

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 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：24592212

研究課題名(和文) 椎間板線維輪組織由来の前駆細胞の分離と組織再生への応用

研究課題名(英文) Isolation and application of progenitor cells from annulus fibrosus of the intervertebral disc

研究代表者

中井 知子 (NAKAI, Tomoko)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：20624589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：変性椎間板の線維輪(AF)を修復するためAF由来前駆細胞の有効性を検討した。CD146は間葉系幹細胞のマーカーでありかつ、マウスAFの初代培養に発現があるためマーカーでソートしたCD146陽性細胞における間葉系への多分化能及びタンパク、遺伝子発現、コラーゲン内での収縮能を検討した。結果、CD146陽性細胞はTGF- β 1により強く誘導され、平滑筋タンパク22 α のmRNAを有意に高く発現した。コラーゲン内での三次元培養ではCD146陰性群に比べ有意に高い収縮能を示した。CD146陽性細胞は前駆細胞ではなく分化した細胞であり機能的な線維輪組織再生に有用な細胞であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Introduction; We focused on CD146, a marker for mesenchymal stem cells and detected in the cultured mouse annulus fibrosus (AF) cells to know whether it is a progenitor marker to restore functional AF tissue. AF cell culture was subjected to mesenchymal differentiation assay. Effects of transforming growth factor β 1 on CD146 expression was tested. Sorted CD146+ cells and CD146- cells were compared in their mRNA and protein expression. Morphology and contractile ability in three dimensional collagen gels were also determined. Results: CD146+ cells showed only weak osteogenic potential. Expression of CD146 was up regulated by TGF β 1. In CD146+ cells, significantly higher expression of mRNA of smooth muscle protein 22 alpha and higher collagen gel contractile ability were detected. Our findings suggest that CD146+ cells are differentiated AF cells that are highly contractile and capable of interaction between cell-cell or cell-matrix for remodeling functional AF tissue-like structure.

研究分野：整形外科学

キーワード：椎間板再生医療 線維輪組織再構築 線維輪培養細胞 前駆細胞 細胞表面マーカー コラーゲン収縮

1. 研究開始当初の背景

椎間板変性は髄核部での構成細胞の変化とそれによる基質変化、その後起こる線維輪構造の破綻が強く関係している。椎間板の細胞移植療法として髄核由来の培養細胞を再挿入する臨床研究が実施され、一定の効果が確認されている一方(文献1)、線維輪細胞の応用の可能性は世界的にも殆ど検討されていない(文献2)。椎間板の構造と耐荷重性の維持に不可欠な線維輪組織の修復は未解決の課題である。

我々は低酸素(2%)のインキュベータにおいてマウス線維輪由来の細胞を培養する方法を確立し、培養皿から酵素処理にて細胞を回収する際、トリプシンのみならずコラゲナーゼを混合することで細胞同士のアグリゲーションを解消し、フローサイトメトリーでの表面マーカーの解析に着手していた。マウスはヒトに次いで信頼できる抗体製品が幅広く入手できる動物種である。さらに正常マウス椎間板においては、髄核と線維輪の境界が比較的明瞭に識別できる利点があるため、実体顕微鏡下での組織採取を行い、可能な限り純粋な線維輪組織を材料として研究を開始した。

2. 研究の目的

線維輪はコラーゲンに富む線維状の組織でありゲル状の髄核組織を同心円状に取り巻くことで、椎間板の機械的な強度を保っている。本研究では、マウス線維輪由来培養細胞中に再生力に富む前駆細胞が存在すると仮定し、表面マーカーによりその分離同定を試みる。細胞移植療法を目的として、マウス尾椎線維輪細胞を培養し間葉系幹細胞のマーカーのひとつであるCD146を発現する細胞に着目し組織再生能を検討する。

3. 研究の方法

培養細胞は8-9週齢のC57BL/6Jマウス、通算160匹の尾椎椎間板線維輪組織より調製した。1バッチ6-10匹の線維輪組織を酵素処理後、得られた細胞を2%酸素下に10% FBS含有MEMにて3週間培養し実験材料とした。

以下mAF(マウス線維輪培養細胞)と記す。まず培養系にて骨、軟骨、脂肪の間葉系三系統への分化誘導を実施しmAFの多分化能を調べることにより前駆細胞を含む可能性を検討した。さらにCD146陽性、陰性でソートした群についても同様のアッセイを行った。

なお、微小なマウス線維輪組織より得られる細胞数は少なく、解析をより確実にするためCD146誘導培地(IDM)を検討した。その結果、有意な促進効果を認めたため以下の以降の実験にはIDMで3日培養しCD146発現を誘導した細胞を用いることとした。具体的な実験方法を述べる。

(1)間葉系三系統への分化誘導。

(2)CD146発現を促進する因子としてTransforming growth factor -1(TGF -1)

Insulin-like growth factor-1(IGF-1)の効果を検討。基本培地を5% FBS含有DMEM:F12(1:1)とし、5 μ g/ml インスリン、5 μ g/ml トランスフェリン、5 ng/ml 亜セレン酸 これらの因子を配合した培地をIDMとした。

(3)ソーティングで得たCD146+、CD146-群における遺伝子発現をリアルタイムPCRにて検討し、ソートした細胞をチャンバースライドに付着させ4% PFA固定後、タンパク発現を免疫蛍光抗体法により検討した。

(4)タイプIコラーゲンゲル内でGel Contraction Assayに供しCD146+細胞の機能の評価した。具体的には、最終濃度1.8 mg/mlとなるように調製したタイプIコラーゲン溶液に2.2 x 10⁵個/mlの細胞を浮遊し24wellプレートに0.5mlずつ添加し37で1時間ゲル化させたのち、0.5mlの増殖培地を加えて24時間培養後、ゲル表面積を計測し収縮率を求めた。

(5)8週齢のC57BL/6Jマウス尾椎線維輪組織より凍結切片を作成し免疫染色し、CD146+細胞の局在を特定した。

4. 研究成果

(1)未ソートの線維輪培養細胞は骨、軟骨、脂肪の三系統への多分化能を示したが、CD146陰性細胞は骨・軟骨へ、CD146+細胞は骨および不完全な軟骨分化(アグリカン陽性タイプIIコラーゲン陰性)を示した。したがってCD146は前駆細胞マーカーではなく、より分化した細胞のマーカーであることが示唆された。

(2)CD146発現はTGF -1、IGF1の添加により有意に増加を示した。(図1、3.43 \pm 0.97倍、mRNA 3.21 \pm 0.44倍、P<0.05、N=4)

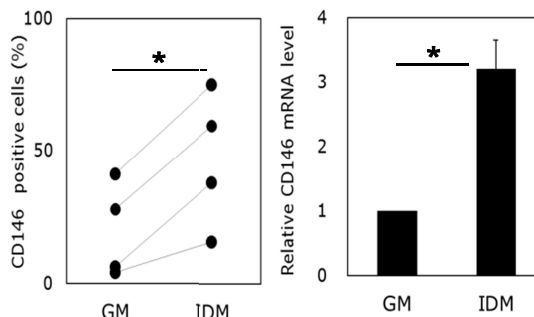


図1.GM:増殖培地 IDM: TGF -1, IGF 添加培地

(3)リアルタイムPCRの結果、CD146+群において、平滑筋(SM)22 mRNA発現が陰性に対し2.3倍(P<0.05、N=4)と有意に増加した。蛍光抗体法でもCD146+群にてSM22タンパク、直線状のF-アクチンの発達やより広範な細胞間の連結、タイプIコラーゲン分布が見られた。一方CD146-ではF-アクチンは細胞膜付近に局在、タイプIコラーゲンは細胞質内部に集中していた(図2、スケールバーは50 μ m)。

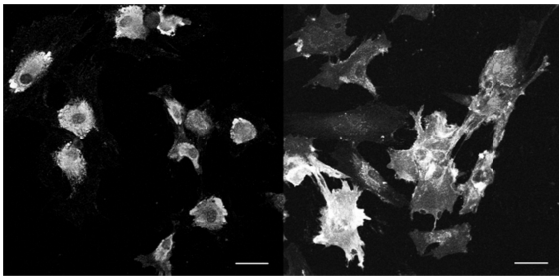


図 2. CD146- CD146+

(4) Gel Contraction Assay の結果、CD146 + 細胞は CD146-細胞に比べてゲル表面が、 $75 \pm 2\%$ (N=4、 $P < 0.05$) と有意に収縮し、より強い細胞収縮能を示した(図 3)。

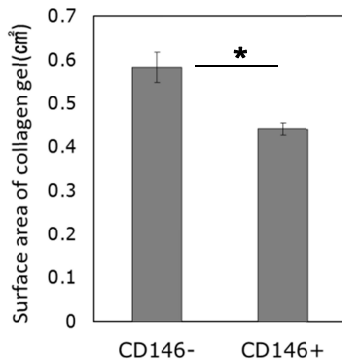


図 3. CD146- CD146+

(5) 組織染色の結果、CD146 + 細胞は線維輪組織の再外層に局在することが明らかとなった(図 5、スケールバーは $50 \mu\text{m}$)。

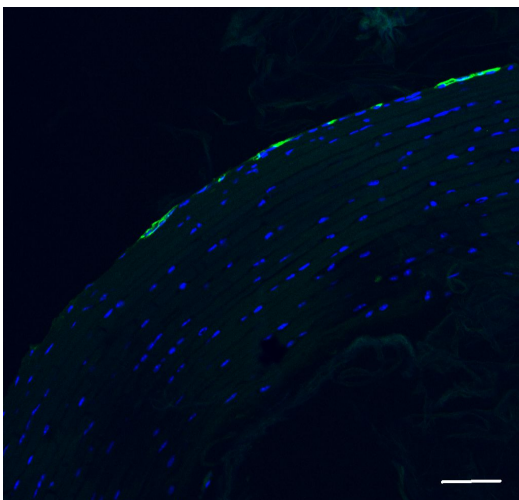


図 5. 抗 CD146 染色, Alexa 488, 核染 ; DAPI

以上の実験結果より、CD146 は TGF- β 1 により発現が強く誘導され、F アクチンの重合を促進する SM22 (文献 3) の発現と有意に関連のある因子であると考えられた。コラーゲンゲル内での三次元培養では CD146 陽性細胞は、陰性群に対し有意に高い収縮能を示した。近年、培養系においてヘテロジニアスであるといわれるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の CD146 陽性細胞は、血管平滑筋細胞系へと傾倒した細胞集団を特定するマーカーであるとの報告がある(文献 4)。一方、本研究における mAF での間葉系三系統への分化能評価の結果からは、CD146 陽性細胞は前駆細胞ではなく分化した細胞であると結論づけられた。さらにマウス線維輪組織では、線維輪再外層に CD146 陽性細胞の局在を認め、単層培養系において維持増殖可能であり、三次元培養環境に置かれた場合、マトリクスへの付着や細胞同士の相互作用を通して、収縮能に富むフレキシブルな線維輪組織を再生しうる細胞であると考えられた。細胞膜表面に露出部分を持つ接着因子(文献 5)である CD146 は、このような形質を発現する線維輪細胞の表面マーカーとして、培養細胞の管理や細胞選別に役立つ可能性が示唆された。

<引用文献>

1. Mochida J, Sakai D, Nakamura Y, Watanabe T, Yamamoto Y, and Kato S : Intervertebral disc repair with activated nucleus pulposus cell transplantation: a three-year prospective clinical study of its safety. *European cells and materials*, 2015, 29:202-212
2. Samuel P. Veres B, Peter A. Robertson, Neil D Broom: Disc Lesions and the Mechanics of the Intervertebral Joint Complex. *SPINE*, 2008, 33: 2711-2720
3. Li L MJ, Cserjesi P, Olson EN: SM22 alpha, a marker of adult smooth muscle, is expressed in multiple myogenic lineages during embryogenesis. 1996, 78:188-195
4. Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, Gadelorge M, Sensebe L, Bourin P: CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *Journal of cellular and molecular medicine* 2014, 18:104-114
5. Zhaoqing Wang , Xiyun Yan : CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Letters*, 2013, 330: 150-162

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

中井知子、酒井大輔、中村嘉彦、持田譲治、「マウス線維輪培養細胞の分化過程における CD146 の発現について」第 28 回日本整形外科基礎学術集会、2013.10.18、幕張メッセ国際会議場(千葉県、千葉市)

中井知子、酒井大輔、中村嘉彦、持田

譲治、「マウス線維輪培養細胞に発現する CD146 の機能」、第 29 回日本整形外科基礎学術集会、2014.10.10、城山観光ホテル（鹿児島県・鹿児島市）

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

(3)連携研究者

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