

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592213

研究課題名(和文) 椎間板線維輪再生に向けた至的細胞ソースの解析研究

研究課題名(英文) Analysis of appropriate cell source for efficient annulus fibrosis regeneration

研究代表者

酒井 大輔 (SAKAI, Daisuke)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10408007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板障害は、脊椎の様々な疾患の原因となる。本研究は線維輪細胞を解析する基礎的研究である。我々はC57BL/6マウス尾椎線維輪由来の細胞培養法を確立した。さらに様々な臓器由来の間葉系幹細胞のマーカーのひとつであるCD146発現に着目し、細胞増殖および分化との関連を検討した。マウス線維輪組織を採取し、酵素処理で得られた細胞を培養、表面マーカーと多分化能を調べるた。その結果、マウス線維輪細胞は培養系で間葉系三系統の多分化能を示した。またCD146陽性線維輪細胞は、低酸素状態、TGF- β 1、R3-IGF1刺激に応じて増大し、線維輪再生に有益な分化の指標であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Altered function of the intervertebral disc leads to various degenerative spine disorders. We established an isolation method for retrieving purely annulus fibrosus cells from intervertebral disc of C57BL/6 mouse. We then tested whether CD146, a marker for mesenchymal stem cells in various organs, relates to proliferation and differentiation of annulus fibrosus cell. We isolated AF tissue from mouse and cultured isolated cells to analyze their cell surface markers and multi-potency. Result showed that mouse annulus fibrosus cells differentiated to three mesenchymal lineages. Furthermore, CD 146 positive annulus fibrosus cells became proliferative with hypoxia, TGF-beta 1 or R3-IGF1 stimuli suggesting its role as a useful differentiation marker for annulus fibrosus regeneration.

研究分野：整形外科学

キーワード：椎間板 再生医療 幹細胞 線維輪

1. 研究開始当初の背景

椎間板障害は、脊椎の様々な疾患の原因となり、その診療にかかる医療費は年間 1,700 億円超とされ、医薬経済に与える影響が大きい上に、その好発年齢は壮年期の男性に多いため社会的な医療問題となっている。科学的根拠に基づいた新規治療法を開発するためには、椎間板の細胞・分子レベルでの理解が必須である。椎間板は人体最大の無血管臓器という特性から、通常の組織修復機能である、血行を介した外部からの幹細胞誘導機能に乏しい。このため、本研究グループでは、これまで不明であった椎間板組織における内在性幹細胞ニッチの局在を解明するべく、マウスおよびヒトでの解析を行ってきた。

2. 研究の目的

椎間板変性は脊柱の不安定性に始まり変性疾患へと様々な病変のトリガーとなる重大な病態である。本研究は椎間板変性機序の解明と治療法の開発の一助となるべく、線維輪細胞を解析する基礎的研究である。これまでに申請者は椎間板細胞、とりわけ髄核細胞に着目し、髄核内在性幹細胞を表面マーカーにて分離する方法を開発した。椎間板を構成するもう一つの主コンポーネントである線維輪細胞については基礎的研究が少なく、今回の目的は、髄核とは発生学的に異なる起源を持つ線維輪細胞を表面マーカーを用い分離、その機能を解析することである。そしてその結果、線維輪の再生に最も適した細胞の形質を見極めることである。

3. 研究の方法

10 匹の 8-9 週齢の C57BL/6 マウス尾椎椎間板より、実態顕微鏡下に線維輪組織を採取し、酵素処理で得られた細胞を 10%FBS 含有 MEM 培地にて培養、酸素濃度を 2%、20% と設定し、細胞増殖と CD146 発現を比較した。マウス線維輪培養細胞(mAF)の多分化能を調べるため、骨、軟骨、脂肪の三系統への分化誘導を行い、所定の染色法により評価を行った。また、CD146 発現を増加させる因子についても調査し、CD146 陽性、陰性で細胞をソートし、得られた CD146(+)mAF、CD146(-)mAF の二集団についても間葉系の多分化能を評価した。

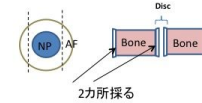
4. 研究成果

上記研究の結果、mAF は 2%酸素下で 20%酸素下に比べて 8.6 倍(N=3)の増殖を示し、CD146 陽性率は同じく 2%酸素下で 4.7 倍(N=3)の高値を示した。CD146 の陽性率は TGF- β 1、R3-IGF1 を含有する培地で 3 日間単層培養することにより、6.4%から 38.1%と約 6 倍(N=2)増大した。全 mAF は骨、軟骨、脂肪の三系統への多分化能を示したが、CD146(+)mAF、CD146(-)mAF はいずれも、骨、軟骨の二方向のみで脂肪への分化能は欠如していた。軟骨方向への 3D 培養におい

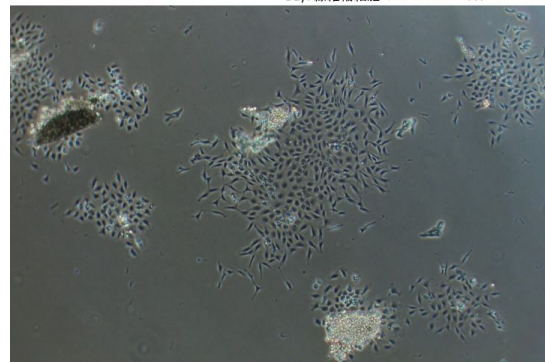
て、CD146(-)mAF では、軟骨様ペレットが形成されたが、CD146(+)mAF では、ペレット内部に、免疫染色にてタイプ I、およびタイプ II コラーゲン陽性を示す直線状の構造体が形成された。さらに、CD146(+)mAF はゲル収縮アッセイにて優れた機能を有する事が証明され、線維輪再生の至適細胞ソースとして利用される事が期待された。

酵素処理法

- ・表皮を除去した尾椎全体を、直ちに滅菌PBSに浸す
- ・椎間板髄核部で椎体を切り分ける (下図参照、骨周囲の結合組織は剥がさない)
- ・AFを切り取り、12ml FBSfree α MEMに集める (7椎間板/個体 x4~5個体 (実態顕微鏡下))
- ・Vortex 後、遠心分離、ペレットを x1 Triple Express 5ml 処理 37°C 30min, 160 r.p.m. Rotary shaker
- ・消化、未消化物をすべて、セルスレーナー100 μ mlに移しPBS洗浄 濾過されなかった組織をピンセットで一か所にまとめる
- ・まとめた組織をビベットマンチップの先端につけて新しいチューブに移す
- ・5ml 0.025% CollagenaseP で処理, 37°C 30min, Vibrator
- ・5ml PBSを添加し、遠心分離後、10%FBS α MEM(一個体あたり2.5ml)に分散し 6well plate に播く (例: 5匹 \rightarrow 5well)
- ・O₂ 2%, CO₂ 5% で培養する
- ・3~4日後、0.5ml/well 培地を追加する



Day7線維輪細胞コロニー X4



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8件)

1. Sakai D, Andersson GB. Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions. *Nat Rev Rheumatol.* (査読有)2015 Apr;11(4):243-256. doi: 10.1038/nrrheum.2015.
2. Sakai D, Grad S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease. *Adv Drug Deliv Rev.* (査読有)2015;84:159-171. doi: 10.1016/j.addr.2014.06.009.
3. Mochida J, Sakai D, Nakamura Y,

- Watanabe T, Yamamoto Y, Kato S. Intervertebral disc repair with activated nucleus pulposus cell transplantation: a three-year, prospective clinical study of its safety. *Eur Cell Mater.* (査読有)2015 Mar 20;29:202-12.
www.ecmjournal.org/journal/papers/vol029/pdf/v029a15.pdf
4. Hiyama A, Watanabe M, Katoh H, Sato M, Sakai D, Mochida J. Evaluation of quality of life and neuropathic pain in patients with low back pain using the Japanese Orthopedic Association Back Pain Evaluation Questionnaire. *Eur Spine J.* (査読有)2015 Mar;24(3):503-12. doi: 10.1007/s00586-014-3723-y.
5. Sakai D, Nishimura K, Tanaka M, Nakajima D, Grad S, Alini M, Kawada H, Ando K, Mochida J. Does disc degeneration recruit cells from the bone marrow? Migration of bone marrow-derived cells in a new tail-looping disc degeneration model in the mouse. *Spine J.* (査読有)2014 Nov 24. pii: S1529-9430(14)01749-5. doi: 10.1016/j.spinee.2013.07.491.
6. Likhitpanichkul M, Dreischarf M, Illien-Junger S, Walter BA, Nukaga T, Long RG, Sakai D, Hecht AC, Iatridis JC. Fibrin-genipin adhesive hydrogel for annulus fibrosus repair: performance evaluation with large animal organ culture, in situ biomechanics, and in vivo degradation tests. *Eur Cell Mater.* (査読有)2014 Jul 18;28:25-37. <http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol028/pdf/v028a03.pdf>
7. Pattappa G, Peroglio M, Sakai D, Mochida J, Benneker LM, Alini M, Grad S. CCL5/RANTES is a key chemoattractant released by degenerative intervertebral discs in organ culture. *Eur Cell Mater.* (査読有)2014;27:124-36. <http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol027/pdf/v027a10.pdf>
8. Benneker LM, Andersson G, Iatridis JC, Sakai D, Härtl R, Ito K, Grad S. Cell therapy for intervertebral disc repair: advancing cell therapy from bench to clinics. *Eur Cell Mater.* (査読有)2014 May 6;27:5-11. Review. <http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol027s/pdf/v027sa02.pdf>
- 〔学会発表〕(計4件)
- Sakai D. Intervertebral Disc Cell Regulation from Development to Adult Disease. Gordon Research Conference on Cartilage Biology & Pathology. 3/26/2015, (Galveston, Texas, USA)
- 酒井大輔, 中井知子, 額賀唯至, 持田讓治. 再生医療の最先端 椎間板再生 ES 細胞による細胞移植の可能性と線維輪再生に向けた新展開. 第87回日本整形外科学会学術総会, 5/23/2014 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)
- 酒井大輔, 中井知子, 檜山明彦, 持田讓治. 椎間板変性と臨床 未来への展望 幹細胞ニッチと転写因子制御による椎間板再生医療の近未来. 第87回日本整形外科学会学術総会, 5/24/2014 神戸国際会議場(兵庫県、神戸市)
- 酒井大輔, 持田讓治. 椎間板再生の今. 第86回日本整形外科学会学術総会, 5/24/2013 広島グリーンアリーナ(広島県、広島市)
- 〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 大輔 (SAKAI, Daisuke)
東海大学・医学部・准教授
研究者番号：10408007

(2) 研究分担者

持田 譲治 (MOCHIDA, Joji)
東海大学・医学部・教授
研究者番号：30129697

檜山 明彦 (HIYAMA, Akihiko)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：00514382

中井 知子 (NAKAI, Tomoko)
東海大学・医学部・特定研究員
研究者番号：20624589