨髄から”mobilize”する細胞は終板付近には多く認められるが、線維輪、髄核と中心部に行くに従い減少し、椎間板には幹細胞プールからの細胞供給が極端に少なく、このことは外来から細胞を補充することの妥当性を示した。

研究成果の概要(英文)：Heterogeneity of nucleus pulposus cells was revealed in various animal species including human. Endogenous stem/progenitor cells were identified in the intervertebral disc tissue. Its immaturity correlated negatively with age in humans showing that number of endogenous stem cell populations in the intervertebral disc decrease with aging. Exogenous stem cells did not supply cells to the degenerated intervertebral disc showing that in the intervertebral disc, exogenous mobilization of cells is extremely difficult. These facts rationalize the idea of supplying cells through external access.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学・脊椎脊髄病学

キーワード：整形外科学、脊椎脊髄病学、椎間板、再生医療、幹細胞

1. 研究開始当初の背景

腰痛は本邦で有訴者率男女共に 1、2 位に入

る common disease であり、労働障害、医療経済上、社会問題である。腰痛の主原因の1つである椎間板変性は不可逆的な変化であり、現在のところ臨床的に有効な治療法は存在しないため、国内外の多数の研究施設で新たな治療法の開発が研究されている。申請者は自家骨髄間葉系幹細胞移植療法が変性椎間板の再生に有効である事を動物実験にて証明し報告し、現在臨床応用化に向けた大動物実験、技術的検討を行っている。また本申請者が考案したアルジネート内での Mixed-coculture system にて初めて in vitro で間葉系幹細胞を髄核、線維輪細胞に近い形質を持つ細胞へ分化誘導させることに成功した。またこれまで特異的なマーカーが無く、解析に難渋していた問題に対しては国際共同研究を通じ申請者はヒト椎間板細胞のフローサイトメトリーを用いた解析においてインテグリン $\alpha 6$ の髄核細胞での特異的発現と CTGF (Connective Tissue Growth Factor)の椎間板細胞での軟骨細胞とは異なった機能的役割について第20、21回日本整形外科学会基礎学術集会および2006、2007年度 Orthopaedic Research Society にて報告した。

今後、新規治療法を科学的根拠に基づき開発する為には椎間板の細胞・分子レベルでの理解が必須であるが、椎間板は未だその発生、構成細胞の分化、恒常性維持、そして変性機序に至るまで骨や関節軟骨に比し未知である。近年、多くの臓器でその恒常性維持に内在性幹細胞・前駆細胞の役割が注目されている。椎間板組織における内在性幹細胞ニッチの局在は不明であるが造血系幹細胞が骨芽細胞と interaction を持つように、間葉系幹細胞でもその局在周囲に各種の細胞間接着や関連パスウェイの関与が予想される。申請者は preliminary な実験において椎間板内に幹細胞マーカー(CD90、CD166、CD105 など)を発現する細胞集団が存在することを確認している。多くの臓器でその組織修復機構に関わる幹細胞は分化段階に応じて臓器内あるいは骨髄から遊走し供給されることが知られる。椎間板が早期に変性する理由は人体最大の無血管臓器であるがゆえに修復細胞の供給が困難であることが大きな要因の一つであると考えられる。しかし我々は椎間板変性モデルにおいて骨髄由来細胞が椎間板内に出現してくることをトランスジェニックマウスの骨髄移植モデルで報告しており、幹細胞供給システムが無血管の椎間板にも存在すると考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は(1)椎間板内における内在性幹細胞システムの存在とニッチを同定し、(2)そこでの分子機構の解明、(3)その結果を開発中である幹細胞移植療法に応用することな

どにより老化制御、椎間板変性抑制研究に関する新たな知見を明らかにし、椎間板変性の病態理解と新治療法の開発を促進することである。病態の把握を分子生物学的根拠に基づいて理解することで現在試行されつつある新規薬剤、生物製剤、再生医療技術の妥当性、安全性の向上に寄与できるものと考えている。

3. 研究の方法

椎間板を構成する髄核細胞はヒトにおいては10代前後に脊索由来細胞が消失し、軟骨様細胞に取って代わるとされる。また線維輪領域にも線維芽細胞様な細胞と軟骨様細胞が存在する。一方、大多数の動物は生涯にわたり脊索細胞が主体であり、Hunterらによるとヒトの様な細胞の変化を示すのは、16週以上のラット、1歳以上の軟骨異栄養種のイヌと4歳以上の羊とされている。

本研究ではそのような理由から主に比較的早期に椎間板変性、ヘルニアを来す軟骨異栄養種のビーグル犬、そしてラットを用い、代用がないトランスジェニック実験のみマウスを使用する。そしてヒト椎間板において解析を要する際には倫理委員会承認、インフォームド Consent のもと手術症例より提供を受け使用する。

研究計画テーマは長期に5段階で構成される。

第1段階は椎間板を構成する細胞集団中の CD49f、CD90、CD105、CD166、Tie2、Ang1、MHC class I などの Stem cell マーカーを高発現する細胞の局在、最終分化した成熟細胞との関わりを in vivo で解析する。

第2段階において同定した内在性幹細胞を in vitro で当研究機関にて開発した共培養技術等を用いて成熟細胞や周囲組織との interaction を調べることでそのニッチを明らかにする。

第3段階では各種疾患動物モデルを用いて恒常性維持、老化や機能不全に伴う幹細胞ニッチに起こる変化を明らかにする。

第4段階でその治療法を模索検討する。

第5段階では創薬、遺伝子導入、細胞移植の観点からヒトへ応用可能な手法につき検討する。

尚、本研究期間においては主に第1段階から第3段階までの内容を計画する。具体的には以下の通りである。

1. in vitro assay 系の確立

椎間板髄核組織の heterogeneity を示唆する結果は組織の免疫染色、細胞外マトリックスの産生能の違い、そしてウサギなどの小型動物への移植実験などから過去において多く報告されてきた。しかしながら、椎間板の再生医療実現化に向けて培養後の髄核細胞集団がどの様に変化したか、またヒトへの投与

を前提とした場合、その有効性を簡便にそして的確に評価できる assay 系は現在でも存在しない。そこで培養髄核細胞の heterogeneity ないしは有効性を簡便に評価できる assay 系の開発を行う。現在、我々は造血前駆細胞の heterogeneity を簡便に評価できるコロニーアッセイを応用した椎間板髄核細胞コロニーアッセイシステムを開発中である。また同組織には間葉系幹細胞の存在を示唆する報告もあるが、これら間葉系幹細胞の同定やその多分化能も同時に評価する予定である。

2. in vivo assay 系の確立

椎間板の再生医療を考慮した場合、同組織における stem and/or progenitor 細胞の有無を発見することは非常に有意義である。そのためには的確に簡便に同細胞を同定できる in vivo assay の開発は必要不可欠となる。現在、我々は上記髄核細胞コロニーアッセイ法を用いて同細胞集団における progenitor 細胞の存在を示唆する結果を得ている。これらの結果をもとに in vivo assay 系を開発し、同組織における stem cell の存在を証明する。現在、免疫不全マウスの1つである NOD/SCID マウスへの様々な移植実験を行い、有効かつ簡便な in vivo assay 系の確立を目指している。

4. 研究成果

マウス、ラット、イヌ全ての髄核および線維輪細胞で接着型と球状型の2種類のコロニー形成細胞および細胞の heterogeneity を確認し、少なくとも椎間板の構成には3種類以上の形質の違う細胞が関与していることが示唆された。最もヒトに近い軟骨異栄養犬種であるビーグルでの結果、細胞増殖率は腰尾椎間で差は認めなかったが(培養4、16、28日目で腰椎平均4.0倍、53.9倍、83597.5倍、尾椎で平均3.7倍、86.3倍、71593.7倍、 $p > 0.05$)、より器質合成能力が高い細胞を多く含むとされる尾椎髄核から多くのコロニーが出現した(コロニー数:腰椎では培養4、28日目で接着型が平均66個、155個、球状型79個、57個、尾椎で接着型94個、179個、球状型99個、191個、 $p < 0.05$)。ヒト髄核細胞でもこの2種類のコロニーを認め、提供者の年齢が若い方が球状コロニーの出現数が顕著に多く、免疫染色の結果、球状コロニーにより多くプロテオグリカン、II型コラーゲンを産生する細胞が存在することが判明した。

また椎間板内における組織内在性幹細胞とそのニッチにつき解析、椎間板内在性幹細胞やその未分化度、活性度について年齢と負の相関関係にあることを実証した。これは椎間板再生により適した細胞集団の選択に役立つものと考えられる。さらに他臓器では骨髄などの幹細胞プールより細胞が”mobilize”し

てくるが、椎間板においてそのような機構が存在するかにつき、GFP キメラマウスを用いて解析した。その結果、骨髄から”mobilize”する細胞は終板付近には多く認められるが、線維輪、髄核と中心部に行くに従い減少し、椎間板には幹細胞プールからの細胞供給が極端に少なく、このことは外来から細胞を補充することの妥当性を示した。

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)

[雑誌論文] (計6件)

1. 査読有り Rutges J, Creemers LB, Dhert W, Milz S, Sakai D, Mochida J, Alini M, Grad S. Variations in gene and protein expression in human nucleus pulposus in comparison with annulus fibrosus and cartilage cells: potential associations with aging and degeneration. *Osteoarthritis Cartilage*. 2010;18(3):416-23.

2. 査読有り Murai K, Sakai D, Nakamura Y, Nakai T, Igarashi T, Seo N, Murakami T, Kobayashi E, Mochida J. Primary immune system responders to nucleus pulposus cells: evidence for immune response in disc herniation. *Eur Cell Mater*. 2010;19:13-21.

3. 査読有り Sakai D, Nakai T, Mochida J, Alini M, Grad S. Differential phenotype of intervertebral disc cells: microarray and immunohistochemical analysis of canine nucleus pulposus and annulus fibrosus. *Spine*. 2009;34(14):1448-56.

4. 査読有り Hiyama A, Gajghate S, Sakai D, Mochida J, Shapiro IM, Risbud MV. Activation of TonEBP by calcium controls β 1,3-glucuronosyltransferase-I expression, a key regulator of glycosaminoglycan synthesis in cells of the intervertebral disc. *J Biol Chem*. 2009;284(15):9824-34.

5. 査読有り Kobayashi Y, Sakai D, Iwashina T, Iwabuchi S, Mochida J. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor-related genes in human nucleus pulposus cell line. *Eur Cell Mater*. 2009;17:15-22.

6. 査読有り Gajghate S, Hiyama A, Shah M, Sakai D, Anderson DG, Shapiro IM, Risbud MV. Osmolarity and intracellular calcium regulate aquaporin2 expression through TonEBP in nucleus pulposus cells of the

intervertebral disc. J Bone Miner Res.
2009;24(6):992-1001.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：椎間板髄核幹/前駆細胞、その作成方法および用途

発明者：酒井大輔、持田讓治、安藤潔、中村嘉彦

権利者：学校法人 東海大学

種類：特許

番号：2010-077743

出願年月日：2010/03/30

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 大輔 (SAKAI DAISUKE)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：10408007

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：