HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	椎間板障害に対する細胞治療法の開発［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	筌場, 大介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14313号
Issue Date	2020-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/80225
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Ukeba_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　筌　場　大　介

学 位 論 文 題 名

椎間板障害に対する細胞治療法の開発

(Development of cell therapy to treat intervertebral disc disorders)

【背景と目的】　生体内における椎間板の再生能力は著しく低く，変性あるいは欠損した椎間板は自然再生しないとされている．椎間板障害に起因する腰椎椎間板ヘルニアは代表的な脊椎疾患の一つであり，手術治療では椎間板摘出術が一般的に行われている．しかし，摘出のみを行う現在の術式では，摘出後の椎間板内部が空洞化するため組織再生が障害され，術後早期では疼痛の残存やヘルニアの再発，長期的には椎間板変性が進行して追加の固定術が必要となる場合がある．我々はこれまで，アルギン酸ナトリウムを基盤とした高純度硬化性ゲルを椎間板ヘルニア術後の組織修復材として開発し，空隙へのゲル単独（無細胞）投与にて既存の髄核前駆細胞の増殖，活性化により椎間板組織が自然修復されることを証明し医師主導治験を実施している．

しかしながら，ゲル単独投与は生体内の組織修復環境の最適化を主眼としているため，例えば中高年期の自己修復能力の乏しい患者に対してはその効果に限界があると考えられる．そこで，骨髄由来間葉系幹細胞 (bone marrow derived mesenchymal stem cells: BMSCs) と骨髄濃縮液 (bone marrow aspirate concentrate: BMAC) に着目し，高純度硬化性ゲルとの併用による新たな椎間板細胞治療法の開発を目的とし，その効果とメカニズムを検証することとした．

【対象と方法】　実験 1　*In vitro* 試験：20 週齢の雄日本白色家兎から正常腰椎椎間板を摘出し，髄核細胞 (nucleus pulposus cells: NPCs) を単離，培養した．BMSCs は同種他家由来を使用した．NPCs 単独群，BMSCs 単独群，NPCs と BMSCs 混合群の 3 群に分け，各々ゲルに包埋して低酸素条件下で 3 次元培養を行った．培養 7 日後に各細胞を分離，抽出し，髄核細胞マーカー (HIF-1, GLUT-1, Brachyury)，成長因子 (CDMP-1, TGF-β, IGF-1)，細胞外基質 (Type II collagen, Aggrecan) の遺伝子発現を quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) にて評価した．

In vivo 試験：20 週齢の雄日本白色家兎に対し椎間板線維輪を経皮的に穿刺し変性モデルを作製した．穿刺 4 週後に髄核摘出を行ない，ゲルまたはゲルと蛍光標識した同種他家 BMSCs およびヒト BMSCs を埋植した．術後 1 日，7 日，28 日に免疫組織化学的評価による髄核細胞マーカーの発現評価，術後 4 週，12 週に細胞生存評価，MRI，組織学的評価，免疫組織化学的評価による変性定量評価を行った．またゲル単独，ゲルとウサギ BMSCs，ゲルとヒト BMSCs の 3 群に分けて非拘束性圧縮試験を実施し，歪み率 10-20%におけるヤング率を算出した．

実験 2　20 週齢の雄日本白色家兎に対し同様に椎間板変性モデルを作製した．同時に腸骨稜から骨髄液を採取し，単核細胞群を単離，培養して自家 BMSCs を作製した．穿刺 4 週後，腸骨稜より骨髄液を採取し，遠心分離操作にて骨髄濃縮液を作製した．髄核摘出を行ない，ゲルまたはゲルと蛍光標識した BMSCs または BMAC を埋植した．術後 4 週，12 週に細胞生存評価，MRI，組織学的評価，免疫組織化学的評価による変性定量評価を行った．また，ゲル単独，ゲルとウサギ BMSCs，ゲルと BMAC の 3 群に分け非拘束性圧縮試験によるゲル弾性率を評価した．

【結果】　実験 1　*In vitro* 試験：共培養後の BMSCs では単独培養後の BMSCs に比較して，

髄核細胞マーカー, 成長因子, 細胞外基質の遺伝子発現量が有意に上昇し, 共培養後の NPCs では単独培養後の NPCs に比較して成長因子, 細胞外基質の遺伝子発現量が有意に上昇した.

In vivo 試験:非拘束性圧縮試験にて得られたヤング率はゲル単独, ゲルとウサギ BMSCs, ゲルとヒト BMSCs の 3 群間で有意差はなかった．埋植した BMSCs はウサギ，ヒトともに術後 12 週時点における蛍光標識を確認した．MRI，組織学的評価では，ゲル群が髄核摘出群と比較して変性が有意に抑制されていた一方で，BMSCs との併用では穿刺群，髄核摘出群，ゲル群と比較して有意に抑制されていた．免疫組織化学的評価における Type II collagen 陽性細胞率は，ゲル群が穿刺群，髄核摘出群と比較して有意に高値であり，BMSCs 併用群では穿刺群，髄核摘出群，ゲル群と比較して有意に高値であった．一方，Type I collagen 陽性細胞率は，ゲル群が穿刺群，髄核摘出群と比較して有意に低値であり，さらに BMSCs 併用群では穿刺群，髄核摘出群，ゲル群と比較して有意に低値であった．また MRI，組織学的評価，免疫組織化学的評価いずれにおいてもウサギ BMSCs とヒト BMSCs の 2 群間では有意差はなかった. 埋植した BMSCs における HIF-1α, GLUT-1, Brachyury 陽性細胞率は, day1, 7, 28 の全ての群間で有意に経時的に上昇し，day28 での陽性細胞率は 3 種ともに 90%以上であった.

実験 2　ヤング率は，ゲル単独，ゲルと BMSCs，ゲルと BMAC の 3 群間で有意差はなかった．埋植した BMSCs，BMAC ともに術後 12 週時点で埋植した細胞の生存を確認した．MRI および組織学的評価では，BMSCs 併用群と BMAC 併用群ともに髄核摘出群，ゲル群と比較して変性が有意に抑制されており，2 群間に有意差はなかった．Type II collagen 陽性細胞率は，BMSCs 併用群，BMAC 併用群ともに髄核摘出群，ゲル群と比較して有意に高値であり，さらに BMSCs 群は BMAC 群に比較して有意に高値であった．一方，Type I collagen 陽性細胞率は，BMSCs 併用群，BMAC 併用群ともに髄核摘出群，ゲル群と比較して有意に低値であり，2 群間に差はなかった.

【考察】　実験 1　ゲル単独でも髄核摘出単独に比較して変性進行を有意に抑制されていたが，BMSCs の併用によりさらに組織再生が確認された．この効果はウサギ BMSCs とヒト BMSCs で同等であった．以上から，ゲル単独による組織修復効果に加えて，同種およびヒト BMSCs の併用によりその効果が上乗せされたことが示唆された．また，非拘束性圧縮試験において，ウサギ BMSCs，ヒト BMSCs ともにゲルと同等の弾性率を示した．BMSCs はゲルの力学的特性に変化を与えず，埋植後に椎間板外へ逸脱する可能性は低いことが示唆された．本研究では BMSCs と NPCs の 3 次元共培養により BMSCs における髄核細胞マーカーの発現上昇, 両細胞での成長因子および細胞外基質の発現上昇が認められ, *in vivo* でも同様の結果が確認されたことから，1) 埋植した BMSCs からの細胞外基質と成長因子の産生による既存 NPCs の活性化, 2) 活性化した NPCs から細胞外基質と成長因子の産生促進, 3) BMSCs の NPCs への分化，が椎間板再生の一連のメカニズムとして考えられた.

実験 2　BMSCs 併用と BMAC 併用ではいずれも髄核摘出単独，ゲル単独に比較して組織修復効果が有意に認められ，免疫組織化学的評価を除いてその効果は同等であった．以上から，ゲル単独の組織修復効果に加え，BMAC の併用によりその効果が上乗せされ，細胞外基質の産生を除いて BMSCs 併用と同等の効果であることが示唆された．ゲル弾性率はゲル単独，BMSCs 併用，BMAC 併用の 3 群間で有意差なく同等であり，BMAC の併用においてもゲルの力学的特性に変化を及ぼさないことが示唆された.

【結論】　BMSCs とゲルを組み合わせた細胞治療が, 既存 NPCs と BMSCs からの成長因子産生による相互活性化と BMSCs の NPCs への分化をもたらし，細胞外基質の産生が促進され組織再生が誘導されることを証明した．また，BMAC とゲルの組み合わせも有意な椎間板組織再生効果を示したことで，培養細胞では容易になし得ない簡便性や低コストを実現する有効な治療法として期待される.