

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

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系整形外科学専攻

宮方 啓行

修了年 2016 年

指導教員 徳橋 泰明

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

日本大学大学院医学研究科博士課程  
外科系整形外科学専攻

宮方 啓行

修了年 2016 年

指導教員 徳橋 泰明

## 目次

概要	・ ・ ・ ・ ・ 1
諸言	
1、はじめに	・ ・ ・ ・ ・ 3
2、椎間板の構造	・ ・ ・ ・ ・ 4
3、椎間板の変性	・ ・ ・ ・ ・ 5
4、タバコによる影響	・ ・ ・ ・ ・ 6
5、受動喫煙によるラット椎間板変性モデル	・ ・ ・ ・ ・ 7
6、椎間板変性症に対する臨床的治療	・ ・ ・ ・ ・ 7
7、椎間板変性に対する再生治療	・ ・ ・ ・ ・ 8
8、DFAT について	・ ・ ・ ・ ・ 10
目的	・ ・ ・ ・ ・ 10
対象と方法	・ ・ ・ ・ ・ 11
結果	・ ・ ・ ・ ・ 15
1. 受動喫煙ラットにおける椎間板組織所見の比較	
2. 受動喫煙ラットにおける髄核内プロテオグリカンの定量比較	
3. 受動喫煙ラットにおける髄核内軟骨関連遺伝子発現の比較	
4. 受動喫煙ラットにおける肺組織の免疫制御関連遺伝子発現の比較	
考察	・ ・ ・ ・ ・ 17
まとめ	・ ・ ・ ・ ・ 21
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 22
図表	・ ・ ・ ・ ・ 23
引用文献	・ ・ ・ ・ ・ 34
研究業績	・ ・ ・ ・ ・ 43

## 《 概要 》

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変化を示す。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。腰椎椎間板からは髓核を摘出し、髓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 群に比べ髓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。髓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。髓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。

## 《 諸言 》

### 1. はじめに

日本人の平均寿命は男性が 80.21 歳、女性が 86.61 歳であり、女性は世界で第 1 位である（厚生労働省統計データベース 平成 25 年簡易生命表の概況 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life13/>）。また、65 歳以上が全人口の 25.1%を占め、世界でも有数の長寿大国である（内閣府ホームページ 平成 25 年度高齢化の状況及び高齢社会対策の実施状況 <http://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2014/gaiyou/index.html>）。その日本において腰痛は国民有訴率の第 1 位であり、また国民の約 8 割が一生涯で腰痛を経験するとされている（厚生労働省統計データベース 平成 22 年度国民生活基礎調査 2010 <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa10/3-1.html>）。腰痛の原因は、外傷、腫瘍、感染など多種にわたり、椎間板の変性も原因となる。椎間板が変性を起こすと脊柱が変形し、全脊椎のアライメントが崩れる脊椎後側弯症になる。現在、脊椎アライメントを矯正する手術が行われ注目を集めている。しかし、脊椎後側弯症に対する手術は、骨盤から胸腰椎レベルまでの固定術を要し、それに伴いスクリュウの緩みや脱転、隣接椎間障害、隣接椎体骨折といった多くの問題点が存在する。

椎間板変性に関する因子として、遺伝的要因、力学的負荷、加齢、喫煙などが挙げられる。これまでに喫煙と椎間板変性の関連についてさまざまな報告がされているが、当整形外科教室においてもラット喫煙モデルを使用し椎間板の変性が惹起されることを報告している<sup>1-5)</sup>。椎間板変性に対する根治治療は現在のところ存在せず、椎間板を再生したり変性を抑制することはできていない。近年、椎間板変性に対する有効な治療法を確立するため様々な研究成果が報告されている。例えば、多血小板血漿（Platelet-rich plasma: PRP）などの成長因子治療<sup>6-7)</sup>、遺伝子治

療<sup>8-9)</sup>、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) などを用いた細胞治療<sup>10-11)</sup>、などである。

今回、我々は Matsumoto ら<sup>12)</sup>によって開発され、MSC と同等の多分化能を示す脱分化脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT) を用いて、喫煙によって引き起こされた椎間板変性を抑制できるかを検討した。そして椎間板変性症に対する DFAT を用いた細胞治療の可能性について考察した。

## 2. 椎間板の構造

椎間板は椎体と椎体を連結し脊柱の多様な動きを可能にし、力学的負荷を緩衝することから、支持性と可動性の役割を併せ持っている。椎間板は円盤状の線維軟骨組織であり、中央に存在するゲル状の髄核とこれを取り囲む線維輪、椎体との境界をなす軟骨終板から構成されている。構造的特徴から椎間板は、軟骨終板を介した拡散によって栄養補給がなされ、人体最大の無血管組織であることが知られている。

### ① 髄核

椎間板体積の 40～60%を占め、椎間板の中央やや後方部に存在し、肉眼的には白色ゲル状の組織である。無構造の基質内に髄核細胞がまばらに存在し、椎間板のコラーゲンやグリコサミノグリカンの産生に寄与している。髄核細胞は脊索に由来し、ヒトでは 10 歳までに軟骨様細胞に置換される。髄核は、乾燥重量の約 70%がプロテオグリカンで、約 15%が II 型コラーゲンで構成される。椎間板に多くみられるプロテオグリカンはアグリカンであり、アグリカンのコアタンパクに付着し高度に負の電荷を帯びた糖鎖がグリコサミノグリカンである。グリコサミノグリカンが中和する陽イオンを引き付けることで椎間板基質内に高イオンつまり膨

張圧を作り出している。

## ② 線維輪

線維輪は、乾燥重量の約 25%がプロテオグリカンであり、約 50～60%が I 型コラーゲンで構成される。線維輪は外側と内側にわかれており、外層は I 型コラーゲンで、内層になるに従って II 型コラーゲンの比率が高くなる。外側線維輪は大部分がコラーゲンを含んだ緻密な結合織による厚い層板を形成し、構成細胞の大部分は線維芽細胞である。線維輪の各層は椎体終板と 60° の角度でおのおの平行に存在している。連続した層板において線維は方向を変え、脊椎の軸回旋に抵抗し、屈曲・伸展・側屈を可能にする。内側線維輪は膠原線維を伴った軟骨基質からなる。外側線維輪と同様に斜走し、椎体終板表面の硝子軟骨より起始・停止する。

## ③ 軟骨終板

厚さが 1～2mm の軟骨層で椎体の上下の皮質骨面を覆う。組織学的には椎体側は硝子軟骨で椎間板側が線維軟骨である。椎間板は無血管組織であるため、軟骨終板を介して栄養を椎間板内に拡散している。

## 3. 椎間板の変性

ヒトの椎間板は人体に存在する結合組織の中で最も早く変性変化を起こすことが知られている。椎間板変性の要因として、加齢<sup>13)</sup>、脊椎に加わる反復性の軸圧負荷や振動<sup>14)</sup>、遺伝的要素<sup>15-16)</sup>、肥満<sup>17)</sup>、喫煙<sup>17-18)</sup>が挙げられる。椎間板変性においてプロテオグリカン量の低下が最も重大な生化学的変化である<sup>19)</sup>。髓核細胞の減少によって起こるプロテオグリカンの産生低下が、椎間板の水和作用を減弱させ、椎間板高の低下をもたらし、椎間板の力学的強度を低下させる<sup>19-20)</sup>。また、椎間板の変性



過程において細胞外基質の組成変化が炎症性メディエーターを活性化させ、Matrix metalloproteinases(MMP)<sup>21)</sup> や A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs(ADAMTS)<sup>22)</sup> がアグリカンを分解し、さらなる椎間板の変性を引き起こす。椎間板変性の進行とともに、周囲の線維輪は層状構造の乱れから亀裂を認め、内部の髄核は弾力性が低下し固体化する<sup>23-24)</sup>。そして、椎間板変性の結果、脊椎の不安定性や椎間板の突出・脱出が腰痛や周囲の神経組織を圧迫刺激し下肢痛を惹起する<sup>25)</sup>。

#### 4. タバコによる影響

タバコは約 4,000 種類の化学物質を含み、そのうち約 200 種類の有毒物質が存在する。それらの有害物質は、心疾患や多種の癌、肺疾患など多くの健康被害をもたらす。またタバコは腰痛<sup>26)</sup>との関連も深く、椎間板変性を引き起こすことが報告されている<sup>27)</sup>。その原因となる代表的な化学物質として、ニコチン、一酸化炭素、タールなどが挙げられる。ニコチンは副腎皮質を刺激しカテコラミンを遊離し、交感神経系を刺激することで末梢血管の収縮、血圧上昇、心拍数の増加をもたらす。また血中リポ蛋白の変性を起こし、血管内皮障害を伴うアテローム性動脈硬化を惹起する。一酸化炭素は、酸素の約 200 倍以上の親和性で血液中のヘモグロビンと結合し、慢性的な酸素欠乏状態を作り出す。椎間板は椎体終板に流入する Capillary beds から血流を維持している。そのため、血管収縮<sup>28)</sup>、動脈硬化性血管変化<sup>29)</sup>、CO ヘモグロビンの増加<sup>28)</sup>などによって、椎間板の血流低下や低酸素、低栄養が引き起こされ、椎間板は加速度的に変性する。

## 5. 受動喫煙によるラット椎間板変性モデル

Uematsu ら<sup>1)</sup>は家兎にニコチンを投与し、椎間板の変性を試みた。ヘビースモーカーの血中ニコチン濃度に相当する量(200  $\mu$ g/ml)のニコチンを4週間持続静注した結果、コラーゲン合成能とプロテオグリカン合成能を表す<sup>3</sup>H-proline と<sup>35</sup>S-sulfate の椎間板細胞への取り込みが有意に低下し、ニコチン毒性によって椎間板変性が誘導できることが示された。Oda ら<sup>30)</sup>は、受動喫煙ボックスを使用し、ラットに8週間受動喫煙を行った。その結果、ラットの椎間板が菲薄化し、線維輪・髄核ともに変性を認め、椎間板組織内のIL-1 $\beta$ が増加したと報告している。Nemoto ら<sup>4)</sup>は、この受動喫煙ラット椎間板変性モデルを使用し、変性した椎間板が禁煙によって修復するかを検討した。その結果、禁煙後8週間で髄核、線維輪の変性は軽くなる傾向であったと報告している。また Uei ら<sup>5)</sup>は受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおいて Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) 遺伝子の発現増加が認められ、喫煙による組織障害に対して修復反応が働く可能性を報告している。

## 6. 椎間板変性症に対する臨床的治療

椎間板変性による腰痛に対する治療法として、保存療法と手術療法に大別されるが、まずは保存療法が基本となる。保存療法には、運動療法と薬物治療があり、運動療法として体幹の筋力トレーニングやストレッチなどが行われ、薬物治療としてアセトアミノフェンや NSAIDS、三環系抗うつ薬、オピオイド、抗けいれん薬などが使用される。これらの内服薬にて疼痛のコントロールが得られない場合は、当該椎間板にブロック注射が施行される。これらの保存療法に抵抗性の場合、椎体間固定術などの手術療法が選択される。椎体間固定術では、変性した椎間板を摘出しその部位に骨移植を行った後、当該椎間板を架橋するようにスクリュー

一固定を行う。いずれの治療法においても変性した椎間板を再生させるものではなく、対症療法による疼痛コントロールが目的である。

## 7. 椎間板変性に対する再生治療

椎間板の再生を目的とした研究として、成長因子、遺伝子、細胞などを用いた治療法の開発や臨床研究が行われている。

### ① 成長因子治療

変性した椎間板の修復、再生に関わる種々の成長因子の存在が明らかとなり、また椎間板に直接注射する手技が容易なことから、成長因子治療に関する多くの基礎研究が行われている。1991年に Thompson ら<sup>31)</sup>は、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )や Epidermal growth factor (EGF)を椎間板内に注射することでプロテオグリカンの合成を増幅させたと報告した。その後 Osteogenic protein-1 (OP-1)<sup>32)</sup>、Growth and differentiation factor-5 (GDF-5)<sup>33)</sup>などの成長因子群も、椎間板細胞外基質の合成を促進させる効果があることが明らかになっている。

最近では、PRP が血小板由来の様々な成長因子を含み、容易に自己血より作製できることから、注目されている。Nagae ら<sup>34)</sup>は、日本白色家兎の髓核を吸引し PRP とゼラチンハイドロゲルと一緒に髓核内へ注射することにより、髓核内のプロテオグリカンとⅡ型コラーゲンの合成が促進し、髓核細胞のアポトーシスが抑制されたと報告している。

### ② 遺伝子治療

1998年、Nishida らは、ウイルスベクターを用いて椎間板内に導入された遺伝子が副作用なく 12 週間以上発現が持続することを報告した<sup>35)</sup>。その後、アデノウイルスベクターを用いた GDF-5<sup>36)</sup>や Lim mineralization

protein-1 (LMP-1)<sup>37)</sup> の遺伝子導入が、椎間板変性モデル動物の細胞外基質産生を促進し、機能を維持することが報告されている。また、より安全性が高いマイクロバブルによる超音波コントラスト法を用いて、効率よく椎間板に遺伝子導入ができることが報告されている<sup>38)</sup>。さらに、Small interfering RNA (siRNA) を用いた ADAMTS-5 や Caspase-3 に対する遺伝子干渉によっても、椎間板変性が治療できる可能性について報告がなされている<sup>9, 39)</sup>。

### ③ 細胞治療

MSC は高い増殖能と多分化能を特徴とする体性幹細胞の一種である<sup>40)</sup>。骨髄、脂肪組織の間質や臍帯、羊膜などの胎児付属組織に存在し、プラスチックディッシュへの接着性を利用して培養増殖させることができる<sup>41)</sup>。MSC は微小環境やある一定のサイトカインの存在下で骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞など主に中胚葉系列細胞への分化能を示す。また、MSC は種々の刺激に反応して様々な液性因子を分泌し、パラクライン作用を介して創傷治癒、血管新生、免疫制御、抗炎症作用などを示す<sup>42)</sup>。線維輪の穿刺や髄核の吸引、酵素処理などにより誘導した椎間板変性モデル動物に対して MSC を移植することにより、椎間板高の回復や椎間板細胞外基質の合成上昇、移植された MSC の椎間板様形質変化などが認められることが報告されている<sup>43)</sup>。また現時点において結果の報告は少ないが、椎間板変性症に対する MSC 細胞治療の臨床研究も行われており、例えば、Orozco ら<sup>44)</sup> は椎間板変性を有する腰痛患者に対し、自家骨髄 MSC を髄核領域に注射することで腰痛の改善と MRI での椎間板内水分量の増加を得たと報告している。MSC は髄核細胞に比べ増殖活性が高く、骨髄穿刺などにより患者自身から調製できるため、椎間板変性に対する細胞治療の細胞源として期待されている。一方、高齢者や骨粗鬆症といった変性性疾患をも

った患者では、体内の MSC の数が少なく、移植に必要な細胞数を確保できないといった問題点も指摘されている。

## 8. 脱分化脂肪細胞 (DFAT)

Matsumoto ら<sup>12)</sup>は成熟脂肪細胞を天井培養することで、体外で脱分化を起こし得られた線維芽細胞様の形態をした細胞群 (DFAT) が、高い増殖能と MSC と同等の多分化能を有することを明らかにした。DFAT は、組織採取量が少量 (1g 以下) で調製可能であり、ドナーの年齢や基礎疾患に影響されず高純度の細胞が得られる。また遺伝子操作やウイルスベクターを使用しないことから、安全かつ簡便な方法で短期間に大量調製が可能である。DFAT は MSC と同様に血管新生や創傷治癒に関与する種々のサイトカインを分泌し、その分泌パターンは骨髄 MSC や Adipose-derived stem cell (ASC) に類似している<sup>45)</sup>。In vivo 実験においても、ラット急性心筋梗塞<sup>46)</sup>、ラット脊髄損傷<sup>47-48)</sup>、マウス膀胱凍結傷害<sup>49)</sup>、ラット尿道括約筋障害<sup>50)</sup>、ラット皮膚欠損<sup>51)</sup>、ウサギ骨欠損<sup>45)</sup>、ラット免疫複合体性腎炎モデル<sup>52)</sup>などにおいて、DFAT 移植による治療効果が報告されている。

### 《 目的 》

成熟脂肪細胞から人工的に誘導される DFAT は、MSC に類似した多能性を示し、また患者の年齢や基礎疾患に影響されず調製できるため、高齢者に好発する椎間板変性症に対しても椎間板再生を含む治療効果が期待できる。一方、椎間板変性に対する DFAT 細胞移植の効果については、今まで明らかにされていない。本研究の目的は、自動喫煙装置により椎間板の変性を誘導したラット椎間板変性モデルに対して DFAT を静脈内投与することで、椎間板変性の抑制効果が認められるかを明らかにすることである。

## 《対象と方法》

### 1. 実験動物

動物実験は日本大学動物実験委員会の承認（承認番号：第 AP13M030）を得て施行した。生後 8 週齢の雄性 Sprague Dawley (SD) ラットは日本クレア株式会社より購入し、日本大学医学部動物実験指針に従って飼育し実験を行った。

### 2. ラット DFAT

SD ラット由来の DFAT は既報<sup>12)</sup>に従って作製し、凍結保存した細胞<sup>50)</sup>を解凍、培養し実験に使用した。増殖培地は、10% ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) を用い、3-4 日毎に培地交換を行った。第 5 継代以内の細胞を実験に使用した。DFAT 調製方法の概略を図 1 に示す。

### 3. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルの作製

受動喫煙によるラット椎間板変性モデルは既報<sup>30)</sup>に従って作製した。概略を以下に示す。自動受動喫煙装置はアクリル樹脂製のチャンバーと、そのチャンバー内にタバコ煙を送風できる自動喫煙装置から構成される (図 2)。装置は 5 分間の喫煙送風と 5 分間の室内換気を行い、1 時間のインターバルをおき、1 日に 20 回繰り返し施行するよう設定した (Engineering System Co., Nagano, Japan)。酸素分圧連続測定装置 (MT 技研社, Tokyo, Japan) にてボックス内は酸素濃度が 20%、150mmHg を基準となるように設定した。明暗サイクルは 12 時間に設定した。タバコは両切りショートピース (JT, Inc., Tokyo, Japan) を使用した。SD ラットを上記の自動受動喫煙装置内で 8 週間飼育し椎間板変性を誘導した。

#### 4. 実験プロトコール

実験プロトコールを図 3 に示す。18 頭の SD ラットをランダムに、DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に群分けした（各群 n=6）。DFAT 群は 8 週間の喫煙下で 0 週、2 週、4 週、6 週の時点で 0.5ml リン酸化緩衝液 (Phosphate buffered saline: PBS) にラット DFAT ( $1 \times 10^6$  個) を溶解し、尾静脈から静脈内投与した。DFAT 移植細胞数は、Maruyama ら<sup>52)</sup>の既報に従い、静脈内投与しても肺塞栓などの副次作用を起こさず、全身性の免疫制御作用が期待できる細胞数として  $1 \times 10^6$  個/頭を採用した。

PBS 群は、8 週間の喫煙下で 0 週、2 週、4 週、6 週の時点で PBS 0.5ml を尾静脈より投与した。Control 群は非喫煙下、非投与で DFAT 群、PBS 群と同様に 8 週間飼育した。

実験終了時、イソフルラン (4.0%) 吸入麻酔下に、ペントバルビタール (100mg/kg) を腹腔内投与し、ラットを安楽死させた。その後、背部脊椎直上より縦切開を加え脊椎を露出させ、脊椎周囲の靭帯・筋などの軟部組織を切除し、腰椎と尾椎の組織を摘出した。腰椎より椎間板を単離後、椎間板に尖刀を用いて割を入れ中心部の髄核のみを摘出し、直ちに  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存し、プロテオグリカン測定および遺伝子発現解析に用いた。尾椎組織 (Co6~9) は 10% 緩衝ホルマリンで固定し、組織学的評価に用いた。また安楽死させたラットは胸骨正中切開後、肺組織を摘出し、直ちに  $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結保存し、遺伝子発現解析に用いた。

#### 5. 組織学的検討

10%ホルマリンで固定した尾椎組織は KCX (塩酸と DETA の混合液) にて脱灰し、パラフィン包埋後に  $3 \mu\text{m}$  厚で薄切した。脱パラフィン後に薄切標本を Hematoxylin and Eosin (HE) 染色、Elastica van Gieson (EVG) 染色、アリシアンブルー染色を行った。作製した標本は、正立顕微鏡

Olympus BX51(Olympus, Tokyo, Japan)で観察し、顕微鏡デジタルカメラ DP20-5(Olympus)を用いて写真撮影を行った。

## 6. プロテオグリカンの定量

各群 6 頭の腰椎椎間板より髓核を摘出し、6 頭分を合わせて 1.5ml tube 内に入れ、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。保存した髓核は、凍結乾燥し乾燥重量を測定した。その後、0.5ml の 0.1% プロナーゼ液 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) を加え、 $60^{\circ}\text{C}$ で 3 時間消化した。得られた試料原液を PBS で 500 倍希釈し Proteoglycan Detection Kit (ASB-8000, Lot. MA2011G, Astarte Biologics LLC, Bothell, WA) を使用し、使用マニュアルに従いプロテオグリカン (PG) 量を測定した。測定波長は 530nm とし、測定キット中の Chondroitin sulfate (CS) を標準として作成した検量線に基づいて、検体中の PG 量を乾燥重量当たりの CS 相当量として算出した。検体中の PG 量 (CS 相当量) は以下の式より算出した。

測定用試料原液中の PG 量 (mg) =

$$\text{測定値 } (\mu\text{g/mL}) \times \text{希釈倍率} \times \text{消化液量 } (0.500\text{mL}) / 1000$$

検体乾燥重量あたりの PG 量 (mg/mg dry wt.) =

$$\text{測定用試料原液中の PG 量 (mg)} / \text{乾燥重量 (mg dry wt.)}$$

## 7. mRNA の定量

髓核及び肺組織の mRNA 発現変化は、TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いたリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (Reverse transcription polymerase chain reaction: RT-PCR) 法にて解析した。各群 6 頭の腰椎椎間板より髓核を摘



出し、TRIZOL (Invitrogen) 中で攪拌し、total RNA を抽出した。Total RNA を DNase I 処理後、Random hexamer を 65°C 5 分間反応させ、Super Script III を 55°C 60 分、70°C 15 分間反応させ、cDNA を合成した。cDNA を 10ng 使用し、TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems) と目的遺伝子の primer/probe を加え、20  $\mu$  l で PCR 反応を行った。PCR 反応は 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて、初期活性化を 95°C 2 分、変性工程を 96°C 30 秒、アニーリングと DNA の伸長反応工程を 60°C 30 秒、72°C 1 分を 1 サイクルとし 30 サイクル施行した。解析遺伝子として以下の primer/probe を使用した。Sox9 (Rn01751069\_mH)、aggrecan (Rn00573424\_m1)、versican (Rn01493755\_m1)、HGF (Hepatocyte growth factor: Rn01442473\_m1)、PGE2 (Prostaglandin E2: Rn01435535\_g1)、TSG-6 (Tumor necrosis factor- stimulated gene-6: Rn01753871\_m1)、TGF  $\beta$  1 (Transforming growth factor-  $\beta$  1: Rn00572010\_m1)。GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: Rn01775763\_g1) を内在性コントロール遺伝子とした。全てのサンプルは triplicate にて測定した。遺伝子発現の比較は、GAPDH 発現量に対する相対的定量解析法 (comparative Ct 法) によって行った。

## 8. 統計処理

統計解析は PRISM 5 (GraphPad software, La Jolla, CA) を用いて行った。群間比較には Unpaired Student' s t-test を使用し、 $P < 0.05$  を統計学的有意差ありと判定した。

## 《 結果 》

### 1. 受動喫煙ラットにおける椎間板組織所見の比較

DFAT群、PBS群、Control群から椎間板を摘出し組織学的検討を行った。HE染色像を図4に示す。非喫煙Control群では、軟骨細胞と細胞外マトリックスから構成される正常の髓核組織が認められ、周囲の線維輪ではエオジン好性で一定の層状配列を認めた。椎間板と椎体の境界部には軟骨終板が認められた。8週間の受動喫煙を行ったPBS群では、髓核組織の明らかな破壊は認められなかったが、細胞密度の減少が認められた。一方、線維輪及び軟骨終板には明らかな異常は認められなかった。受動喫煙を行いDFATを移植したDFAT群では、髓核組織構造は保たれており細胞密度の減少もPBS群に比べ軽度であった。PBS群と同様に線維輪や軟骨終板には異常所見は認められなかった。

結合組織性酸性ムコ多糖類を青色に染めるアリシアンブルー染色では、髓核組織及び軟骨終板が青色に染色された(図5)。Control群では、髓核組織が均一にアリシアンブルー強陽性を示した。PBS群では、髓核組織の特に中心部においてアリシアンブルー陰性となる領域が認められた。DFAT群では、PBS群に比べ髓核組織のアリシアンブルー陰性領域が少ない傾向が認められた。軟骨終板のアリシアンブルー染色像は、3群間に明らかな差を認めなかった。

弾性線維を紫黒色、膠原線維を赤色に染めるEVG染色では、髓核組織内部および軟骨終板が紫黒色、線維輪が赤色に染色された(図6)。Control群では、髓核組織中に紫黒色で染色される弾性線維が豊富に認められた。これに対しPBS群では、髓核組織辺縁を中心に弾性線維が低下している所見が認められた。DFAT群ではPBS群に比べ髓核組織中の弾性線維の低下が軽度であった。線維輪や軟骨終板のEVG染色では、3群間で明らかな組織学的変化は認められなかった。

以上の結果から、8週間の受動喫煙により髓核組織中の細胞密度の低下と結合組織性酸性ムコ多糖類及び弾性線維の蓄積低下を主徴とする椎間板変性が起こり、DFATの全身投与はこれらの組織学的変化を抑制することが示唆された。

## 2. 受動喫煙ラットにおける髓核内プロテオグリカンの定量比較

次にDFAT群、PBS群、Control群の髓核内プロテオグリカンを定量比較した。8週間の受動喫煙を行ったPBS群の髓核内プロテオグリカン量(0.254 mg/mg dry wt)は、非喫煙Control群(0.581 mg/mg dry wt)に比べ52.2%の減弱を認めた(図7)。DFAT群の髓核内プロテオグリカン量は、0.373 mg/mg dry wtであり、Control群に対する減弱率は35.9%とPBS群に比べ低率であった。以上の結果から、8週間の受動喫煙により髓核内プロテオグリカンの減少が認められ、DFATの全身投与は喫煙による髓核内プロテオグリカン量の減少を抑制することが示唆された。

## 3. 受動喫煙ラットにおける髓核内軟骨関連遺伝子発現の比較

次にDFAT群、PBS群、Control群の髓核内軟骨関連遺伝子のmRNA発現をリアルタイムRT-PCR法にて定量比較した。実験経過中にDFAT群の1頭が死亡したため、DFAT群(N=5)、PBS群(N=6)、Control群(N=6)で群間解析を行った。軟骨初期分化マーカーであるSox9のmRNA発現はControl群に比べ、PBS群で有意に低下した( $P<0.05$ ) (図8)。DFAT群では、喫煙によるSox9発現低下が抑制される傾向があり、PBS群に比べ有意に高値を示した( $P<0.05$ )。軟骨特異的プロテオグリカンであるアグリカン及びバーシカンの遺伝子発現解析結果を図9、10に示す。アグリカンのmRNA発現はControl群に比べ、PBS群で有意に低下した( $P<0.05$ ) (図9)。DFAT群では、喫煙によるアグリカンの発現低下が抑制される傾向があり、PBS

群に比べ有意に高値を示した ( $P < 0.01$ )。バーシカンの mRNA 発現も同様の傾向が認められたが、各群間に統計学的有意差は認められなかった (図 10)。以上の結果から、8 週間の受動喫煙により髄核内軟骨関連遺伝子の発現減少が認められ、DFAT の全身投与はこの減少を抑制することが示唆された。

#### 4. 受動喫煙ラットにおける肺組織の免疫制御関連遺伝子発現の比較

次に DFAT 群、PBS 群の肺組織における免疫制御関連遺伝子の mRNA 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて定量比較した。免疫制御関連遺伝子として HGF、PGE2、TSG-6、TGF  $\beta$  1 を選択し測定した。DFAT 群は PBS 群に比較し、HGF、PGE2、TSG-6 が有意に高値であった ( $P < 0.05$ ) (図 11)。TGF  $\beta$  1 も DFAT 群は PBS 群に比較して高い傾向が認められたが、統計学的有意差は認められなかった。以上の結果から、DFAT 移植により肺組織における免疫制御関連遺伝子の発現が亢進することが示唆された。

#### 《 考察 》

腰痛は外傷や腫瘍、感染、腰部脊柱管狭窄症、腰椎椎間板ヘルニア、腰椎椎間板変性症など多くの病態から引き起こされる。なかでも、椎間板変性症は、単独で腰痛の原因になるばかりか椎間板が変性を起こすことで、脊柱の変形や不安定性から脊椎後側弯症、脊柱管狭窄症を惹起する。これにより、腰痛だけでなく下肢痛を認めるまでに至る。喫煙と椎間板変性は以前より関連がありさまざまな報告がされている<sup>53-54)</sup>。

今回、ラットに受動喫煙されることによって、髄核細胞の減少と髄核内プロテオグリカンの減少が認められた。この所見は、本モデルを用いた以前の報告に一致する<sup>30)</sup>。タバコに含有される化学物質には、椎間板の細胞増殖率を低下させ、プロテオグリカンやコラーゲンの生合成活性

を抑制する作用がある<sup>55)</sup>。また、タバコは椎間板細胞に作用して MMPs や ADAMTS を活性化し、TIMP を抑制することでプロテオグリカン産生を低下させる<sup>27)</sup>。さらに、軟骨終板における血管網の構造変化を起こし、椎間板内への血流低下から低栄養、低酸素状態を起こすとされる<sup>56-57)</sup>。このようにタバコは、椎間板への直接的な組織障害や血流障害によって、変性を惹起するとされる<sup>58)</sup>。われわれの実験結果からも 8 週間の受動喫煙によりラット髓核細胞密度の低下とプロテオグリカンの減少が認められており、椎間板の変性は上述したようなメカニズムに起因すると考えられた。

今回の実験結果では、DFAT 静脈内投与によって喫煙による椎間板変性の抑制とプロテオグリカン減少が抑制された。喫煙による椎間板変性に対し、DFAT が治療効果を示すことはいままでに報告されておらず、新規性の高い研究成果であると考えられる。種々の動物モデルに対し MSC 移植が髓核細胞の変性を抑制し、髓核内プロテオグリカンを増加させることが報告されている<sup>59)</sup>。MSC に類似した形質と多能性を有する DFAT も、MSC と同様の髓核変性抑制作用を有することが示唆される。今までに報告されている MSC の治療効果の多くは、椎間板に直接移植する方法で得られた研究成果である<sup>43)</sup>。今回の検討では、DFAT を静脈から全身投与することにより、治療効果が認められた。椎間板変性症は加齢に伴い全身性に椎間板が変性する変性性疾患であることから、全身投与による治療効果が確認されたことは、細胞を用いた治療戦略を確立する上で意義が大きいと考えられる。椎間板変性症に対し細胞治療を行う場合、病変部位への局所投与または全身投与のどちらがより効果が高いか明確になっていない。MSC と髓核細胞の共培養により MSC が髓核細胞へ分化するとの報告<sup>60)</sup>や、変性した椎間板組織に MSC を移植することにより MSC が髓核細胞様の形質を獲得するといった報告<sup>61-62)</sup>がある。MSC が髓核細胞と直接

接触することにより髓核細胞様の形質を獲得するといった観点では、変性椎間板への局所投与が望ましいと考えられる。一方、椎間板は非常に血流に乏しい組織であることから、椎間板への局所投与により移植細胞の長期生着が得られるとは考えにくい。移植細胞の長期生存、生着を考えた場合、全身投与のほうが有利であると考えられる。実際、静脈内投与した MSC の大部分が肺にトラップされ、一定期間生存した後一部の細胞は傷害組織に移行することが報告されている<sup>63)</sup>。今後、移植細胞のデリバリー法の違いにより治療効果にどのような違いが起こるか検討する必要がある。

今回、喫煙により髓核細胞の軟骨関連遺伝子の発現が低下し、DFAT 投与によりその発現低下が抑制されるという結果が得られた。変性椎間板内への MSC 移植によって軟骨関連遺伝子の発現が増加することが報告されている<sup>64)</sup>が、全身投与により同様の効果が得られることは検索した限りでは報告がない。近年、MSC を静脈内投与することにより造血幹細胞移植後の GVHD、全身性エリテマトーデス、心筋梗塞、急性肺障害など多くの疾患に対し治療効果があることが明らかにされ、急性 GVHD、心筋梗塞、肝硬変などを対象疾患とした MSC 全身投与による細胞治療の臨床研究も開始されている<sup>65)</sup>。このような、MSC 全身投与による免疫抑制作用や抗炎症作用は肺にトラップされた MSC とその周囲組織との相互作用により発現される種々の液性因子が全身性に作用する結果であることが明らかにされている。このような液性因子として現在までに TSG-6, Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA), PGE, Indoleamine 2,3-dioxygenase, Nitric oxide (NO), TGF- $\beta$ 1, Stromal cell derived factor (SDF-1), keratinocyte growth factor, angiopoietin-1, LL-37 などが報告されている<sup>66-67)</sup>。今回、DFAT 全身投与による肺組織の遺伝子発現変化を解析した結果 HGF、PGE<sub>2</sub>、TSG-6 といった免疫制御や抗炎症に

関与する遺伝子の発現が有意に増加していた。HGFは血管内皮細胞に存在するその特異的受容体 c-met を介して、強力な血管新生効果を有する。さらに、細胞の運動性や増殖を制御し、軟骨細胞に対してプロテオグリカンの合成を調製する役割を持つ<sup>68)</sup>。PGE2は、IL-2、INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-1、ロイコトリエンなどの種々の炎症性メディエーターの産生を抑制することにより抗炎症作用・免疫制御作用を示す。また細胞内のcAMPを上昇させることで、Vascular endothelial growth factor (VEGF)の生成を誘導し、血管新生を増強させることが知られている。さらに、PGE2は髄核細胞に発現する E-prostanoid (EP)受容体を介して Wnt- $\beta$ -catenin経路を活性化し、その標的遺伝子の発現調節に関与することが明らかにされている<sup>69)</sup>。静脈内投与したDFATが血流の乏しい椎間板組織に効率よく移行するとは考えにくく、DFAT静脈内投与による髄核の軟骨関連遺伝子の発現増加は、肺組織から分泌されたこれらの免疫制御関連遺伝子のエンドクライン効果に起因する可能性が示唆される。また、HGFやPGE2の血管新生作用が、椎体終板に存在する毛細血管網(Capillary beds)の血流障害を改善し、椎間板への血流を維持したことで椎間板変性を抑制した可能性も考えられる。近年、MSCから分泌されるTSG-6が、急性心筋梗塞、急性肺障害、脊髄損傷など種々の病態に対するMSCの治療効果に重要な役割を果たすことが明らかにされている<sup>65)</sup>。また最近、DFAT静脈内投与による免疫複合体性腎炎の進行抑制効果にも、TSG-6が関与していることが報告されている<sup>52)</sup>。どの液性因子が主体となって髄核変性を抑制するかについては今後の検討課題である。また、今回の研究は、8週間の受動喫煙を施行しながらDFATを静脈内投与しており、椎間板変性過程における細胞移植の効果を検討したモデルである。したがって本研究では、すでに椎間板変性を起こしている患者に対して効果があるかについては明らかになっていない。今後、椎間板変性が完成したモデルに対す

る治療効果についても検討する必要がある。今回の研究結果から、DFATの静脈内投与は、レントゲンにて椎間板高が保たれているが、MRIにて椎間板の輝度変化があり椎体終板の変化を伴っているような初期の椎間板変性症や、椎間板変性は認められるが脊柱変形を起こしていない進行過程にある症例などがよい適応となると考えられる。

高齢者に好発する椎間板変性症に対して細胞治療を行う場合、年齢や基礎疾患に影響されず調製できる細胞源が望まれる。骨髄 MSC や ASC は患者年齢や基礎疾患に影響をうけ、必要な細胞数を得られない症例が存在することが知られている。これに対して DFAT は高齢者でも豊富に存在する皮下の成熟脂肪細胞から調製するため、患者の年齢や全身状態に左右されず大量調製が可能である。このような理由により、DFAT は椎間板変性症に対する細胞治療用細胞として有望であると考えられた。

#### 《まとめ》

受動喫煙ラット椎間板変性モデルに対して DFAT を静脈内投与し、椎間板変性の抑制効果が認められるか検討した。8 週間の受動喫煙により髓核組織中の細胞密度の減少とプロテオグリカン低下を主徴とする椎間板変性が惹起された。DFAT の全身投与は、受動喫煙による髓核組織の変性やプロテオグリカン量の減少を抑制し、軟骨関連遺伝子の発現低下を抑制した。また DFAT の全身投与により肺組織の免疫制御関連遺伝子の発現増加が認められた。椎間板変性症に対する DFAT を用いた細胞治療の可能性が示唆された。



## 謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った日本大学医学部整形外科学講座 徳橋泰明教授に心より厚く御礼申し上げますとともに、また研究に際し適切な御指導を頂いた日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野 松本太郎教授、スタッフの方々に心より深謝いたします。

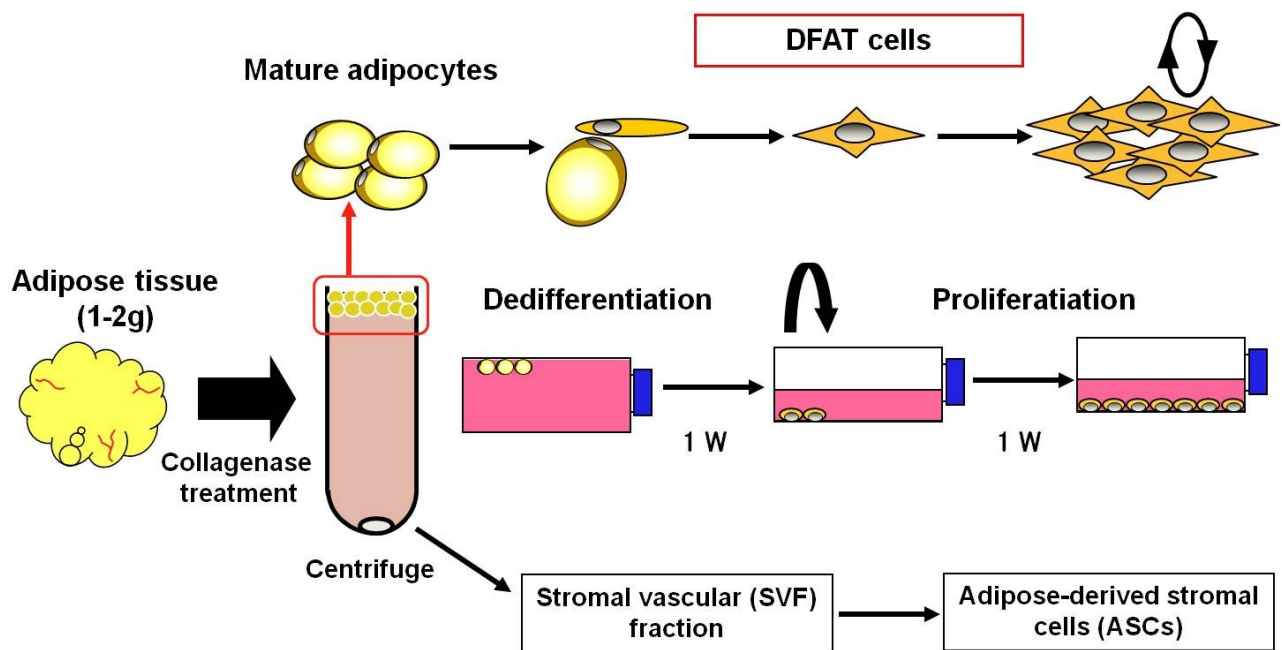


図 1. 脱分化脂肪細胞（DFAT）調製方法

皮下脂肪組織 1～2 g をコラゲナーゼ処理し、低速度遠心分離することで単離される成熟脂肪細胞を 20% FBS 含有 DMEM 培地で満たしたフラスコ内で天井培養を行う。成熟脂肪細胞はフラスコ天井面で脱分化し、分裂し DFAT が産生される。1 週間後にフラスコを反転させ付着培養を行うことにより DFAT を増殖させることができる。

A



B

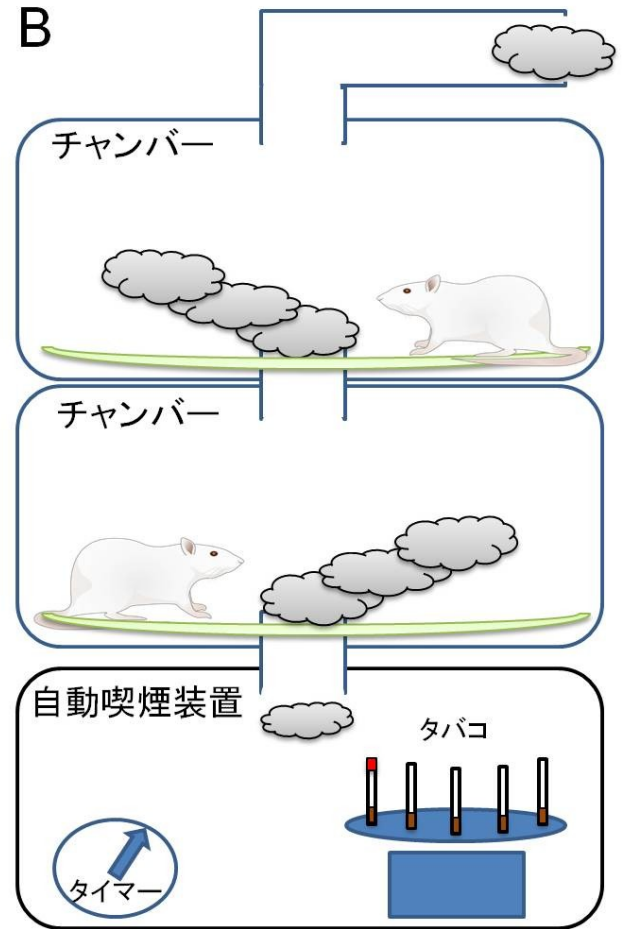


図 2. 受動喫煙ボックス

受動喫煙ボックスはアクリル樹脂製のチャンバーと、そのチャンバー内にタバコ煙を送風できる自動喫煙装置から構成される。自動喫煙装置は5分間の喫煙送風と5分間の室内換気を行い、1時間のインターバルをおき、1日に20回繰り返し施行するよう設定した。(A:受動喫煙ボックスの写真 B:模式図)

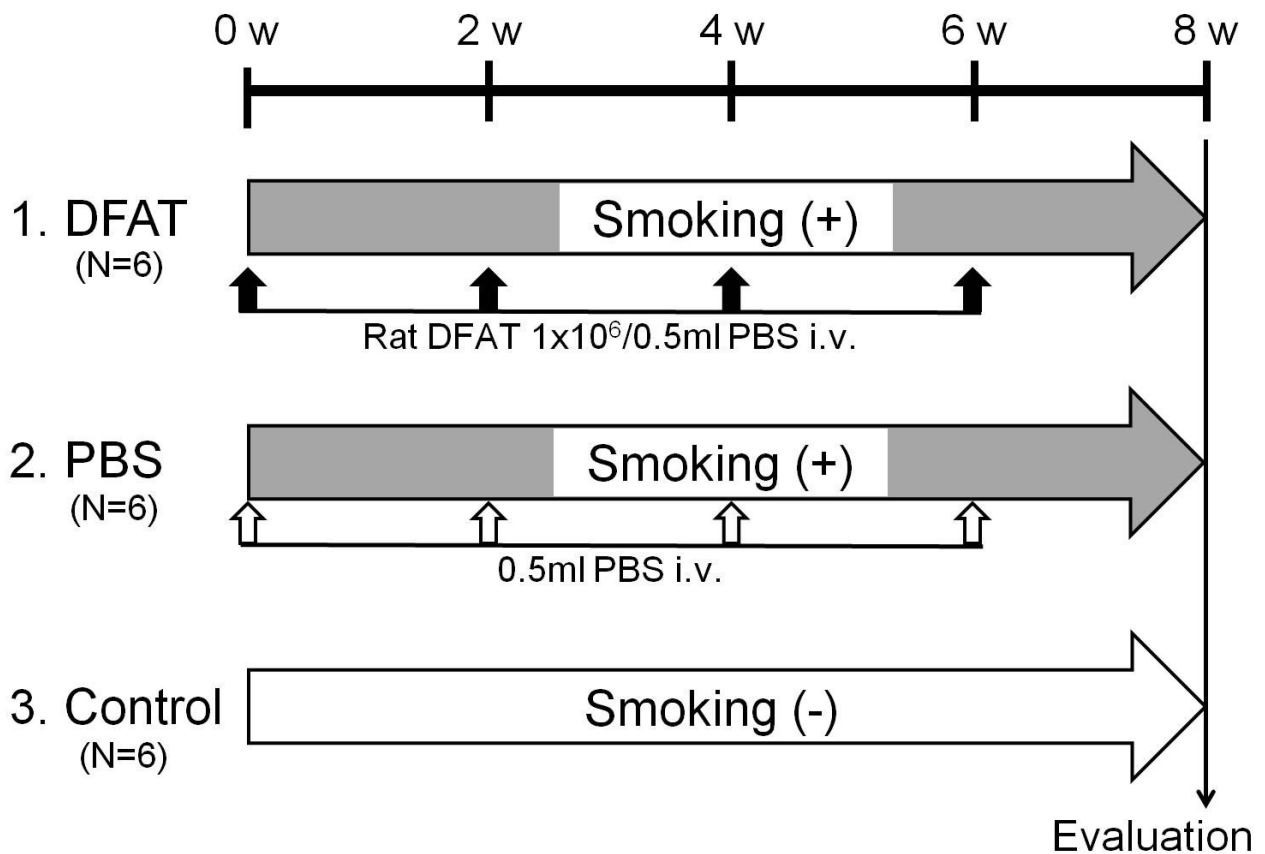


図 3. 実験プロトコール

オス SD ラット 8 週齢を使用し、DFAT 群、PBS 群、Control 群、各群 6 頭と設定した。8 週間の喫煙下で 0 週、2 週、4 週、6 週に、DFAT 群は DFAT  $1 \times 10^6$  個 / 0.5 ml を、PBS 群には PBS 0.5 ml を尾静脈から静脈内投与した。Control 群は非喫煙下、非投与で 8 週間飼育した。8 週間の飼育後（16 週齢）に安楽死させ椎間板と肺を摘出し、評価を行った。

Control

PBS

DFAT

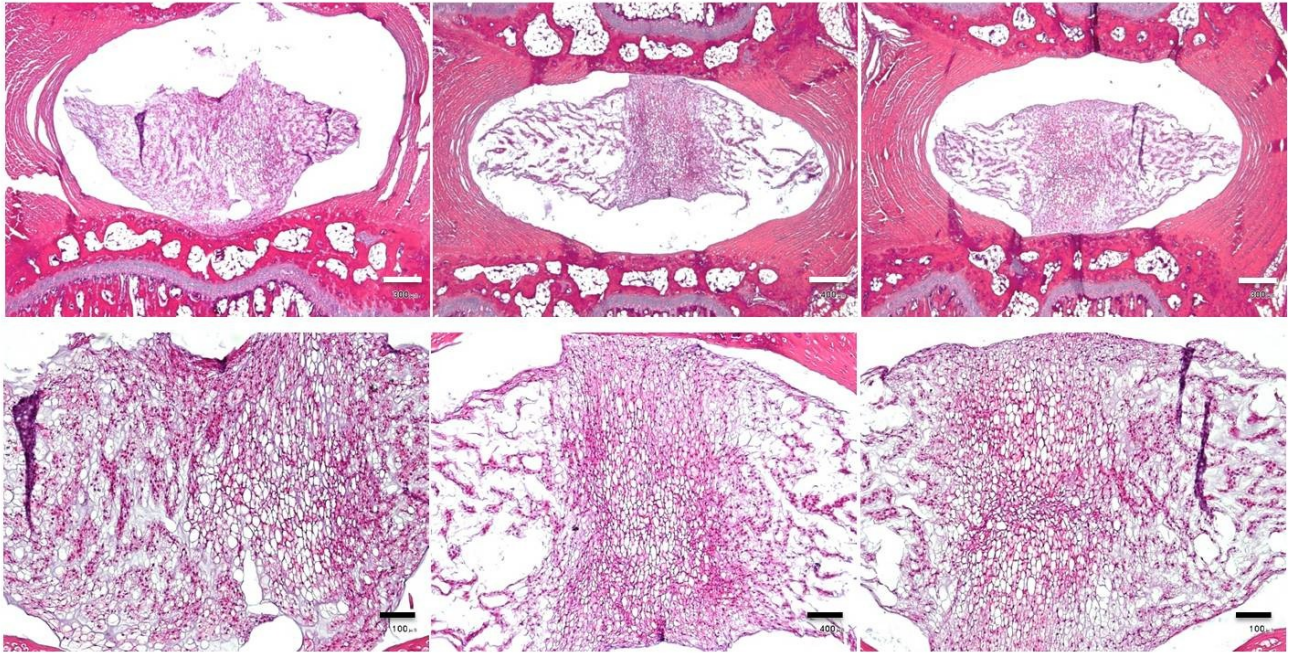


図 4. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける DFAT 移植の効果  
(HE 染色)

SD ラットを DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に分け、DFAT 群は喫煙下に DFAT  $1 \times 10^6$  個 / 0.5ml を、PBS 群は喫煙下に PBS 0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与した。非喫煙、非投与下で飼育したラットを Control 群とした。8 週間の飼育後に安楽死させ、尾椎 Co6~9 を摘出し脱灰後パラフィン切片 ( $3 \mu\text{m}$ ) を作成し、種々の染色を行った。図は Co7/8 の椎間板および周囲組織の HE 染色像を示す。(Bar: 上段  $300 \mu\text{m}$  下段  $100 \mu\text{m}$ )

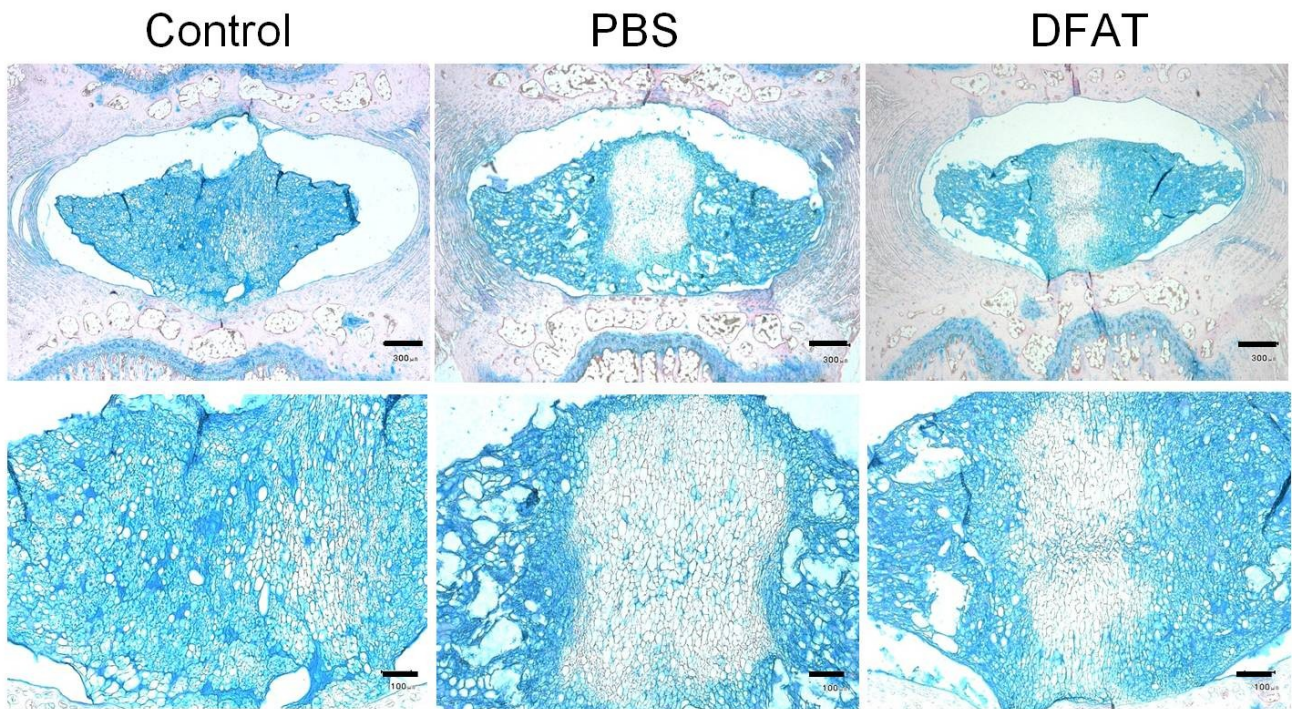


図 5. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける DFAT 移植の効果  
(アリシアンブルー染色)

SD ラットを DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に分け、DFAT 群は喫煙下に DFAT  $1 \times 10^6$  個 / 0.5ml を、PBS 群は喫煙下に PBS 0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与した。非喫煙、非投与下で飼育したラットを Control 群とした。8 週間の飼育後に安楽死させ、尾椎 Co6~9 を摘出し脱灰後パラフィン切片 ( $3 \mu\text{m}$ ) を作成し、種々の染色を行った。図は Co7/8 の椎間板および周囲組織のアリシアンブルー染色像を示す。(Bar: 上段  $300 \mu\text{m}$  下段  $100 \mu\text{m}$ )

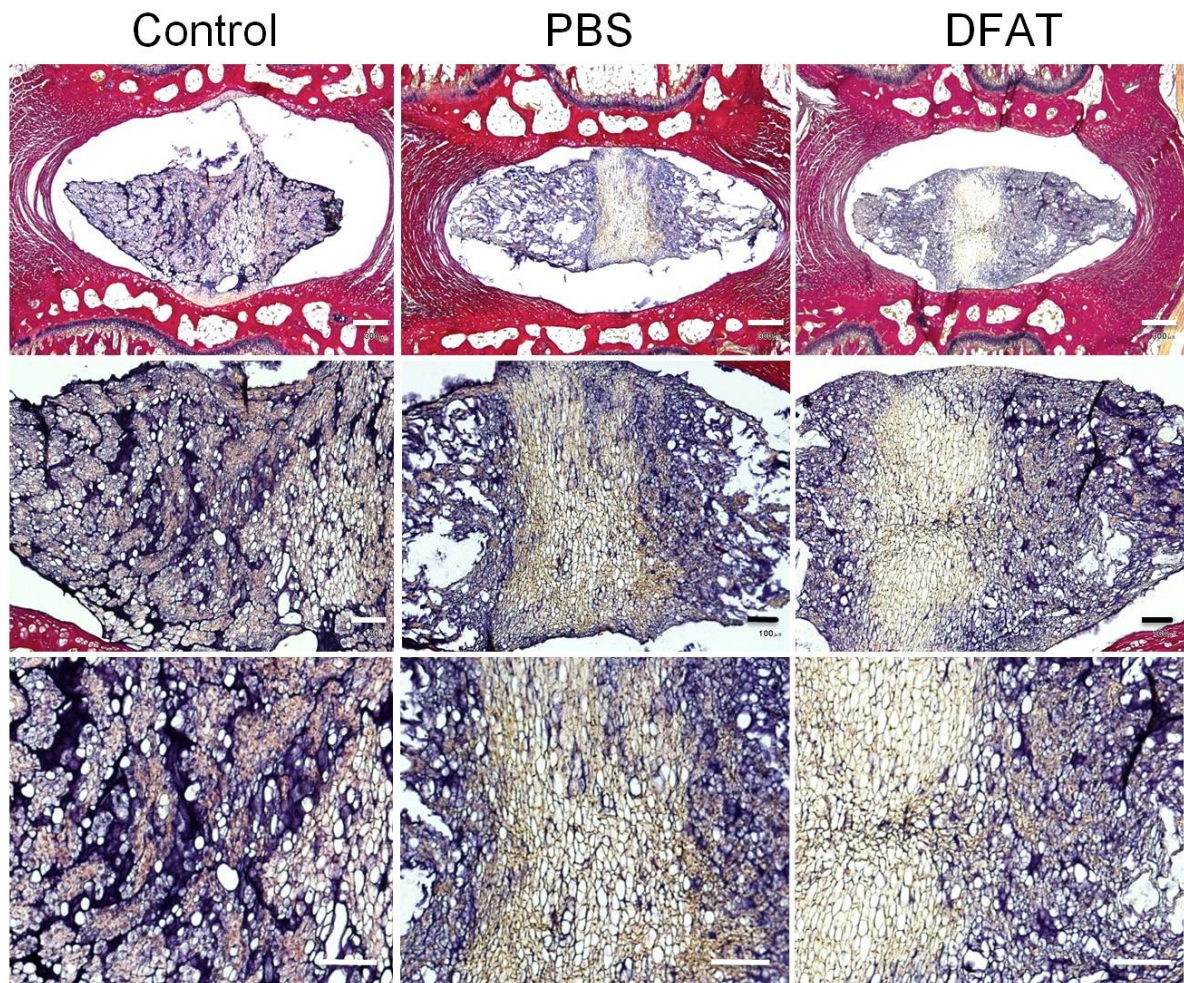


図 6. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける DFAT 移植の効果  
(EVG 染色)

SD ラットを DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に分け、DFAT 群は喫煙下に DFAT  $1 \times 10^6$  個 / 0.5ml を、PBS 群は喫煙下に PBS 0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与した。非喫煙、非投与下で飼育したラットを Control 群とした。8 週間の飼育後に安楽死させ、尾椎 Co6~9 を摘出し脱灰後パラフィン切片 ( $3 \mu\text{m}$ ) を作成し、種々の染色を行った。図は Co7/8 の椎間板および周囲組織のアリシアンブルー染色像を示す。(Bar: 上段  $300 \mu\text{m}$ , 中段  $100 \mu\text{m}$ , 下段  $100 \mu\text{m}$ )

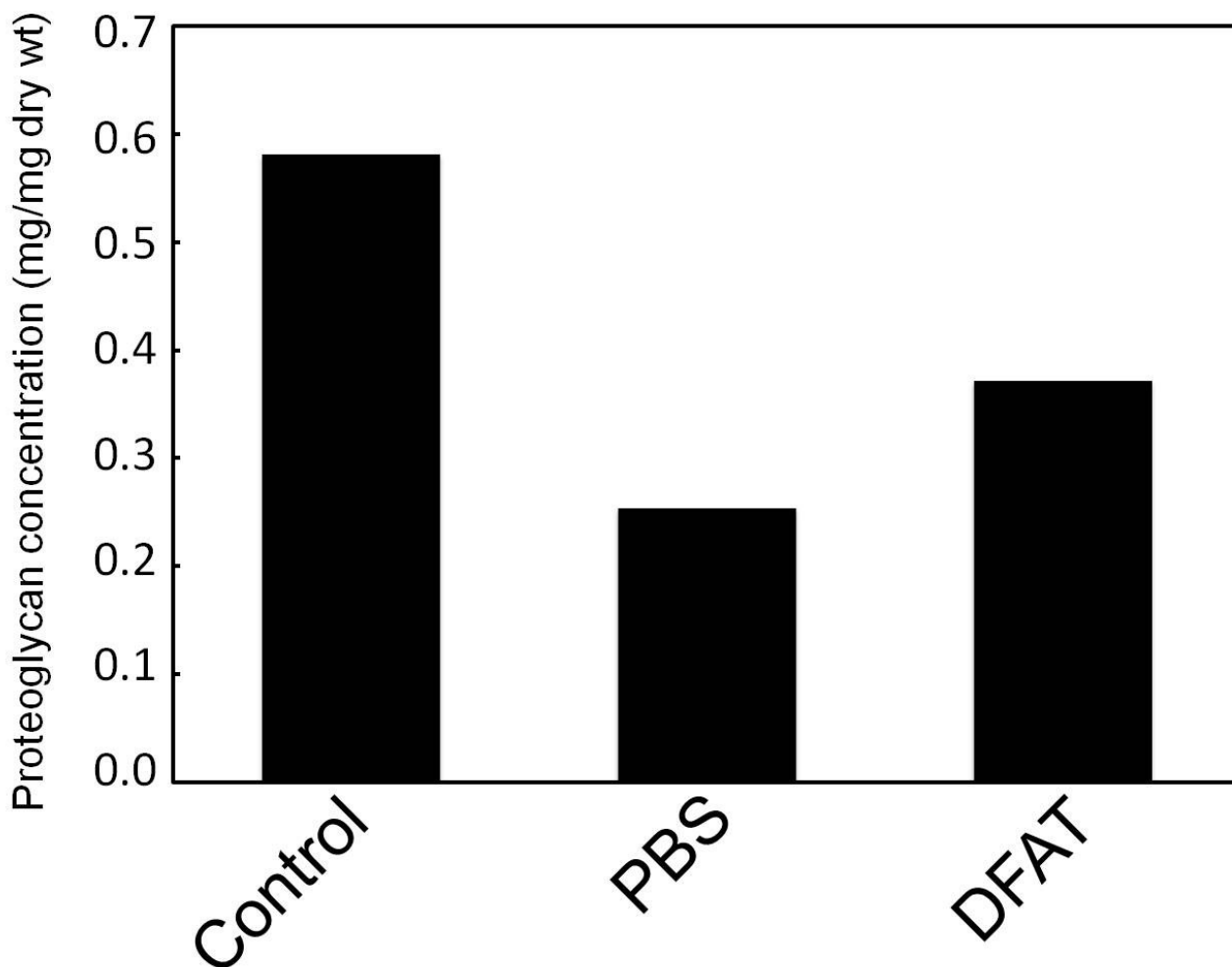


図 7. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける DFAT 移植の効果  
(髄核内プロテログリカン定量)

SD ラットを DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に分け、DFAT 群は喫煙下に DFAT  $1 \times 10^6$  個/0.5ml を、PBS 群は喫煙下に PBS 0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与した。非喫煙、非投与下で飼育したラットを Control 群とした。8 週間の飼育後に安楽死させ、腰椎椎間板 (L1-5) より髄核を単離し、各群 6 頭分を合わせて Proteoglycan Detection Kit を用いて、プロテオグリカン量を測定した。乾燥重量あたりのプロテオグリカン量を定量値とした。



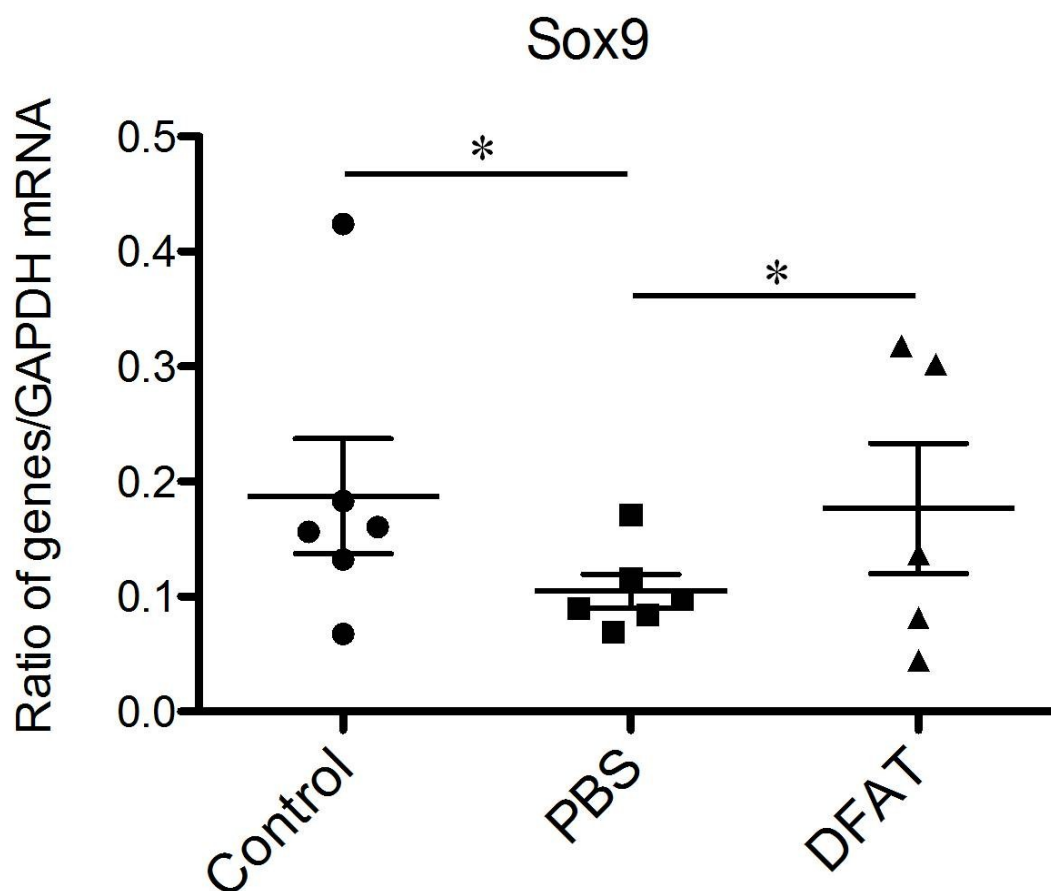


図 8. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける DFAT 移植の効果  
(髄核 Sox9 の遺伝子発現解析)

SD ラットを DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に分け、DFAT 群は喫煙下に DFAT  $1 \times 10^6$  個/0.5ml を、PBS 群は喫煙下に PBS 0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与した。非喫煙、非投与下で飼育したラットを Control 群とした。8 週間の飼育後に安楽死させ、腰椎椎間板 (L1-5) より髄核を単離し、total RNA を抽出した。Sox9 の mRNA をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。遺伝子発現の比較は GAPDH を内在性コントロールとし Comparative Ct 法にて解析した。(Bar: Mean  $\pm$  SD, \*:  $p < 0.05$  Unpaired t test)

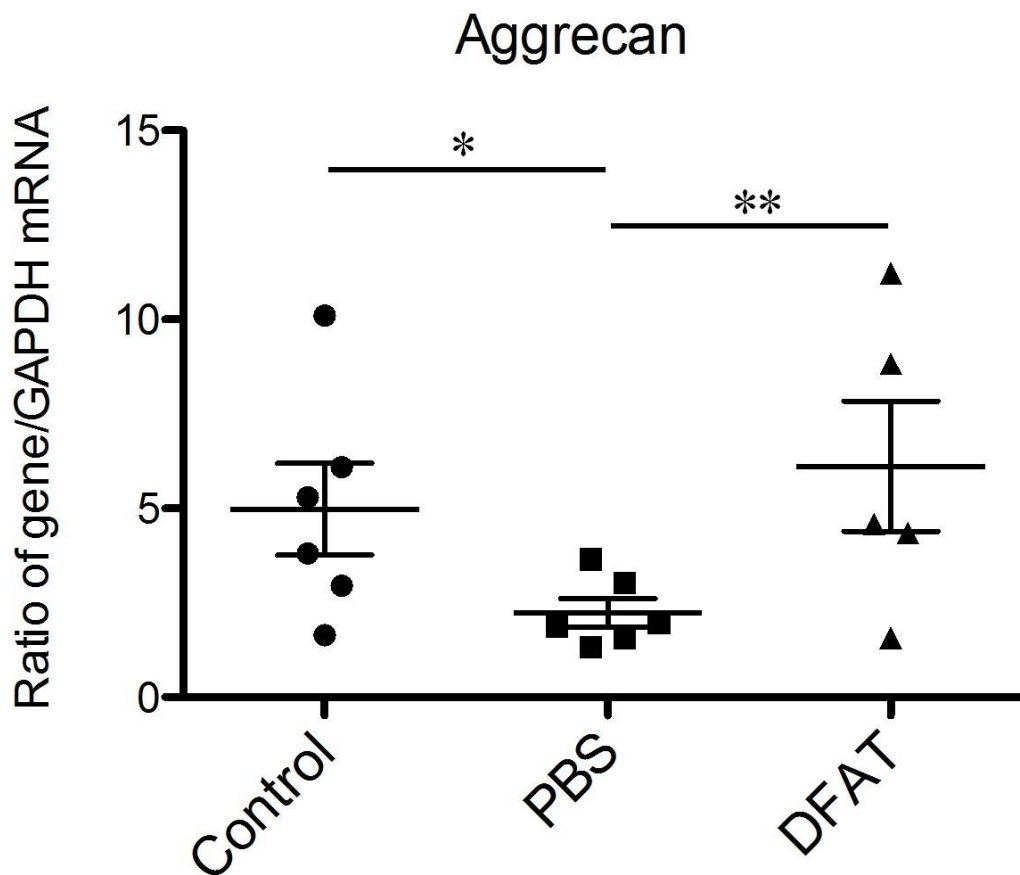


図 9. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける DFAT 移植の効果  
(髄核アグリカンの遺伝子発現解析)

SD ラットを DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に分け、DFAT 群は喫煙下に DFAT  $1 \times 10^6$  個/0.5ml を、PBS 群は喫煙下に PBS 0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与した。非喫煙、非投与下で飼育したラットを Control 群とした。8 週間の飼育後に安楽死させ、腰椎椎間板 (L1-5) より髄核を単離し、total RNA を抽出した。アグリカンの mRNA をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。遺伝子発現の比較は GAPDH を内在性コントロールとし Comparative Ct 法にて解析した。(Bar: Mean  $\pm$  SD, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$  Unpaired t test)

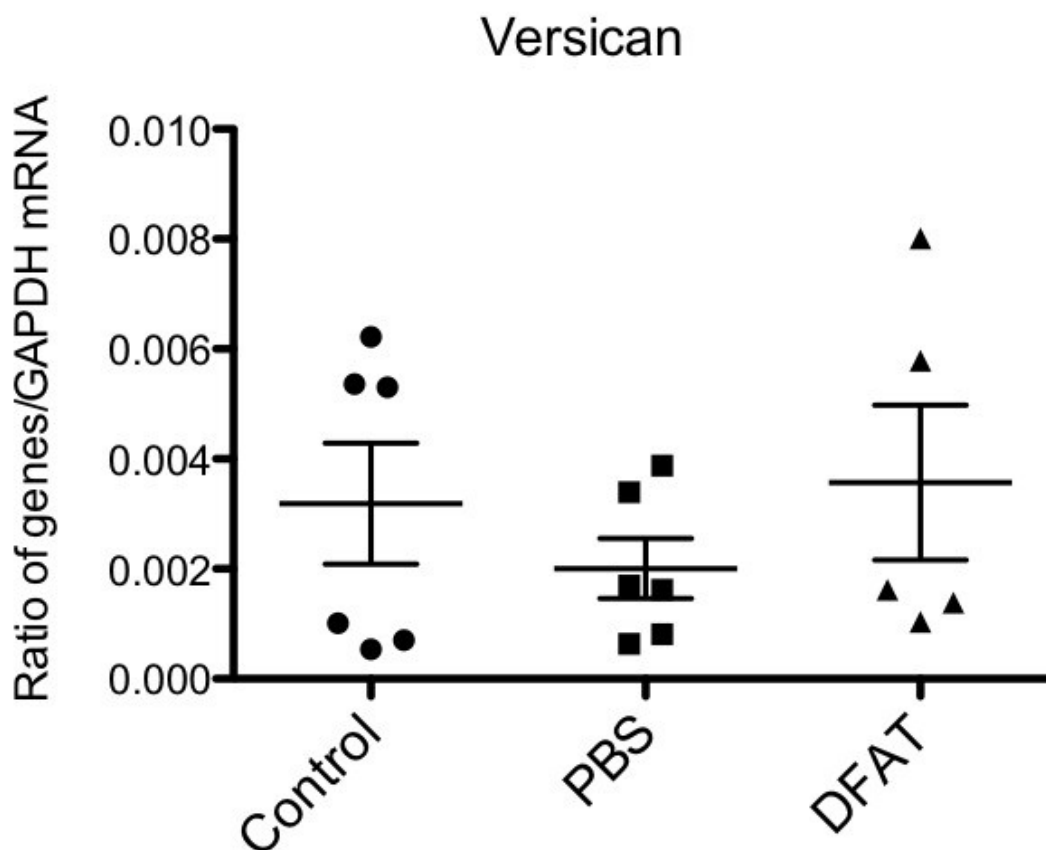


図 10. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける DFAT 移植の効果  
(髄核バーシカンの遺伝子発現解析)

SD ラットを DFAT 群、PBS 群、Control 群の 3 群に分け、DFAT 群は喫煙下に DFAT  $1 \times 10^6$  個/0.5ml を、PBS 群は喫煙下に PBS 0.5ml を 2 週間ごとに静脈内投与した。非喫煙、非投与下で飼育したラットを Control 群とした。8 週間の飼育後に安楽死させ、腰椎椎間板 (L1-5) より髄核を単離し、total RNA を抽出した。バーシカンの mRNA をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。遺伝子発現の比較は GAPDH を内在性コントロールとし Comparative Ct 法にて解析した。(Bar: Mean  $\pm$  SD)

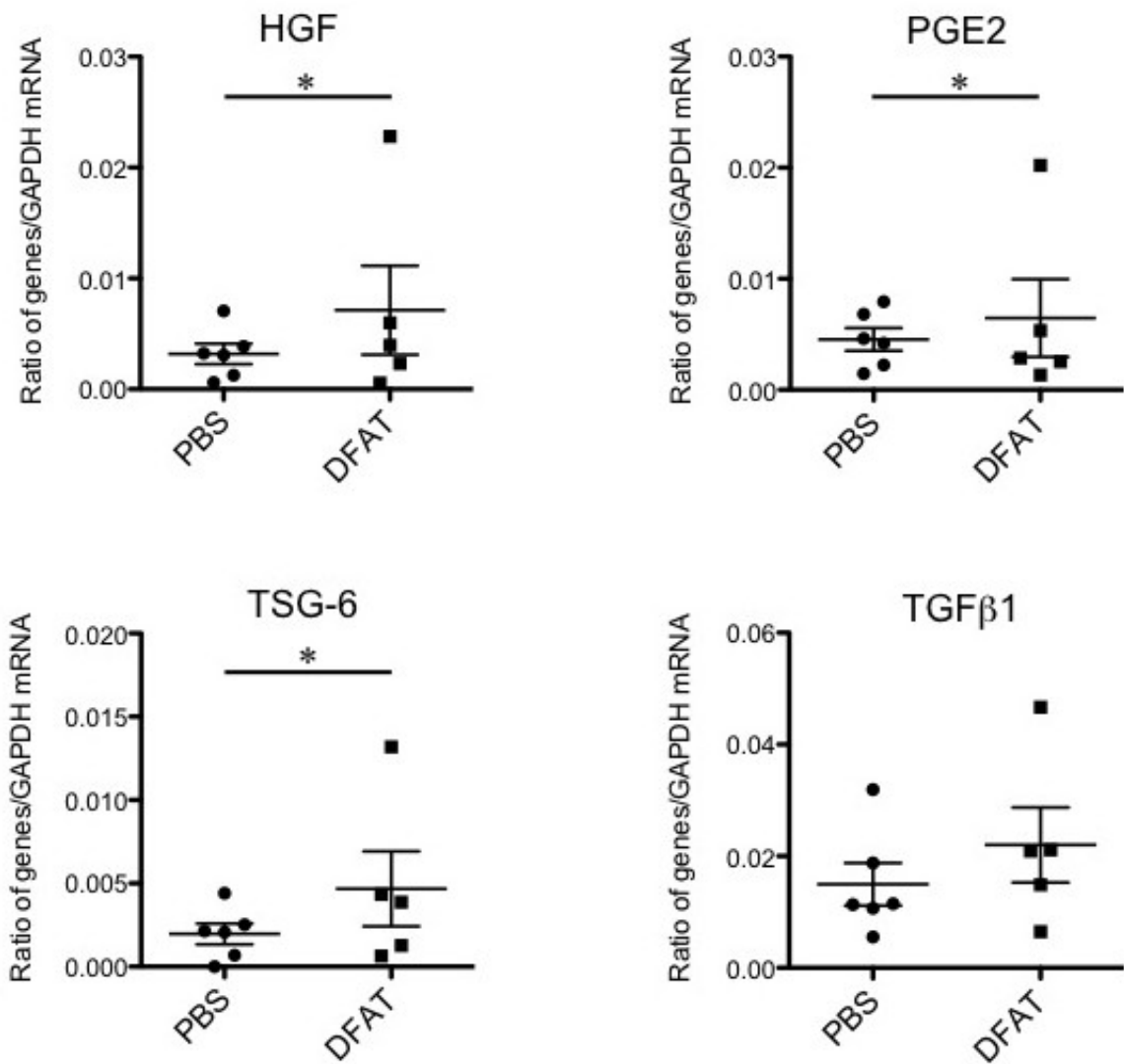


図 11. 受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける DFAT 移植の効果  
(肺における免疫制御関連遺伝子の発現解析)

実験終了時に DFAT 群、PBS 群の肺を摘出し、total RNA を抽出した。HGF、PGE2、TSG-6、TGF β 1 の mRNA をリアルタイム RT-PCR 法にて測定した。遺伝子発現の比較は GAPDH を内在性コントロールとし Comparative Ct 法にて解析した。(Bar: Mean ± SD, \*: p < 0.05 Unpaired t test)

《引用文献》

- 1) Uematsu Y, Matuzaki H, Iwahashi M. Effects of nicotine on the intervertebral disc: an experimental study in rabbits. *J Orthop Sci* 2001; **6**:177-182.
- 2) Iwahashi M, Matsuzaki H, Tokuhashi Y *et al.* Mechanism of intervertebral disc degeneration caused by nicotine in rabbits to explicate intervertebral disc disorders caused by smoking. *Spine (Phila Pa 1976)* 2002; **27**:1396-1401.
- 3) Ogawa T, Matsuzaki H, Uei H *et al.* Alteration of gene expression in intervertebral disc degeneration of passive cigarette- smoking rats: separate quantitation in separated nucleus pulposus and annulus fibrosus. *Pathobiology* 2005; **72**:146-151.
- 4) Nemoto Y, Matsuzaki H, Tokuhashi Y *et al.* Histological changes in intervertebral discs after smoking and cessation: experimental study using a rat passive smoking model. *J Orthop Sci* 2006; **11**:191-197.
- 5) Uei H, Matsuzaki H, Oda H *et al.* Gene expression changes in an early stage of intervertebral disc degeneration induced by passive cigarette smoking. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; **31**:510-514.
- 6) Akeda K, An HS, Okuma M *et al.* Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; **14**:1272-1280.
- 7) Wang SZ, Chang Q, Lu J *et al.* Growth factors and platelet-rich plasma: promising biological strategies for early intervertebral disc degeneration. *Int Orthop* 2015; **39**:927-934.
- 8) Moon SH, Nishida K, Gilbertson LG *et al.* Biologic response of human

- intervertebral disc cells to gene therapy cocktail. *Spine (Phila Pa 1976)* 2008; **33**:1850-1855.
- 9) Seki S, Asanuma-Abe Y, Masuda K *et al.* Effect of small interference RNA (siRNA) for ADAMTS5 on intervertebral disc degeneration in the rabbit anular needle-puncture model. *Arthritis Res Ther* 2009; **11**:R166.
  - 10) Sakai D, Mochida J, Iwashina T *et al.* Regenerative effects of transplanting mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen to the degenerated intervertebral disc. *Biomaterials* 2006; **27**:335-345.
  - 11) Sun W, Zhang K, Liu G *et al.* Sox9 gene transfer enhanced regenerative effect of bone marrow mesenchymal stem cells on the degenerated intervertebral disc in a rabbit model. *PLoS One* 2014; **9**:e93570.
  - 12) Matsumoto T, Kano K, Kondo D *et al.* Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**:210-222.
  - 13) Miller JA, Schmatz C, Schultz AB. Lumbar disc degeneration: correlation with age, sex, and spine level in 600 autopsy specimens. *Spine (Phila Pa 1976)* 1988; **13**:173-178.
  - 14) Videman T. Evaluation of the prevention of occupational low-back pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 1991; **16**:685-686.
  - 15) Ala-Kokko L. Genetic risk factors for lumbar disc disease. *Ann Med* 2002; **34**:42-47.
  - 16) Sambrook PN, MacGregor AJ, Spector TD. Genetic influences on cervical and lumbar disc degeneration: a magnetic resonance imaging study in twins. *Arthritis Rheum* 1999; **42**:366-372.
  - 17) Pye SR, Reid DM, Adams JE *et al.* Influence of weight, body mass index and lifestyle factors on radiographic features of lumbar disc

- degeneration. *Ann Rheum Dis* 2007; **66**:426-427.
- 18) Battie MC, Videman T, Gill K *et al.* 1991 Volvo Award in clinical sciences. Smoking and lumbar intervertebral disc degeneration: an MRI study of identical twins. *Spine (Phila Pa 1976)* 1991; **16**:1015-1021.
- 19) Lyons G, Eisenstein SM, Sweet MB. Biochemical changes in intervertebral disc degeneration. *Biochim Biophys Acta* 1981; **673**:443-453.
- 20) Roberts S, Evans H, Trivedi J *et al.* Histology and pathology of the human intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Am* 2006; **88 Suppl 2**:10-14.
- 21) Saliken DJ, Mulet-Sierra A, Jomha NM *et al.* Decreased hypertrophic differentiation accompanies enhanced matrix formation in co-cultures of outer meniscus cells with bone marrow mesenchymal stromal cells. *Arthritis Res Ther* 2012; **14**:R153.
- 22) Pockert AJ, Richardson SM, Le Maitre CL *et al.* Modified expression of the ADAMTS enzymes and tissue inhibitor of metalloproteinases 3 during human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Rheum* 2009; **60**:482-491.
- 23) Osti OL, Vernon-Roberts B, Fraser RD. 1990 Volvo Award in experimental studies. Anulus tears and intervertebral disc degeneration. An experimental study using an animal model. *Spine (Phila Pa 1976)* 1990; **15**:762-767.
- 24) Yasuma T, Koh S, Okamura T *et al.* Histological changes in aging lumbar intervertebral discs. Their role in protrusions and prolapses. *J Bone Joint Surg Am* 1990; **72**:220-229.
- 25) Ito K, Creemers L. Mechanisms of intervertebral disk

- degeneration/injury and pain: a review. *Global Spine J* 2013; **3**:145-152.
- 26) Scott SC, Goldberg MS, Mayo NE *et al.* The association between cigarette smoking and back pain in adults. *Spine (Phila Pa 1976)* 1999; **24**:1090-1098.
- 27) Wang D, Nasto LA, Roughley P *et al.* Spine degeneration in a murine model of chronic human tobacco smokers. *Osteoarthritis Cartilage* 2012; **20**:896-905.
- 28) Miller VM, Clouse WD, Tonnessen BH *et al.* Time and dose effect of transdermal nicotine on endothelial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; **279**:H1913-1921.
- 29) Ernst E. Smoking, a cause of back trouble? *Br J Rheumatol* 1993; **32**:239-242.
- 30) Oda H, Matsuzaki H, Tokuhashi Y *et al.* Degeneration of intervertebral discs due to smoking: experimental assessment in a rat-smoking model. *J Orthop Sci* 2004; **9**:135-141.
- 31) Thompson JP, Oegema TR, Jr., Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine (Phila Pa 1976)* 1991; **16**:253-260.
- 32) Masuda K, Imai Y, Okuma M *et al.* Osteogenic protein-1 injection into a degenerated disc induces the restoration of disc height and structural changes in the rabbit anular puncture model. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; **31**:742-754.
- 33) Chujo T, An HS, Akeda K *et al.* Effects of growth differentiation factor-5 on the intervertebral disc--in vitro bovine study and in vivo rabbit disc degeneration model study. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; **31**:2909-2917.



- 34) Nagae M, Ikeda T, Mikami Y *et al.* Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres. *Tissue Eng* 2007; **13**:147-158.
- 35) Nishida K, Kang JD, Suh JK *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer to nucleus pulposus cells. Implications for the treatment of intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)* 1998; **23**:2437-2442; discussion 2443.
- 36) Liang H, Ma SY, Feng G *et al.* Therapeutic effects of adenovirus-mediated growth and differentiation factor-5 in a mice disc degeneration model induced by annulus needle puncture. *Spine J* 2010; **10**:32-41.
- 37) Yoon ST, Park JS, Kim KS *et al.* ISSLS prize winner: LMP-1 upregulates intervertebral disc cell production of proteoglycans and BMPs in vitro and in vivo. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004; **29**:2603-2611.
- 38) Nishida K, Doita M, Takada T *et al.* Sustained transgene expression in intervertebral disc cells in vivo mediated by microbubble-enhanced ultrasound gene therapy. *Spine (Phila Pa 1976)* 2006; **31**:1415-1419.
- 39) Sudo H, Minami A. Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum* 2011; **63**:1648-1657.
- 40) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**:143-147.
- 41) Frenette PS, Pinho S, Lucas D *et al.* Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol* 2013; **31**:285-316.
- 42) Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell*

- 2012; **10**:709-716.
- 43) Sakai D, Grad S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; **84**:159-171.
- 44) Orozco L, Soler R, Morera C *et al.* Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation* 2011; **92**:822-828.
- 45) Kikuta S, Tanaka N, Kazama T *et al.* Osteogenic effects of dedifferentiated fat cell transplantation in rabbit models of bone defect and ovariectomy-induced osteoporosis. *Tissue Engineering Part A* 2013; **19**:1792-1802.
- 46) Jumabay M, Matsumoto T, Yokoyama S *et al.* Dedifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J Mol Cell Cardiol* 2009; **47**:565-575.
- 47) Ohta Y, Takenaga M, Tokura Y *et al.* Mature adipocyte-derived cells, dedifferentiated fat cells (DFAT), promoted functional recovery from spinal cord injury-induced motor dysfunction in rats. *Cell Transplant* 2008; **17**:877-886.
- 48) Yamada H, Ito D, Oki Y *et al.* Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells promotes locomotor functional recovery by remyelination and glial scar reduction after spinal cord injury in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; **454**:341-346.
- 49) Sakuma T, Matsumoto T, Kano K *et al.* Mature, adipocyte derived, dedifferentiated fat cells can differentiate into smooth muscle-like cells and contribute to bladder tissue regeneration. *J Urol* 2009; **182**:355-365.
- 50) Obinata D, Matsumoto T, Ikado Y *et al.* Transplantation of mature

- adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. *Int J Urol* 2011; **18**:827-834.
- 51) Soejima K, Kashimura T, Asami T *et al.* Effects of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells on generation and vascularisation of dermis-like tissue after artificial dermis grafting. *J Plast Surg Hand Surg* 2015; **49**:25-31.
- 52) Maruyama T, Fukuda N, Matsumoto T *et al.* Systematic implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated monoclonal antibody 1-22-3-induced glomerulonephritis by immunosuppression with increases in TNF-stimulated gene 6. *Stem Cell Res Ther* 2015; **6**:80.
- 53) Deyo RA, Bass JE. Lifestyle and low-back pain. The influence of smoking and obesity. *Spine (Phila Pa 1976)* 1989; **14**:501-506.
- 54) Holm S, Nachemson A. Nutrition of the intervertebral disc: acute effects of cigarette smoking. An experimental animal study. *Ups J Med Sci* 1988; **93**:91-99.
- 55) Masuda K, An HS. Growth factors and the intervertebral disc. *Spine J* 2004; **4**:330S-340S.
- 56) Horner HA, Urban JP. 2001 Volvo Award Winner in Basic Science Studies: Effect of nutrient supply on the viability of cells from the nucleus pulposus of the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001; **26**:2543-2549.
- 57) Urban JP. The role of the physicochemical environment in determining disc cell behaviour. *Biochem Soc Trans* 2002; **30**:858-864.
- 58) Elmasry S, Asfour S, de Rivero Vaccari JP *et al.* Effects of Tobacco Smoking on the Degeneration of the Intervertebral Disc: A Finite Element Study. *PLoS One* 2015; **10**:e0136137.

- 59) Yim RL, Lee JT, Bow CH *et al.* A systematic review of the safety and efficacy of mesenchymal stem cells for disc degeneration: insights and future directions for regenerative therapeutics. *Stem Cells Dev* 2014; **23**:2553-2567.
- 60) Sakai D. Stem cell regeneration of the intervertebral disk. *Orthop Clin North Am* 2011; **42**:555-562, viii-ix.
- 61) Henriksson HB, Svanvik T, Jonsson M *et al.* Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model. *Spine (Phila Pa 1976)* 2009; **34**:141-148.
- 62) Wei A, Tao H, Chung SA *et al.* The fate of transplanted xenogeneic bone marrow-derived stem cells in rat intervertebral discs. *J Orthop Res* 2009; **27**:374-379.
- 63) Lee RH, Pulin AA, Seo MJ *et al.* Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 2009; **5**:54-63.
- 64) Sun Z, Luo B, Liu ZH *et al.* Adipose-derived stromal cells protect intervertebral disc cells in compression: implications for stem cell regenerative disc therapy. *Int J Biol Sci* 2015; **11**:133-143.
- 65) Ren G, Chen X, Dong F *et al.* Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med* 2012; **1**:51-58.
- 66) Dimarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal stem cells in tissue repair. *Front Immunol* 2013; **4**:201.
- 67) Lee JW, Fang X, Krasnodembskaya A *et al.* Concise review: Mesenchymal stem cells for acute lung injury: role of paracrine soluble

factors. *Stem Cells* 2011; **29**:913-919.

- 68) Takebayashi T, Iwamoto M, Jikko A *et al.* Hepatocyte growth factor/scatter factor modulates cell motility, proliferation, and proteoglycan synthesis of chondrocytes. *J Cell Biol* 1995; **129**:1411-1419.
- 69) Hiyama A, Yokoyama K, Nukaga T *et al.* Response to tumor necrosis factor-alpha mediated inflammation involving activation of prostaglandin E2 and Wnt signaling in nucleus pulposus cells. *J Orthop Res* 2015; **33**:1756-1768.

《 研究業績 》

官方啓行

I	発表	① 一般発表	22 (単 5 / 共 17)
		② 特別発表	なし
II	論文	① 原著論文	なし
		② 症例報告	3 (単 1 / 共 2)
		③ 総説	なし
III	著書		なし

以上

## I 発表

### ① 一般発表

1. 池田迅, 羽毛田公, 宇賀真知子, 松三雄騎, 新谷榮崇, 袖山雅子, 宮方啓行, 氷見智子, 奈倉千苗美, 宇都栄作, 田平佳子, 相馬正義, 松本紘一 : Preclinical Cushing 症候群を合併したインスリンノーマの 1 例, 第 478 回日本大学医学会例会, 東京, 2007 年 9 月
2. 宮方啓行, 長尾聡哉, 森本祐介, 鈴木元, 木下豪紀, 長岡正宏, 斎藤明義, 徳橋泰明 : ガンマナイール後、ラグスクリュー骨頭穿孔に対して U-ラグスクリューで置換した 1 例, 第 50 回関東整形災害外科学会, 東京, 2010 年 3 月
3. 中島智直, 植松義直, 加藤有紀, 小川剛史, 田中伸明, 大幸英至, 谷口眞, 根本菜穂, 岡村祐己, 宮方啓行, 秋田護, 相馬大鋭, 柳澤正彦, 伊藤亜希子, 大幸俊三 : 特発性腰椎硬膜外脂肪腫の 1 例, 第 17 回練馬医学会, 東京, 2010 年 6 月
4. 宮方啓行, 岡村祐己, 中島智直, 加藤有紀, 植松義直, 大幸俊三, 徳橋泰明 : トリガーポイント注射後に発症した右上肢壊死性筋膜炎の 1 例, 第 656 回整形外科集談会東京地方会, 東京, 2010 年 11 月
5. 宮方啓行, 矢作宏, 石神等, 李東信 : 頸胸椎硬膜外血腫に対し手術療法を施行した 1 例, 第 144 回神奈川整形災害外科研究会, 神奈川, 2012 年 3 月
6. 宮方啓行, 長尾聡哉, 清水学, 後藤文聖, 鈴木麗, 谷本浩二, 洞口敬, 長岡正宏, 徳橋泰明 : Missing talus (外傷性距骨完全脱臼) の 1 例, 第 61 回東日本整形災害外科学会, 群馬, 2012 年 8 月
7. 長谷川太志, 植松義直, 網代泰充, 長尾聡哉, 豊泉泰洋, 澤田浩

- 克，宮方啓行，長岡正宏，徳橋泰明：妊娠後骨粗鬆症の1例，第665回整形外科集談会東京地方会，東京，2012年11月
8. 網代泰充，植松義直，宮方啓行，上田修平，徳橋泰明：S2 alar iliac screwによる脊柱再建の検討，第42回日本脊椎脊髄病学会学術集会，沖縄，2013年4月
9. 長尾聡哉，豊泉泰洋，駿河誠，石垣乾貴，宮方啓行，長岡正宏：中手骨骨折に対するcirclage wiring法の治療成績，第39回日本骨折治療学会，福岡，2013年6月
10. 上井浩，徳橋泰明，大島正史，間世田優文，澤田浩克，宮方啓行：脊椎破裂骨折に対する経皮的椎弓根スクリューによる多椎間後方固定術，第62回東日本整形災害外科学会，長野，2013年9月
11. 三嶋信太郎，間世田優文，上井浩，大島正史，永井悠，小島敏雄，澤田浩克，宮方啓行，矢作善之，徳橋泰明：腰椎に発生したMTX関連リンパ増殖性疾患(MTX-LPD)の1例，第669回整形外科集談会東京地方会，東京，2013年9月
12. 大島正史，徳橋泰明，網代泰充，上井浩，中島伸哉，間世田優文，澤田浩克，宮方啓行：腰椎分離症に対する分離部修復術の治療成績 segmental screw hook fixation，第43回日本脊椎脊髄病学会学術集会，京都，2014年4月
13. 上井浩，徳橋泰明，大島正史，間世田優文，中橋昌弘，宮方啓行，中山渕志：多椎胸椎後縦靱帯骨化症に対する除圧範囲骨化巣後彎角による後方除圧固定術の治療成績，第43回日本脊椎脊髄病学会学術集会，京都，2014年4月
14. 上井浩，徳橋泰明，大島正史，間世田優文，澤田浩克，宮方啓行：多椎胸椎後縦靱帯骨化症に対する除圧範囲骨化巣後彎角に



よる後方除圧固定術，第 87 回日本整形外科学会学術総会，神戸，2014 年 5 月

15. 上井浩，徳橋泰明，大島正史，間世田優文，澤田浩克，宮方啓行：化膿性脊椎炎に対するインストゥルメンテーションを併用した後方固定術の意義，第 87 回日本整形外科学会学術総会，神戸，2014 年 5 月
16. 大島洋平，宮方啓行，大島正史，上井浩，間世田優文，澤田浩克，徳橋泰明：診断に難渋した肥厚性硬膜炎の 1 例，第 673 回整形外科集談会東京地方会，2014 年 6 月
17. 柳澤正彦，上井浩，宮方啓行，佐久間俊行，間世田優文，大島正史，徳橋泰明：難治性化膿性脊椎炎に対して経皮的椎弓根スクリューを用いて後方固定術を行った 1 例，第 21 回練馬医学会，東京，2014 年 6 月
18. 佐久間俊行，徳橋泰明，上井浩，大島正史，間世田優文，宮方啓行：透析脊椎症の手術成績 脊椎手術を施行した透析性脊椎症患者の検討，第 63 回東日本整形災害外科学会，東京，2014 年 9 月
19. 上井浩，徳橋泰明，中島伸哉，大島正史，間世田優文，佐久間俊行，宮方啓行：骨粗鬆症性椎体骨折に対するインストゥルメンテーション手術の合併症・対策 骨粗鬆症性椎体骨折後の後彎変形に対する矯正骨切り術の長期成績，第 63 回東日本整形災害外科学会，東京，2014 年 9 月
20. 上井浩，徳橋泰明，大島正史，間世田優文，澤田浩克，宮方啓行：脊椎破裂骨折に対する経皮的椎弓根スクリューによる低侵襲後方固定術，第 20 回日本最小侵襲整形外科学会，栃木，2014 年 11 月

21. 大島正史，徳橋泰明，上井浩，間世田優文，佐久間俊行，宮方啓行，中島智直，網代泰充：腰椎分離すべり症に対する後側方固定術の長期成績 術後15年以上，第88回日本整形外科学会学術総会，神戸，2015年5月
22. 宮方啓行，松本太郎，風間智彦，小山公行，上井浩，徳橋泰明：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，第36回日本炎症・再生医学会，東京，2015年7月

②特別発表 なし

## II 論文

①原著論文 なし

②症例報告

1. 岡村祐己，大幸俊三，大幸英至，植松義直，加藤有紀，田中申明，谷口眞，中島智直，宮方啓行，関雅之：転移性大腿骨頸部骨折術後、再骨折し、全人工大腿骨置換術を行った一例，Hip Joint，37:936-940，2011.
2. 宮方啓行，長尾聡哉，清水学，谷本浩二，長岡正宏，徳橋泰明：missing talus（開放性距骨完全脱臼）の1例，東日本整形災害外科学会雑誌，25:178-184，2013.
3. 佐久間俊行，徳橋泰明，上井浩，大島正史，間世田優文，宮方啓行：脊椎手術を施行した透析性脊椎症患者の検討，東日本整形災害外科学会雑誌，27:76-78，2015.

③総説 なし

III 著書 なし