

ラット椎間板変性モデルに対する脱分化脂肪細胞移植の効果

Effect of dedifferentiated fat cell transplantation in a rat intervertebral disc degeneration model

中山渕志¹⁾, 風間智彦²⁾, 加野浩一郎³⁾, 徳橋泰明¹⁾, 松本太郎²⁾

Enshi NAKAYAMA¹⁾, Tomohiko KAZAMA²⁾, Koichiro KANO³⁾, Yasuaki TOKUHASHI¹⁾, Taro MATSUMOTO²⁾

¹⁾日本大学医学部整形外科学系整形外科学分野, ²⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野, ³⁾日本大学生物資源科学部応用生物科学科

【要旨】

腰痛の主原因である椎間板変性症は髄核細胞の不可逆的な変性によって起こる。近年、椎間板変性症に対して間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)などの細胞移植による再生医学的アプローチを用いた研究が行われている。脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)は成熟脂肪細胞を天井培養することにより調製される MSC 様細胞である。本研究では、ラット尾椎針穿刺による椎間板変性モデルに対し DFAT を椎間板内に投与し、その治療効果を評価した。その結果、DFAT 投与により、椎間板間隙の短縮が有意に抑制され、線維輪組織の一部に髄核様組織の再生が認められた。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。

【背景および目的】

椎間板変性症は、日本人に最も多い愁訴である腰痛症の主原因であり、椎間板を構成する髄核細胞の不可逆的な変性によって起こる。椎間板変性症に対する治療法として、鎮痛剤投与などの保存療法や、椎体間固定術などの手術療法が行われているが、現時点では根本的な治療方法はない。近年、椎間板再生を目指す再生医学的アプローチとして、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell: MSC)を変性椎間板に移植する研究が行われ、その有効性がメタ解析¹⁾等にて報告されている。一方、MSC はその採取に伴い比較的侵襲性の高い手技が必要であることや、ドナー年齢や基礎疾患に影響され必要細胞数が調製できない症例が存在するといった問題点が指摘されている。Matsumoto ら²⁾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 に類似した多分化能を獲得することを明らかにした。DFAT は少量の脂肪組織より大量調製することが可能であることから実用性の高い細胞治療用ソースとして期待される。本研究では、ラット尾椎針穿刺による椎間板変性モデルに対し DFAT を椎間板内に投与し、その治療効果を評価した。

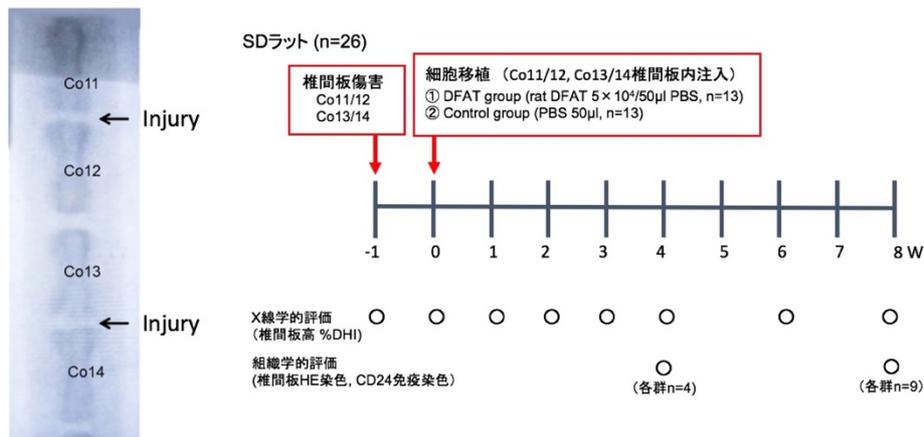


図1. 実験プロトコール

【方法】

尾椎針穿刺によるラット椎間板変性症モデルは、Issy らの既報³⁾を一部改変して作成した。雄性 SD ラットに対して、全身麻酔下に尾椎椎間板Co11/Co12 及びCo13/Co14 を21G 針にて、5 回 x 6 方向 穿刺を行い、椎間板傷害を作製した。傷害作製 7 日後に傷害椎間板 にラット DFAT (5×10^4 /頭, DFAT 群, n=13)または PBS (Control 群, n = 13)を移植した。移植後、経時的にX 線撮影を行い、椎間板高の変化(%DHI)を算出し、両群を比較した。また移植 4, 8 週間後に尾椎の切片標本を作製し、HE 染色および髓核細胞マーカーCD24 に対する免疫染色にて組織学的評価を行った。また移植したDFAT の局在や髓核細胞への分化の有無を検討するため、椎間板穿刺 1 週間後にGFP ラベルしたDFAT (5×10^4 / 頭)を傷害椎間板内に注射した。移植 4, 8 週後に、尾椎切片標本を作成し、抗GFP 抗体及び抗 CD24 抗体を用いた蛍光免疫染色を行った。

【結果】

尾椎穿刺による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、X 線学的評価では、DFAT 群は Control 群に比べ、Co11/Co12 では移植 2 週間後より、Co13/Co14 では移植3 週間後より%DHI が有意に高値となり、この差は移植 8 週間後まで認められた。組織学的評価では、移植4 週間後のCo11/Co12, Co13/Co14 において、両群とも髓核構造は消失し、結合組織に置換されている所見が認められた。DFAT 群の一部(9 検体中5 検体)では、椎間板辺縁に不定形の腔胞をもつ髓核様細胞塊が認められ、この組織の構成細胞は、髓核細胞マーカーCD24 陽性を示した。一方、Control 群ではこのような所見は認められなかった。次にGFP 標識DFAT を傷害椎間板に移植し、GFP とCD24 に対する蛍光免疫染色を行った。その結果、移植 4 週間および8 週後の検体において、椎間板辺縁に出現した髓核様組織には、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、DFAT 移植により椎間板間隙の狭小化が改善し、また移植した DFAT が直接髓核様細胞に分化していることが明らかになった。

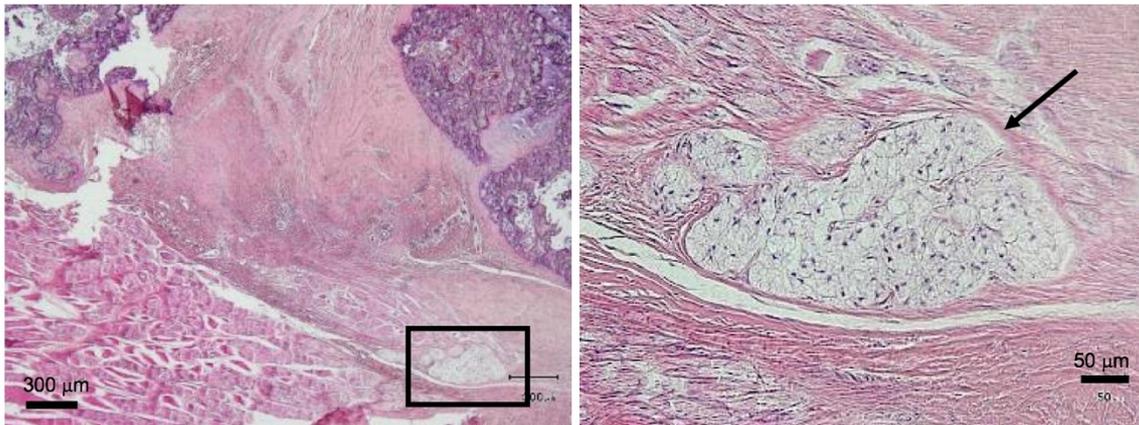


図 2. DFAT 移植群の傷害椎間板組織に認められた異所性髄核様組織

【考察】

本研究では、DFAT を傷害椎間板に局所注入すると椎間板変性が抑制できる可能性が示された。既報では髄核細胞や骨髄 MSC の椎間板再生効果は硫酸化グリコサミノグリカンや II 型コラーゲンの産生増加に起因することが示されている^{4,5)}。本研究の組織学的検討結果から DFAT の椎間板変性抑制作用に関しても同様の機序が考えられる。今後、再生椎間板組織のプロテオグリカンや細胞外マトリックスの定量評価を行い、作用機序の検証が必要である。DFAT は、①組織採取に伴う侵襲性が低く高齢者からも調製可能であること、②単離された成熟脂肪細胞から調製される細胞であるため初代培養から高純度の細胞が得られること、③少量の脂肪組織から低侵襲性に大量調製できること、等の利点があることから、椎間板変性症患者の大部分を占める高齢者でも自家移植を可能とする治療用細胞として期待できる。今後ヒト DFAT を用いた前臨床試験を行い、有効性や安全性を検証することが望まれる。

【結語】

椎間板穿刺によるラット椎間板変性症モデルの傷害椎間板にDFATを局所注射することにより、椎間板間隙の狭小化抑制が認められ、移植したDFATの一部は髄核細胞へ分化している所見が認められた。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された。

【参考文献】

- 1) 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.
- 2) Matsumoto T, Kano K, Kondo D, et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; **215**: 210-222.
- 3) Issy AC, Castania V, Castania M, et al. Experimental model of intervertebral disc degeneration by needle puncture in Wistar rats. *Brazilian Journal of Medical & Biological Research* 2013; **46**: 235-244.
- 4) 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.
- 5) Feng G, Zhao X, Liu H, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells in a degenerative disc model in rabbits: a comparison of 2 cell types as potential candidates for disc regeneration. *J Neurosurg Spine* 2011; **14**: 322-329.