

ラット椎間板変性モデルに対する  
脱分化脂肪細胞(DFAT)の  
静脈内投与による治療効果

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

小山 公行

修了年 2017 年

指導教員 徳橋 泰明

ラット椎間板変性モデルに対する  
脱分化脂肪細胞(DFAT)の  
静脈内投与による治療効果

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

小山 公行

修了年 2017 年

指導教員 徳橋 泰明

目次	
概要	
諸言	.....1
1. はじめに	.....3
2. 椎間板の構造と組成	.....3
3. 椎間板の変性	.....5
4. 椎間板変性症の治療	.....5
5. 脱分脂肪細胞 (Dedifferentiated fat cell: DFAT)	.....9
目的	.....10
対象と方法	.....10
結果	.....14
考察	.....17
まとめ	.....20
謝辞	.....21
図表	.....22
引用文献	.....36
研究業績	.....41

## 【概要】

椎間板変性症は髄核細胞の不可逆的な変性によって生じ、根本的な治療は現在までに確立されていない。近年、椎間板変性症に対する細胞治療が注目されており、特に間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)を使った研究が多く試みられている。Matsumoto ら<sup>1)</sup>は、皮下脂肪組織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 MSC と同等の多分化能を示すことを明らかにした。本研究では、椎間板穿刺によるラット椎間板変性モデルにDFAT を静脈内投与し、椎間板変性に対する抑制効果を示すか検討した。

合計 18 頭の SD ラット(12 週齢 雄性)に対し、X 線透視下に 21G 針を用いて尾椎椎間板 Co11/Co12 および Co13/Co14 を全周性に 30 回穿刺し、椎間板傷害処理を行った。Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群 (各群 n=6)に分け、Control 群は 0.5 ml PBS を、DFAT 群は DFAT  $1.0 \times 10^6$  / 0.5 ml PBS を、Fibroblast 群は Fibroblast  $1 \times 10^6$  / 0.5 ml PBS をそれぞれ傷害直後および 4 週間後に静脈内注射した。2 週間毎に尾椎の X 線撮影を行い、椎間板高を評価した。8 週間後に尾椎椎間板組織を摘出し脱灰した後、パラフィン切片標本を作成した。そして HE 染色、アルシアンブルー染色、マッソントリクローム染色、サフラニン O 染色、EVG 染色を行い、組織学的に評価した。

X 線学的に椎間板高を定量し、%Disc Height Index(以下%DHI)としてその変化を評価した結果、Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群ともに傷害椎間板である Co11/12 および Co13/14 の%DHI の低下が傷害 2 週目から認められた。Control 群では、Co11/12、Co13/14 とともに 2 週目以後も徐々に%DHI が低下し、8 週目にはそれぞれ約 40%まで低下していた。Fibroblast 群では、Co11/12、Co13/14 とともに

に Control 群より早期から%DHI が低下する傾向が認められ、8 週目にはそれぞれ Control 群とほぼ同等のレベル (%DHI 約 40%) まで低下していた。これに対して DFAT 群では、Co11/12、Co13/14 とともに傷害 2 週間目に%DHI の低下が認められるものの、その後の低下が抑制される傾向にあり、8 週目の%DHI は Co11/12、Co13/14 とともに約 60%であった。統計学的解析を行った結果、Co11/12 では、DFAT 群は Control 群および Fibroblast 群に比べ有意に%DHI が高かった。

組織学的評価では、Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群ともに髓核が消失していた。軟骨終板周囲にはしばしば炎症性細胞浸潤を示唆する単核細胞の集積が認められた。DFAT 群では、髓核組織は消失しているものの、繊維輪の退縮は軽度であり、軟骨終板周囲の炎症性細胞の数も少ない傾向が認められた。また DFAT 群では、Control 群、Fibroblast 群に比べ繊維輪や軟骨終板周囲組織のコラーゲンマトリックスの増生が強い傾向が認められた。各群の軟骨終板周囲の微小血管数を定量比較した結果、傷害椎間板組織において Control 群、Fibroblast 群に比べ DFAT 群では、微小血管数が有意 ( $p < 0.05$ ) に増加していることが明らかになった。

以上の結果より、本椎間板変性モデルにおいて DFAT 静脈内投与により軟骨終板周囲の微小血管の増生と軟骨基質の増加が誘導され、椎間板間隙の狭小化抑制効果が認められることが明らかとなった。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、DFAT 静脈内投与による椎間板変性症治療の可能性が示された。

## 【緒言】

### 1. はじめに

2007年に日本整形外科学会はロコモティブシンドローム、日本語では運動器症候群という概念が提唱された。ロコモティブシンドロームとは、運動器の低下により寝たきりや、要介護が必要な状態になる手前の状態を示す。高齢化社会である日本において、寝たきりとなり、要介護が必要な高齢者の増加を抑制することは健康寿命を伸ばすためには不可欠である。寝たきりや要介護が必要となる原因として、腰痛があげられている。慢性腰痛症は、高齢化社会である日本において、最も代表的な **Common disease** である。平成25年度の国民生活基礎調査において腰痛の有訴者率は、男性1位、女性2位であり、その割合も年齢が上がるにしたがって増加している。腰痛の主要な原因である椎間板変性症は椎間板を構成する髄核細胞の不可逆的な変化により発生する。椎間板変性に対する根治治療は現在のところ存在せず、主に対症療法が行われている。近年、再生医療の進歩はめざましく、椎間板再生においても種々の試みが検討されている。遺伝子を直接ターゲットにする方法<sup>2-4)</sup>、成長因子<sup>5)</sup>などを含めたサイトカインを用いる方法、間葉系幹細胞 (**Mesenchymal stem cell: MSC**)<sup>6-10)</sup>など細胞を用いる方法などが検討されている。最近新たな再生医療用細胞ソースとして成熟脂肪細胞に由来する脱分化脂肪細胞 (**Dedifferentiated fat cell: DFAT**) が注目されている<sup>1)</sup>。本研究では、ラット椎間板変性症モデルに対し、DFATを静脈内投与することで、椎間板変性症に対する新たな細胞治療の可能性について検討した。

### 2. 椎間板の構造と組成

椎間板は脊椎の支持性と運動性を担っている。上下に隣接する椎体の間に介在する円盤状の組織であり、大部分を繊維軟骨から構成され、関節包、関節腔、滑膜組織を欠いている。基本的な構成要素は、髄核とこれを取り囲む繊維輪、椎体面に存在する軟骨終板である(図 2)。

#### ①髄核(Nucleus pulposus)

髄核は無血管の組織で、無構造の基質内に髄核細胞がまばらに存在し、ムコ多糖染色で陽性を示す。髄核は脊索由来の組織であり、幼児期に軟骨様細胞の髄核細胞に置換される。水分が豊富で湿重量の 70~90%を占める。コラーゲンはⅡ型で乾燥重量の 15~20%に過ぎない。一方、プロテオグリカンは乾燥重量の約 65%を占め、その高い保水性により髄核に高い内圧を発生させる。プロテオグリカンのコア蛋白に結合しているグリコサミノグリカンが陰性に荷電し、水分を引き寄せていることによって維持されている。

#### ②繊維輪(Anulus fibrosus)

繊維輪は内層と外層に分かれる。外層の層板の繊維は椎骨の骨に結合しているが、内層の繊維は軟骨板と結合している。繊維輪の湿重量の 60~70%が水分であり、乾燥重量の約 50%をコラーゲンが占める。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大きくなる。外層は細長い繊維芽細胞様細胞が存在し、内層に向かうにつれて細胞の形態は丸みを帯びて、内層では軟骨細胞様の形態をとる。

#### ③軟骨終板(Cartilage endplate)

軟骨終板は椎体の上下の皮質骨面を覆う。厚さは 1~2 mm であり、組織学的には椎体側は硝子軟骨で、椎間板側は繊維軟骨である。椎間板を構成する髄核と繊維輪内層の栄養は椎体内血管から軟骨終板を介して拡散するため、その経路

として重要な役割を果たしている。

### 3. 椎間板の変性

脊柱の機能に関係する椎間板は、一生を通じて力学的負荷にさらされている。椎間板内圧でみると、立位を 100%とすると、上体の屈曲で 150%、屈曲位での物体の挙上で 220%以上となる。椎間板組織は大部分が無血管で、その栄養は軟骨板と周囲からの拡散に依存しており、代謝は荷重に応じて変化する。日頃の労働やスポーツに伴う急激な椎間板内圧の上昇によっても、髄核組織が繊維輪の亀裂を通して脱出することがある。これが椎間板ヘルニアであり、後縦靭帯を圧迫し神経根を刺激するため腰痛、下肢痛が出現する。加齢に伴う生理的変化でも生じ、壮年期から老年期にはより多く見られる。特に頸椎や腰椎に起こりやすい。ヘルニアを生じなくても加齢とともに椎間板の変性は生じ、繊維輪が緩んで外側に向かって膨隆する。すなわち腰部脊柱管狭窄症という病態である。レントゲン写真では、椎間板が変性すると椎間高が減少し、また MRI では水分量の低下が認められる。変性した椎間板は髄核が消失し椎体の間隙は狭小化し、膠原繊維が露出してくる。細胞外基質の多糖類やコンドロイチン硫酸も減少する。また石灰の沈着などの所見も認められやすい。

### 4. 椎間板変性症の治療

治療方法として現在は保存的治療と手術治療の二つがある。保存療法は主に、鎮痛剤などの投薬、ストレッチなどの体操、コルセットなどの装具療法がある。手術

療法としては椎間板摘出術、椎体間固定術、人工椎間板置換術などの手術療法がある。しかし、現時点では対症療法が中心であり根本的な治療法はない。そのため新たな治療が検討されている。

#### ①遺伝子治療

遺伝子治療は、ウイルスベクターもしくは非ウイルス性のベクターを用いて形質導入する治療である。細胞の不死化に係わる human telomerase reverse transcriptase (hTERT)遺伝子を、レンチウイルスを使って髄核細胞に形質導入することで、210 日後にも細胞内に hTERT が発現することが報告されている<sup>11)</sup>。遺伝子ベクターを直接変性椎間板に注射する方法も検討されている。たとえばウサギの椎間板を穿刺傷害させ、Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)や Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP1)を Adeno-associated virus serotype 2 (AAV2) ベクターを用いて、傷害椎間板に直接移植したところ椎間板変性が抑制されたという報告がある<sup>12)</sup>。ビーグル犬にヒト Bone morphogenic protein 7 (BMP7)を発現させた椎間板組織を移植したところ、24 週間にわたり移植された椎間板の変性が抑制され、椎間板高が保たれた<sup>13)</sup>。ただしウイルスベクターによる治療には免疫学的、毒性、突然変異などいくつかのハードルがある。非ウイルスベクターではその危険性は低いですが、長期にわたって有効であるという結果が出ていない<sup>14)</sup>。

#### ②成長因子療法

椎間板の変性に係わっていることが明らかになっている Growth differentiation factor 5 (GDF-5)<sup>15-16)</sup>、Osteogenic protein-1<sup>17-18)</sup>、BMP-2<sup>19)</sup>、Fibroblast growth Factor (FGF)<sup>20)</sup>といった成長因子を用いた研究が報告されて

いる。たとえばリコンビナントヒト GDF-5 がウシ髄核細胞の増殖能を高めることが示されている<sup>16)</sup>。またマウス椎間板へ GDF-5 を注射することにより髄核内の繊維軟骨細胞の増殖を認め、アグリカンとタイプ II コラーゲンの発現増加することが報告されている<sup>21)</sup>。しかし成長因子療法は、タンパク質の投与が主であるため、単回の注射ではその効果は長期間期待できない。このため椎間板への複数回にわたる注射が必要になるが、炎症や感染などのリスクを生む可能性がある<sup>22)</sup>。

### ③細胞治療

変性椎間板を再生する試みとして、細胞治療は最も進歩している分野である。細胞治療に使われる細胞は多種にわたっている。骨髄 MSC<sup>23-24)</sup>、脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived stem cell: ASC)<sup>25)</sup>、滑膜幹細胞<sup>26)</sup>、筋肉由来の幹細胞<sup>27)</sup>、嗅神経由来の幹細胞<sup>28)</sup>、人工多能性幹細胞(Induced pluripotent stem cell: iPSC)<sup>29)</sup>、造血幹細胞<sup>30)</sup>、胚性幹細胞 (Embryonic stem cell: ESC)<sup>31)</sup>などを使った椎間板変性への治療効果が報告されている。

細胞治療で臨床応用を含め最も研究が進んでいるのは MSC である。MSC は髄核様細胞に分化することが明らかにされている<sup>32-33)</sup>。また MSC と髄核細胞を共培養することで、相互作用が起こりプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス合成が促進する。Le Visage ら<sup>34)</sup>は、三次元ペレットシステムを用い MSC と髄核細胞を共培養したところ、プロテオグリカンの構成要素であるグリコサミノグリカンが産生されることを示した。また椎間板の細胞外マトリックスの主成分であるタイプ II コラーゲンやアグリカンの発現も亢進することが報告されている<sup>35-37)</sup>。また髄核細胞との共培養により MSC からタイプ II コラーゲンの遺伝子発現が誘導される<sup>38)</sup>。脊索細胞由来の培養上清を使用することにより MSC は髄核様細

胞としての機能を示すことも明らかとなっている<sup>39)</sup>。共培養において、MSC は変性していない椎間板由来の髄核細胞よりも変性した椎間板由来の髄核細胞のほうが、より遺伝子の発現へ影響力を発揮することも示されており、変性椎間板の髄核細胞と共培養したほうが、タイプ II コラーゲンの発現が亢進する。さらに Zhang ら<sup>40)</sup>は、健康な椎間板に同種 MSC を移植するとプロテオグリカンの産生が亢進することを明らかにした<sup>41)</sup>。

変性椎間板への細胞移植の際に、細胞単体で移植するよりも、適切な担体と同時に移植することが有用であることが明らかにされている。担体にはフィブリンやヒアルロン酸ゲルが使用され、MSC をそれら担体と同時に移植した方が椎間板高を維持できることが報告されている<sup>9, 42)</sup>。Sakai ら<sup>43)</sup>はウサギ椎間板変性モデルに、タイプ II コラーゲンを担体にして自家骨髄 MSC を椎間板に移植した。X線、MRI で椎間板の高さを評価したところ、椎間板高さが保たれていたことが分かった。髄核穿刺によるブタ椎間板変性モデルにおいて、ハイドロゲルを担体としてヒト MSC を移植すると、移植後 6 か月まで MSC は残存し、Sox9 やタイプ II コラーゲンの発現が認められた<sup>44)</sup>。また担体や細胞と共にサイトカインを投与方法も検討されている。Yang ら<sup>45)</sup>はウサギ椎間板変性モデルにおいて、フィブリン、TGF $\beta$ -1、MSC を一緒に移植したところ、椎間板の高さの減少が抑えられたばかりか、タイプ II コラーゲンの量が保たれ、細胞のアポトーシスする割合が減少する結果を得た。ヒトから採取した MSC を、ウシ椎間板に移植した研究では、4 週間後に髄核様細胞に分化することが示された<sup>46)</sup>。

MSC を用いた臨床研究も始まっている。Orozco ら<sup>23)</sup>は自家骨髄 MSC を 10 人の椎間板変性症患者の変性椎間板に移植する治療を行った。移植 3 ヶ月後に腰痛や椎間の不安定性の改善を認め、12 か月後の MRI では椎間板の水分が保たれて

いた。しかし一方で椎間板高は保たれないといった結果となった。また、Yoshikawa ら<sup>24)</sup>は脊柱管狭窄症の患者にスポンジグラフトに埋め込んだ自家骨髄 MSC の移植を二人の患者に行ったところ、2 年後に腰痛症状の改善を認め、X 線、CT にて椎間関節の不安定性の改善を示し、MRI にて水分が保たれたとの報告もある。

## 5. 脱分化脂肪細胞(Dedifferentiated fat cell: DFAT)

細胞治療において、MSC は最も広く研究されている。しかし、椎間板変性疾患の患者の多くは高齢者であり、このような患者では生体内における MSC の数や増殖能が低下していることから、移植に必要な細胞数の MSC が調製できない症例が多く存在することが明らかになっている。Matsumoto ら<sup>41)</sup>は、ヒトを含む哺乳類の脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を天井培養することにより、生じてくる細胞群が、高い増殖能と MSC に類似した多分化能を獲得することを明らかにした。これは一端終末分化した細胞を適切な環境下で培養することで人工的に未分化な細胞へ誘導することができることを示唆している。この成熟脂肪細胞に由来する多能性細胞は脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell : DFAT)と呼ばれ、種々の疾患に対する再生医療への応用が期待されている。DFAT はドナーの年齢、基礎疾患に影響されず、少量の脂肪組織から短期間に大量調整が可能であることが明らかにされている。従って椎間板変性症患者からも DFAT は容易に調製できることが予想される。整形外科領域では、Kikuta ら<sup>47)</sup>が、骨欠損モデルウサギや卵巣摘出による骨粗鬆症モデルウサギに DFAT を移植することにより、骨形成が促進することを報告している。

## 【目的】

成熟脂肪細胞に由来する DFAT は、少量の脂肪組織から低侵襲性に大量調製が可能な MSC に類似した多能性細胞である。ドナーの年齢や基礎疾患に影響されず調製できるため、高齢者骨軟骨疾患に対する実用的な治療用細胞として期待できる。以前当教室では、椎間板穿刺による外傷性ラット椎間板変性モデルにおいて、DFAT を局所投与することで椎間板の変性が抑制されることを報告した(中山渕志 2015 年 日本大学大学院学位論文)。また喫煙によるラット椎間板変性モデルにおいて、DFAT を静脈内投与することにより椎間板の変性が組織学的に抑制されることを報告した(宮方啓行 2016 年 日本大学大学院学位論文)。本研究では、椎間板穿刺によるラット椎間板変性モデルに対し、DFAT を静脈内投与することにより、椎間板変性を抑制できるか検討した。

## 【対象と方法】

### 1. 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 AP15M056）を得て実施した。雄性 Sprague-Dawley (SD)ラット(体重:約 300g、約 12 週齢)はオリエンタル酵母株式会社から購入して実験に使用した。動物の飼育、実験は日本大学医学部動物実験指針にしたがって施行した。

### 2. 細胞の調整と培養

ラット DFAT は既報<sup>1)</sup>に従って調製した。SD ラットの皮下脂肪 1g を細切し、振盪下に 37°C、1 時間 0.1% (w/v)コラゲナーゼ (Sigma-Aldrich) 処理を行った。これを 250  $\mu\text{m}$  のフィルターを用いて濾過した後 135G、3 分間遠心を行った。

上清(成熟脂肪細胞分画)をリン酸緩衝バッファー (Phosphate-buffered saline; PBS)で洗浄後、20 %ウシ胎児血清(Fetal bovine serum; FBS, JRH Bioscience, Lot 6G2146)含有 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, Invitrogen)に満たされた T-12.5 細胞培養フラスコ(BD Falcon)内に  $5 \times 10^4$  の脂肪細胞を播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。一週間後に培養液を除去し、フラスコを反転し、天井面に付着した細胞を 20% FBS 含有 DMEM で通常の付着培養を行った(図 1)。得られた DFAT は 20%ウシ胎児血清含有 DMEM を用いて継代培養を行った。培養液の交換は 3-4 日毎に行った。得られた DFAT は継代 5 代以内に実験に使用した。

ラット繊維芽細胞の採取方法は既報<sup>48)</sup>に従い調製した。SD ラットから 1 x 1cm 四方の皮膚を採取し、PBS で洗浄後、60 mm ディッシュ(BD Falcon)上に付着させた。1 時間後 10%FBS 含有 DMEM に培養液を交換し、付着培養を行った。皮膚組織から派生し増殖した繊維芽細胞は 4 代継代培養した後、実験に用いた。

### 3. ラット椎間板変性モデル

ラット椎間板変性モデルは、Issy ら<sup>49)</sup>の方法に従って作成した。SD ラット (n=18)に対し、イソフルランによる吸入麻酔を行った後、X 線透視装置下に尾椎の椎間板 Co11/Co12 及び Co13/Co14 を 21G 針にて、5 回×6 方向 (計: 30 回) 穿刺を行い、椎間板傷害を作製した。この方法により Issy らは椎間板の変性が穿刺 1 週間後から椎間板変性が生じることを報告している<sup>49)</sup>。また当教室でも、この穿刺処理により穿刺 1 週間後から少なくとも 8 週間後まで持続する髄核組織の消失を伴う椎間板変性が誘導されることを確認している (中山渕志 2015 年 日本大学大学院学位論文)。傷害作製後、経時的に X 線撮影を行い、椎間板高の変化を

観察した。

#### 4. ラット椎間板変性モデルへの DFAT 移植実験

合計 18 頭の SD ラット(12 週齢 雄性)に対し、上記方法にて尾椎椎間板 Co11/Co12 および Co13/Co14 を全周性に 30 回穿刺し、椎間板変性処理を行った。尾椎椎間板 Co11/Co12 と Co13/Co14 の間の椎間板 Co12/13 は非傷害コントロールとした。

ランダムに Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群の 3 群 (各群 n=6) に分け、Control 群には 0.5 ml PBS を、DFAT 群は DFAT  $1.0 \times 10^6$  / 0.5 ml PBS を Fibroblast 群はラット繊維芽細胞  $1.0 \times 10^6$  / 0.5 ml PBS をそれぞれ傷害直後および 4 週間後に尾静脈より静脈内注射した。投与ルート、投与細胞数、投与間隔は、以前当教室にて行った受動喫煙モデルラットに対して DFAT 静脈内投与の有効性を認めた研究 (宮方啓行 2016 年 日本大学大学院学学位論文)を参考に決定した。2 週間毎に尾椎(Co11~Co14)の X 線撮影を行い、椎間板高の変化を評価した。また傷害 8 週間後に炭酸ガスによる安楽死処理を行い、尾椎椎間板組織を摘出し、組織学的検討をおこなった。実験プロトコールを図 3 に示す。

#### 5. X 線学的評価

椎間板傷害後 0 週、2 週、4 週、6 週、8 週に X 線撮影を施行し、椎間板高を評価した。イソフルランによる吸入麻酔を行った後、X 線透視装置下にてラット尾椎の椎間板高を測定した。椎間板高の X 線学的評価は Issy ら<sup>49)</sup>の方法に従った。Co11/Co12、Co12/Co13、Co13/Co14 の近位(PV: Proximal vertebra)と遠位(DV: Distal vertebra)の椎体の高さ、椎間板の高さ(DH: Disc height)を X 線透視

装置下に 2 mm 幅のスケールをリファレンスとし、画像解析ソフト Photoshop CC (Adobe)を用いて測定した。そして DH インデックス(DHI)を下記の計算式を用いて算出した。

$$DHI = 2 \times (DH1+DH2+DH3) / [(PV1+PV2+PV3)+(DV1+DV2+DV3)]$$

また、穿刺前後における DHI の変化率 (%DHI)を算出し、椎間板高の評価基準とした (図 4)。

## 6. 組織学的評価

椎間板傷害後 8 週目のレントゲンによる椎間板高測定後に、過量の炭酸ガス吸入を用い安楽死処置を行った。その後、尾椎椎間板 Co10/11 と Co14/15 で切断し、Co11/Co12、Co12/Co13、Co13/Co14 の椎間板を含んだ尾椎を摘出した。直ちに 10%ホルマリン固定し、KCX(塩酸と EDTA の混合液)を用いて脱灰後、パラフィン包埋し、厚さ 8  $\mu$ m で薄切を行い、組織切片標本を作製した。脱パラフィン処理後に Hematoxilin and Eosin (HE) 染色、アリシアンブルー染色、マッソントリクローム染色、サフラニン O 染色、エラスチカワンギーソン(Elastica van Gieson: EVG)染色を行った。作製した標本は、正立顕微鏡 BX51 (Olympus)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。

また各群の尾椎椎間板組織の EVG 染色標本を用いて、軟骨終板近傍の微小血管数を定量評価した。傷害椎間板(Co11/12, Co13/14)と、非傷害椎間板(Co12/13)の軟骨終板に存在する微小血管数をそれぞれ顕微鏡下に計測し、1 椎間板あたりの血管総数を算出した。

## 7.統計学的検討

定量データは、mean±SD または mean±SE で表した。連続した多群間の比較は、Repeated measured analysis of variance (ANOVA)を行った後、Post-hoc 解析として Turkey's multiple comparison test により各群間の有意差検定を行った。また独立した多群間の比較には、One way ANOVA を行った後、Turkey's multiple comparison test により各群間の有意差検定を行った。P<0.05 を有意水準とした。統計解析は GraphPad Prism ソフトウェア(Ver5.0a)を用いて行った。

### 【結果】

尾椎椎間板 Co11/Co12 および Co13/Co14 に対し、椎間板傷害処理を行ったラットをランダムに Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群の 3 群に分け、それぞれ PBS、DFAT、fibroblast を傷害直後および傷害 4 週間後の 2 回静脈内注射した。Fibroblast 群のうち一頭が注射後に死亡したため、Control 群 n=6、DFAT 群 n=6、Fibroblast 群 n=5 で評価した。

#### ① X 線学的検討

Control 群と DFAT 群の代表的な尾椎 X 線像を図 4 に示す。X 線透視装置による観察において、Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群ともに傷害椎間板である Co11/12 および Co13/14 の椎間板間隙の狭小化が椎間板傷害 2 週間目から認められた。この狭小化は実験終了時である傷害 8 週目まで持続的に認められた。PBS を投与した Control 群に対し、DFAT を投与した DFAT 群では、椎間板傷害による Co11/12 および Co13/14 の椎間板間隙の狭小化が軽度である傾向が認められた(図 4)。一方、非傷害椎間板である Co12/13 は、各群とも椎間板間隙に明らかな

変化は認められなかった。

X 線学的に椎間板高を定量し、%DHI としてその変化を評価した結果を図 5 に示す。Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群ともに傷害椎間板である Co11/12 および Co13/14 の%DHI の低下が傷害 2 週目から認められた。Control 群では、Co11/12、Co13/14 ともに 2 週目以後も徐々に%DHI が低下し、8 週目にはそれぞれ約 40% まで低下していた。Fibroblast 群では、Co11/12、Co13/14 ともに Control 群より早期から%DHI が低下する傾向が認められ、8 週目にはそれぞれ Control 群とほぼ同等のレベル (%DHI 約 40%) まで低下していた。これに対して DFAT 群では、Co11/12、Co13/14 ともに傷害 2 週間目に%DHI の低下が認められるものの、その後の低下が抑制される傾向にあり、8 週目の%DHI は Co11/12、Co13/14 ともに約 60% であった。統計学的解析を行った結果、Co11/12 では、DFAT 群は Control 群および Fibroblast 群に比べ有意に%DHI が高かった。また Co13/14 では、DFAT 群は Fibroblast 群に比べ有意に%DHI が高かった。

以上の結果より、ラット椎間板変性モデルにおいて DFAT 静脈内投与は椎間板間隙の狭小化を抑制することが明らかになった。

## ② 組織学的検討

椎間板傷害後 8 週目に尾椎の脱灰切片を作成し、各群の組織学的評価を行った。各群の代表的な傷害椎間板組織像を図 7~12 に示す。HE 染色像では Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群ともに髄核が消失しており、これにより椎間板間隙の狭小化をきたしている所見が認められた (図 7)。軟骨終板周囲にはしばしば炎症性細胞浸潤を示唆する単核細胞の集積が認められた。DFAT 群では、髄核組織は消失しているものの、線維輪の退縮は軽度であり、軟骨終板周囲の炎症性細胞の数

も少ない傾向が認められた。マッソントリクローム染色では 3 群とも髄核消失に伴い線維輪におけるコラーゲンマトリックスの増生がみとめられた(図 9)。DFAT 群では、Control 群、Fibroblast 群に比べ線維輪や軟骨終板周囲組織のコラーゲンマトリックスの増生が強い傾向が認められた。アルシアンブルー染色像では、3 群とも髄核の消失に伴い、青に染色される髄核の軟骨基質が減少している所見が認められた(図 10)。一方、軟骨終板の軟骨基質は 3 群とも保たれていた。DFAT 群では、Control 群や Fibroblast 群に比べ、線維輪と軟骨終板の間の組織に軟骨基質が増加している傾向が認められた(図 10 矢印)。硝子軟骨基質を赤く染色するサフラニン O 染色像(図 11)でもアルシアンブルー染色像と同様の所見が認められ、DFAT 群では、Control 群や Fibroblast 群に比べ、線維輪と軟骨終板の間の組織に軟骨基質が増加している傾向が認められた(図 11 矢印)。EVG 染色では、3 群とも髄核消失に伴い線維輪における弾性繊維の増生がみとめられた(図 12)。また EVG 染色では、軟骨終板周囲の微小血管を観察することが可能であった(図 13 矢印)。DFAT 群の傷害椎間板における軟骨終板周囲の微小血管は、Control 群や Fibroblast 群に比べ増生している所見が観察された。そこで、各群の軟骨終板周囲の微小血管数を定量比較した。その結果、傷害椎間板組織において Control 群、Fibroblast 群に比べ DFAT 群では、微小血管数が有意 ( $p < 0.05$ ) に増加していることが明らかになった(図 14)。一方、DFAT 投与による微小血管数の増加は、非傷害椎間板(Co12/13)では認められなかった。

以上の結果より、本椎間板変性モデルにおいて DFAT 静脈内投与により髄核組織の明確な再生は起こらないが、軟骨終板周囲の微小血管の増生と、軟骨基質の増加が誘導されることが明らかになった。

## 【考察】

日本大学医学部整形外科学教室では、これまでニコチン投与や受動喫煙による椎間板変性モデルラットを確立し、種々の研究を行ってきた<sup>50-54)</sup>。すでに受動喫煙による椎間板変性モデルラットに対し DFAT を静脈内投与すると椎間板変性の進行が抑制されることが明らかにされている(宮方啓行 2015 年学位論文)。本研究では、より椎間板変性の程度が著明で髄核の消失を伴う尾椎椎間板穿刺によるラット椎間板変性モデルを用いた。使用した椎間板変性モデルは、Issy ら<sup>49)</sup>の既報を参考に、尾椎に 21G 針を用いて全周性に 30 回穿刺する方法をとった。本研究室においても、すでにこの方法で椎間板の持続的な変性が誘導されることを確認しており、さらにこのモデルに対し DFAT を傷害椎間板に局所投与すると、椎間板間隙の狭小化が抑制されることが示されている(中山渕志 2015 年学論文)。今回、本モデルに対する DFAT 全身投与(静脈内投与)による治療効果を検討した。PBS 投与群(Control 群)、DFAT 移植群(DFAT 群)、繊維芽細胞移植群(Fibroblast 群)の 3 群で評価を行った結果、X 線学的評価では DFAT 群は Control 群や Fibroblast 群に比べ傷害後の%DHI が有意に高く、椎間板間隙の狭小化が抑制されることが明らかになった。いままでに種々の細胞で椎間板変性抑制作用が報告されているが、いずれも椎間板腔に直接移植したという研究である<sup>55)</sup>。本研究は静脈内全身投与により椎間板変性を抑制できる可能性を示した最初の報告であると思われる。MSC や ASC を静脈内投与するとその大部分が肺にトラップされ、トラップされた局所における細胞の相互作用により種々の液性因子が分泌され、免疫制御反応や組織再生を促すことが明らかにされている<sup>56)</sup>。最近、Maruyama ら<sup>57)</sup>は、免疫性腎炎モデルラットに DFAT を静脈内投与する実験を行った。その結果、移植された DFAT は肺にトラップされ、抗炎症サイトカインである TNF-stimulated

gene 6 protein (TSG-6)の放出を介して、腎組織における炎症性サイトカイン IL-6 や IL12 $\beta$  を減少させることにより腎炎改善効果を示したことを報告している。IL-6 などの炎症性サイトカインが椎間板変性に関与していることはすでに示されている<sup>58)</sup>。したがって、本研究において静脈内投与された DFAT は TSG-6 の分泌を介して、傷害局所における IL-6 や IL12 $\beta$  といった炎症性サイトカインの産生を抑制したことが、椎間板変性抑制機序の一つと推定される<sup>57)</sup>。一方、本研究では移植した DFAT が傷害椎間板に集積し、治療効果を発揮した可能性については検討していない。椎間板は無血管組織であることから、傷害部位に直接ホーミングする可能性は低いと思われるが、今後蛍光標識した細胞を用いた移植実験を行って確認する必要がある。今回、細胞コントロールとして用いた線維芽細胞を静脈内投与すると椎間板変性が促進されるという結果が得られた。この理由として、椎間板において針穿刺の外傷による炎症を DFAT が抑制的に作用するものだとすれば、線維芽細胞では逆に肺でトラップされることで、炎症惹起性サイトカインが放出され、椎間板の変性を促進した可能性が考えられる。肺でトラップされた線維芽細胞がどのようなサイトカインを放出するかは今後基礎研究が必要である。

組織学的評価では、DFAT 移植 8 週目の HE 染色で DFAT 群では炎症細胞が Fibroblast 群や Control 群よりも比較的少ない所見が得られた。また DFAT 群では髓核の再生は認められなかったものの、繊維輪の細胞外マトリックスが増生している所見が認められた。さらに DFAT 群では軟骨終板近傍の微小血管密度が、Control 群や Fibroblast 群に比べ有意に高いことが明らかになった。DFAT は血管新生因子である Vascular endothelial growth factor (VEGF)、Hepatocyte growth factor (HGF)などを発現分泌し、虚血部位に移植することにより高い血管新生作用を示すことが報告されている<sup>59-61)</sup>。したがって移植された DFAT がこの

ような血管新生因子を分泌し、傷害部位の軟骨終板近傍の血管新生を促進させた可能性がある。一方、DFAT 群でも非傷害椎間板では、軟骨終板の血管密度の増加は認められなかった。DFAT 投与により傷害部位のみで血管新生が起こった理由は明確ではないが、血管新生のトリガーとして組織傷害により局所に発現、活性化してくる何らかの因子との協調が必要なのかもしれない。今後、DFAT 移植後の椎間板、肺組織、血液中のサイトカインの発現を PCR 法などを用いて検証することが必要である。また MSC は組織傷害部位にホーミングしやすい性質を有しているため、MSC に類似した形質を有する DFAT も移植後、傷害椎間板近傍に集積し、血管新生効果を現した可能性がある。今回我々は、DFAT の静脈内投与による椎間板変性作用を確認したが、今後 MSC でも同様の治療効果が得られるか比較検討することが望まれる。

今回の椎間板変性モデルに対する DFAT 移植実験の結果より、将来的に椎間板変性症患者の皮下脂肪から DFAT を調製し、患者に点滴静注にて移植するといった治療戦略が考えられる。現在の細胞治療による椎間板変性症の治療戦略は、変性椎間板腔に細胞を直接注射するといった方法が主流である。実際、椎間板変性モデル動物に対する MSC 椎間板腔投与による細胞治療の研究は 22 報あり、そのメタ解析では MSC の局所投与により、椎間板変性の進行が有意に抑制されることが報告されている<sup>62)</sup>。一方、椎間板は無血管領域であり、椎間板腔に移植された細胞が長期間生存し生着することは期待できないこと、また椎間板変性症は基本的に加齢に伴う変性疾患であるため、病変は複数の椎間板に及ぶことなどを考慮すると、椎間板腔への局所投与による細胞治療にはその有効性に限界があることが予想される。したがって、本研究にて細胞の静脈内投与による治療効果が示されたことは意義が大きいと思われる。このように局所投与に比べ静脈内投与の

優位性はあるものの椎間板組織における MSC や DFAT の髓核細胞様組織への分化による髓核の再生という点では静脈内投与では大きな期待はできないだろう。

今回の実験系では、椎間板の傷害後から経時的に DFAT を静脈内投与しており、変性が進行した椎間板に DFAT を投与したものではない。臨床的な加齢性変化による慢性炎症モデルというよりは、傷害後すぐの急性炎症モデルといった意味合いが強いと思われる。今後、より臨床の椎間板変性症に類似したモデルを用いて長期間観察し、DFAT 静脈内投与の治療効果を検討することが望まれる。

既に多くの疾患領域で自家 MSC を用いた細胞治療の臨床応用が始まっている。しかし、椎間板変性症を対象とした場合、患者の多くは高齢者であり、自家移植のための十分な細胞数を安定して確保することは難しい。DFAT は MSC に比べ、少量の脂肪組織から低侵襲性に調製でき、ドナーの年齢や基礎疾患に影響を受けない。また成熟脂肪細胞を単離してから調製するため、均質性も高く、細胞医薬品としての開発も期待できる。このように椎間板変性症に対する細胞治療を実用化するうえで、DFAT は有望な細胞源となり得る可能性がある。

### 【まとめ】

椎間板穿刺によるラット椎間板変性モデルを使い、DFAT の静脈注射による椎間板変性の抑制効果を検討した。X 線学的には、DFAT 静脈内投与は椎間板間隙の狭小化を抑制することが明らかになった。組織学的には、DFAT 静脈内投与により髓核組織の明確な再生は起こらないが、軟骨終板周囲の微小血管の増生と、椎間板軟骨基質の増加が誘導されることが明らかになった。DFAT は高齢者からも低侵襲性に採取・調製が可能であり、また外来での施行も可能であることから、椎間板変性症に対する有望な治療法となる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系整形外科学分野 徳橋泰明教授に心より厚く御礼申し上げますとともに、研究に際し適切な御指導・御鞭撻を頂き、御校閲も賜っ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、風間智彦博士およびスタッフの方々に心より感謝いたします。また、本研究のために命を失った多くのラットたちに哀悼の意をささげます。

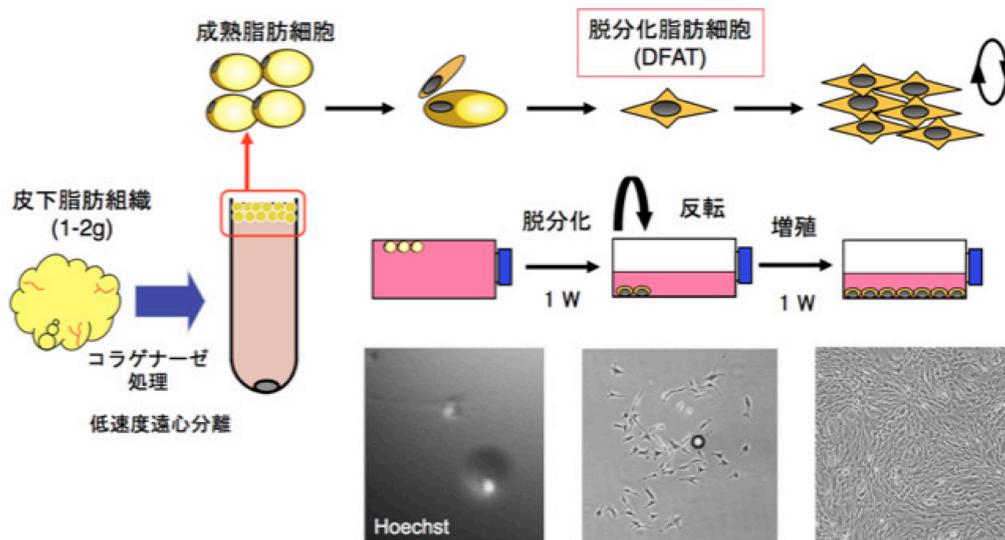


図 1. DFAT の調製法

動物から皮下脂肪組織を 1~2g を採取し、コラゲナーゼ処理を行い、低速遠心分離をかけることにより、成熟脂肪細胞が表層に遊離し、他の細胞は沈降する。浮遊した成熟脂肪細胞分画を採取し、培地(20%FBS/DMEM)を満たしたフラスコ内で一週間培養する。脂肪細胞はフラスコ内で天井側に移動し付着する。培養 3 日目頃から非対称分裂を始め、繊維芽細胞様の形態を示す DFAT が産生される。7 日後にフラスコを反転させ、通常の付着培養を行うことにより DFAT は増殖速度を速め、約 14 日でコンフルエントに到達する。

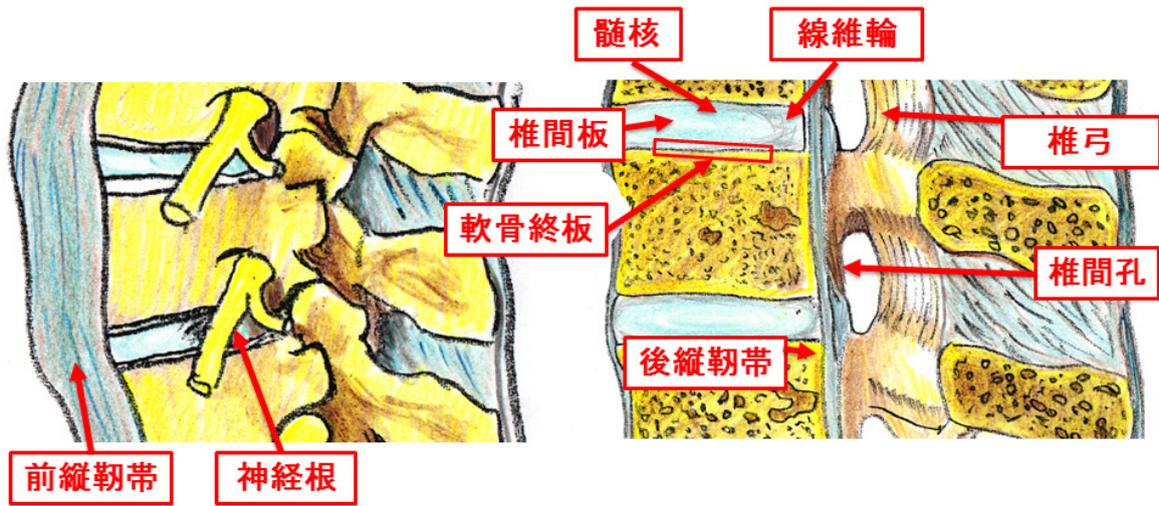


図 2. 椎間板の解剖

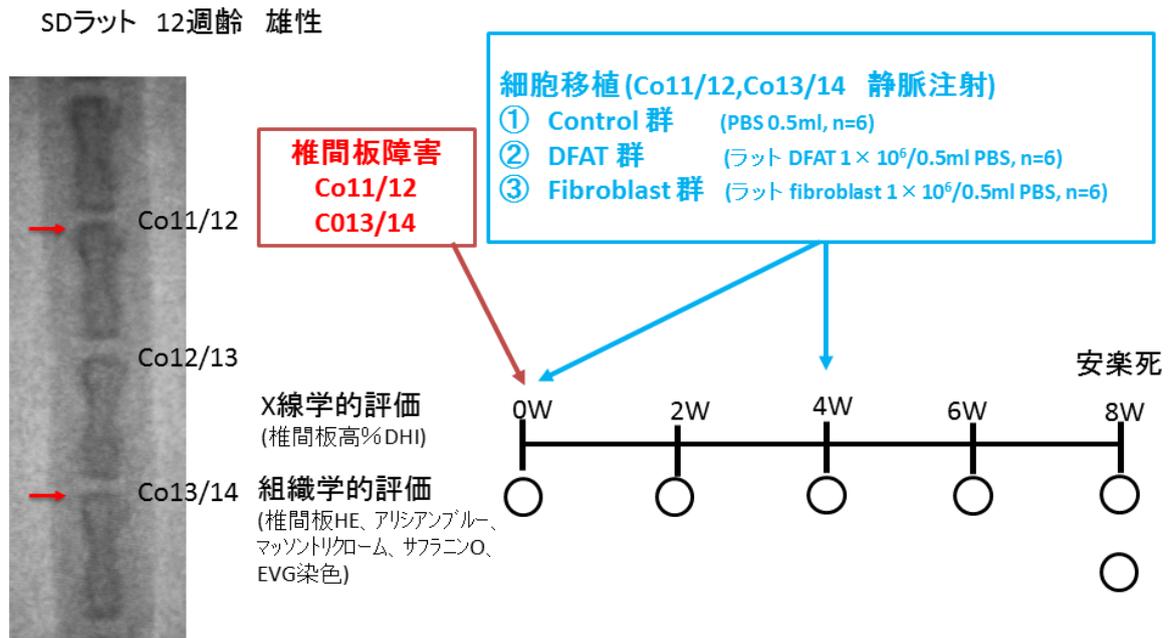
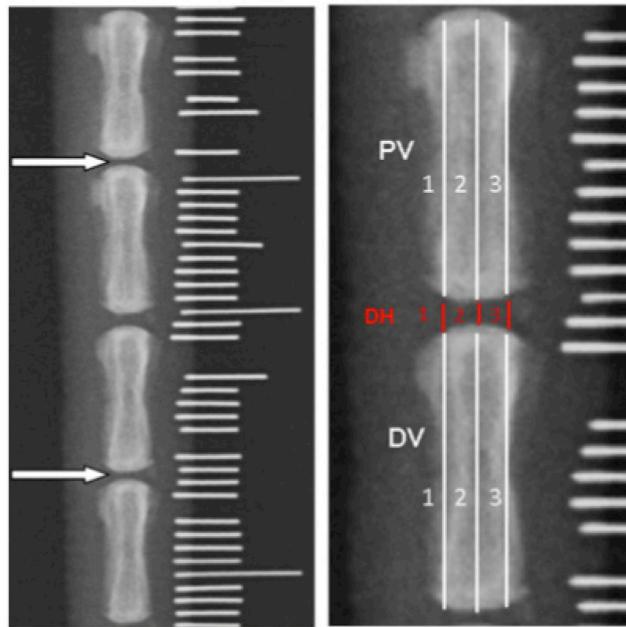


図 3 : 実験プロトコール

合計 18 頭の SD ラット(12 週齢 雄性)に対し、X 線透視下に 21G 針を用いて尾椎椎間板 Co11/Co12 および Co13/Co14 を全周性に 30 回穿刺し、椎間板傷害処理を行った(左図矢印)。Control 群、DFAT 群、Fibroblast 群 (各群 n=6)に分け、Control 群は 50  $\mu$ l PBS を、DFAT 群は DFAT  $5 \times 10^4$ /50  $\mu$ l PBS を、Fibroblast 群は  $5 \times 10^4$ /50  $\mu$ l PBS をそれぞれ傷害直後および 4 週間後に静脈内注射した。2 週間毎に尾椎の X 線撮影を行い、椎間板高を評価した。8 週間後に炭酸ガスによる安楽死措置を行い、尾椎椎間板組織を摘出した。K-CX にて脱灰した後、パラフィンブロックを作成した。その後、厚さ 3  $\mu$ m で薄切を行い、HE 染色、アリシアンブルー染色、マッソントリクローム染色、サフラニン O 染色、EVG 染色を行い、組織学的に評価した。



$$DHI=2 \times (DH1+DH2+DH3) / \{(PV1+PV2+PV3)+(DV1+DV2+DV3)\}$$

$$\%DHI=(DHI \text{ post-lesion}/DHI \text{ pre-lesion}) \times 100$$

*Issy AC et al. Braz J Medical Biol Res (2013) 46:235-244*

図 4：椎間板高の評価法

椎間板高の定量は、スケールと共に尾椎の X 線撮影を行い、Co11/Co12、Co12/Co13、Co13/Co14 の近位(PV)と遠位(DV)の椎体の高さ、椎間板の高さ(Disc Height:DH)を X 線透視装置下に 2mm 幅のスケールをリファレンスとし、椎間板の高さ DH と隣接する椎体の長さ PV(Proximal Vertebra)+DV(Distal Vertebra)の比として、DH インデックス(DHI)を計算した。矢印は傷害椎間板を示す。傷害による椎間板高の変化は、椎間板傷害前の DHI に対する傷害後の DHI 比率 (%DHI)を算出して評価した。写真は文献<sup>49)</sup>から引用改変。

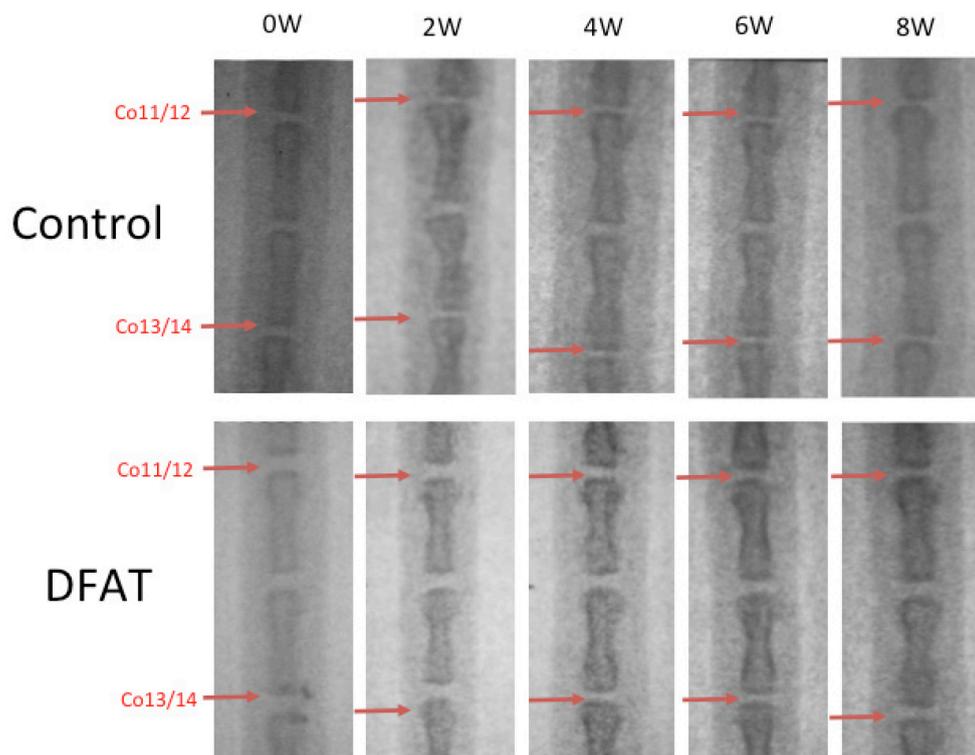


図 5： Control 群と DFAT 群の椎間板の X 線学的評価

Control 群と DFAT 群の代表的な X 線像を示す。Control 群では 2 週後より傷害椎間板(矢印)が狭小化し 8 週間後まで改善が認められなかった。これに対し DFAT 群では傷害椎間板の狭小化が Control 群に比べて軽度であった。

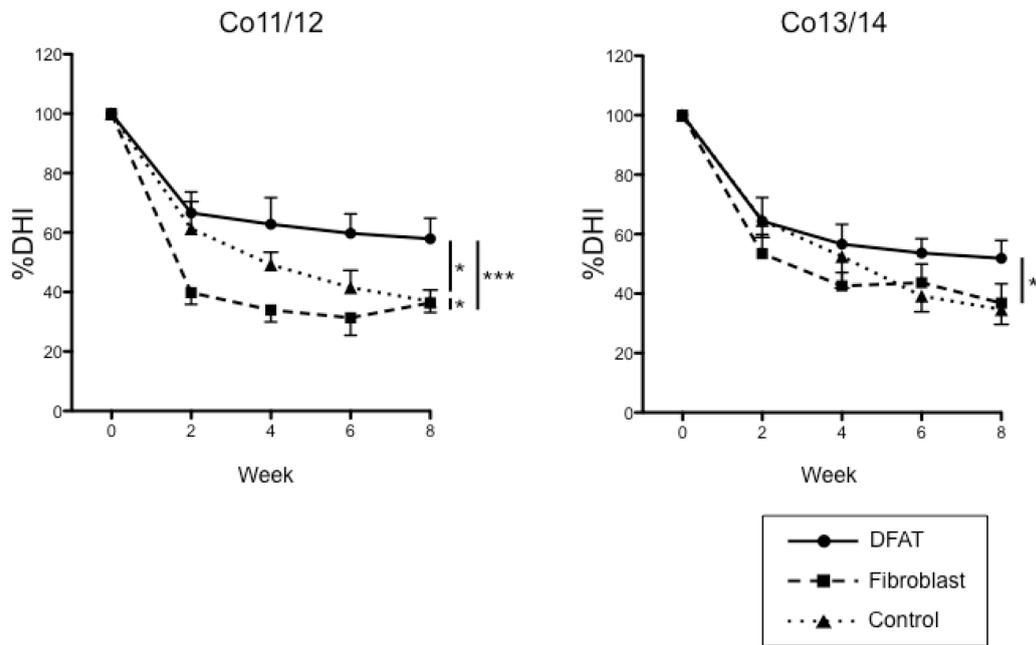


図 6 : DFAT 移植による椎間板高(%DHI)の変化

Co11/12、Co13/14 とともに Control 群や Fibroblast 群に比べ、DFAT 群では傷害後の%DHI の低下が軽度であった。グラフは mean±SE を示す。\*: p < 0.05, \*\*\*: p < 0.005 (Repeated measures ANOVA, Turkey's multiple comparison test)

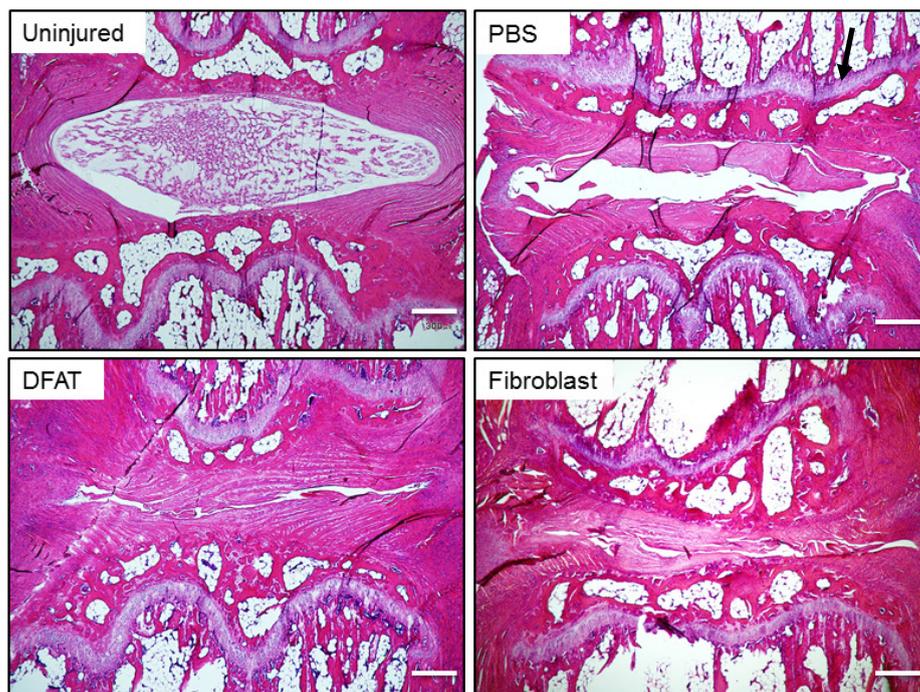


図 7 : DFAT 移植による傷害椎間板の組織学的変化(HE 染色像)

各群のマウスは傷害 8 週間後に尾椎椎間板組織を摘出し、K-CX にて脱灰した後、パラフィン切片標本を作製した。各群の傷害椎間板の組織学的変化を光学顕微鏡にて評価した。写真は各群の代表的な HE 染色像を示す。左上の写真はコントロールとして非傷害椎間板の組織像を示す。Uninjured において中央に見える組織が髄核組織である。その周りを同心円状に囲っている組織が線維輪である。Uninjured 以外の三群では髄核組織が消失していることが分かる。髄核組織が消失したことにより、PBS 群、DFAT 群、Fibroblast 群において近位、遠位の終板間隙の狭小化が認められる。PBS 群の右上の矢印は終板を示す。Scale bar: 300  $\mu$ m

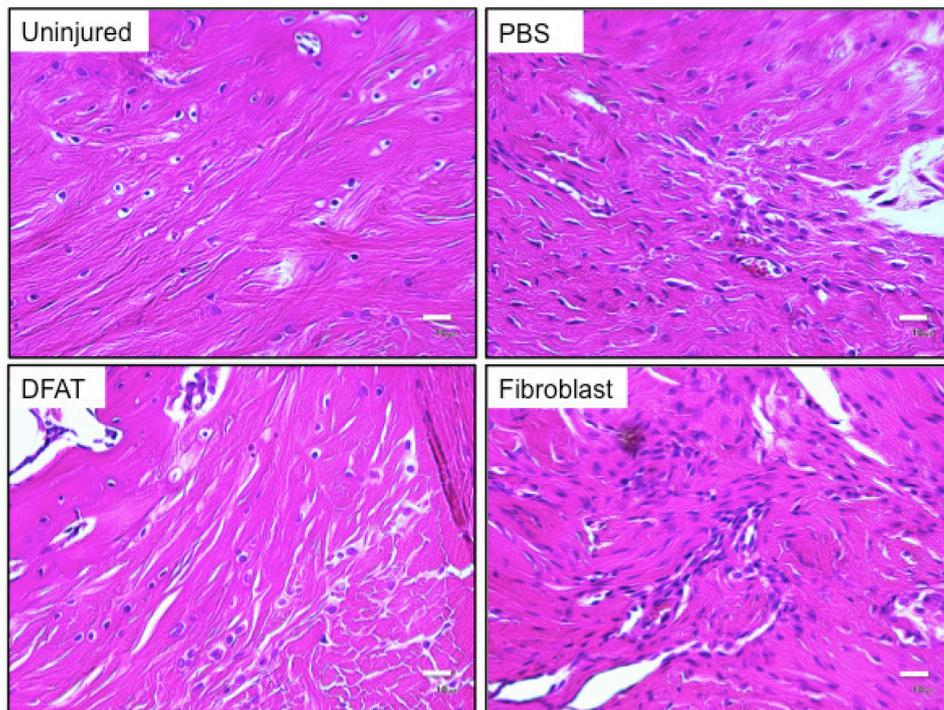


図8：DFAT 移植による傷害椎間板の組織学的変化(HE 染色強拡大像)

写真は各群の線維輪周囲の代表的な HE 染色像（強拡大像）を示す。DFAT 群は PBS 群、Fibroblast 群に比較して、炎症性細胞が少ないことが分かる。左上の写真はコントロールとして非傷害椎間板の組織像を示す。Scale bar: 10 μm

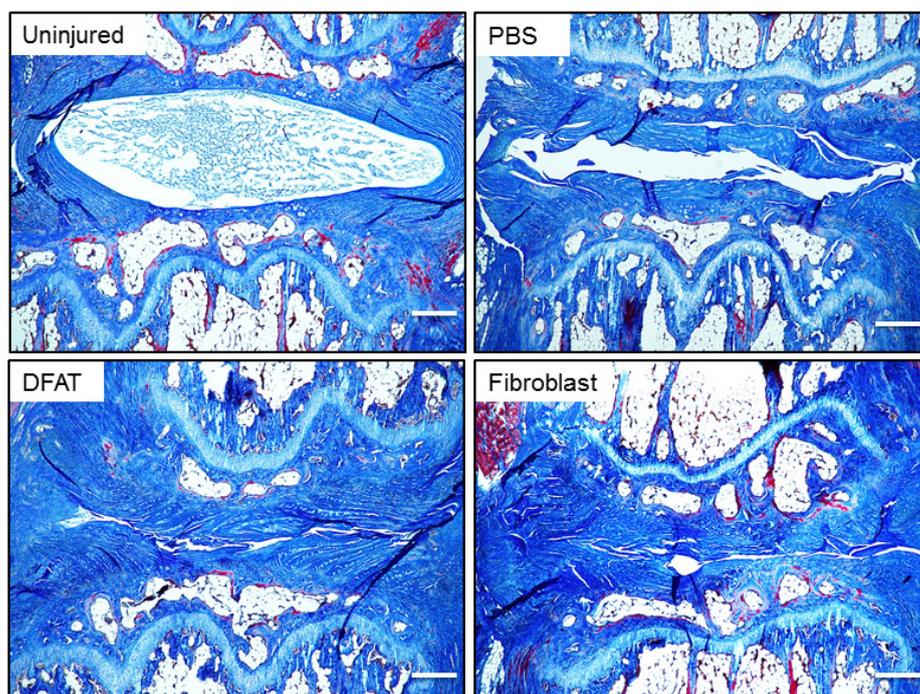


図 9 : DFAT 移植による傷害椎間板の組織学的変化  
(マッソントリクローム染色像)

各群のマウスは傷害 8 週間後に尾椎椎間板組織を摘出し、K-CX にて脱灰した後、パラフィン切片標本を作製した。各群の傷害椎間板の組織学的変化を光学顕微鏡にて評価した。写真は各群の代表的なマッソントリクローム染色像を示す。マッソントリクローム染色ではコラーゲンマトリックスが青く染色される。DFAT 群では PBS 群、Fibroblast 群に比べ、線維輪とその周囲組織が強く染まっている。左上の写真はコントロールとして非傷害椎間板の組織像を示す。Scale bar: 300  $\mu\text{m}$

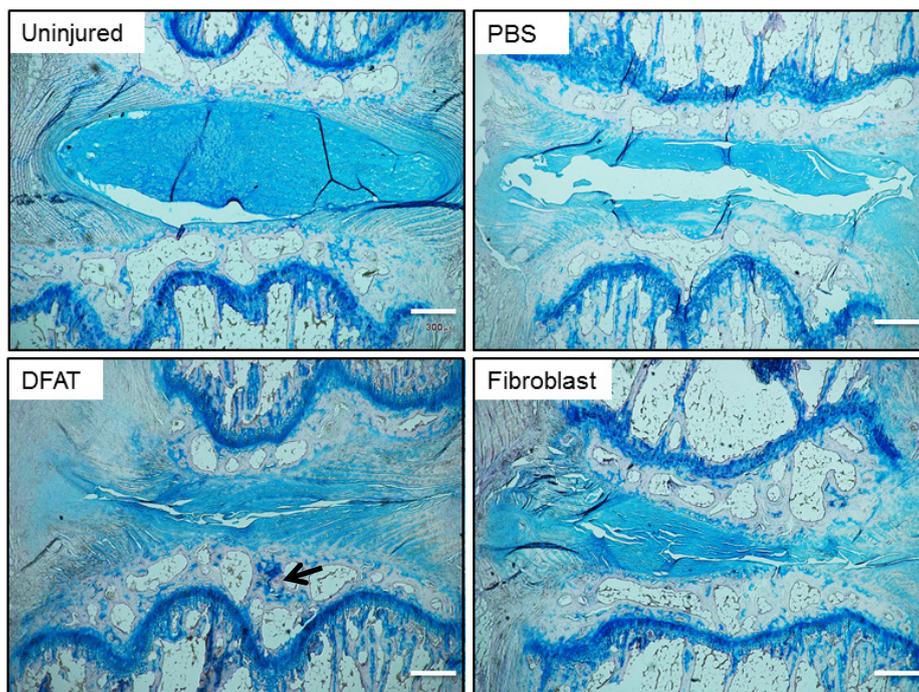


図 10 : DFAT 移植による傷害椎間板の組織学的変化(アルシアンブルー染色像)

各群のマウスは傷害 8 週間後に尾椎椎間板組織を摘出し、K-CX にて脱灰した後、パラフィン切片標本を作製した。各群の傷害椎間板の組織学的変化を光学顕微鏡にて評価した。写真は各群の代表的なアルシアンブルー染色像を示す。左上の写真はコントロールとして非傷害椎間板の組織像を示す。アルシアンブルー染色は軟骨基質を青く染色する。DFAT 群では、矢印に示すように線維輪と軟骨終板の間質に蓄積した軟骨基質を認めた。Scale bar: 300  $\mu$ m

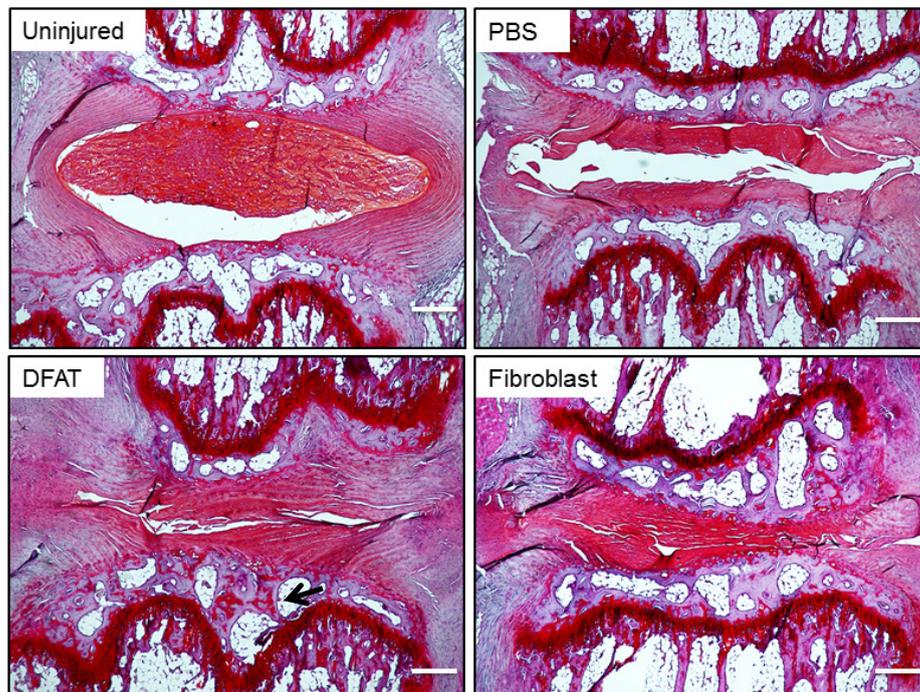


図 11 : DFAT 移植による傷害椎間板の組織学的変化(サフラニン O 染色像)

各群のマウスは傷害 8 週間後に尾椎椎間板組織を摘出し、K-CX にて脱灰した後、パラフィン切片標本を作製した。各群の傷害椎間板の組織学的変化を光学顕微鏡にて評価した。写真は各群の代表的なサフラニン O 染色像を示す。サフラニン O 染色は軟骨基質を赤く染色する。左上の写真はコントロールとして非傷害椎間板の組織像を示す。DFAT 群では矢印に示すように線維輪と軟骨終板の間質に蓄積した軟骨基質が有意に認められた。Scale bar: 300  $\mu$ m

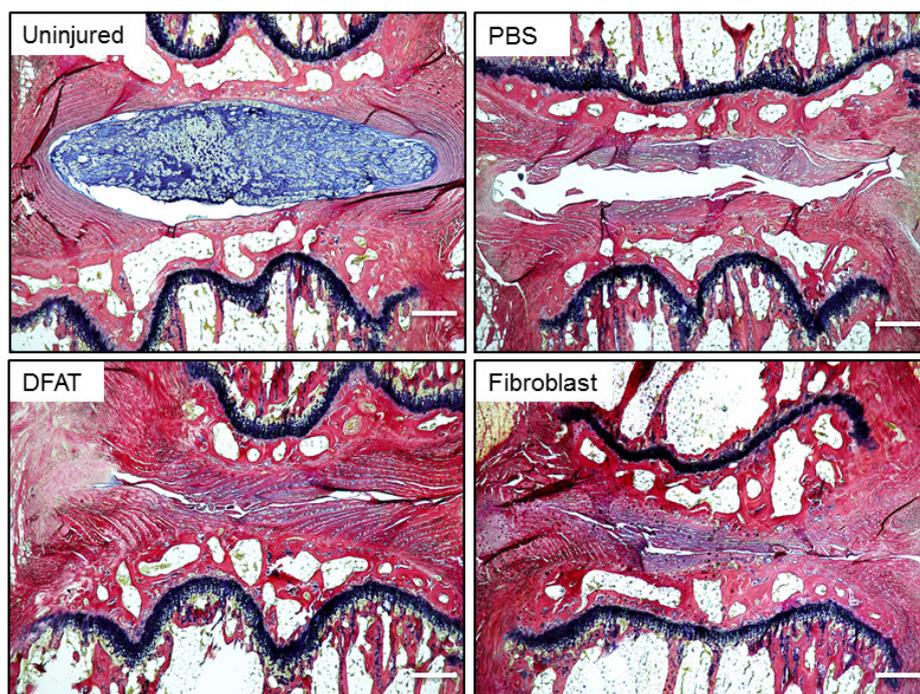


図 12 : DFAT 移植による傷害椎間板の組織学的変化(EVG 染色像)

各群のマウスは傷害 8 週間後に尾椎椎間板組織を摘出し、K-CX にて脱灰した後、パラフィン切片標本を作製した。各群の傷害椎間板の組織学的変化を光学顕微鏡にて評価した。写真は各群の代表的な EVG 染色像を示す。左上の写真はコントロールとして非傷害椎間板の組織像を示す。EVG 染色は弾性繊維を紫色に染色する。PBS 群、DFAT 群、Fibroblast 群共に弾性繊維の増生が認められた。Scale bar: 300  $\mu\text{m}$

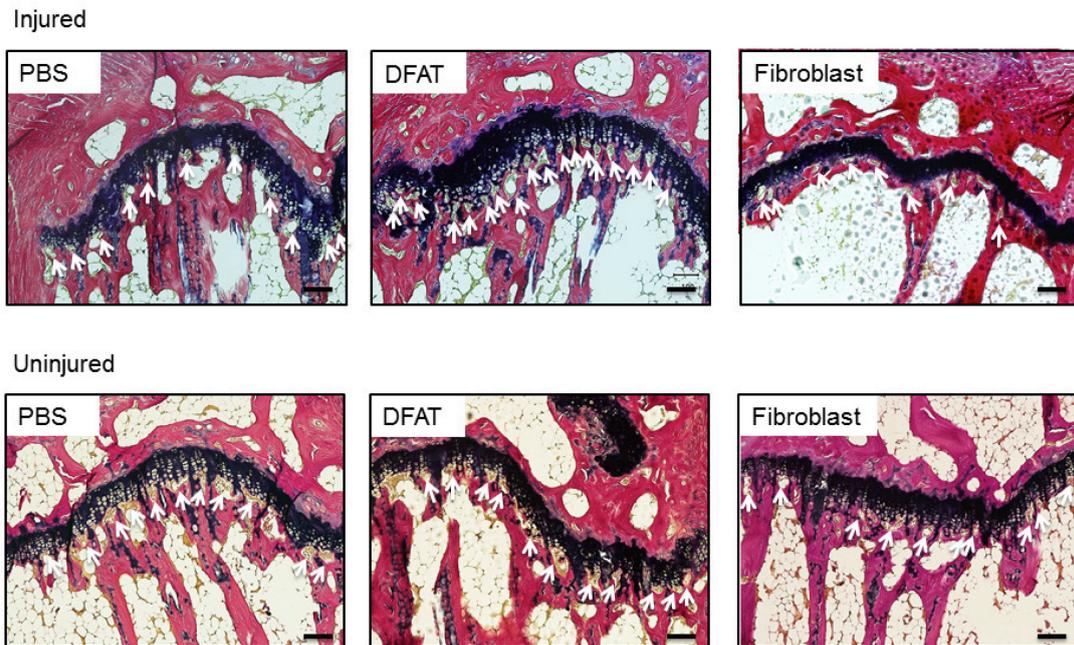


図 13 : DFAT 移植による傷害椎間板の組織学的変化(EVG 染色像)

各群のマウスは傷害 8 週間後に尾椎椎間板組織を摘出し、K-CX にて脱灰した後、パラフィン切片標本を作製した。各群の傷害椎間板の組織学的変化を光学顕微鏡にて評価した。写真は図 12 で示した各群の代表的な EVG 染色像の拡大像を示す。左上の写真はコントロールとして非傷害椎間板の組織像を示す。矢印は軟骨終盤の微小血管を示す。Scale bar: 100  $\mu$ m

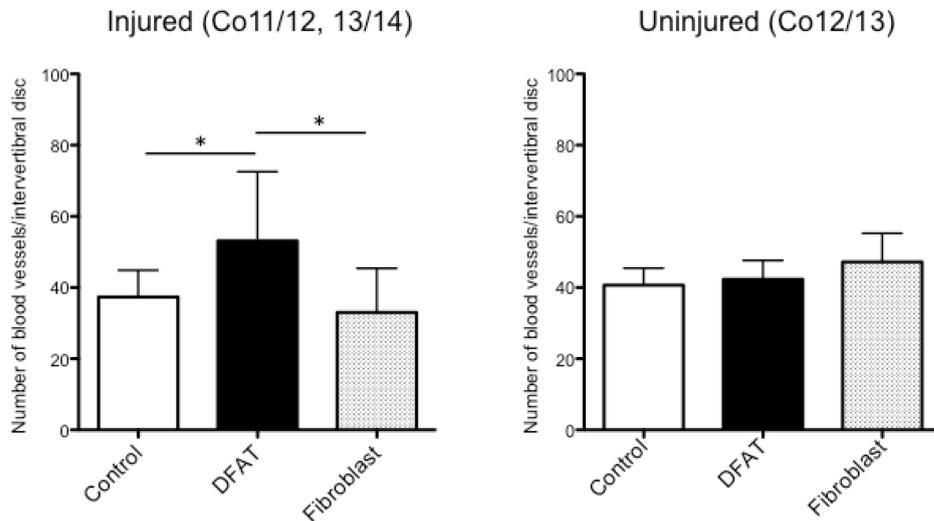


図 14 : DFAT 移植による軟骨終板近傍の微小血管数の変化

各群の尾椎椎間板組織の EVG 染色標本を用いて、軟骨終板近傍の微小血管数を定量評価した。傷害椎間板(Co11/12, Co13/14)と、非傷害椎間板(Co12/13)の軟骨終板に存在する微小血管数をそれぞれ顕微鏡下に計測し、1 椎間板あたりの血管総数を算出した。グラフは mean±SD を示す。群間比較した結果、傷害椎間板組織において Control 群、Fibroblast 群に比べ DFAT 群では微小血管数が有意に増加していることが明らかになった。\*:  $p < 0.05$  (One way ANOVA, Turkey's multiple comparison test)

## 【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**:210-222.
- 2) 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* 1998; **23**:2437-2442; discussion 2443.
- 3) Nishida K, Kang JD, Gilbertson LG *et al.* Modulation of the biologic activity of the rabbit intervertebral disc by gene therapy: an in vivo study of adenovirus-mediated transfer of the human transforming growth factor beta 1 encoding gene. *Spine* 1999; **24**:2419-2425.
- 4) 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* 2006; **31**:1415-1419.
- 5) 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.
- 6) Nishimura K, Mochida J. Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. *Spine* 1998; **23**:1531-1538; discussion 1539.
- 7) Yamamoto Y, Mochida J, Sakai D *et al.* Upregulation of the viability of nucleus pulposus cells by bone marrow-derived stromal cells: significance of direct cell-to-cell contact in coculture system. *Spine* 2004; **29**:1508-1514.
- 8) Sakai D, Mochida J, Iwashina T *et al.* Differentiation of mesenchymal stem cells transplanted to a rabbit degenerative disc model: potential and limitations for stem cell therapy in disc regeneration. *Spine* 2005; **30**:2379-2387.
- 9) Crevensten G, Walsh AJ, Ananthakrishnan D *et al.* Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann Biomed Eng* 2004; **32**:430-434.
- 10) Uchio Y, Ochi M, Matsusaki M *et al.* Human chondrocyte proliferation and matrix synthesis cultured in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res* 2000; **50**:138-143.
- 11) Wu J, Wang D, Ruan D *et al.* Prolonged expansion of human nucleus pulposus cells expressing human telomerase reverse transcriptase mediated by lentiviral vector. *J Orthop Res* 2014; **32**:159-166.
- 12) Hiyama A, Mochida J, Iwashina T *et al.* Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J Orthop Res* 2008; **26**:589-600.
- 13) Chaofeng W, Chao Z, Deli W *et al.* Nucleus pulposus cells expressing hBMP7 can prevent the degeneration of allogenic IVD in a canine transplantation model. *J Orthop Res* 2013; **31**:1366-1373.
- 14) Priyadarshani P, Li Y, Yao L. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 2016; **24**:206-212.

- 15) Peng BG. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of discogenic low back pain. *World J Orthop* 2013; **4**:42-52.
- 16) 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* 2006; **31**:2909-2917.
- 17) An HS, Takegami K, Kamada H *et al.* Intradiscal administration of osteogenic protein-1 increases intervertebral disc height and proteoglycan content in the nucleus pulposus in normal adolescent rabbits. *Spine* 2005; **30**:25-31; discussion 31-22.
- 18) 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* 2006; **31**:742-754.
- 19) Kim DJ, Moon SH, Kim H *et al.* Bone morphogenetic protein-2 facilitates expression of chondrogenic, not osteogenic, phenotype of human intervertebral disc cells. *Spine* 2003; **28**:2679-2684.
- 20) Thompson JP, Oegema TR, Jr., Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine* 1991; **16**:253-260.
- 21) Walsh AJ, Bradford DS, Lotz JC. In vivo growth factor treatment of degenerated intervertebral discs. *Spine* 2004; **29**:156-163.
- 22) Woods BI, Vo N, Sowa G *et al.* Gene therapy for intervertebral disk degeneration. *Orthop Clin North Am* 2011; **42**:563-574, ix.
- 23) 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.
- 24) Yoshikawa T, Ueda Y, Miyazaki K *et al.* Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies. *Spine* 2010; **35**:E475-480.
- 25) Jeong JH, Lee JH, Jin ES *et al.* Regeneration of intervertebral discs in a rat disc degeneration model by implanted adipose-tissue-derived stromal cells. *Acta Neurochir* 2010; **152**:1771-1777.
- 26) Miyamoto T, Muneta T, Tabuchi T *et al.* Intradiscal transplantation of synovial mesenchymal stem cells prevents intervertebral disc degeneration through suppression of matrix metalloproteinase-related genes in nucleus pulposus cells in rabbits. *Arthritis Res Ther* 2010; **12**:R206.
- 27) Adachi N, Sato K, Usas A *et al.* Muscle derived, cell based ex vivo gene therapy for treatment of full thickness articular cartilage defects. *J Rheumatol* 2002; **29**:1920-1930.
- 28) Murrell W, Sanford E, Anderberg L *et al.* Olfactory stem cells can be induced to express chondrogenic phenotype in a rat intervertebral disc injury model. *Spine J* 2009; **9**:585-594.
- 29) Liu Y, Rahaman MN, Bal BS. Modulating notochordal differentiation of human induced pluripotent stem cells using natural nucleus pulposus tissue matrix. *PLoS One* 2014; **9**:e100885.
- 30) 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.
- 31) Sheikh H, Zakharian K, De La Torre RP *et al.* In vivo intervertebral disc

- regeneration using stem cell-derived chondroprogenitors. *J Neurosurg Spine* 2009; **10**:265-272.
- 32) Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT *et al.* Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 2007; **32**:2537-2544.
  - 33) Steck E, Fischer J, Lorenz H *et al.* Mesenchymal stem cell differentiation in an experimental cartilage defect: restriction of hypertrophy to bone-close neocartilage. *Stem Cells Dev* 2009; **18**:969-978.
  - 34) Le Visage C, Kim SW, Tateno K *et al.* Interaction of human mesenchymal stem cells with disc cells: changes in extracellular matrix biosynthesis. *Spine* 2006; **31**:2036-2042.
  - 35) Sobajima S, Vadala G, Shimer A *et al.* Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2008; **8**:888-896.
  - 36) Svanvik T, Henriksson HB, Karlsson C *et al.* Human disk cells from degenerated disks and mesenchymal stem cells in co-culture result in increased matrix production. *Cells Tissues Organs* 2010; **191**:2-11.
  - 37) Richardson SM, Walker RV, Parker S *et al.* Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 2006; **24**:707-716.
  - 38) Yang SH, Wu CC, Shih TT *et al.* In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation. *Spine* 2008; **33**:1951-1957.
  - 39) Korecki CL, Taboas JM, Tuan RS *et al.* Notochordal cell conditioned medium stimulates mesenchymal stem cell differentiation toward a young nucleus pulposus phenotype. *Stem Cell Res Ther* 2010; **1**:18.
  - 40) Zhang YG, Guo X, Xu P *et al.* Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans. *Clin Orthop Relat Res* 2005:219-226.
  - 41) Strassburg S, Richardson SM, Freemont AJ *et al.* Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen Med* 2010; **5**:701-711.
  - 42) Allon AA, Butcher K, Schneider RA *et al.* Structured bilaminar coculture outperforms stem cells and disc cells in a simulated degenerate disc environment. *Spine* 2012; **37**:813-818.
  - 43) 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.
  - 44) Henriksson HB, Svanvik T, Jonsson M *et al.* Transplantation of human mesenchymal stems cells into intervertebral discs in a xenogeneic porcine model. *Spine* 2009; **34**:141-148.
  - 45) Yang H, Wu J, Liu J *et al.* Transplanted mesenchymal stem cells with pure fibrinous gelatin-transforming growth factor-beta1 decrease rabbit intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2010; **10**:802-810.
  - 46) Le Maitre CL, Baird P, Freemont AJ *et al.* An in vitro study investigating the survival and phenotype of mesenchymal stem cells following injection into nucleus pulposus tissue. *Arthritis Res Ther* 2009; **11**:R20.

- 47) 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.
- 48) Rodemann HP, Bayreuther K. Abnormal collagen metabolism in cultured skin fibroblasts from patients with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**:5130-5134.
- 49) 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**:235-244.
- 50) 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.
- 51) 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* 2002; **27**:1396-1401.
- 52) 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.
- 53) 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.
- 54) 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* 2006; **31**:510-514.
- 55) Vadala G, Russo F, Ambrosio L *et al.* Stem cells sources for intervertebral disc regeneration. *World J Stem Cells* 2016; **8**:185-201.
- 56) 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.
- 57) 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.
- 58) Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content. *Nat Rev Rheumatol* 2014; **10**:44-56.
- 59) 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.
- 60) 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.
- 61) Matsumine H, Takeuchi Y, Sasaki R *et al.* Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 2014; **134**:686-697.

- 62) Wang Z, Perez-Terzic CM, Smith J *et al.* Efficacy of intervertebral disc regeneration with stem cells - a systematic review and meta-analysis of animal controlled trials. *Gene* 2015; **564**:1-8.

研究業績目録

- I 発表 ① 2
- II 論文 原著論文 なし  
症例報告 なし  
総説 なし
- III 著書 なし

以上

## I 発表

- ① . 小山公行、宮方啓行、上井浩、風間智彦、松本太郎、徳橋泰明：受動喫煙ラット椎間板変性モデルにおける脱分化脂肪細胞（DFAT）静脈内投与の治療効果第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、富山、2015 年 10 月
- ② . 小山公行、宮方啓行、上井浩、風間智彦、松本太郎、徳橋泰明：受動喫煙ラットにおける椎間板変性への脱分化脂肪細胞（DFAT）静脈内投与の治療効果、第 15 回日本再生医療学会総会、大阪、2016 年 3 月

## II 論文

- ① 原著論文 なし
- ② 症例報告 なし
- ③ 総説 なし

## III 著書

なし



