

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791406

研究課題名（和文）椎間板内在性幹細胞の由来、ニッチ環境の解析から新規治療法への応用
研究課題名（英文）

Identifying the origin and niche environment of nucleus pulposus progenitor cells of the intervertebral disc and its therapeutic 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）：マウスおよびヒト椎間板髄核より内在性幹細胞の候補となる球状型コロニーを同定し、これを構成する細胞集団を特定するために数多くの表面マーカーにつきフローサイトメトリーを用いて検討したところ、Disialoganglioside GD2 と Tie2 と呼ばれるマーカーを発現する少数の細胞集団に細胞増殖能が高いことが判明した。Tie2+GD2+細胞から導出した球状型コロニーの免疫染色を行った結果、球状型コロニーは2型コラーゲンとプロテオグリカン合成能力に優れ、Tie2+GD2+NP 細胞の未分化性を示唆した。In Vitro において Tie2+GD2+NP 細胞は脂肪、骨、軟骨への分化能力を示した。Tie2+GD2+NP 細胞が椎間板組織の維持及び再構築能力を有するか否かを調べた結果、組織維持、再構築能力の高さを証明した。

研究成果の概要（英文）：

Despite many reports on the identification of endogenous stem/progenitor cell populations in various musculoskeletal tissues, no definitive cell population has been reported in NP tissue. Furthermore, the origin or niche that regulates the self-renewal and maintenance of NP stem/progenitor cells is also unknown. The primary goal of the current study was to identify a set of specific markers to isolate the cell population sharing universal stem cell characteristics from the NP. Then we sought to determine the presence of a stem-cell niche in NP tissue and the role of NP stem cells in ageing and degeneration of the IVD in humans. Results demonstrated that in mouse and human nucleus pulposus cell populations, isolated by defined surface markers possess stem cell characteristics, such as clonogenicity, self-renewal and multi-potent differentiation ability in vitro, and tissue maintenance ability in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：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

腰痛は二足歩行を開始した時点から人類の宿命であるとされ、その主たる原因は脊椎および周辺臓器に端を発する。体のまさに“Back Bone”をなす脊椎は仙尾椎を除く通常 24 個の独立した椎骨が安定性かつ可動性を獲得しつつ、脊柱管内において脊髄、馬尾という神経組織を保護する多彩な役割を担う複合臓器である。脊椎は前方を椎間板、後方を椎間関節により上下椎体との連結をなし、それらの可動性能により前後左右への屈伸と回旋運動を可能とする。椎間板はさらに脊椎にかかる軸圧を緩衝する役割を担っており、脊椎の生体力学的に重要な要素をなす。椎間板の機能不全は脊柱可動性の低下、アライメント不良を来し、やがて神経組織にも影響を与えうる椎間板ヘルニア、変性すべり症、変性側弯症、脊柱管狭窄症といった変性疾患の発症につながっていく。これら多くの疾患は腰痛を伴い、本邦における腰痛の有訴者率は男性では 1 位、女性では 2 位であり、社会の高齢化に伴い近年益々増加している。椎間板障害はその主因の 1 つであり、その診療にかかる医療費は年間約 1700 億円超とされ²⁾医療経済に与える影響も大きく、さらに椎間板障害の好発年齢は青壮年期の男性に多く、労働力への影響も大きい社会的医療問題といえる。我々は細胞移植による変性抑制を目指し、小から大動物に至る実験を継続し、細胞の種類としては自家活性化髄核細胞や未分化骨髄幹細胞、髄核細胞へ分化誘導を促した幹細胞などを検討してきた。本手法は我々のみならず、海外でも多数追試され細胞移植療法の将来性につき注目されている。しかし動物モデルの限界や構成細胞の発生、分化、運命、脊索性髄核細胞の意義などが未知であり、真の椎間板再生を目指すには椎間板内の微小環境における細胞レベルでの様々な変化、恒常性維持機構を解明する必要がある。

2. 研究の目的

椎間板はドーナツ型をした軟骨性の臓器であり、中心部の髄核(Nucleus Pulposus;NP)と周りを何周にも取り巻く線維性軟骨である線維輪(Annulus Fibrosus;AF)、そして隣接椎骨とを上下で連結する終板軟骨(Cartilaginous Endplate;EP)とで形成されている。ゼラチン状の NP は無血管臓器で大型のプロテオグリカンとコラーゲンで構成される細胞外基質(Extracellular Matrix;ECM)を多く含有する。NP は発生学的に脊索に由来するが周囲の臓器は間葉から発生することが判明している。今日まで髄核細胞は特異的細胞マーカーなどが不明であった為に他の細胞と区別される際には形

態学的特徴でのみに頼るしかなく、詳細な解析は不可能であった。ヒトを含む脊椎動物の一部において脊索由来髄核細胞が一生の早い時期に消失することが報告されている。脊索由来髄核細胞が消失したのち、その起源は未だ確定していないが形態学的には軟骨細胞に類似した軟骨様細胞が髄核を形成する。この細胞形質の転換は ECM 組成に影響を与え、含水量低下、線維化などその後の椎間板の加齢や変性、のちには腰痛や腰椎変性疾患に大きく関わると考えられている。一方、脊索由来髄核細胞を終生保持するマウス、ラットやブタなどの多くの動物種では椎間板変性は殆ど認められないことを考えると脊索由来髄核細胞や他の髄核細胞の制御機構の解明は椎間板障害の予防や椎間板の再生に有用な情報を提供するものと考ええる。

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。また幹細胞の可塑性維持やメンテナンスに周囲の微小環境、いわゆるニッチが重要であることも多数報告される。椎間板組織における内在性幹細胞の詳細な同定、ニッチの局在の報告は現在までに無く、造血系幹細胞が骨芽細胞と相互作用を持つように、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。本研究の目的は椎間板 NP 内における幹細胞性質を持つ細胞集団を特定するための表面マーカーを探索すること、そして NP 組織中の幹細胞ニッチを同定しヒトにおける椎間板の加齢変化における NP 内在性幹細胞の意義を見出すことにある。

3. 研究の方法

Institutional Review Board 承認の下、C57BL6 マウス(12 週齢、n=30)、SD 系ラット(16 週齢、n=3)、ビーグル成犬(24 ヶ月齢、n=3)の腰椎あるいは尾椎より各々髄核と線維輪細胞を trypsin、collagenase にて酵素処理し分離した。初代細胞を 400cells/dish でメチルセルロース上にて 28 日間培養、経時的に細胞増殖率、コロニー形成能、形態を評価した。次にヒト髄核細胞(18-52 歳、平均 33.8 歳、n=9)を同様の手法にて評価した。また出現したコロニーにつき免疫染色を行い基質合成能につき評価した。その後、in vitro および in vivo にてクローンレベルで多分化能を評価した。

4. 研究成果

球状コロニー形成髄核細胞のクローン形成能

クローン形成能と球状コロニー形成能は造血幹細胞、神経幹細胞、ES 細胞の特徴である。このような特徴を持つ細胞集団が椎間板髄核内に存在するか否かを検証するため、

C57BL/6 マウス尾椎椎間板より採取した NP 細胞をメチルセルロース上で培養したところ複数の付着型と球状型コロニーの導出を認めた。10 日間の培養で大多数のコロニーが付着型であり、付着型：球状型の比率は 3.5 : 1 であった。我々はこの球状型コロニーを CFU-NP と命名した。球状型コロニーを構成する細胞集団を特定するために数多くの表面マーカーにつきフローサイトメトリーを用いて検討したところ、Disialoganglioside GD2 と Tie2 と呼ばれるマーカーを発現する少数の細胞集団に細胞増殖能が高いことが判明した。これまで

glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor protein CD24 が分化型 NP 細胞のマーカーとして報告されている。GD2 が CD24 陽性細胞の一部に発現し、GD2+CD24+ から球状型コロニーの導出を確認、GD2-CD24+ 細胞からの導出は認められなかった。さらに 3-4% の少数の NP 細胞が tyrosine kinase receptor Tie2 陽性であり、のちに GD2+細胞へと分化した。フローサイトメトリーの結果をまとめると Tie2+GD2- 細胞が 10.2±2.9% (n=3) の Tie2+GD2+細胞を導出し、やがて Tie2-GD2-CD24+ cells へと最終分化するという分化傾向にヒエラルキーが存在することが判明した。

ヒト Tie2+GD2+NP 細胞における単細胞解析
単細胞からの自己複製能は幹細胞形質の重要な因子である。我々はヒト Tie2+GD2+NP 細胞の単細胞培養からでも球状型コロニーが導出され、二次コロニーも導出できることを証明した。NP 細胞の主要な役割は主に 2 型コラーゲンとプロテオグリカンで構成される ECM の産生である。Tie2+GD2+細胞から導出した球状型コロニーの免疫染色を行った結果、球状型コロニーは 2 型コラーゲンとプロテオグリカンに加えて神経幹細胞のマーカーである nestin 陽性であり、Tie2+GD2+NP 細胞の未分化性を示唆した。

Tie2+GD2+NP 細胞の組織維持、再構築能

Tie2+GD2+NP 細胞が椎間板組織の維持及び再構築能力を有するか否かを調べる目的でまず免疫不全マウスの皮下に細胞を注入した。すると 8 週間で皮下に軟骨基質で染色される組織構築を Tie2+GD2NP 細胞を注入した群にのみ認めた。さらに EGFP により遺伝的にマーキングした Tie2+GD2+細胞と Tie2-GD2-CD24+細胞を椎間板に傷害を加えた免疫不全マウス尾椎椎間板に移植し、Bioluminescence imaging を用いて評価した。その結果、Tie2+GD2+細胞を移植した群においてのみ 12 週間経ても組織内に認め、移植細胞が 2 型コラーゲンを産生し、組織維持、再構築能力の高さを証明した。

ヒト Tie2+GD2+NP 細胞の多分化能

In Vitro において Tie2+GD2+NP 細胞は脂肪、

骨、軟骨への分化能力を示した。RT-PCR の結果、Tie2+GD2+細胞は骨髄間質細胞に比べ Nanog, Oct3/4, Nestin, Musashi-1 などの未分化マーカーを強く発現、蛋白レベルにおいては Oct3/4, Nanog, cMyc, Sox2, klf4 などの ES 細胞マーカーも他の細胞集団に比べて高く発現していた。Nestin と Musashi-1 は神経幹細胞のマーカーと知られている為、神経分化能力も検証した。その結果 Tie2+GD2+NP 細胞は特別な誘導をかけずにニューロン、グリア系のマーカーを複数発現し神経方向への分化能力も合わせ持っていることが判明、Tie2+GD2+細胞の多分化能力の高さを証明した。

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 9 件)

1. Arai F, Hiyama A, Sakai D, Yokoyama K, Mochida J. The expression and role of non-canonical (PKC) signaling in nucleus pulposus cell metabolism. *J Orthop Res.* 2012 Mar 2. doi: 10.1002/jor.22095. 査読有り
2. Sakai D. Stem cell regeneration of the intervertebral disk. *Orthop Clin North Am.* 2011;42(4):555-62. 査読有り
3. Hiyama A, Sakai D, Arai F, Nakajima D, Yokoyama K, Mochida J. Effects of a glycogen synthase kinase 3 β inhibitor (LiCl) on c-myc protein in intervertebral disc cells. *J Cell Biochem.* 2011;112(10):2974-86. 査読有り
4. Hiyama A, Skubutyte R, Markova D, Anderson DG, Yadla S, Sakai D, Mochida J, Albert TJ, Shapiro IM, Risbud MV. Hypoxia activates the notch signaling pathway in cells of the intervertebral disc: implications in degenerative disc disease. *Arthritis Rheum.* 2011;63: 1355-1364. 査読有り
5. Hiyama A, Sakai D, Tanaka M, Arai F,

- Nakajima D, Abe K, Mochida J. The relationship between the Wnt/ β -catenin and TGF- β /BMP signals in the intervertebral disc cell. *J Cell Physiol.* 2010; 226: 1139-1148. 査読有り
6. Serigano K, Sakai D, Hiyama A, Tamura F, Tanaka M, Mochida J. Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res.* 2010;28:1267-75. 査読有り
7. Hiyama A, Sakai D, Risbud MV, Tanaka M, Arai F, Abe K, Mochida J. Enhanced intervertebral disc cells senescence by Wnt/beta-catenin signaling-induced matrix metalloproteinase expression. *Arthritis Rheum.* 2010;62:3036-47. 査読有り
8. 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. 査読有り
9. Watanabe T, Sakai D, Yamamoto Y, Iwashina T, Serigano K, Tamura F, Mochida J. Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 2010;28:623-30. 査読有り

[学会発表] (計6件)

1. 2010.11.4, International Conference Center, (Taipei, Taiwan) 16th Triennial Congress of the Asia Pacific Orthopaedic Association, Sakai D. Stem Cell therapy for disc repair.
2. 2010.10.15, 京都国際会議場(京都府), 第25回日本整形外科学会基礎学術集会, 酒井大輔, 持田讓治. 臨床への橋渡し研究の現況 関節軟骨・骨・椎間板(ヒト幹細胞指針以後) 椎間板再生のための細胞移植療法 臨床研究の進捗および幹細胞研究による新展開.
3. 2010.5.27, 東京国際フォーラム(東京都), 第83回日本整形外科学会学術総会, 酒井大輔, 持田讓治. 軟骨再生の基礎と臨床の進歩(椎間板を含む) 椎間板再生 細胞移植療法のその先に.
4. 2009.11.10, Moscone West Convention Center, (San Francisco, CA, USA), The 24th Annual Meeting of the North American Spine Society, Sakai D. Stem cell therapy in disc: What happens to transplanted disc cells?
5. 2009.6.24, Westin St. Francis, (San Francisco, CA, USA), Global Spine Conference, Sakai D. Biological treatments: cells-how do they work?
6. 2009.4.23, 神戸ポートピアホテル(神戸市), 第38回日本脊椎脊髄病学, 酒井大輔, 田村太, 芹ヶ野健司, 持田讓治. 椎間板再生医療における培養髄核細胞の質を簡便に評価できるアッセイの開発.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 椎間板髄核幹/前駆細胞、その培養方法および用途

発明者: 酒井大輔、持田讓治、安藤潔、中村嘉彦

権利者：東海大学 共同
種類：特許
番号：特願 2010-077743
出願年月日：2010/3/30
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