

## 論文の内容の要旨

氏名：宮 方 啓 行

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：受動喫煙によるラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞(DFAT)移植の効果

日本において腰痛は、最も多い国民有訴疾患である。腰痛の原因は多種にわたるが、椎間板変性はその一因として重要である。椎間板の変性は、加齢、遺伝的素因、喫煙などが危険因子となり、髄核細胞の減少やプロテオグリカン産生低下を特徴とする不可逆的变化を示す。以前より喫煙は、腰痛や椎間板変性との関連が指摘されており、ニコチンの静脈内投与や、受動喫煙により椎間板変性が誘導できることが動物モデルで明らかにされている。変性した椎間板に対する根本的な治療は、現在までに確立されていない。近年、椎間板変性に対して多血小板血漿(Platelet-rich plasma: PRP)による増殖因子治療や、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)を用いた細胞治療などの椎間板再生を目標とする研究がなされている。脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)は、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得られ、高い増殖能と MSC と同等の多分化能を有する細胞群である。DFAT は患者の年齢や基礎疾患に影響されず大量調製できるため、椎間板変性症に対する治療用細胞として有用である可能性がある。本研究は、喫煙によって誘導された椎間板変性ラットに対し、DFAT を静脈内投与し、その治療効果を検討した。

Sprague Dawley (SD)ラットを DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群（各群 n = 6）に分け、DFAT 群、PBS 群は受動喫煙装置を用いて 8 週間の受動喫煙を行った。DFAT 群は喫煙下に DFAT  $1 \times 10^6$  個/0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与し、PBS 群は喫煙下に Phosphate buffered saline (PBS) 0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与した。Control 群は非喫煙、非投与下で 8 週間飼育した。実験開始 8 週間後に、椎体を摘出し、尾椎は組織切片標本を作成し HE 染色、EVG 染色、アリシアンブルー染色を行い、組織学的評価を行った。腰椎椎間板からは髄核を摘出し、髄核内プロテオグリカン量を測定すると共に、軟骨関連遺伝子（アグリカン、バーシカン、Sox9）の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。さらに肺組織から total RNA を抽出し、免疫制御関連遺伝子 Hepatocyte growth factor (HGF)、Prostaglandin E2 (PGE2)、Tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6)、Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$  1) の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法を用いて測定した。

各群の尾椎椎間板の組織学的検討において、喫煙処理を行った PBS 群は、Control 群に比べ髄核組織の細胞密度の減少が認められた。DFAT 群は PBS 群と比較して椎間板の変性程度が軽度であった。髄核内のプロテオグリカン量は、Control 群と比較して PBS 群で 50%以上の低下を認めた。一方 DFAT 群は PBS 群に比べプロテオグリカン量の減少が抑制される傾向を認めた。髄核内のアグリカンと Sox9 の遺伝子発現量は、Control 群と比較して PBS 群で有意( $p < 0.05$ )に減少していた。さらに、DFAT 群は PBS 群と比較しアグリカンと Sox9 の遺伝子発現量の減少が有意( $p < 0.05$ )に抑制された。肺組織の遺伝子発現解析では、DFAT 群は PBS 群と比較して、免疫制御関連遺伝子である HGF と PGE2、TSG-6 の発現量が有意( $p < 0.05$ )に高値であった。

これらの結果より、受動喫煙ラット椎間板変性モデルに対し DFAT 静脈内投与は椎間板変性を抑制する作用があることが明らかになった。また DFAT の椎間板変性抑制メカニズムとして肺組織からの免疫制御因子の発現、分泌が関与している可能性が示唆された。DFAT は椎間板変性症に対する細胞治療ソースとして有望であると考えられた。