

ラット椎間板変性モデルに対する
脱分化脂肪細胞（DFAT）移植の治療効果
（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

中山 洵志

修了年 2015 年

指導教員 徳橋 泰明

【目的】 Matumoto ら⁽¹⁾は皮下脂肪から単離した成熟脂肪細胞を天井培養という方法で体外培養することにより調製される脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell : DFAT) が、高い増殖能と間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell : MSC) と同等の多分化能を示すことを明らかにした。今回、人工的に椎間板変性を生じさせたラットの椎間板に DFAT を移植し、椎間板再生効果を示すかについて検討した。

【方法】 体重約 300g の雄性 Sprague-Dawley(SD)ラットに対し、X 線透視装置を用いて椎間板高を測定した後、Issy ら⁽²⁾の方法に従い、尾椎の椎間板組織 Co11/Co12 及び Co13/Co14 を 21G 針にて、経皮的に 5 回×6 方向 (計 : 30 回)穿刺を行い、椎間板変性モデルを作製した。穿刺 1 週間後に傷害椎間板内 (Co11/Co12 及び Co13/Co14) に DFAT (5×10^4 / 50 μ l Phosphate buffered saline(PBS), DFAT 群, n=13) または同量の PBS (Control 群, n=13)を注射した。移植後 8 週間まで経時的に X 線撮影を行い、椎間板傷害前に対する傷害後の椎間板高の比率 % Disc height index(%DHI)を算出し、両群を比較した。また、移植 4 週間後、8 週間後に尾椎の切片標本を作成し、Hematoxylin & Eosin(HE)染色、免疫組織学的検討として髓核細胞の特異的表面マーカーである CD24 に対する免疫染色にて組織学的評価を行った。移植した DFAT の局在、髓核細胞への分化の有無を検討するため、SD ラット(n=4)Co11/12 および Co13/14 に対し椎間板穿刺処理を行い、1 週間後に Green fluorescent protein(GFP)トランスジェニックラットより調整した DFAT (5×10^4 / 50 μ l PBS)を傷害椎間板内に注射した。移植 4、8 週後に尾椎を摘出し、凍結切片を作成した。切片は抗 GFP 抗体および抗 CD24 抗体を用いた蛍光免疫染色を行い、組織学的所見により椎間板細胞の再生能や増殖能について評価した。

【結果】

穿刺による椎間板傷害を行った結果、椎間板変性モデルに対する X 線学的評価では、穿刺 1 週間後より傷害部位(Co11/Co12 および Co13/Co14)では、非傷害部位 (Co12/Co13) に比べ椎間板高の減少がおり、穿刺 2、4、8 週間後においても持続していた。また、組織学的評価では、穿刺後 2 週間後より、髓核細胞が消失し、細胞外マトリックスに置換される所見が認められた。同様の所見は、穿刺 4、8 週間後にも認められ、持続的な髓核の傷害・消失と細胞外マトリックスの増生が認められた。計 14 頭のラットの内 12 頭のラットを用い、傷害 2、4、8 週の時点において各 4 頭ずつ組織学的検討を行った結果、全例において髓核組織の消失が認められた。以

上の結果より、少なくとも傷害後 8 週間持続する椎間板変性モデルが再現性良く作製されることを確認した。

椎間板変性モデルラットに対する DFAT 移植の効果を検討した結果、移植 2 週間後における X 線学的評価では、DFAT($5 \times 10^4 / 50 \mu\text{l}$ PBS)を椎間板内に注入した群(DFAT 群)では、同量の PBS を注射した群(Control 群)に比べ、傷害を受けた椎間板の狭小化が抑制される所見が認められた。移植 8 週間後も同様に DFAT 群では傷害を受けた椎間板間隙の高さが保持される傾向が認められた。その結果、傷害・細胞移植部位である Co11/Co12 では、傷害 1 週間後より%DHI の低下が認められた。DFAT 群では、移植 2 週間後より Control 群に比べ、%DHI が有意($p < 0.05$)に高値となった。同様の結果は、もう一カ所の傷害、移植部位である Co13/Co14 の椎間板でも認められた。この椎間板では、DFAT 群は、移植 3 週間後より%DHI が有意に高値となった。%DHI の両群間における差は移植 8 週間後まで持続的に認められた。これらの結果から、傷害椎間板への DFAT 局所注入により、椎間板間隙の狭小化が改善することが明らかになった。病理組織学的には移植 4 週間後の傷害椎間板組織(Co11/Co12、Co13/Co14)において、両群とも髄核構造は消失し、結合組織に置換されている所見が認められた。DFAT 群の 9 例中 5 例では、椎間板辺縁に、不定形の腔胞をもつ髄核細胞に類似した形態を示す細胞塊が認められた。一方、Control 群ではこのような所見は認められなかった。移植 8 週間後の傷害椎間板組織では、両群とも中心部の髄核は消失したままで、細胞外マトリックスの著明な増生が認められた。また、DFAT 群の一部では、椎間板辺縁部に線維に取り囲まれた分葉状の髄核様組織が認められ、4 週目のものと比較して、大きさは大きく、より成熟した組織を形成していた。CD24 で免疫染色を行ったところ、この部位に存在する細胞が陽性を示し、髄核細胞の形質を有していることが明らかになった。以上の結果より、傷害を受けた椎間板に DFAT を移植すると、正常の部位ではないものの髄核様組織を誘導できることが明らかになった。

移植 DFAT の局在解析のため、GFP トランスジェニックラットに由来する GFP 標識 DFAT を傷害椎間板に移植した結果、移植 4 週後の検体において、椎間板辺縁に出現した髄核様組織を構成する細胞集団は CD24 陽性を示し、その一部は CD24、GFP 二重陽性を示した。移植 8 週間後の検体では、4 週目の検体と比較して、より大きく、成熟した髄核様組織が認められた。この組織は、4 週目の検体と同様に CD24、GFP 二重陽性を示す細胞が多数認められた。以上の結果より、移植した DFAT が直接髄核様細胞に分化していることが明らかになった。

【考察】

椎間板変性モデルに対する DFAT 移植の効果を検討した結果、傷害椎間板に DFAT を局所注入した群(DFAT 群)は、PBS を注入した群(Control 群)に比べ、椎間板間隙の狭小化が有意に改善することが明らかになった。今回、DFAT 群における椎間板高の増高作用は DFAT の直接作用であることが示唆された。今後、DFAT と骨髄 MSC や髓核細胞などとの椎間板再生効果を同一移植条件で直接比較し、その差異を評価する必要がある。また、非傷害椎間板に DFAT を注入し、髓核様組織ができるのかどうかについても比較検討していく必要がある。

一方、DFAT 移植により誘導された髓核様組織は、本来の局在部位である線維輪の中央ではなく、線維輪の辺縁部に限局していた。この理由を明らかにするため、今後、血流の関与を含めた DFAT から髓核細胞への分化メカニズムを明らかにすることや DFAT と共に線維輪細胞を共移植するといった方法などを検討することにより、正常部位への髓核組織の誘導や、より機能的な髓核組織の誘導が可能となると思われる。また、今後よりヒト椎間板変性症に近い週齢を重ねた慢性変性や過重負荷のかかる変性モデルにて同様の治療効果が得られるかについても検討したり、ヒト椎間板変性症に臨床応用することを考慮し、運動機能などの椎間板変性症に伴う臨床症状の変化についても評価していく必要がある。

【結論】

本研究では、椎間板穿刺によるラット椎間板変性症モデルを作成し、このモデルの傷害椎間板に DFAT を局所注射することにより、椎間板の修復・再生が起こるかについて検討した。その結果、DFAT 注入により椎間板間隙の狭小化抑制が認められ、移植した DFAT の一部は髓核細胞へ分化している所見が認められた。DFAT は、ドナー年齢に影響されず均質な多能性細胞を大量調製できることから、椎間板変性症に対する新たな細胞治療用細胞ソースとして有望である可能性が示唆された。

【引用文献】

- [1] Matsumoto T, Kano K, Kondo D et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol.* 2008; **215**: 210-22.
- [2] Issy AC, Castania V, Castania M et al. Experimental model of intervertebral disc degeneration by needle puncture in Wistar rats. *Braz J Med Biol Res.* 2013; **46**: 235-44