



Title	椎間板障害に対する細胞治療法の開発
Author(s)	筧場, 大介; Ukeba, Daisuke
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14313号
Issue Date	2020-12-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14313">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14313</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/84305">https://hdl.handle.net/2115/84305</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Ukeba.pdf



学 位 論 文

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)

2020年12月

北 海 道 大 学

筧 場 大 介

Daisuke Ukeba



学 位 論 文

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)

2020年12月

北 海 道 大 学

筧 場 大 介

Daisuke Ukeba

## 目 次

発表論文目録および学会発表目録	・・・・・・・・・・・・・・・・	1 頁
要旨	・・・・・・・・・・・・・・・・	3 頁
略語表	・・・・・・・・・・・・・・・・	7 頁
緒言	・・・・・・・・・・・・・・・・	8 頁
第一章		
緒言	・・・・・・・・・・・・・・・・	9 頁
実験方法	・・・・・・・・・・・・・・・・	10 頁
実験結果	・・・・・・・・・・・・・・・・	17 頁
考察	・・・・・・・・・・・・・・・・	32 頁
第二章		
緒言	・・・・・・・・・・・・・・・・	35 頁
実験方法	・・・・・・・・・・・・・・・・	36 頁
実験結果	・・・・・・・・・・・・・・・・	40 頁
考察	・・・・・・・・・・・・・・・・	49 頁
結論	・・・・・・・・・・・・・・・・	51 頁
謝辞	・・・・・・・・・・・・・・・・	52 頁
利益相反	・・・・・・・・・・・・・・・・	53 頁
引用文献	・・・・・・・・・・・・・・・・	54 頁

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Daisuke Ukeba, Hideki Sudo, Takeru Tsujimoto, Katsuro Ura, Katsuhisa Yamada, Norimasa Iwasaki

Bone marrow mesenchymal stem cells combined with ultra-purified alginate gel as a regenerative therapeutic strategy after discectomy for degenerated intervertebral discs.

EBioMedicine, 53: 102698, (2020)

2. Daisuke Ukeba, Hideki Sudo, Katsuhisa Yamada, Takeru Tsujimoto, Katsuro Ura, Takayuki Nonoyama, Norimasa Iwasaki

Bone marrow aspirate concentrate combined with *in-situ* forming bioresorbable gel enhances intervertebral disc regeneration in rabbits.

The journal of bone & joint surgery, in press.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Daisuke Ukeba, Hideki Sudo, Takeru Tsujimoto, Katsuro Ura, Norimasa Iwasaki  
Intervertebral disc regeneration after implantation of an acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel.

Orthopedic Research Society 2019 Annual Meeting

February 2-5, 2019

Austin, TX, USA.

2. 釜場大介, 須藤英毅, 辻本武尊, 浦勝郎, 岩崎倫政  
高純度硬化性ゲルと骨髄由来間葉系幹細胞による椎間板再生.  
第 32 回日本軟骨代謝学会  
2019 年 3 月 1-2 日  
千里ライフサイエンスセンター (豊中市)

3. 釜場大介, 須藤英毅, 辻本武尊, 浦勝郎, 岩崎倫政  
高純度硬化性ゲルと骨髄由来間葉系幹細胞による椎間板再生.  
第 48 回日本脊椎脊髄病学会学術集会  
2019 年 4 月 18-20 日  
パシフィコ横浜 (横浜市)
4. 釜場大介, 須藤英毅, 辻本武尊, 浦勝郎, 岩崎倫政  
高純度硬化性ゲルと骨髄由来間葉系幹細胞による椎間板治療.  
第 34 回日本整形外科学会基礎学術集会  
2019 年 10 月 17-18 日  
パシフィコ横浜 (横浜市)
5. 釜場大介, 須藤英毅, 辻本武尊, 浦勝郎, 岩崎倫政  
高純度硬化性ゲルと骨髄由来間葉系幹細胞による椎間板治療.  
第 39 回整形外科バイオマテリアル研究会  
2019 年 12 月 7 日  
北海道大学 (札幌市)
6. Daisuke Ukeba, Hideki Sudo, Takeru Tsujimoto, Katsuro Ura, Norimasa Iwasaki  
Effects of the bioresorbable ultra-purified alginate gel combined with bone marrow  
derived mesenchymal stem cells or bone marrow aspirate concentrates on  
intervertebral disc regeneration in rabbits.  
Orthopedic Research Society 2020 Annual Meeting  
February 8-11, 2020  
Foenix, AZ, USA.
7. 釜場大介, 須藤英毅, 辻本武尊, 浦勝郎, 山田勝久, 岩崎倫政  
ウサギ髄核摘出モデルにおける高純度硬化性ゲルと自家骨髄濃縮液による  
組織修復効果.  
第 49 回日本脊椎脊髄病学会学術集会  
2020 年 9 月 7-9 日  
神戸コンベンションセンター (神戸市)

## 要 旨

### 【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- $\beta$ , 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髓液を採取し, 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, 腸骨稜より骨髓液を採取し, 遠心分離操作にて骨髓濃縮液を作製した. 髓核摘出を行ない, 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, 髓核細胞マーカー, 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, ゲル群が髓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, 髓核摘出群, 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, 髓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, 髓核摘出群, 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, 髓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, 髓核摘出群, 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-1 $\alpha$ , 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, 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と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, ゲル単独と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。

## 略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ACD-A	Anticoagulant Citrate Dextrose Solution A
AF	annulus fibrosus
BMAC	bone marrow aspirate concentrate
BMSCs	bone marrow derived mesenchymal stem cells
CDMP	cartilage-derived morphogenetic protein
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CFDA-SE	carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
G	gauge
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLUT	glucose transporter
H&E	Hematoxylin & Eosin
HIF	hypoxia inducible factor
IGF	insulin-like growth factor
MRI	magnetic resonance imaging
NP	nucleus pulposus
NPCs	nucleus pulposus cells
N.S.	not significant
PBS	phosphate buffered saline
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
TGF	transforming growth factor
UPAL	ultra-purified alginate gel

## 緒 言

体幹を支える脊柱を構成する椎間板は、中心部の髄核と周囲を取り囲む線維輪からなる軟部組織であり、衝撃を吸収し脊髄神経を保護する役割を担っている。また、椎間板は、人体最大の無血管組織の一つであり栄養供給に乏しく、椎間板細胞は終末分化状態で細胞分裂能が低いため、変性あるいは欠損した椎間板は生体内で自然再生しないとされている (Lipson and Muir, 1981 ; Bradford et al., 1983 ; Strassburg et al., 2010 ; Oehme et al., 2014)。椎間板障害に起因する脊椎疾患には脊柱管狭窄症、椎間板性腰痛、脊柱変形などが挙げられるが、腰椎椎間板ヘルニアはその中でも代表的な脊椎疾患である。手術治療では、神経を圧迫している脱出髄核を摘出する術式が行われているが、髄核摘出後の椎間板内部は空洞化し組織再生が障害される。そのため、術後初期には疼痛の残存やヘルニアの再発のリスクを伴い、長期的には椎間板変性が進行して追加の固定術を要する場合がある (Barth et al., 2008 ; McGirt et al., 2009 ; Bailey et al., 2013)。こうした背景から術後のヘルニア再発を予防し、かつ椎間板変性の進行を抑制し組織を再生させる新規治療法の確立が期待されている。

我々はこれまで、椎間板ヘルニア術後の組織修復材として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開発し、髄核摘出術後の空隙へゲルを単独投与することで組織修復環境を改善させ、既存髄核前駆細胞の増殖により椎間板組織が自然修復されることを証明した。また、ヒツジ脊椎を用いた力学試験により、荷重負荷によってもゲルが椎間板外へ逸脱せず、さらに生物学的安全性も担保しうることを明らかにしており (Tsujiimoto et al., 2018)、現在、椎間板ヘルニアの手術患者に対してヘルニア摘出術後のゲル単独投与による医師主導治験を実施している。

しかし、本治験においては、ゲルによる生体内組織修復環境の最適化を主眼としているため対象患者を 20 歳から 40 歳台に限定しており、50 歳以降の中高年期の自己修復能力が乏しい患者に対してはゲル単独では修復効果に限界があると考えている。そこで我々は、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、変性椎間板を対象とした椎間板細胞治療における新規治療法の実現を目標とした。

本研究では、変性椎間板における髄核摘出術後に対して、BMSCs あるいは BMAC と硬化性ゲルの併用が椎間板の組織再生を促進させるという仮説のもと、これらの併用療法の効果とメカニズムを検証することとした。

## 第 一 章

### 変性椎間板における髄核摘出術後の骨髄由来間葉系幹細胞と高純度硬化性ゲルを組み合わせた椎間板細胞治療の検討

#### 緒 言

変性椎間板における髄核摘出術後の椎間板組織再生を目的とし、高純度硬化性ゲルと組み合わせる細胞として BMSCs に着目した。BMSCs は、椎間板再生医療研究において広く使われており、動物実験レベルでは自家 (Sakai et al., 2006 ; Hiyama et al., 2008), 同種他家 (Zhang et al., 2005 ; Sobajima et al., 2008), 異種 (Henriksson et al., 2012 ; Wang et al., 2014) 由来の BMSCs が、臨床研究では自家 (Yoshikawa et al., 2010 ; Orozco et al., 2011), 同種他家 (Noriega et al., 2017) 由来の BMSCs を用いた研究が報告されている。

自家由来細胞を利用する場合、細胞採取、培養、調製といった細胞作製工程を要し二期的手術となり、患者侵襲や培養操作による感染リスクやコスト高が課題となるため、本研究では、同種他家 BMSCs を採用した。

第一章では変性椎間板における髄核摘出後に対して、同種他家 BMSCs と硬化性ゲルの埋植が、髄核摘出単独やゲル単独に比べて椎間板組織の再生を促進するという仮説のもと、家兎椎間板変性モデルを用いて椎間板組織再生効果とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 実験方法

### 【*In vitro* 試験】

#### ウサギ髄核細胞と骨髄由来間葉系幹細胞による3次元共培養

本実験のために実施した動物実験は、北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。20週齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5 kg) をペントバルビタール過量投与により安楽死させ、腰椎切除後に非変性椎間板を摘出した。椎間板組織より髄核組織を取り出し、0.25% Collagenase (Wako, Osaka, Japan) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で37°C, 4時間処理し、髄核細胞 (Nucleus pulposus cell; NPCs) を単離した。得られたNPCsを1% penicillin/streptomycin, 1.25 µg/ml fungizone (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% fetal bovine serum (FBS; Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) を含むDMEMを培養液としてインキュベーター内で37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>の条件下で培養し、2継代した細胞を実験で使用した (Tsujiimoto et al., 2018 ; Naqvi and Buckley, 2015 ; Yamada et al., 2014 ; Sudo and Minami, 2011).

ウサギBMSCsは各種細胞への分化能が証明されている市販のOriCell™ Rabbit Mesenchymal Stem Cells (RBXMX-01001; cyagen, Santa Clara, CA, USA) を使用した。DMEMを培養液としてインキュベーター内で37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>の条件下で培養し、2継代した細胞を使用した。細胞は使用する直前に20 µM Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFDA-SE) (CFDA-SE Cell Proliferation Assay Kit (135-1201); BIO RAD, Hercules, CA, USA) にて蛍光標識を行った (Sato et al., 2012).

3次元培養用アルギン酸ゲルとして粘調度400-600 mPa/sのUltra-purified alginate (UPAL) ゲル (Mochida Pharma. Co. Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。ゲルは2% (v/w) の濃度で使用した (Tsujiimoto et al., 2018)。実験群の設定としてNPCsの単独培養, BMSCsの単独培養, NPCsとBMSCsを混合した共培養の3群に分け、各々の細胞を1.0×10<sup>6</sup> cells/mlの濃度 (Yamamoto et al., 2004 ; Strassburg et al., 2010 ; Ouyang et al., 2017) で2% UPAL水溶液に懸濁した (図1A)。これら3種の細胞懸濁液を22-gauge (G) の注射針を付けたシリンジから102 mMの塩化カルシウム水溶液中に滴下して、直径約2 mmのUPALビーズ内に包埋した (図1B)。塩化カルシウム水溶液中に滴下してから10分後に出来上がったビーズ (約2×10<sup>4</sup> cells/ビーズ) を回収し、0.9% 生理食塩水で2回洗浄を行った。ビーズは培養液中で37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>の低酸素環境の条件下で7日間培養した。

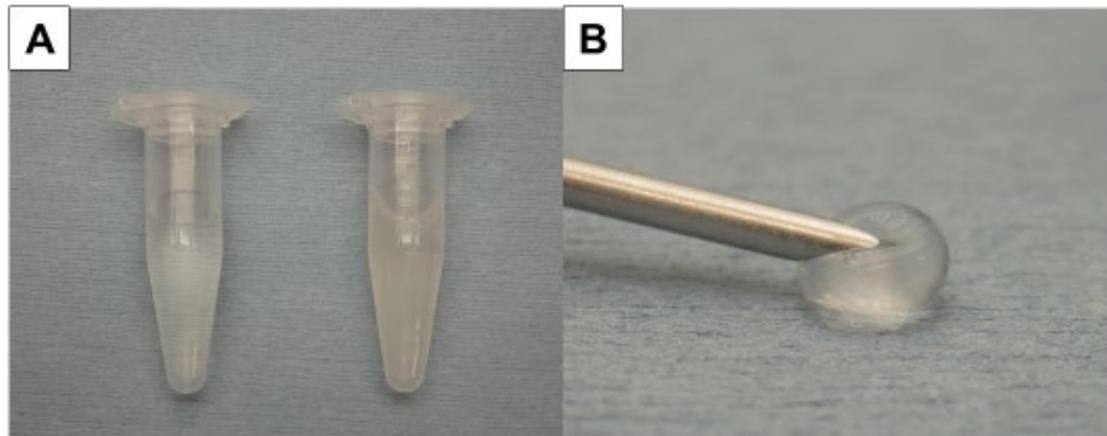


図1. (A) 2% UPAL水溶液（左）と細胞を混合した懸濁液（右）. (B) 22G針を用いて塩化カルシウム水溶液に滴下しビーズ状にゲル化.

#### 細胞の回収とセルソーターによる分離

培養前または培養7日後にUPALビーズを55  $\mu\text{M}$ のクエン酸ナトリウム (Wako) と0.15 Mの塩化ナトリウム (Wako) 混合溶液に4°C, 20分間浸した後, 遠心分離 (4°C, 110 g, 10分間) して細胞を回収した (Sudo and Minami, 2011). 共培養を行った細胞は細胞回収後にセルソーター (BD FACSAria III high speed cell sorter with Diva 7.0 software; BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を使用して蛍光標識されていないNPCsと蛍光標識されたBMSCsに分離した (Richardson et al., 2006 ; Strassburg et al., 2010). 分離の際はCFDA-SEの蛍光波長である530 nmを利用した.

#### 髄核細胞マーカー, 細胞外基質および成長因子の遺伝子発現量の評価

回収, 分離によって得られた培養前と培養7日後のNPCs (単独培養, 共培養) とBMSCs (単独培養, 共培養) における髄核細胞マーカー, 細胞外基質および成長因子の遺伝子発現量を評価した. 髄核細胞のマーカーは推奨される8種Primary marker (Risbud et al., 2015) のうちHIF-1 $\alpha$ , GLUT-1, Brachyuryの3種を選択し, 細胞外基質に関してはType II collagenとAggrecan (Naqvi and Buckley, 2015) を評価した. また成長因子はCDMP-1, TGF- $\beta$ , IGF-1の3種 (Strassburg et al., 2010) を評価した. House keeping遺伝子としてGAPDHを評価した.

分離した細胞からribonucleic acid (RNA)を抽出し, complementary deoxyribonucleic acid (cDNA)を作製した後にquantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) を行い, 上記9種の遺伝子発現量を測定した. qRT-PCRはThermal Cycler Dice Real Time System II (Takara, Shiga, Japan) にて行い, プライ

マー・プローブセットはTaqMan® Gene Expression AssayおよびCustom TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で作製したものをを使用した (表1) . 評価方法はGAPDHを基準とした $2^{-\Delta Ct}$ 法 (Strassburg et al., 2010) を用いた (n = 3).

表1. 作製したプライマー・プローブのAssay ID

Gene	Gene symbol	Assay ID
HIF-1 $\alpha$	HIF1A	Oc03398626_m1
GLUT-1	SLC2A1	Oc03399482_m1
Brachyury	T	Oc03395780_m1
CDMP-1	GDF5	Oc00433564_m1
TGF- $\beta$ 1	TGFB1	Oc04176122_u1
IGF-1	IGF1	Oc04096599_m1
Type II collagen	COL2A1	Oc03396134_m1
Aggrecan *	ACAN	-
GAPDH	GAPDH	Oc03823402_g1

\* Custom TaqMan ® Gene Expression Assay

### 【*In vivo* 試験】

#### 埋植するウサギ・ヒトBMSCsの作製

埋植するウサギBMSCsは, *in vitro* 試験と同様にOriCell™ Rabbit Mesenchymal Stem Cellsを使用した. DMEMを培養液として37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>の条件下で培養し, 2継代した細胞を使用した. 埋植するBMSCsの生存評価目的に, 埋植する直前に20  $\mu$ M CFDA-SEにて蛍光標識を行った (Wang et al., 2014 ; Polzer et al., 2012). 標識した細胞は2% UPAL水溶液に懸濁し, 最終濃度を $1.0 \times 10^6$  cells/mlとした (Hiyama et al., 2008).

#### ウサギ椎間板変性モデルの作製

はじめに, 20週齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5 kg) を用いて椎間板変性モデルを作製した. 塩酸ケタミン (10 mg/kg) と塩酸キシラジン (3 mg/kg) による静脈麻酔とセボフルランによる吸入麻酔を併用して処置を実施した. 側臥位にて透視下にL2/3およびL4/5椎間板線維輪を経皮的に18 G注射針で5 mmの深度まで穿刺し, 変性モデルを作製した (Sudo and Minami, 2011 ; Lei et al., 2017 ; Ura et al.,

2019) (図2) . L3/4椎間板は無処置のIntact controlとして使用した.

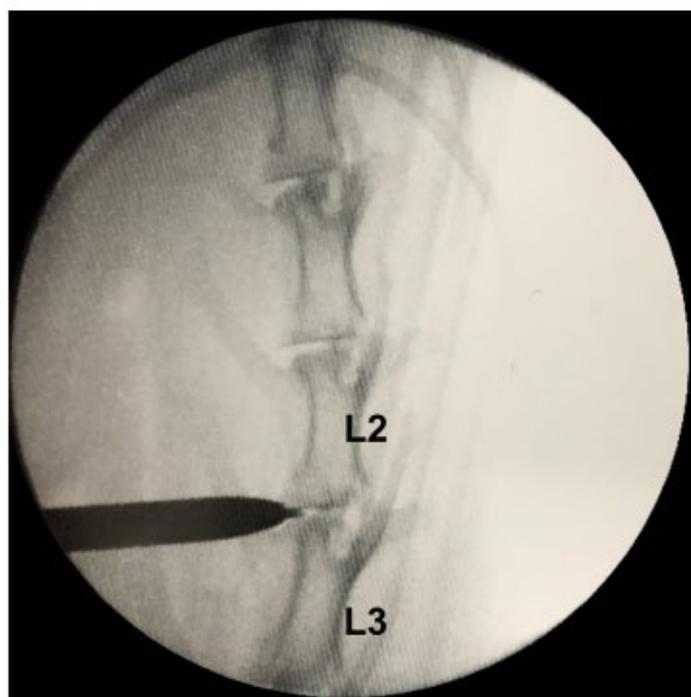


図2. ウサギ椎間板変性モデルの作製. 小皮切の後にダイレーターを挿入. 透視下に椎間板線維輪を18G針にて経皮的に穿刺.

### 変性椎間板に対する髓核摘出と各種埋植

穿刺から4週後, 変性作製時と同様の体位, 麻酔法で処置を行った. 経後腹膜アプローチにより展開して椎間板を露出後, 変性したL2/3およびL4/5椎間板線維輪を18 G注射針で穿刺し, 刺入孔を作製した後に小型の髓核鉗子で髓核摘出を行った (Tsujimoto et al., 2018) (図3A) . 27 G注射針およびマイクロシリンジ (Hamilton, Reno, NV, USA) を使用して髓核摘出にて生じた空隙にUPAL水溶液20  $\mu$ lおよびUPAL水溶液とBMSCsを混合した懸濁液20  $\mu$ lを注入し (図3B) , 102 mM塩化カルシウム水溶液で表層をゲル化させ (図3C) , 5分後に生理食塩水で洗浄した (Sudo and Minami, 2011 ; Yamada et al., 2014 ; Tsujimoto et al., 2018 ; Qian et al., 2019).

実験群の設定として, 無処置のコントロール群, 髓核摘出を行わず変性作製のみを行った穿刺群, 変性椎間板に対し髓核摘出のみを行った髓核摘出群, 髓核摘出後にUPALゲルのみを単独で投与したゲル群, ゲルとBMSCsを併用したBMSCs+ゲル群に群分けした.

また*in vivo* 試験では, ヒト骨髓由来間葉系幹細胞も埋植細胞として用いた. 使用する細胞は, 分化能が証明されている市販のHuman Mesenchymal Stem Cells

from Bone Marrow (C-12974; PromoCell, Heidelberg, Germany) を使用し，ウサギ BMSCs と同様の手順でCFDA-SEによる蛍光標識後に埋植を行った．

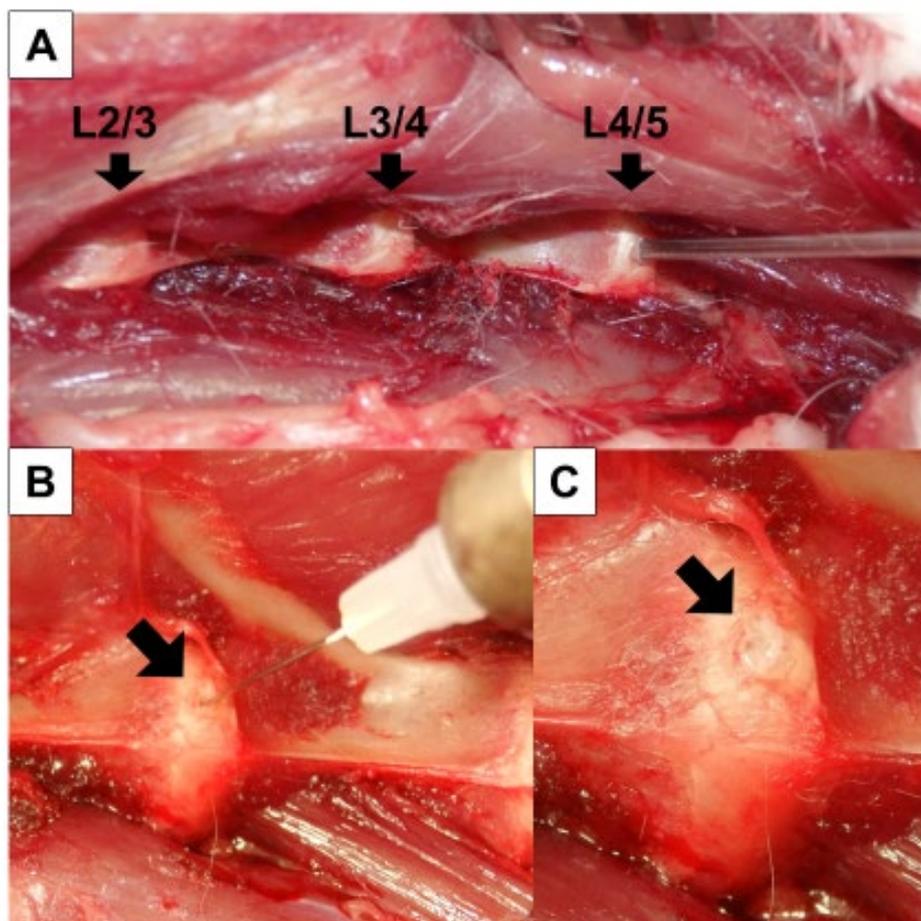


図3. (A) 変性椎間板に対し小型髓核鉗子を用いて髓核を摘出. (B) 27 G注射針およびマイクロシリンジ髓核にて空隙にUPAL水溶液20  $\mu$ lおよびUPAL水溶液とBMSCsを混合した懸濁液20  $\mu$ lを注入. (C) 塩化カルシウム水溶液で表層をゲル化.

手術を施行したウサギは計48羽であり，4羽は埋植したBMSCsの生存評価に使用し，計16椎間板をコントロール群，BMSCs+ゲル群の2群に分けて評価した（各n = 4椎間板）．また32羽は椎間板変性の定量評価（magnetic resonance imaging (MRI) 評価，組織学的評価，免疫組織化学的評価）に使用し，計80椎間板をコントロール群，穿刺群，髓核摘出群，ゲル群，BMSCs+ゲル群の5群に分けて評価した（各n = 8椎間板）．残りの12羽は，髓核細胞マーカーであるHIF-1 $\alpha$ ，GLUT-1，Brachyuryの発現評価に使用し，計36椎間板をコントロール群，髓核摘出群，BMSCs+ゲル群の3群に分けて評価した（各n = 4椎間板）．椎間板変性の定量評価およびBMSCsの生存評価は埋植後4週，12週で行い，髓核細胞マーカーの評価は埋植後1日，7日，28日で行った．各々の評価時期にペ

ントバルビタールの過量投与により安楽死させ腰椎を摘出した。

### 非拘束性圧縮試験による力学試験

上記にて作製したUPAL水溶液とウサギBMSCsの懸濁液 ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml), ヒトBMSCsとの懸濁液 ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml) および無細胞のUPAL水溶液から直径4.5 mm, 厚さ2 mmの3種類のゲルを作製し (Tsujiimoto et al., 2018), 非拘束性圧縮試験を実施し (図4A-C)。検体を試験機 (Autograph AG-X, Shimadzu, Kyoto, Japan) に設置し, 100 Nのロードセルを使用して0.5 mm/minの速度で歪み率95%まで圧縮した (図4D)。得られた応力-ひずみ曲線から, 歪み率10–20%間の直線を用いてヤング率を算出した (Iatridis et al., 1996 ; Zeng et al., 2015 ; Tsujiimoto et al., 2018)。

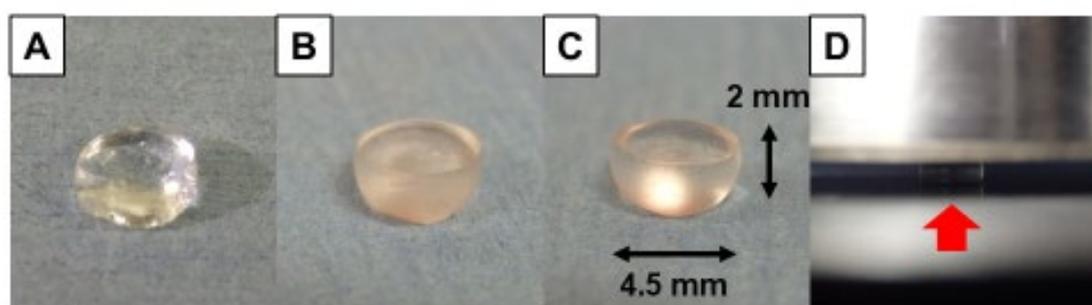


図4. (A) ゲル単独. (B) ウサギBMSCs+ゲル. (C) ヒトBMSCs+ゲル. (D) 非拘束性圧縮試験にてゲル弾性率を測定.

### 埋植したBMSCsの生存評価

摘出した腰椎から椎間板を取り出し10%ホルマリンで固定した。水平断5  $\mu$ m厚の凍結切片を作製し, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 染色を施した後に蛍光顕微鏡で観察した。

### MRI評価

椎間板変性を評価するため, 7.0-Tesla MR scanner (Unity Inova, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA) を用いてT2強調矢状断画像を撮像した。椎間板変性度を評価するため, Pfirrmann分類 (Pfirrmann et al., 2001) を用いてスコア化した。本分類はMRIにおける椎間板変性度を5段階 (1 : normal ~ 5 : highly degenerative) に評価している。また, Analyze 14.0 software (AnalyzeDirect) を用いて, MRI index (髄核の平均信号強度と髄核面積の積) を測定し定量的に評価した。処置椎間板におけるMRI indexをコントロール群のMRI indexに対する割合で評価した (Sudo and Minami, 2011 ; Tsujiimoto et al., 2018 ; Ura et al., 2019)。

### 椎間板の組織学的評価

MRI撮像後，椎間板を摘出し10%ホルマリンで固定した．10% EDTA (pH 7.5) で脱灰処理しパラフィンに包埋した．矢状断5  $\mu\text{m}$ 厚のパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし，アルコール処理，水洗いした後，Hematoxylin & Eosin (H&E) 染色，Safranin O染色を実施した (Tsujiimoto et al., 2018)．椎間板変性の重症度は，内側線維輪の構造破綻の程度で0点 (normal) ~5点 (highly degenerative) に分類した組織変性度を用いて評価した (Nishimura and Mochida, 1998 ; Sakai et al., 2006)．

### 免疫組織化学的評価

Type IおよびType II collagenの発現を評価するために免疫組織化学的評価を行った．1次抗体には抗Type I collagen抗体 (Sigma-Aldrich)，抗Type II collagen抗体 (Kyowa Pharma Chemical, Toyama, Japan) を使用し，Proteinase K (Dako, Denmark) を使用して前処置を行った．PBS洗浄後，1%過酸化水素メタノール処理し1次抗体反応を行い，Envision (Dako) で処理し，DABにて発色後，hematoxylinを用いて後染色した．無作為に選択した5視野において，Type I collagen，Type II collagen陽性細胞数を計測した (Tsujiimoto et al., 2018)．

### 髓核細胞マーカーの発現評価

移植したBMSCsにおける髓核細胞マーカーの発現を埋植後1日，7日，28日で評価した．摘出した椎間板を10%ホルマリンで固定し，パラフィンに包埋した後水平断5  $\mu\text{m}$ 厚の切片を作製した．HIF-1 $\alpha$ ，GLUT-1およびBrachyuryの発現を評価するために免疫染色を行った．1次抗体にはDyLight 550で蛍光標識された抗HIF-1 $\alpha$ 抗体 (Novus Biologicals, Centennial, CO, USA)，PEで蛍光標識された抗GLUT-1 (SLC1A3) 抗体 (LS Bio, Seattle, WA, USA) および未標識の抗Brachyury (TBX1) 抗体 (LS Bio) を使用した．さらにBrachyuryに対しては2次抗体となるAlexa Fluor 568 donkey anti-mouse IgG (Invitrogen, USA) を用いた染色を行った．最後にDAPIによる染色を追加した．無作為に選択した5視野において，CFDA-SE陽性細胞における抗体陽性細胞の割合およびDAPI陽性細胞における抗体陽性細胞の割合を算出した．

### 統計分析

多群間比較においてはone-way ANOVAおよびTukey-Kramer's test，2群間比較においてはStudent's t-testを用いて有意差検定を行い， $p < 0.05$ で有意差ありとした．

## 実験結果

### 【*In vitro* 試験】

#### 髄核細胞と間葉系幹細胞の共培養における髄核細胞マーカーの発現上昇および成長因子と細胞外基質の産生促進

共培養を行った細胞はNPCsとBMSCsが混合しているため、セルソーターにて分離操作を行った。ゲル溶解によって得られた全細胞のうち生細胞をP1ゲート内の細胞とし、混在しているデブリスや死細胞を除去した。さらにP1ゲート内の細胞のうちCFDA-SE陰性細胞となるNPCsをP2ゲートに、CFDA-SE陽性細胞となるBMSCsをP3ゲート内に分離した(図5A-B)。以上の操作を行い、以下の6種の細胞に分類した。(a) コントロールNPCs (未培養), (b) 単独培養NPCs, (c) 共培養NPCs, (d) コントロールBMSCs (未培養), (e) 単独培養BMSCs, (f) 共培養BMSCs。BMSCsの分化を評価する目的に髄核細胞マーカーとしてHIF-1, GLUT-1, Brachyuryの3種, 成長因子としてCDMP-1, TGF- $\beta$ , IGF-1の3種, さらに細胞外基質としてType II collagen, Aggrecanの2種に関して各種細胞における遺伝子発現量をqRT-PCRで測定した。

HIF-1 $\alpha$ に関しては、共培養NPCsがコントロールNPCsに比較して有意に発現量が上昇しており、共培養BMSCsはコントロールBMSCs, 単独培養BMSCsに比較して有意に発現量が上昇していた(図5C)。GLUT-1においては、共培養NPCsがコントロールNPCsと単独培養NPCsに比較して有意に発現量が上昇しており、共培養BMSCsはコントロールBMSCsに比較して有意に発現量が上昇していた(図5D)。Brachyuryでは、コントロールBMSCs, 単独培養BMSCsでは発現がなかったが、共培養BMSCsでは発現が認められた。なおNPCsでは3群間で差はなかった(図5E)。CDMP-1, TGF- $\beta$ , IGF-1に関しては、共培養NPCsがコントロールNPCsと単独培養NPCsに比較して有意に発現量が上昇し、共培養BMSCsもコントロールBMSCsと単独培養BMSCsに比較して有意に発現量が上昇していた(図5F-5H)。Type II collagenでは、共培養NPCsと単独培養NPCsがコントロールNPCsに比較して有意に発現量が上昇し、共培養BMSCsはコントロールBMSCsと単独培養BMSCsに比較して有意に発現量が上昇していた(図5I)。Aggrecanは共培養NPCsがコントロールNPCsと単独培養NPCsに比較して有意に発現量が上昇した。BMSCsにおいては、コントロールBMSCs, 単独培養BMSCsでは発現がなかったが、共培養BMSCsでは発現が認められた(図5J)。

以上の結果より、NPCsとBMSCsの共培養により、1) BMSCsの髄核細胞への分化, 2) NPCsとBMSCsの相互賦活作用, 3) 両細胞からの細胞外基質産生促進, が示唆された。

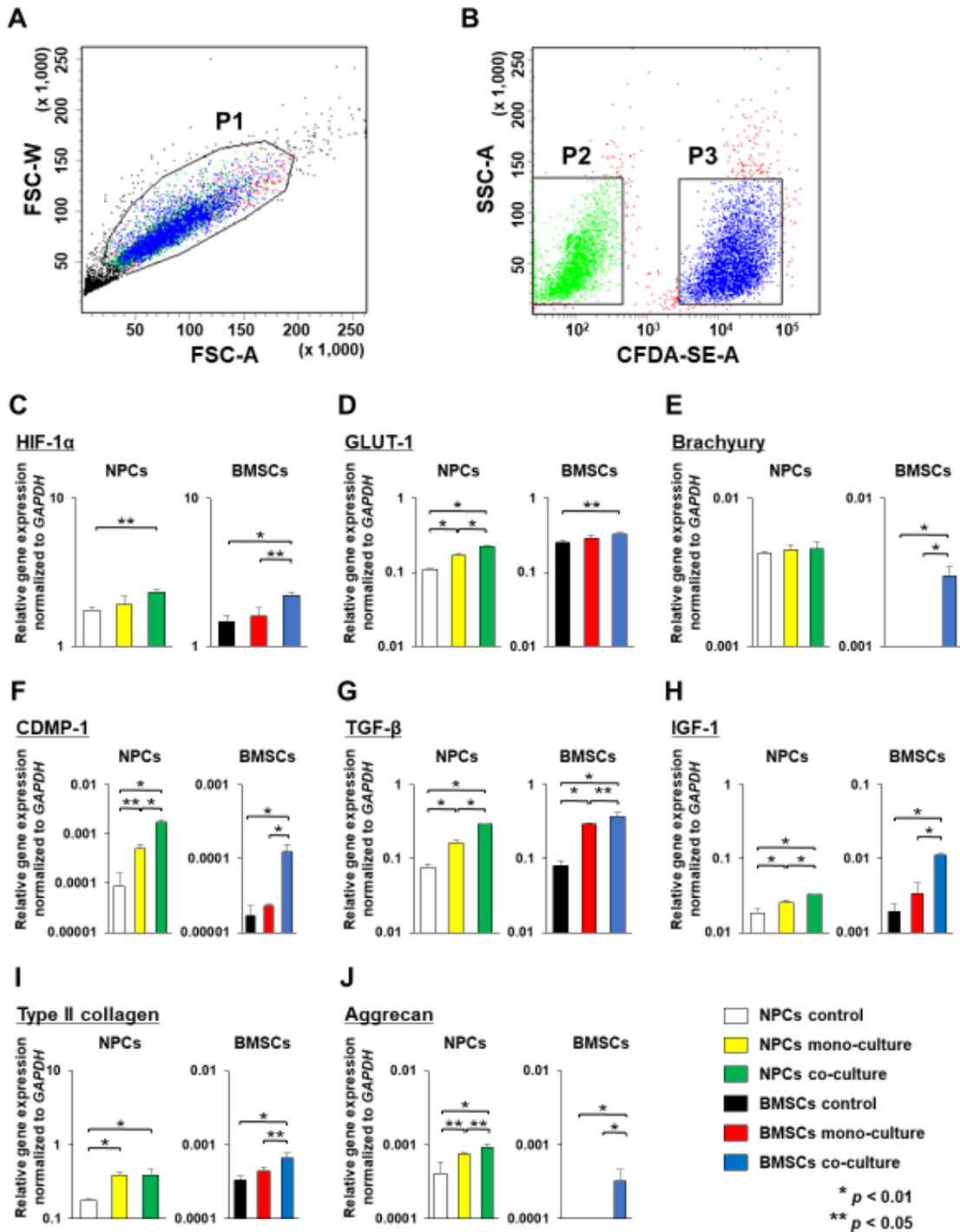


図5. 未培養，培養7日後における髄核細胞（NPCs，単独培養および共培養）と骨髄由来間葉系幹細胞（BMSCs，単独培養および共培養）における各種遺伝子の mRNA 発現量. (A) P1 ゲート内に生細胞を回収して死細胞とデブリスを除去. (B) P1 ゲート内の細胞に対して，CFDA-SE 標識なし NPCs を P2 ゲート内に，CFDA-SE 標識 BMSCs を P3 ゲート内に分離した. (C-E) 髄核細胞マーカーである HIF-1 $\alpha$ ，GLUT-1，Brachyury の

NPCs, BMSCs における発現量. (F-H) 成長因子である CDMP-1, TGF- $\beta$ , IGF-1 の NPCs, BMSCs における発現量. (I-J) 細胞外基質である Type II collagen と Aggrecan の NPCs, BMSCs における発現量.  $n = 3$ , 平均 $\pm$ 標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

### 【In vivo 試験】

#### 非拘束性圧縮試験による力学試験

直径4.5mm, 厚2 mmの各種ゲルを作製し非拘束性圧縮試験を行い, 力学的特性を評価した (図6A). 歪み率10 - 20%におけるヤング率は, ゲルで $15.4 \pm 1.9$  kPa, ウサギBMSCs+ゲルは $16.3 \pm 2.8$  kPa, ヒトBMSCs+ゲルは $15.1 \pm 3.2$  kPa であり各群間で有意差はなく同等の力学的特性を示した (図6B). また, 得られた全てのヤング率はヒト髄核組織のそれと同等であった (Iatridis et al., 1996 ; Tsujimoto et al., 2018).

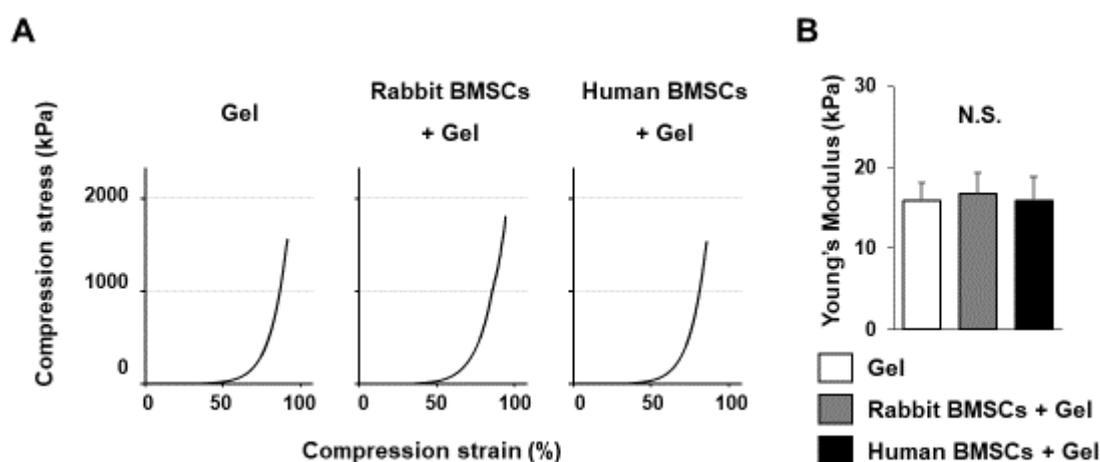


図6. 3種類のゲルの非拘束性圧縮試験を実施. (A) 応力-ひずみ曲線の歪み率10%~20%の間の直線を用いてヤング率を算出. (B) 3種類のゲルのヤング率評価.  $n = 4$ , 平均 $\pm$ 標準誤差, N.S. ; no significance.

#### 埋植椎間板における BMSCs の生存

コントロール群および BMSCs+ゲル群における摘出椎間板に対して DAPI 染色を施した凍結切片を作製し, 蛍光顕微鏡で観察した. その結果, 埋植後 4 週, 12 週ともに DAPI の局在と一致するように CFDA-SE の蛍光を認めた (図 7). また, この結果はヒト BMSCs でも同様であった (図 9A). コントロール群では DAPI のみを認めた. 以上から, 埋植した BMSCs が埋植 12 週の時点において椎間板内で生存していたことが確認された. なお, 追加実験として埋植 24 週, 48 週でも同様に評価したが, 埋植 24 週, 48 週のいずれにおいても

BMSCs の生存が確認された (図 7).

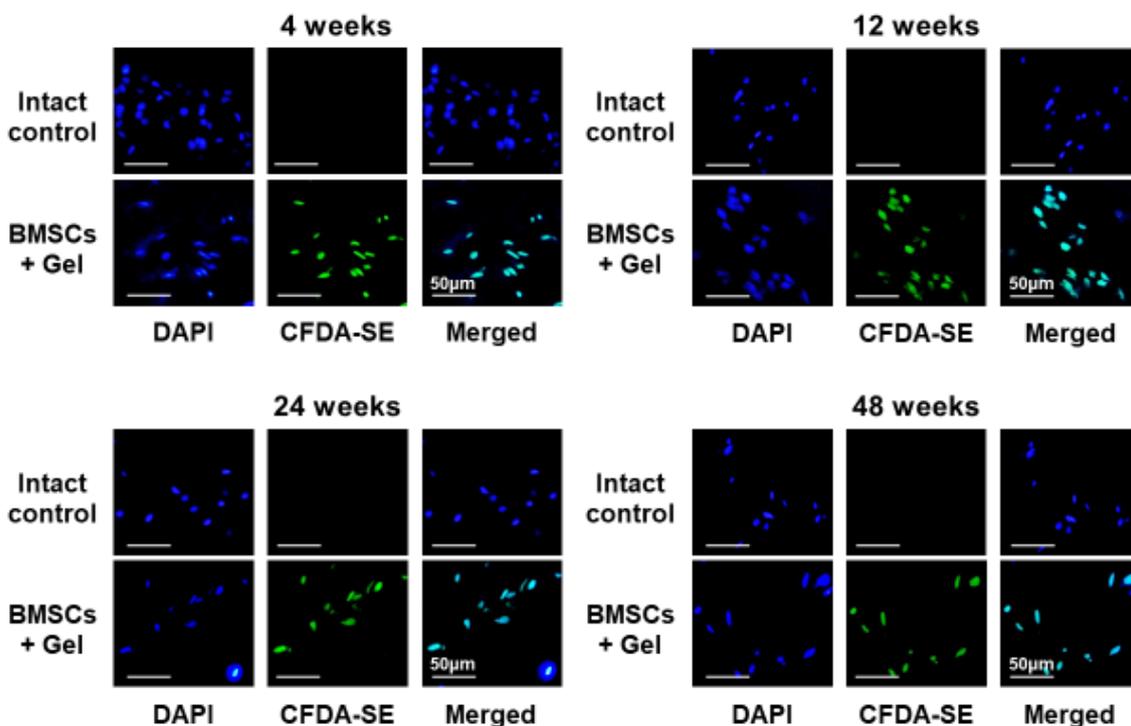


図 7. 埋植 BMSCs の生存評価. 埋植前に CFDA-SE にて標識した BMSCs の蛍光を認め, DAPI の局在に一致していた.

## ゲルと BMSCs の併用による椎間板組織再生効果

### MRI 評価

矢状断T2 強調像 (図8A) におけるウサギ椎間板の変性変化を評価した. Pfirrmann分類による変性評価では, 埋植後4週, 12週ともにコントロール群に比べて穿刺群, 髄核摘出群, ゲル群, BMSCs+ゲル群ともに有意にスコアが高値であり椎間板変性を示す所見であったが, BMSCs+ゲル群は髄核摘出群と比較して有意に低値を示した. 埋植12週時では, ゲル群は髄核摘出群と比較して有意に低値を示し, BMSCs+ゲル群は穿刺群, 髄核摘出群と比較して有意に低値を示した (図8B). 髄核の信号強度を定量化したMRI indexによる変性評価では, 埋植4週時, BMSCs+ゲル群は, 髄核摘出群と比較して有意に高値であった. 埋植12週においては, ゲル群は髄核摘出群と比較して有意に高値であったが, さらにBMSCs+ゲル群は, 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 (図8C). また, ヒトBMSCsではPfirrmann分類, MRI indexともにウサギBMSCsと差はなかった (図9B-D).

以上の結果から, ゲル単独でも髄核摘出に比較して椎間板の変性抑制効果が

示されたが、BMSCs併用によってさらに高い効果が得られたことが示唆された。

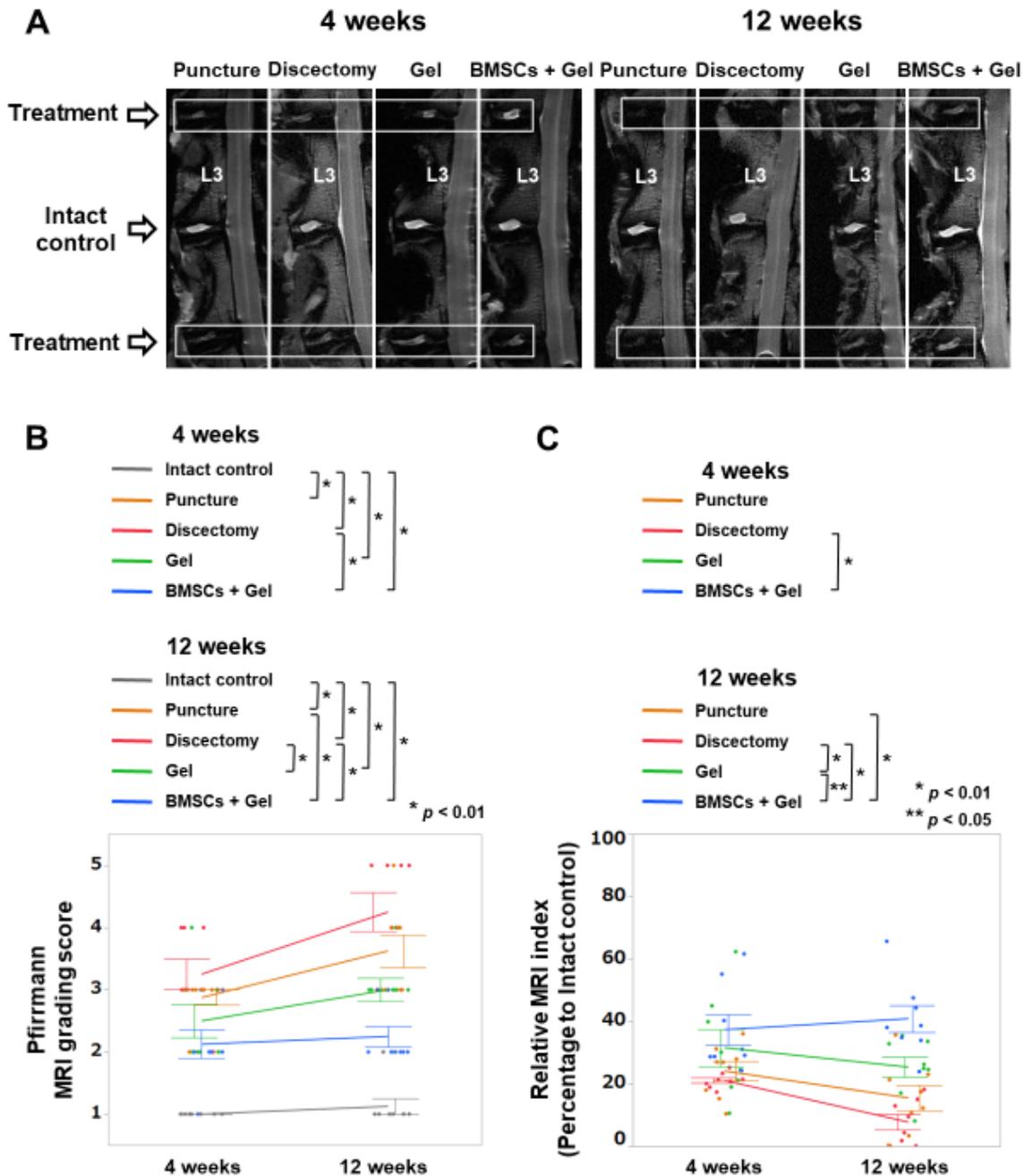


図8. MRIによる椎間板変性評価. (A) ウサギ椎間板における代表的T2強調矢状断面画像. (B) Pfirmann grading scoreによる評価.  $n = 8$ , 平均±標準誤差. (C) MRI index (髄核高信号領域の面積×平均信号強度)による評価. コントロール群に対する各群のMRI indexの比較.  $n = 8$ , 平均±標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

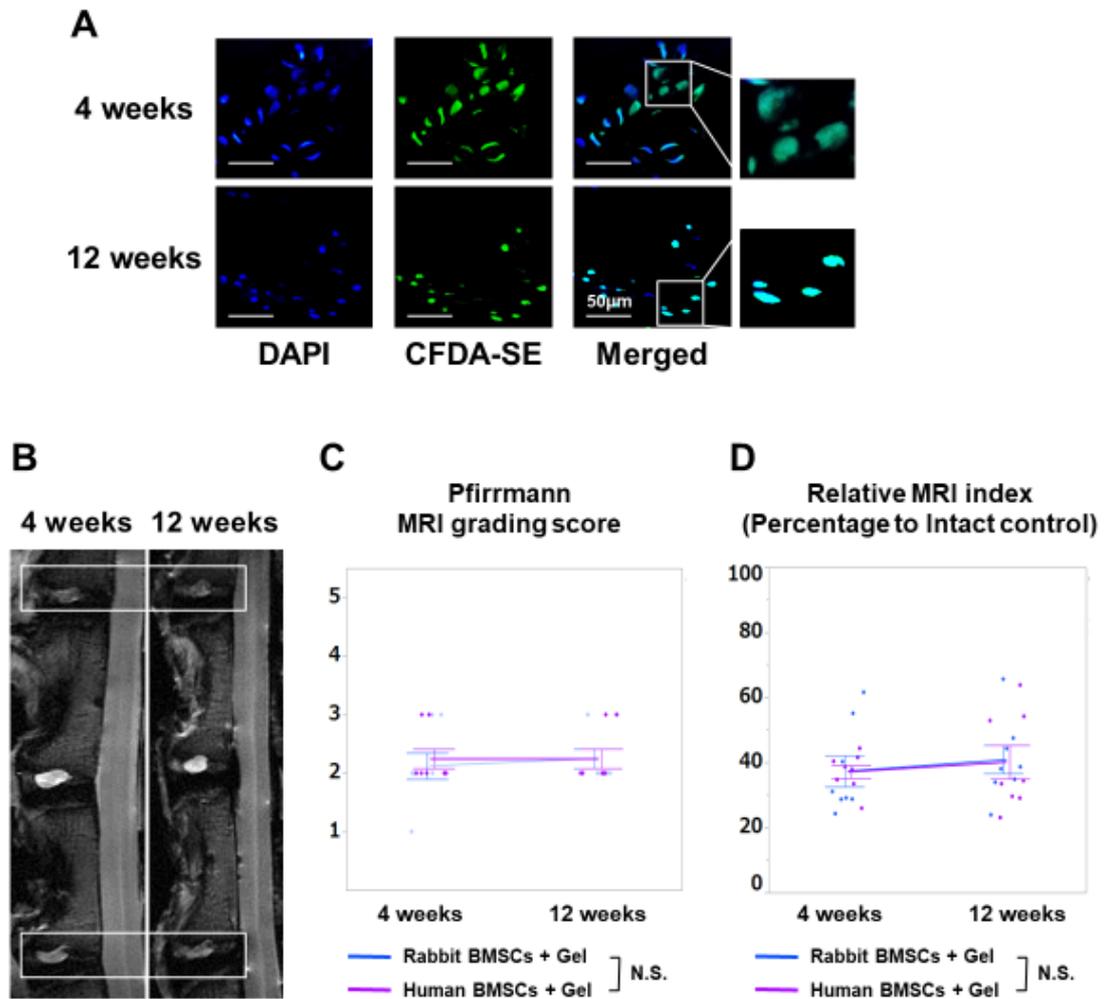


図9. ウサギ椎間板へのヒト BMSCs 埋植. (A) BMSCs の生存評価. (B) T2 強調矢状断画像. (C) Pfirrmann grading score による評価. ウサギ BMSCs との比較.  $n = 8$ , 平均 $\pm$ 標準誤差. (D) MRI index 評価. ウサギ BMSCs との比較.  $n = 8$ , 平均 $\pm$ 標準誤差.

### 組織学的評価

コントロール群では、内層線維輪の圧潰はなく髄核組織に特徴的な楕円形パターンが認められた。髄核摘出群では、ほぼ全ての評価点で内側線維輪構造は破綻、不明瞭化しており、髄核組織の線維化所見を認めた。一方、ゲル群では、髄核摘出群と比較して内側線維輪構造が保たれていた。BMSCs+ゲル群では、穿刺群、髄核摘出群、ゲル群と比較して相対的に内層線維輪構造が保たれており、髄核組織の線維化も軽度であった。また骨棘形成はいずれの群でも認められなかった(図 10A-B)。組織学的変性スコアでは、埋植 4 週において、コントロール群と比較して穿刺群、髄核摘出群、ゲル群、BMSCs+ゲル群とも

にスコアが有意に高値であった。BMSCs+ゲル群は、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。埋植 12 週時において、ゲル群は、髄核摘出群と比較して有意に低値であった。BMSCs+ゲル群は、穿刺群、髄核摘出群、ゲル群と比較して変性スコアが有意に低値であった（図 10C）。また、ヒト BMSCs 埋植ではウサギ BMSCs と差はなかった（図 14A-B）。

以上の結果から、MRI の結果と同様にゲル単独においても髄核摘出に比較して有意な変性抑制効果が認められたが、BMSCs の併用によりさらに高い変性抑制効果が得られることが示された。また、BMSCs+ゲル群における変性スコアが穿刺群と比較して有意に低値であったことから、BMSCs 併用の処置椎間板が、髄核摘出前の変性椎間板よりも組織学的に再生したことが示唆された。

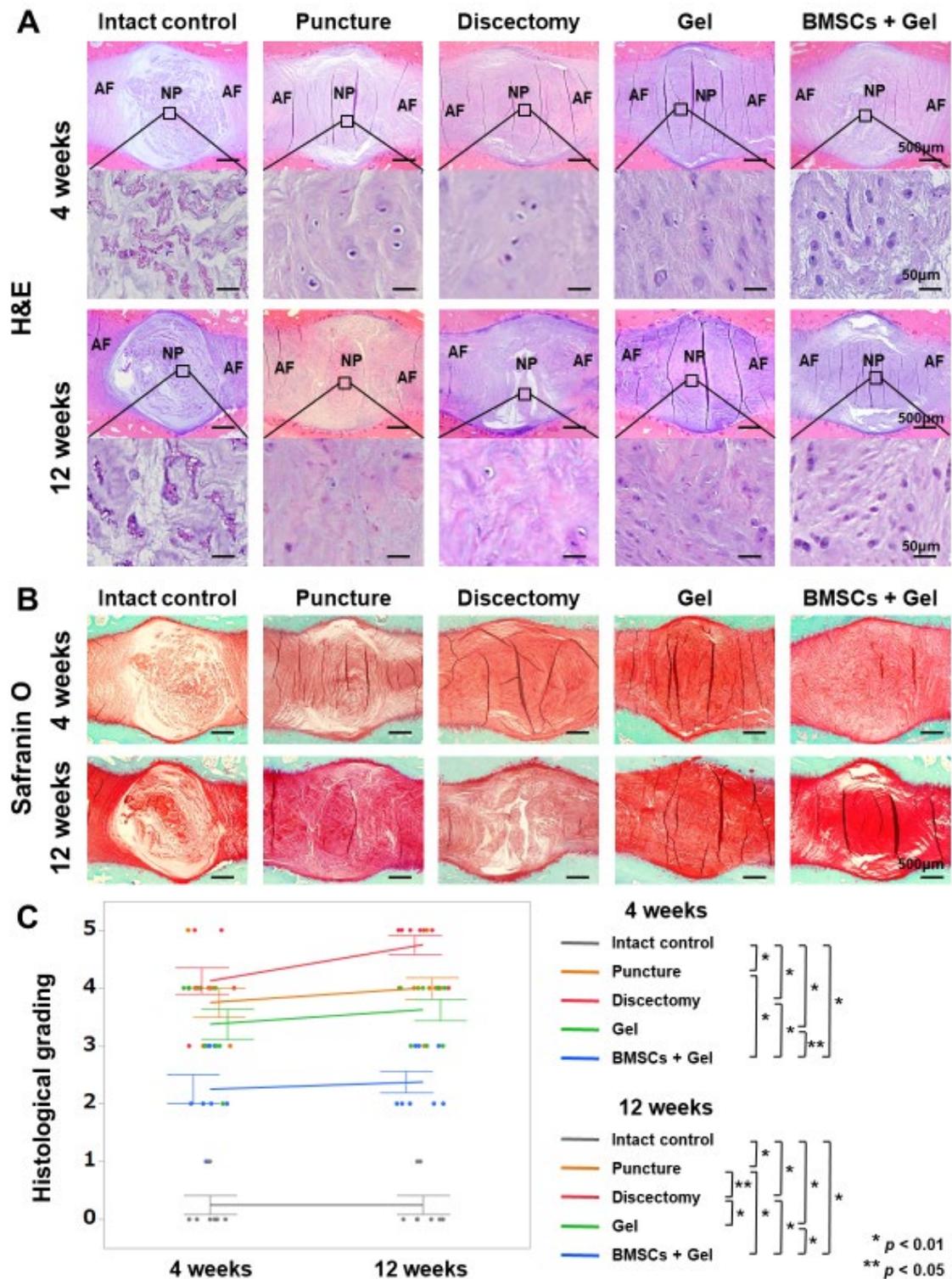


図10. ウサギ椎間板の組織学的評価. (A) 代表的H&E染色像. (B) 代表的Safranin O染色像. (C) 組織学的変性スコア.  $n = 8$ , 平均±標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

### 免疫組織化学的評価

埋植椎間板内部における細胞外基質の産生を評価する目的に、Type IおよびII collagenの産生を評価した。Type II collagenは椎間板の機能を維持する上で必須の基質であり、変性の進行に伴いType I collagenに置換される (Le Maitre et al., 2007)。埋植4週における抗Type II collagen抗体陽性細胞率について、コントロール群は、穿刺群、髓核摘出群、ゲル群、BMSCs+ゲル群と比較して有意に高値であった。ゲル群は、髓核摘出群と比較して有意に高値であり、BMSCs+ゲル群は、穿刺群、髓核摘出群と比較して有意に高値であった。埋植12週では、ゲル群は、穿刺群、髓核摘出群と比較して有意に高値であり、さらにBMSCs+ゲル群は、穿刺群、髓核摘出群、ゲル群と比較して有意に高値であった (図11A-B)。

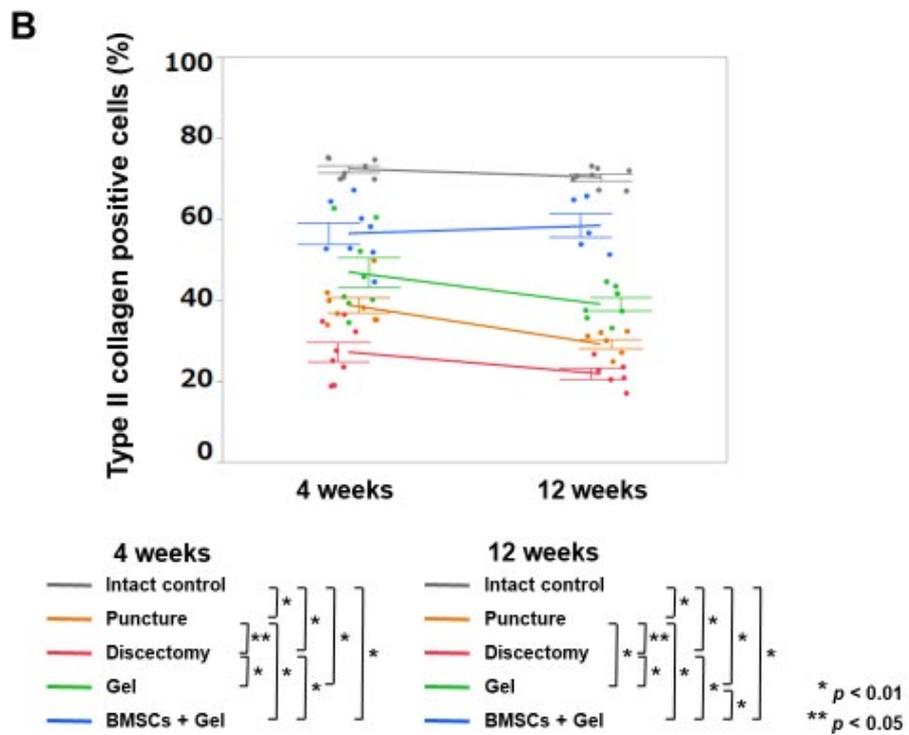
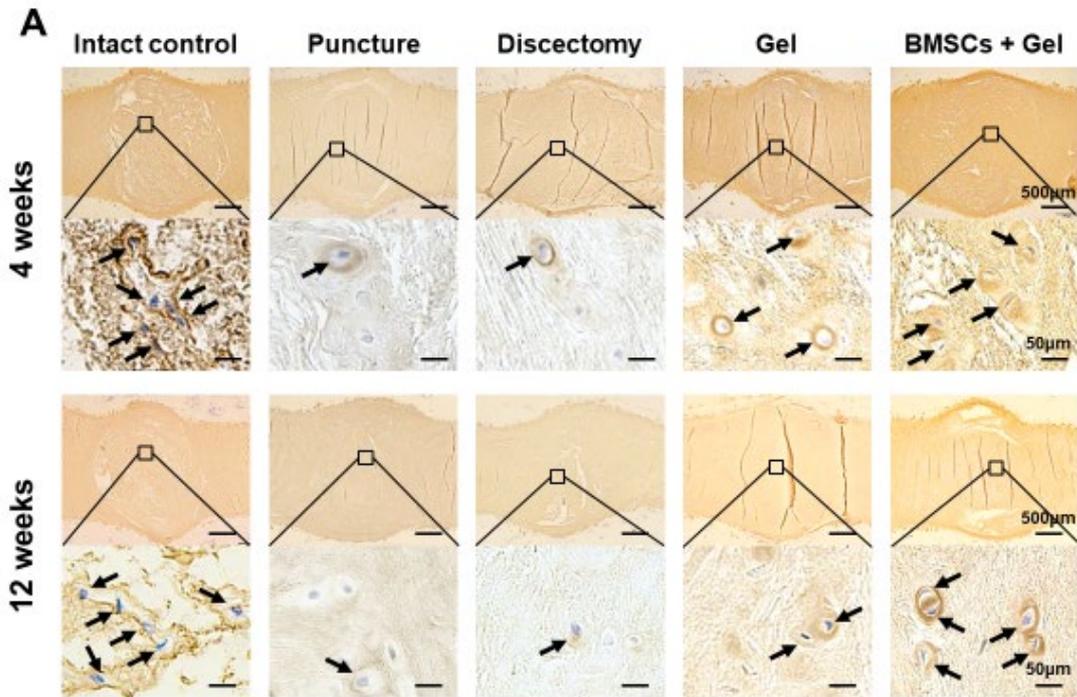


図11. ウサギ椎間板におけるType II collagen染色. (A) 代表的Type II collagen染色像. (B) Type II collagen陽性細胞率 (矢印; Type II collagen陽性細胞).  $n = 8$ , 平均±標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

埋植 4 週における抗 Type I collagen 抗体陽性細胞率について、コントロール群は、穿刺群、髓核摘出群、ゲル群、BMSCs+ゲル群と比較して有意に低値であった。ゲル群は、髓核摘出群と比較して有意に低値であった。BMSCs+ゲル群は穿刺群、髓核摘出群、ゲル群と比較して有意に低値であった。埋植 12 週においては、ゲル群は、穿刺群、髓核摘出群と比較して有意に低値であった。さらに BMSCs+ゲル群は穿刺群、髓核摘出群、ゲル群と比較して有意に低値であった (図 13A-B)。

なお、ヒト BMSCs 埋植に関して、免疫組織化学的評価において Type I/II collagen いずれにおいてもウサギ BMSCs と同等の結果で有意差はなかった (図 13C-F)。

以上の結果から、BMSCs の併用はゲル単独よりも細胞外基質産生を向上させて椎間板組織修復・再生効果をもたらすことが示唆された。

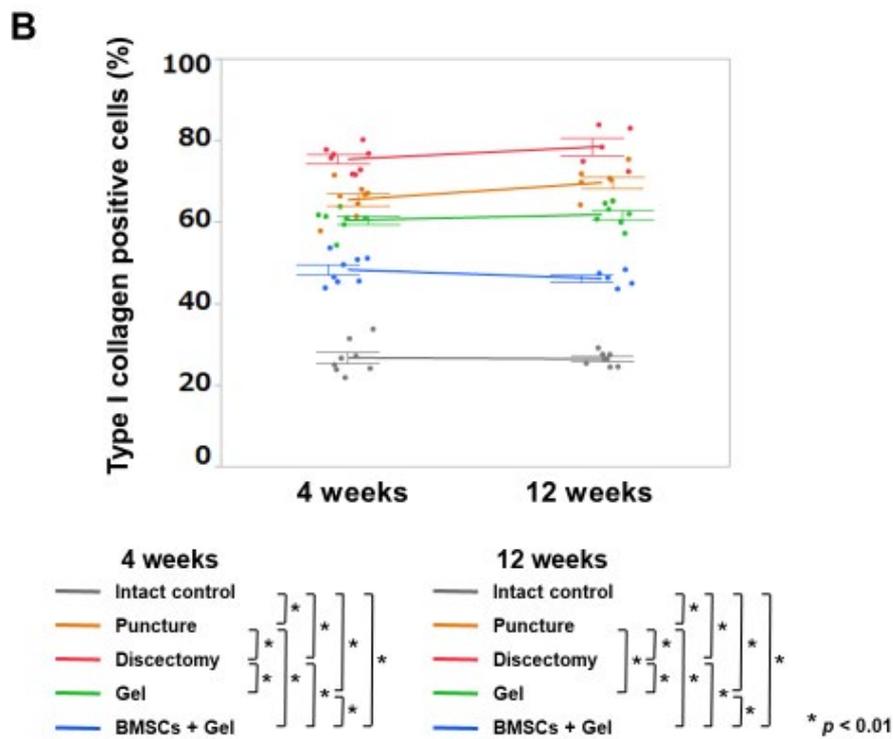
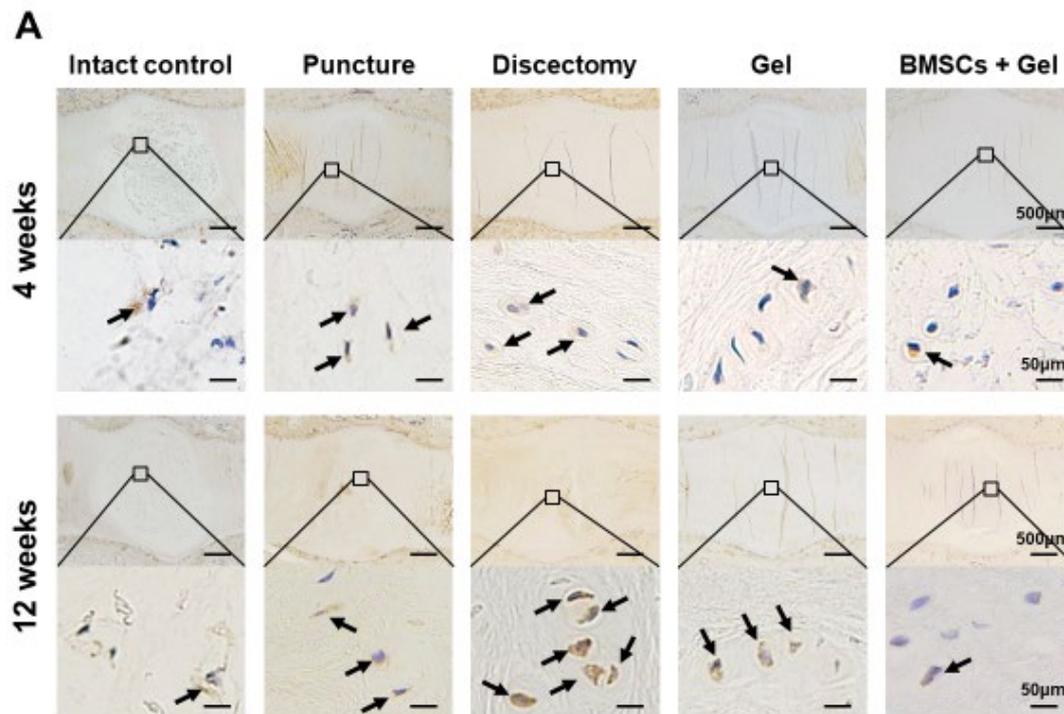


図12. ウサギ椎間板におけるType I collagen染色. (A) 代表的Type I collagen染色像. (B) Type I collagen陽性細胞率 (矢印; Type I collagen陽性細胞).  $n = 8$ , 平均±標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

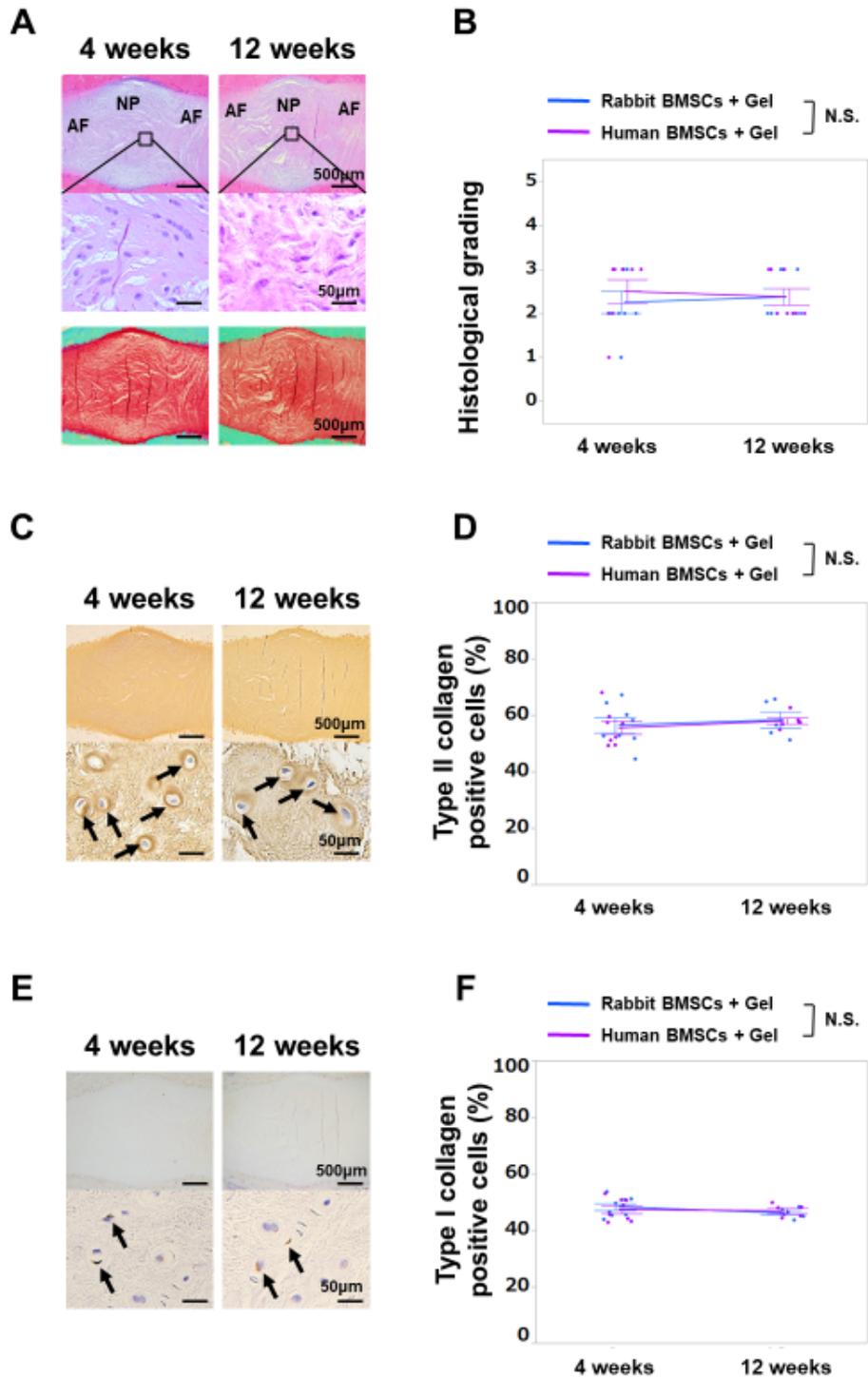


図13. ウサギ椎間板へのヒトBMSCs埋植. (A) 組織学的評価. H&E染色像とSafranin O染色像. (B) 組織学的変性スコア.  $n = 8$ , 平均±標準誤差. (C) Type II collagen染色像. (D) Type II collagen陽性細胞率 (矢印; Type II collagen陽性細胞).  $n = 8$ , 平均±標準誤差. (E) Type I collagen染色像. (F) Type I collagen陽性細胞率 (矢印; Type I collagen陽性細胞).  $n = 8$ , 平均±標準誤差.

### ***In vivo* における BMSCs の髄核細胞への分化**

最後に, *in vitro* と同様に, コントロール群, 髄核摘出群, BMSCs+ゲル群における HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1, Brachyury の発現を免疫染色により経時的に評価した (図 14A-C). コントロール群では, 全細胞 (DAPI 陽性細胞) における HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1, Brachyury 抗体陽性細胞率はいずれも 100%に近似していたのに対し, 髄核摘出群では 20%程度であった. BMSCs+ゲル群に関しては, HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1, Brachyury のいずれにおいても, day1, day7, day28 の全ての群間で有意差をもって経時的に上昇し, day28 での陽性細胞率は 80%程度であった (図 14D-F). さらに, BMSCs (CFDA-SE 陽性細胞) における HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1, Brachyury 抗体陽性細胞率も同様に, day1, day7, day28 の全ての群間で有意差をもって経時的に上昇し, day28 での陽性細胞率は 90%以上であった (図 14G-I).

以上の結果は, 椎間板内に埋植した BMSCs が髄核細胞へ分化したことを示唆している.

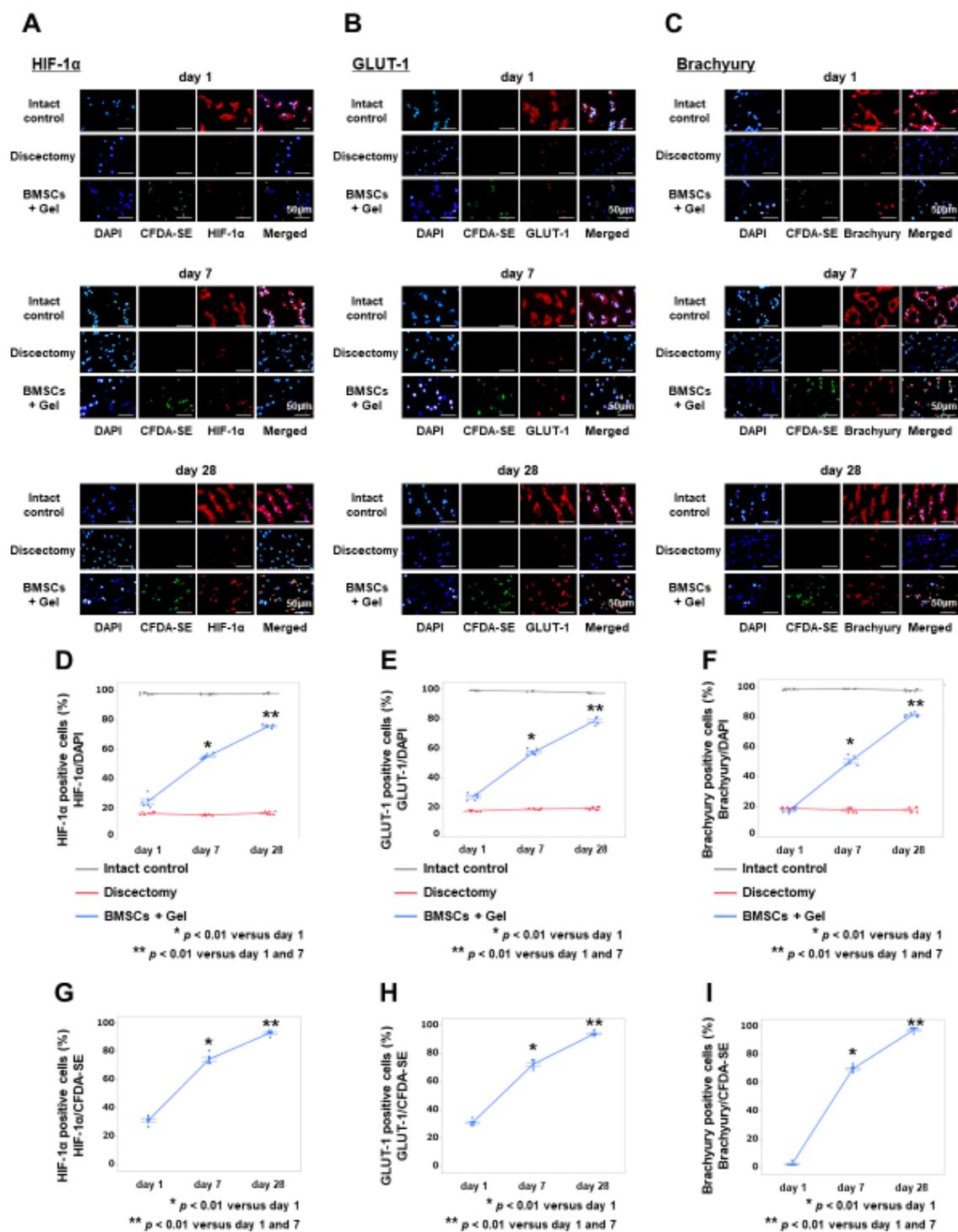


図 14. BMSCs 埋植 1 日, 7 日, 28 日後のウサギ椎間板の HIF-1 $\alpha$ , GLUT-1 および Brachyury 染色. (A-C) 代表的染色像. (D-F) CFDA-SE 陽性細胞における各種マーカー陽性細胞率. (G-I) DAPI 陽性細胞における各種マーカー陽性細胞率.  $n = 4$ , 平均士標準誤差, \*  $p < 0.01$  vs day1, \*\*  $p < 0.01$  vs day1 and 7.

## 考 察

生体内における椎間板の再生能力は著しく低く、例えば椎間板ヘルニアに対する髄核摘出術後の空隙は術後の変性進行の要因となる。我々はこれまでにアルギン酸を基盤とした硬化性ゲルを髄核摘出術後の組織修復材として開発したが (Tsujiimoto et al., 2018), 無細胞によるゲル単独投与では組織修復環境の最適化を主眼としているため、変性を来した自己修復力の乏しい中高年層の患者ではその効果に限界があると予想される。本研究では椎間板変性モデルを作製し、組織再生能を有する幹細胞を併用することで修復効果を上乘せさせる新規治療法の開発を目的とし、その効果とメカニズムに関して検証を行った。

組織学的評価ではゲル単独でも髄核摘出のみに比較して変性が有意に抑制されていたが、BMSCs との組み合わせでさらに変性が有意に抑制されていた。免疫組織化学的評価においても、ゲルと BMSCs の併用が椎間板の恒常性維持に欠かせない細胞外基質である Type II collagen の産生が有意に増加していた。髄核摘出を伴わない変性作製のみの穿刺群と比較して BMSCs 併用群において有意に増加していたことから、BMSCs 埋植により椎間板組織が再生したことが示唆された。

また本研究では、ゲルを用いた 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た。これらの結果から、1) 埋植した BMSCs からの細胞外基質と成長因子の産生により既存 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) 埋植した BMSCs の NPCs への分化、が椎間板再生メカニズムとして考えられた (図 15)。これらの一連のメカニズムは、NPCs と BMSCs の共培養が BMSCs の髄核様細胞への分化 (Risbud et al., 2004 ; Richardson et al., 2006 ; Strassburg et al., 2010), 成長因子産生による両細胞の相互賦活化 (Yamamoto et al., 2004 ; Strassburg et al., 2010 ; Yang et al., 2008), そして細胞外基質の産生促進 (Risbud et al., 2004 ; Naqvi and Buckley, 2015 ; Ouyang et al., 2017) を導くというこれまでの諸家の報告に一致している。さらに本研究では、埋植した BMSCs における髄核細胞マーカーの発現率の経時の上昇と、BMSCs 併用による細胞外基質の産生促進を *in vivo* 試験においても示した。髄核細胞マーカー発現の評価では、埋植した BMSCs が術後 7 日で半数以上が、術後 28 日ではほぼ全ての BMSCs において髄核細胞マーカーを発現しており、椎間板内での BMSCs の NPCs への分化が示唆され、加えて Type II collagen 陽性細胞率の結果から細胞外基質の産生が促進されていることが示されたことから、一連の椎間板再生のメカニズムを証明していると考えられる。

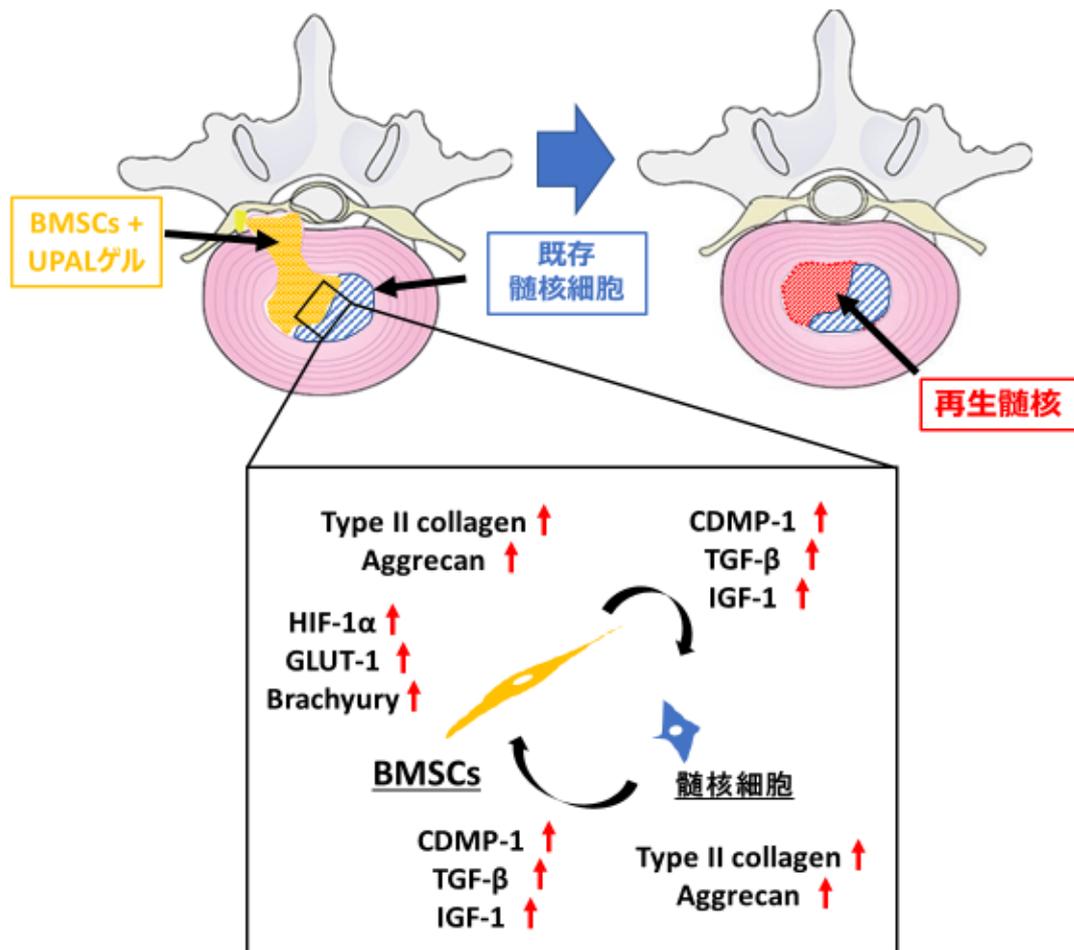


図 15. 硬化性ゲルと BMSCs による椎間板再生のメカニズム。

またこれまでは、椎間板内への幹細胞の単独導入においては投与経路からの細胞漏出と骨棘形成のリスクが問題とされており (Vadalà et al., 2012 ; Li et al., 2014 ; Naqvi and Buckley, 2015), そのためヘルニア摘出術後における細胞移植では細胞漏出を予防するために何らかの担体が求められている。本研究では BMSCs 併用群の全てにおいて細胞漏出がなく骨棘形成を認めなかった。これは硬化性ゲルの即時硬化性と力学的安定性に寄与するもので、細胞埋植の直後から漏出の予防が可能となることが示された。以上のことから細胞流出防止の観点からもゲルの併用が幹細胞導入の臨床応用に際して大きな利点となると考えられる。

本研究で示された椎間板再生効果はウサギ BMSCs とヒト BMSCs では差がなく、非拘束圧縮試験においてもウサギ BMSCs, ヒト BMSCs とともにゲル単独と同等の弾性率を示した。我々はこれまで、ヒトの日常生活動作で椎間板に負荷さ

れる荷重量を想定して静的試験（6 方向負荷，圧縮負荷）と動的試験（圧縮-伸展）を行い，髄核摘出後のゲル単独埋植によりゲルが椎間板外に逸脱しないことを証明しているが (Tsujiimoto et al., 2018)，本研究結果から BMSCs がゲルの力学的特性に変化を与えず，埋植後に逸脱しないことが示唆された。

本治療法の臨床応用においては，ゲル単独では組織修復効果が十分に発揮されない中高年期の患者が良い適応であると考えている．具体的には不安定性のない腰部脊柱管狭窄症に椎間板ヘルニアを合併した混合性腰部脊柱管狭窄症を想定している。

本研究の限界として，ウサギ椎間板を使用した，ヒトへの臨床応用を予定した場合，前臨床段階として大型動物を用いた試験が必要である．このため，現在，ヒト間葉系幹細胞をヒツジ椎間板に埋植する実験を実施している．また，本研究では BMSCs の濃度を  $10^6$  cell/mL しか検証していない．しかしながら，イヌ椎間板内に  $10^5$ ， $10^6$ ， $10^7$  cell/mL の細胞濃度で自家 BMSCs を移植した際に，組織構造や細胞外基質の観点から  $10^6$  cell/mL が最適であるという過去の報告に準拠し設定した(Hiyama et al., 2008 ; Serigano et al., 2010)．

第一章のまとめとして，本研究では，ウサギ変性椎間板に対する髄核摘出モデルを対象として BMSCs と硬化性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 への分化を誘導し，それらにより細胞外基質の産生が促進され組織再生が生じることを証明した．これらの知見から，混合性腰部脊柱管狭窄症を適応とした椎間板ヘルニア摘出術後の椎間板再生治療法としての臨床応用の可能性が示された。

## 第二章

### 変性椎間板における髄核摘出術後の骨髄濃縮液と高純度硬化性ゲルを 組み合わせた椎間板細胞治療の検討

#### 緒言

BMSCs を用いた椎間板細胞治療は、変性椎間板における組織修復を促進することで椎間板性腰痛に対して症状軽減や機能改善が認められ、臨床的意義が示されている (Orozco et al., 2011 ; Noriega et al., 2017). しかしながら米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration; FDA) に認可された BMSCs を用いた治療法は筋骨格系疾患において存在しない (Chu et al., 2019). 一方, BMAC は既に FDA に認可されており, 筋骨格系疾患においては変形性関節症 (Centeno et al., 2014), 軟骨損傷 (Gobbi et al., 2017), 骨折後偽関節 (Scaglione et al., 2014), 骨壊死 (Mishima et al., 2016), 軟部組織損傷 (Xing et al., 2016) に対する有用性が報告されている. BMAC は自家由来の細胞が利用でき, 一期的手術が可能となることに加え, 培養操作が不要であり簡便性と感染リスクの軽減, 低コストが可能となる (Gobbi et al., 2019). 椎間板に対しては, BMAC の椎間板内局所注射による椎間板性腰痛に対する有効性と安全性が報告されている (Pettine et al., 2015 ; Pettine et al., 2017)が, 椎間板ヘルニアに対しては細胞漏出の観点からも BMAC に併用する担体が必須となる (Li et al., 2014).

第二章では変性椎間板における髄核摘出後に対して, BMAC と硬化性ゲルの埋植が, ゲルの力学的特性を変化させることなく髄核摘出単独やゲル単独に比べて椎間板組織の再生を促進するという仮説のもと, 家兎椎間板変性モデルを用いて椎間板組織再生効果を明らかにし, 自家 BMSCs による効果と比較することを目的とした.

## 実験方法

### 【*In vivo* 試験】

#### ウサギ椎間板変性モデルの作製

実験 1 と同様に、20 週齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5 kg) を用いて椎間板変性モデルを作製した。塩酸ケタミン (10 mg/kg) と塩酸キシラジン (3 mg/kg) による静脈麻酔とセボフルランによる吸入麻酔を併用して処置を実施した。側臥位にて透視下に L2/3 および L4/5 椎間板線維輪を経皮的に 18 G 注射針により 5 mm の深度まで穿刺し、変性モデルを作製した (Sudo and Minami, 2011 ; Lei et al., 2017 ; Ura et al., 2019)。L3/4 椎間板は無処置の Intact control として使用した。

#### 骨髓液の採取と自家 BMSCs の作製

変性作製時に、腸骨稜から 18G 注射針を穿刺しへパリン 3000 単位を充填したシリンジ内に骨髓液を 20mL 採取した。培養液を添加し遠心分離 (4°C, 700g, 5 分間) を行い、単核細胞群を単離。実験 1 と同様の DMEM を培養液としてインキュベーター内で 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub> の条件下で培養し、2 継代した細胞を使用した。埋植する BMSCs の生存評価目的に、埋植する直前に 20μM CFDA-SE にて蛍光標識を行った (Wang et al., 2014 ; Polzer et al., 2012)。標識した細胞は 2% UPAL 水溶液に懸濁し、最終濃度を 1.0×10<sup>6</sup> cells/ml とした (Hiyama et al., 2008)。

#### 骨髓濃縮液の作製

穿刺 4 週後、髓核摘出と埋植に先立って、BioCUE Bone Marrow Aspiration Concentration System (ZIMMER BIOMET, Warsaw, IN, USA) を使用して BMAC を作製した。このシステムは専用のキットと遠心分離装置を使用して BMSCs を含む単核細胞群を 6-7 倍に濃縮する機能を有しており (Gaul et al., 2019 ; Polzer et al., 2012)、既に本邦の一部において臨床応用されている。変性作製時と同様の麻酔法にて腸骨稜に 18G 針を穿刺したのち、付属の Anticoagulant Citrate Dextrose Solution A (ACD-A) を 10mL 充填したシリンジに骨髓液を 20mL 採取し、凝固していないことを確認した後に専用のキットに充填した (図 16A)。遠心分離 (室温, 3200 rpm, 15 分間) 後に上清を除去し、1/10 の量に濃縮された 2mL の骨髓濃縮液を作製した (図 16B)。20μM CFDA-SE にて蛍光標識を行った後に (Wang et al., 2014 ; Polzer et al., 2012)、同量の 4% UPAL 水溶液と混合し一様となるように十分に懸濁した (図 16C)。また、上記混合液が塩化カルシウム水溶液にてゲル化することを確認した (図 16D)。

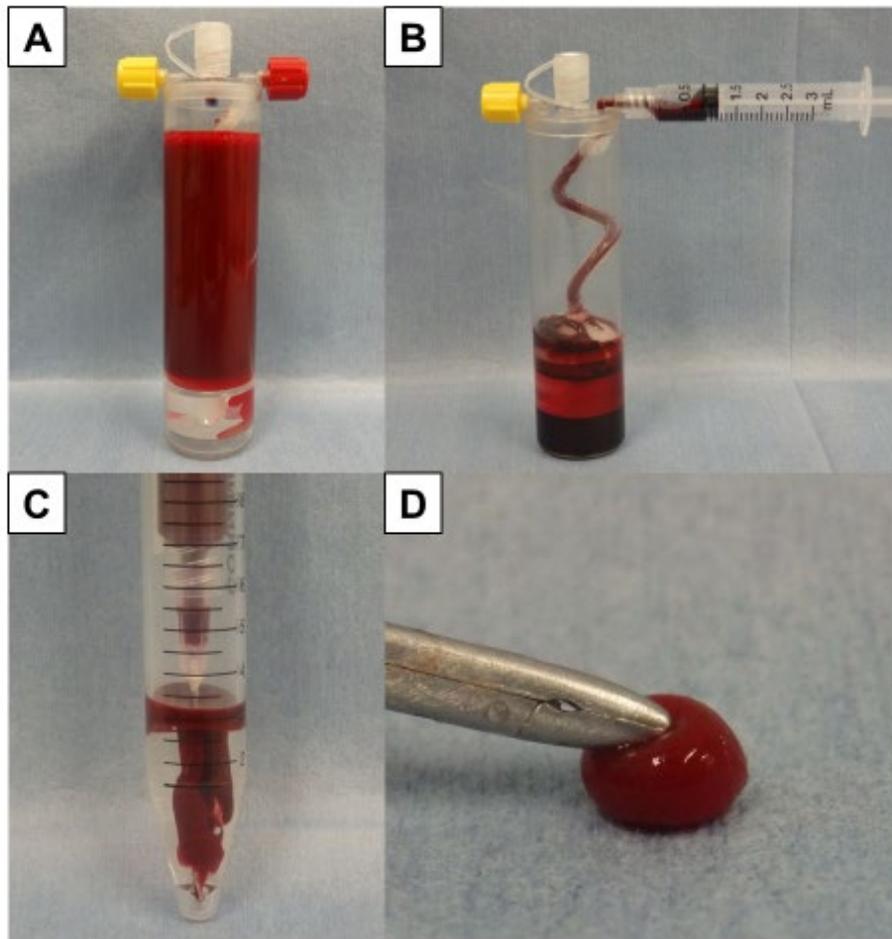


図 16. BMAC の作製. (A) BioCUE キットに骨髄液を充填. (B) 遠心分離後に骨髄濃縮液を獲得. (C) 同量の UPAL 水溶液と骨髄濃縮液の混合. (D) ゲル化の確認.

### 変性椎間板に対する髄核摘出と各種埋植

穿刺から4週後，変性作製時と同様の体位，麻酔法で処置を行った．経後腹膜アプローチにより展開して椎間板を露出後，変性したL2/3およびL4/5椎間板線維輪を18G注射針で穿刺し，刺入孔を作製した後に小型の髄核鉗子で髄核摘出を行った (Tsujiimoto et al., 2018)．27G注射針およびマイクロシリッジを使用して髄核摘出にて生じた空隙に無細胞のUPAL水溶液20  $\mu$ l，2%UPAL水溶液とBMSCsを混合した懸濁液20  $\mu$ lおよび4%UPAL水溶液とBMACを混合した混合液20  $\mu$ lを注入し，102 mM塩化カルシウム水溶液で表層をゲル化させ，5分後に生理食塩水で洗浄した．

実験群の設定として，無処置のコントロール群，変性椎間板に対し髄核摘出のみを行った髄核摘出群，髄核摘出後にゲルのみを単独で投与したゲル群，ゲルとBMSCsを併用したBMSCs+ゲル群，ゲルとBMACを併用したBMAC+ゲル

群に群分けした。

手術を施行したウサギは計40羽であり，8羽は埋植した細胞の生存評価に使用し，計24椎間板をコントロール群，BMSCs+ゲル群，BMAC+ゲル群の3群に分けて評価した（各n=4椎間板）．また32羽は椎間板変性の定量評価（MRI評価，組織学的評価，免疫組織化学的評価）に使用し，計80椎間板をコントロール群，髄核摘出群，ゲル群，BMSCs+ゲル群，BMAC+ゲル群の5群に分けて評価した（各n=8椎間板）．評価時期は埋植後4，12週で，ペントバルビタールの過量投与により安楽死させ腰椎を摘出した．

### 非拘束性圧縮試験による力学試験

上記にて作製した2%UPAL水溶液と自家BMSCsの懸濁液 ( $1.0 \times 10^6$  cells/ml)，4%UPAL水溶液とBMACとの混合液および無細胞の2%UPAL水溶液から直径4.5 mm，厚さ2 mmの3種類のゲルを作製し (Tsujiimoto et al., 2018)，非拘束性圧縮試験を実施した (図17)．同じく100 Nのロードセルを使用して0.5 mm/minの速度で歪み率95%まで圧縮し，得られた応力-ひずみ曲線から，歪み率10–20%間の直線を用いてヤング率を算出した (Iatridis et al., 1996 ; Zeng et al., 2015 ; Tsujiimoto et al., 2018)．

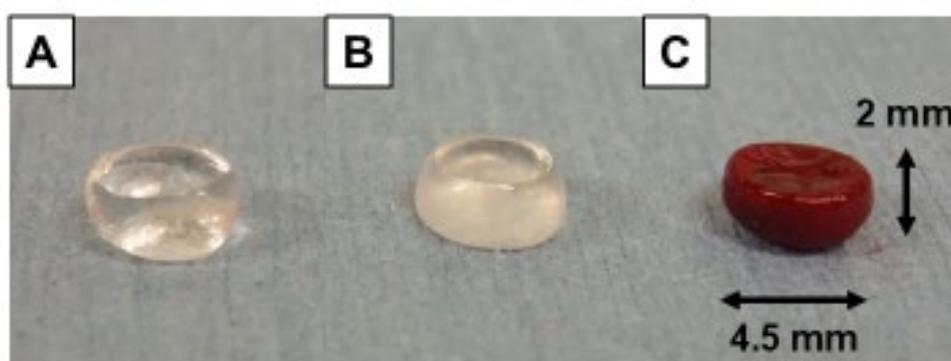


図17. (A) 無細胞のゲル. (B) BMSCs+ゲル. (C) BMAC+ゲル.

### 埋植した細胞の生存評価

摘出した腰椎から椎間板を取り出し10%ホルマリンで固定した．水平断5  $\mu$ m厚の凍結切片を作製し，DAPI染色を施した後に蛍光顕微鏡で観察した．

### MRI評価

椎間板変性を評価するため，7.0-Tesla MR scannerを用いてT2強調矢状断画像を撮像した．椎間板変性度を評価するため，Pfirrmann分類 (Pfirrmann et al., 2001) を用いてスコア化した．また，Analyze 14.0 softwareを用いて，MRI indexを測定し定量的に評価した．処置椎間板におけるMRI indexをコントロール群の

MRI indexに対する割合で評価した (Sudo and Minami, 2011 ; Tsujimoto et al., 2018 ; Ura et al., 2019).

### 椎間板の組織学的評価

MRI撮像後、椎間板を摘出し10%ホルマリンで固定した。10% EDTA (pH 7.5) で脱灰処理しパラフィンに包埋した。矢状断5  $\mu\text{m}$ 厚のパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、アルコール処理、水洗いした後、H&E染色、Safranin O染色を実施した。椎間板変性の重症度は、内側線維輪の構造破綻の程度で6段階 (0~5点) に分類した組織変性度を用いて評価した (Nishimura and Mochida, 1998 ; Sakai et al., 2006)。

### 免疫組織化学的評価

続いてType IおよびType II collagenの発現を評価するために免疫組織化学的評価を行った。一次抗体には抗Type I collagen抗体、抗Type II collagen抗体を使用し、Proteinase Kを使用して前処置を行った。PBS洗浄後、1%過酸化水素メタノール処理し一次抗体反応を行い、Envisionで処理し、DABにて発色後、hematoxylinを用いて後染色した。無作為に選択した5視野において、Type I collagen, Type II collagen陽性細胞数を計測した (Tsujimoto et al., 2018)。

### 統計分析

多群間比較においてはone-way ANOVAおよびTukey-Kramer's testを用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

## 実験結果

### 非拘束性圧縮試験による力学試験

直径4.5mm, 厚さ2 mmの各種ゲルを作製して非拘束性圧縮試験を行い, 力学特性を評価した (図18A). 歪み率10 - 20%におけるヤング率は, それぞれゲル単独で $15.9 \pm 2.2$  kPa, BMSCs+ゲルは $16.7 \pm 2.6$  kPa, BMAC+ゲルは $17.2 \pm 3.6$  kPaであり各群間で有意差はなく同等の力学的特性を示した (図18B). また, これらのヤング率はいずれもヒト髄核組織のそれと同等であった (Iatridis et al., 1996 ; Tsujimoto et al., 2018).

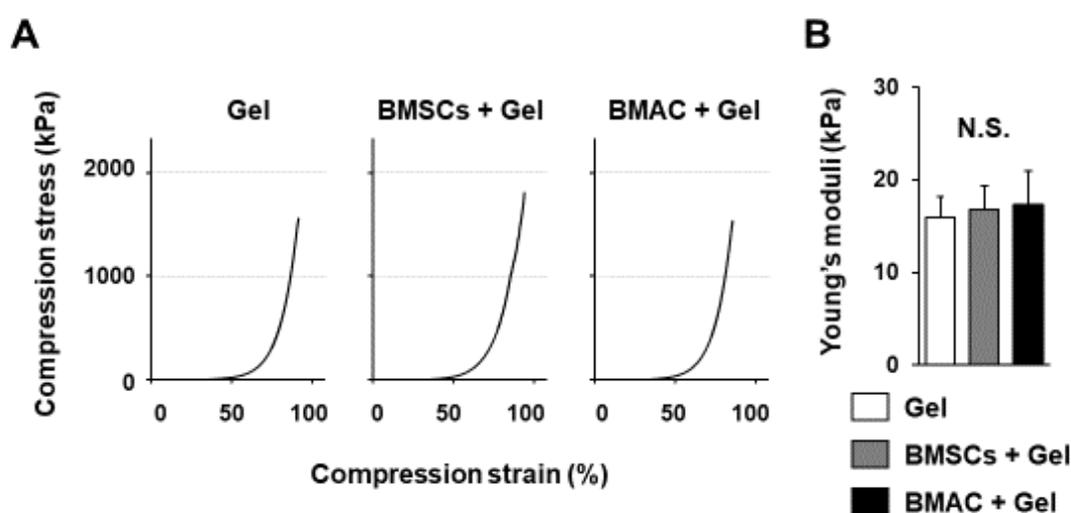


図18. 3種のゲルの非拘束性圧縮試験. (A) 応力-ひずみ曲線の歪み率10~20%の間の直線を用いてヤング率を算出. (B) ヤング率評価.  $n = 4$ , 平均±標準誤差, N.S.; no significance.

### 埋植椎間板における埋植細胞の生存

コントロール群, BMSCs+ゲル群, BMAC+ゲル群の3群における摘出椎間板に対してDAPI染色を施した凍結切片を作製し, 蛍光顕微鏡で観察した. その結果, 埋植後4週, 12週ともにDAPIの局在と一致するようにCFDA-SEの蛍光を認めた (図19). 以上から, BMSCs併用群, BMAC併用群のいずれにおいても埋植した細胞が埋植12週の時点において椎間板内で生存していたことが確認された.

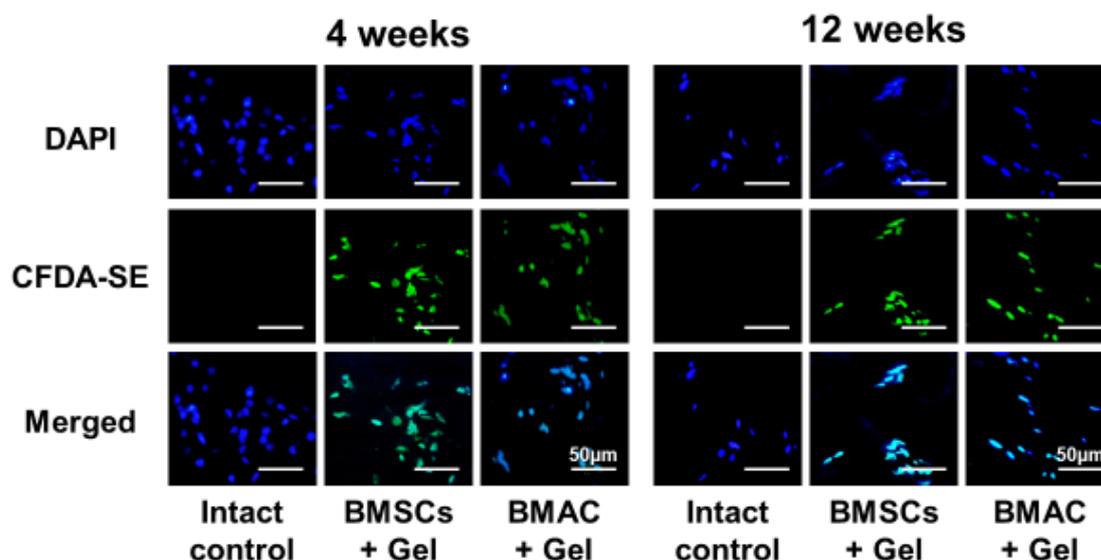


図 19. 埋植細胞の生存評価. 埋植前に CFDA-SE にて標識した細胞の蛍光を認め、DAPI の局在に一致.

## ゲルと BMAC の併用による椎間板組織再生効果

### MRI 評価

矢状断T2 強調像 (図20A) におけるウサギ椎間板の変性変化を評価した. Pfirrmann分類による変性評価では, コントロール群が埋植後4週, 12週ともにその他の4群と比較して有意にスコアが低値であった. また埋植後4週において, BMSCs+ゲル群, BMAC+ゲル群ともに髄核摘出群と比較して有意に低値であり, 12週ではゲル群が髄核摘出群と比較して有意に低値であった. BMSCs+ゲル群とBMAC+ゲル群は, ともに髄核摘出群, ゲル群と比較して有意に低値であった. BMSCs併用群, BMAC併用群の2群間に差はなかった (図20B) .

Relative MRI indexによる評価では, 埋植4週時, BMSCs+ゲル群は, 髄核摘出群と比較して有意に高値であった. 埋植12週においては, ゲル群が髄核摘出群と比較して有意に高値であり, BMSCs+ゲル群とBMAC+ゲル群ともに髄核摘出群, ゲル群と比較して有意に高値であった. またBMSCs併用群とBMAC併用群には差はなかった (図20C) .

以上の結果から, BMSCs併用とBMAC併用によりゲル単独よりさらに高い変性抑制効果が得られ, その効果は同等であることが示唆された.

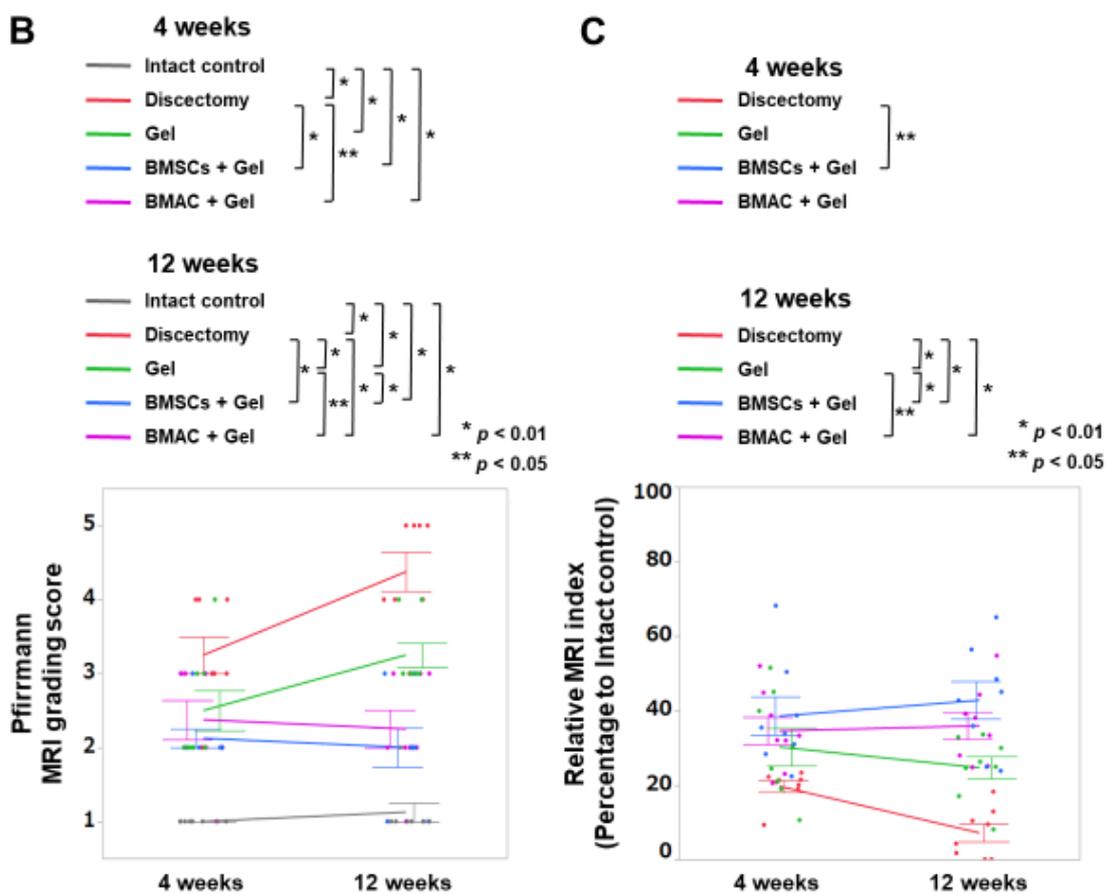
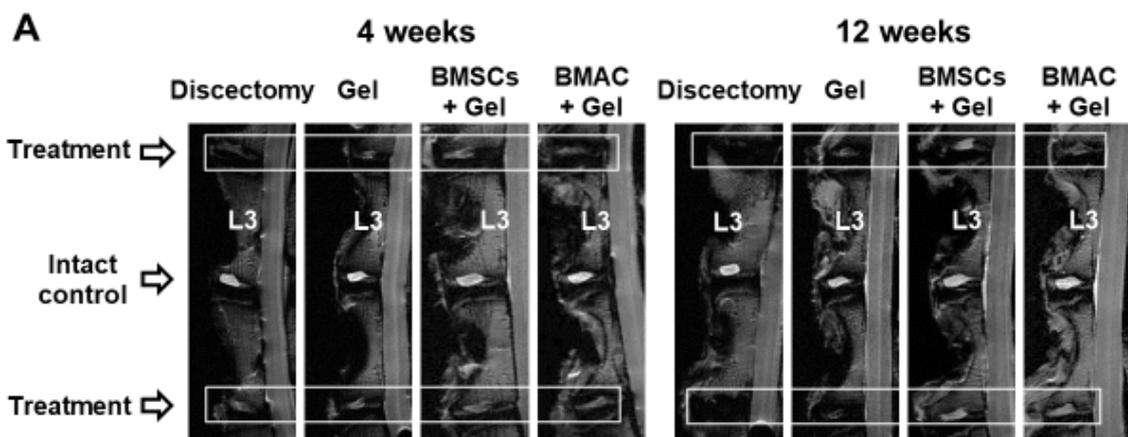


図20. MRIによる椎間板変性評価. (A) ウサギ椎間板における代表的T2強調矢状断画像. (B) Pfirrmann grading scoreによる評価.  $n = 8$ , 平均±標準誤差. (C) MRI index (髄核高信号領域の面積×平均信号強度)による評価. コントロール群に対する各群のMRI indexの比較.  $n = 8$ , 平均±標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

## 組織学的評価

コントロール群，髄核摘出群，ゲル群では，実験 1 と同様の所見が認められた．BMSCs+ゲル群，BMAC+ゲル群では，髄核摘出群，ゲル群と比較して相対的に内側線維輪の構造が保持されており，髄核組織の線維化も軽度であった．（図 21A-B）．組織学的変性スコアでは，埋植後 4 週，12 週ともに，コントロール群はその他の 4 群と比較して有意にスコアが低値であった．また埋植後 4 週では BMSCs+ゲル群は，髄核摘出群，ゲル群と比較してスコアが有意に低値であり，BMAC+ゲル群は髄核摘出群と比較して有意に低値だった．埋植後 12 週において，ゲル群は髄核摘出群と比較して有意にスコアが低値であり，さらに BMSCs+ゲル群，BMAC+ゲル群ともに髄核摘出群，ゲル群と比較して有意に低値であった．BMSCs+ゲル群と BMAC+ゲル群の 2 群間では埋植後 4 週，12 週ともに差はなかった（図 21C）．

以上の結果から，MRI の結果と同様に BMSCs 併用，BMAC 併用によりさらに高い椎間板再生効果が示され，両者の効果は同等であることも示された．

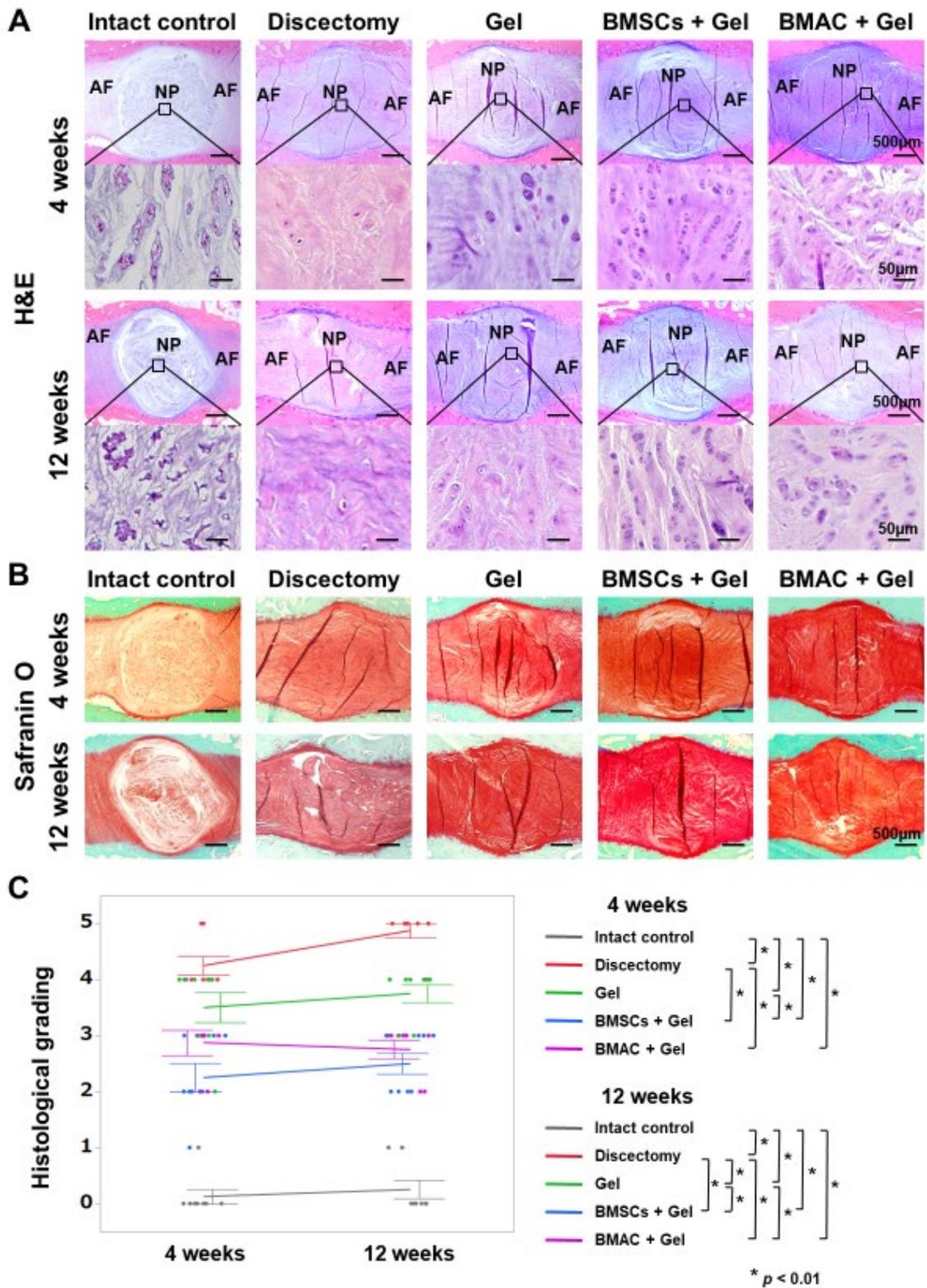


図21. ウサギ椎間板の組織学的評価. (A) 代表的H&E染色像. (B) 代表的Safranin O染色像. (C) 組織学的変性スコア.  $n = 8$ , 平均±標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

## 免疫組織化学的評価

Type II collagen陽性細胞率について，コントロール群は髓核摘出群，ゲル群，BMSCs+ゲル群，BMAC+ゲル群と比較して埋植後4週，12週ともに有意に高値であった．また4週時，ゲル群，BMSCs+ゲル群，BMAC+ゲル群は髓核摘出群と比較して有意に高値であり，さらにBMSCs+ゲル群はゲル群と比較して有意に高値であった．埋植後12週においては，ゲル群は髓核摘出群と比較して有意に高値であり，さらにBMSCs+ゲル群，BMAC+ゲル群ともに髓核摘出群，ゲル群と比較して有意に高値であった．またBMSCs併用群とBMAC併用群の2群間ではBMSCs併用群が有意に高値であった（図22）．

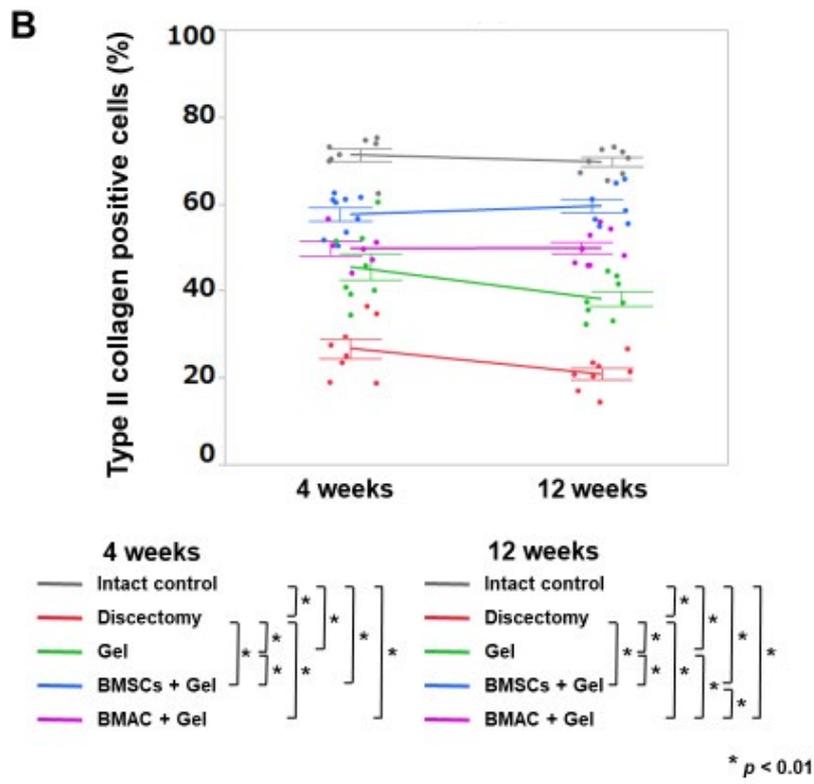
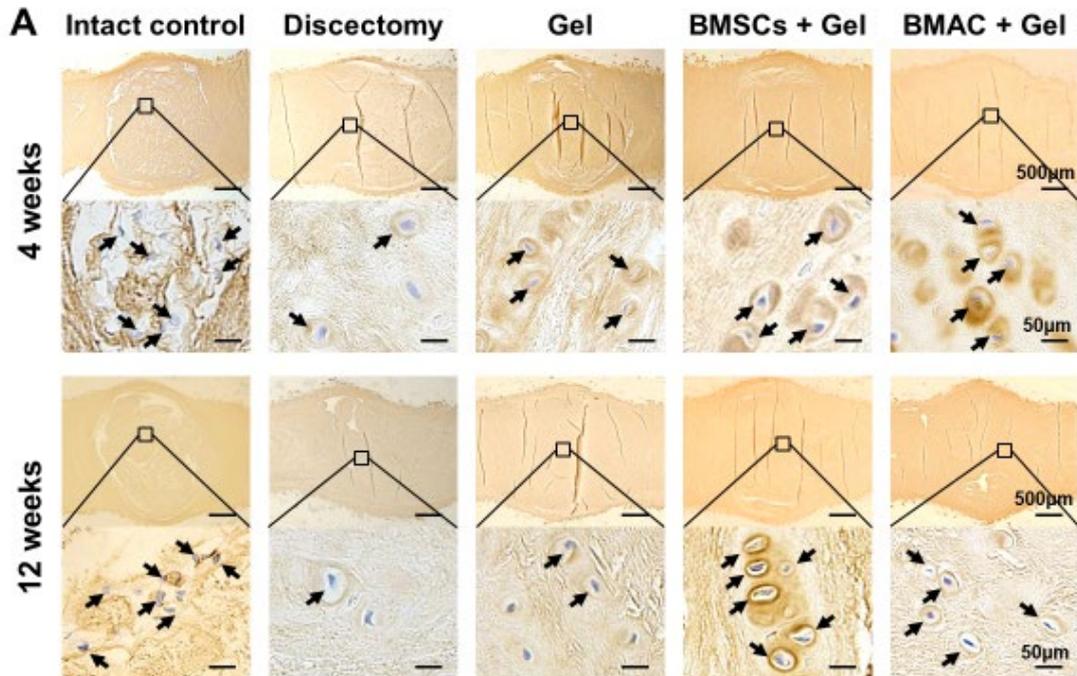


図22. ウサギ椎間板におけるType II collagen染色. (A) 代表的Type II collagen染色像. (B) Type II collagen陽性細胞率 (矢印; Type II collagen陽性細胞).  $n = 8$ , 平均±標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

Type I collagen 陽性細胞率については、コントロール群は他の4群と比較して埋植後4週、12週ともに有意に低値であった。また4週、12週ともにゲル群、BMSCs+ゲル群、BMAC+ゲル群は髄核摘出群と比較して有意に低値であり、さらにBMSCs+ゲル群、BMAC+ゲル群はゲル群と比較して有意に低値であった。なお、BMSCs併用群とBMAC併用群の2群間では4週時、12週時ともに差はなかった(図22)。

以上の結果から、BMSCs併用、BMAC併用ともにゲル単独よりも細胞外基質産生を向上させて椎間板組織修復・再生効果をもたらすことが示唆された。

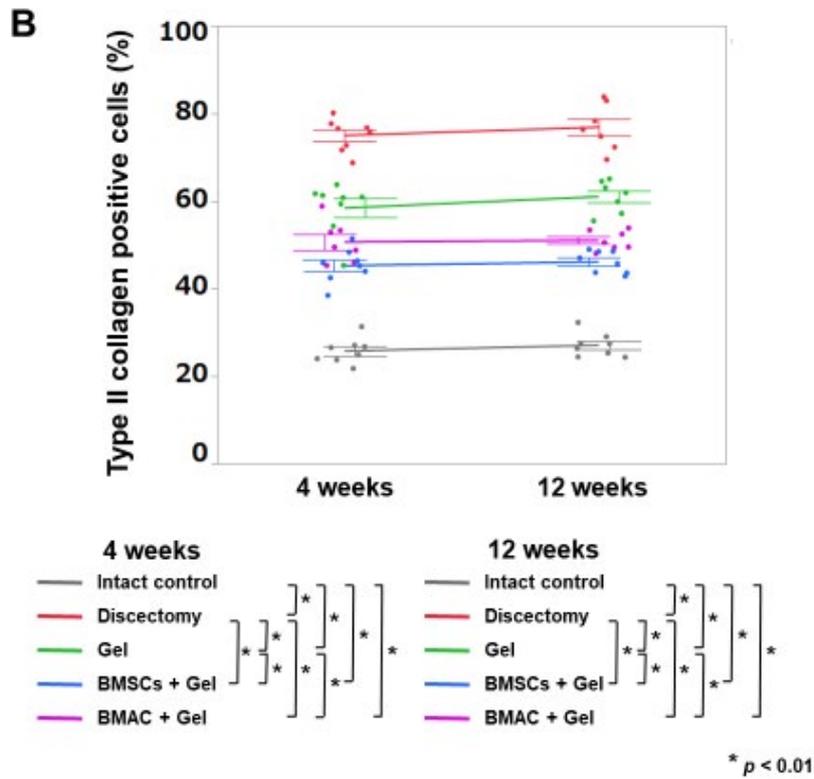
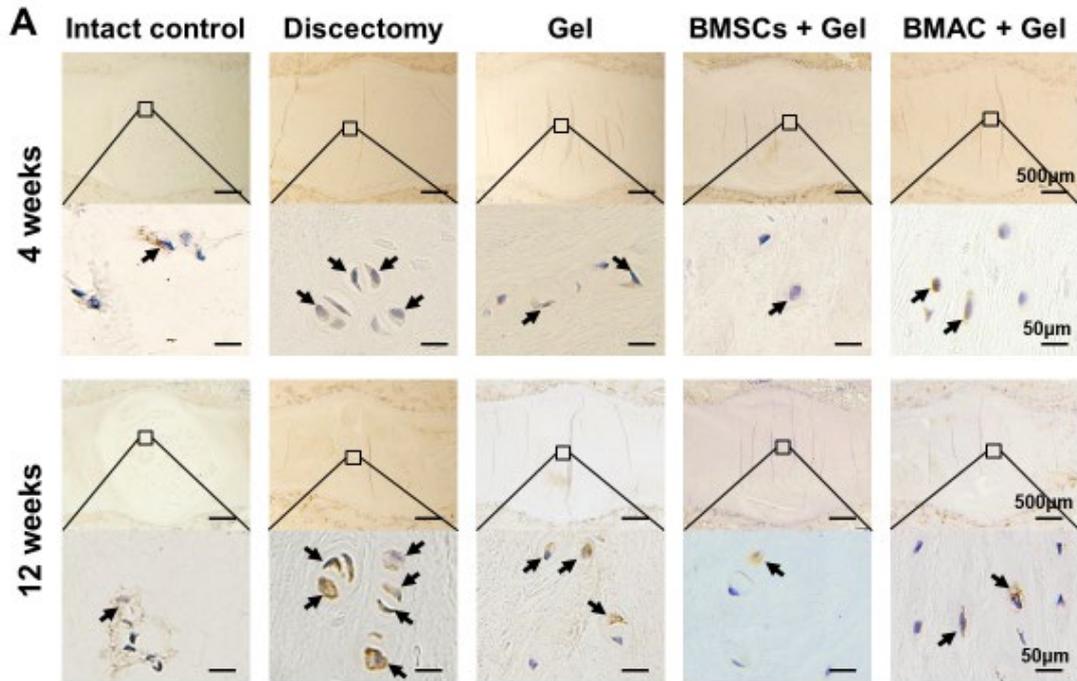


図23. ウサギ椎間板におけるType I collagen染色. (A) 代表的Type I collagen染色像. (B) Type I collagen陽性細胞率 (矢印; Type I collagen陽性細胞).  $n = 8$ , 平均±標準誤差, \*  $p < 0.01$ , \*\*  $p < 0.05$ .

## 考 察

本研究では家兎椎間板変性モデルに対する BMAC と硬化性ゲルの併用による椎間板組織修復効果をゲル単独や自家 BMSCs と比較しつつ検証を行った。MRI 評価と組織学的評価では、BMAC 併用がゲル単独、髄核摘出単独に比較して変性が有意に抑制されており、これらの結果から BMAC 併用が椎間板摘出術後の組織修復を促進させたことを示唆している。

我々はこれまで、ヒツジ屍体脊椎を用いて、椎間板摘出後の硬化性ゲル埋植が、術後逸脱することなく十分な力学的特性を保持していることを示している (Tsujiimoto et al., 2018)。本研究においては非拘束圧縮試験を行い、ゲル単独、BMSCs+ゲルおよび BMAC+ゲルの 3 群における弾性率が同等であることを示した。これらの結果から BMAC の併用がゲルの力学的特性に変化を及ぼさず、髄核摘出術後の埋植においても椎間板外へ逸脱しない可能性が示された。

現在、椎間板摘出術後に対する組織修復を目的とした治療法は存在しない。ウサギおよびヒツジの正常椎間板を用いた前臨床の実証試験では、椎間板摘出術後に対する硬化性ゲルの無細胞治療の安全性と組織修復効果を示した (Tsujiimoto et al., 2018)。さらに、第一章で述べた通り、家兎変性椎間板を対象に、同種他家 BMSCs と硬化性ゲルの併用による組織再生効果を報告した。本研究における MRI 評価と組織学的評価の結果から、ゲル単独および髄核摘出と比較して、BMAC と硬化性ゲルの併用が、変性椎間板における椎間板摘出術後の組織修復を有意に促進させることを示唆している。さらに椎間板機能に不可欠な細胞外基質の産生も有意に促進させ、Type I collagen の産生低下により変性進行を抑制したことを示唆している。

BMAC は様々な成長因子と細胞を含んでおり、その中でも BMSCs の割合は低く (Ha and Park, 2019)、また個体差が生じることが知られている (Shapiro et al., 2017)。培養で獲得される BMSCs と比較して BMAC に含まれる幹細胞や前駆細胞の割合は 0.001 % から 0.01 % と低いため、培養 BMSCs とは異なるものとするべきである (Ha and Park, 2019)。しかしながら、本研究では Type II collagen 産生効果は BMSCs 併用群が BMAC 併用群よりも高値ではあったが、MRI や組織学的評価からは、BMAC と BMSCs の併用効果は同等であることが示唆された。

これまでに、椎間板摘出術における BMAC の組織修復効果に関する研究は存在しない。また、米国における BMAC に対する薬事承認プロセスは市販前届に留められているため (510K)、BMAC に関する詳細な前臨床データおよび臨床データが集積されていない (Cavinatto et al., 2019)。BMAC による治療では細胞導入の不均一性および不正確性が生じるため、組織修復のメカニズムに関する更なる検証が期待される。

本研究の限界として、第一章と同様に、研究対象をウサギ椎間板における髄核摘出モデルとしているためヒトにおける術式を正確には表現していない。本研究では前外側からの進入で手術を実施したが、臨床における術式は後方からの進入であり異なる。しかしながら、ヒツジを対象とした以前の研究でも、今回の手術方法と同様に前外側からの進入で硬化性ゲルの椎間板組織修復効果を示しており、さらにヒツジの屍体脊椎においてはヒトと同様に後方進入で椎間板摘出とゲル埋植を行い、術後の逸脱なく十分な力学的特性を有することを示している (Tsujiimoto et al., 2018)。それゆえ本研究での知見はあくまで予備的なものであるが、ヒトを含めた大動物にも適応できるかもしれない。二つ目の限界としては、BMAC の詳細な組成、構成を特定していない点であり、再生メカニズムの詳細を解明する上でも今後の更なる研究が必要と考える。

第二章のまとめとして、硬化性ゲルと BMAC の併用による椎間板組織再生効果を家兎椎間板変性モデルを用いて検証した。ゲル単独および摘出のみと比較した場合、椎間板摘出術後における BMAC と硬化性ゲルの併用は組織修復を有意に促進させた。自家 BMSCs と BMAC における組織修復効果の比較では、Type II collagen 陽性細胞率のみ BMSCs が有意に高値であったが、MRI と組織学的評価では同等であった。培養 BMSCs の欠点とされる簡便性と低コストを実現可能にする BMAC に対する新規椎間板治療法が期待される。

## 結 論

- 高純度硬化性ゲルと BMSCs および BMAC の併用による椎間板組織再生効果を家兎椎間板変性モデルを用いて検証した.
- ゲル単独でも有意な組織修復効果を示したが, BMSCs や BMAC の併用によりさらに高い効果を示した.
- 同種他家 BMSCs とヒト BMSCs の効果は全評価項目において同等であった.
- BMSCs 併用群が穿刺群と比較して有意に良好な結果であったことから, 組織再生が導かれたことが示唆された.
- 自家 BMSCs と BMAC の効果は MRI と組織学的評価では同等であったが, Type II collagen 陽性細胞率のみ BMSCs が有意に高値であった.
- 椎間板再生のメカニズムを *in vitro*, *in vivo* 試験において証明した.
- 力学試験において BMSCs や BMAC を混合したゲルはゲル単独と同様の力学特性を示した.
- ゲルの併用により幹細胞の導入が可能となり, 治療対象となる患者層の拡大が可能となる.
- BMSCs とゲルの併用は, 混合性腰部脊柱管狭窄症におけるヘルニア摘出後の組織再生を目的とした椎間板細胞治療法として期待される.
- BMAC とゲルの併用は, 簡便性, 低コストという点において有利であり, 腰椎椎間板ヘルニアの術後組織再生を目的とした新規治療法となり得ることが期待される.
- 本研究ではウサギ変性椎間板における髄核摘出モデルを採用しており臨床における手術療法を正確に表現できていないため, 今後大型動物を対象とした検証が求められる.

## 謝 辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学教室岩崎倫政教授に深謝致します。

また本研究を行うにあたり、高純度硬化性ゲルのご提供並びに使用に関するご助言を頂いた持田製薬株式会社の皆様、力学特性試験に関してご指導を頂いた北海道大学大学院生命科学研究院先端融合科学研究部門ソフト&ウェットマター研究室の野々山貴行特任准教授に深く感謝申し上げます。

最後に、これまでの研究課程において直接のご指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院脊椎・脊髄先端医学分野の須藤英毅特任准教授をはじめ、整形外科学分野の諸先生方、研究に関わっていただいた皆様に心よりの感謝を申し上げます。

## 利益相反

本研究で使用した高純度硬化性ゲルと **BioCUE Bone Marrow Aspiration Concentration System** は持田製薬株式会社から提供を受けたものである。

## 引用文献

- Bailey, A., Araghi, A., Blumenthal, S., and Huffmon, G.V. (2013). Prospective, multicenter, randomized, controlled study of annular repair in lumbar discectomy: two-year follow-up. *Spine (Phila Pa 1976)*. *38*, 1161-1169.
- Barth, M., Weiss, C., and Thomé C. (2008). Two-year outcome after lumbar microdiscectomy versus microscopic sequestrectomy: part 1: evaluation of clinical outcome. *Spine (Phila Pa 1976)*. *33*, 265-272.
- Bradford, D.S., Cooper, K.M., and Oegema, T.R. Jr. (1983). Chymopapain, chemonucleolysis, and nucleus pulposus regeneration. *J. Bone Joint Surg. Am.* *65*, 1220-1231.
- Cavinatto, L., Hinckel, B.B., Tomlinson, R.E., Gupta, S., Farr, J., and Bartolozzi, A.R. (2019). The Role of Bone Marrow Aspirate Concentrate for the Treatment of Focal Chondral Lesions of the Knee: A Systematic Review and Critical Analysis of Animal and Clinical Studies. *Arthroscopy*. *35*, 1860-1877.
- Centeno, C., Pitts, J., Al-Sayegh, H., and Freeman, M. (2014). Efficacy of autologous bone marrow concentrate for knee osteoarthritis with and without adipose graft. *Biomed. Res. Int.* *2014*, 370621.
- Chu, C.R., Rodeo, S., Bhutani, N., Goodrich, L.R., Huard, J., Irrgang, J., LaPrade, R.F., Lattermann, C., Lu, Y., Mandelbaum, B., et al. (2019). Optimizing Clinical Use of Biologics in Orthopaedic Surgery: Consensus Recommendations From the 2018 AAOS/NIH U-13 Conference. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* *27*, e50-e63.
- Gaul, F., Bugbee, W.D., Hoenecke, H.R. Jr, and D'Lima, D.D. (2019). A Review of Commercially Available Point-of-Care Devices to Concentrate Bone Marrow for the Treatment of Osteoarthritis and Focal Cartilage Lesions. *Cartilage*. *10*, 387-394.
- Gobbi, A., Scotti, C., Karnatzikos, G., Mudhigere, A., Castro, M., and Peretti, G.M. (2017). One-step surgery with multipotent stem cells and Hyaluronan-based scaffold for the treatment of full-thickness chondral defects of the knee in patients older than 45 years. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* *25*, 2494-2501.

Gobbi, A., and Whyte, G.P. (2019). Long-term Clinical Outcomes of One-Stage Cartilage Repair in the Knee With Hyaluronic Acid-Based Scaffold Embedded With Mesenchymal Stem Cells Sourced From Bone Marrow Aspirate Concentrate. *Am. J. Sports Med.* 47, 1621-1628.

Ha, C.W. and Park, Y.B. (2019). Editorial Commentary: Considering Clinical Application of Bone Marrow Aspirate Concentrate for Restoration of Cartilage Defects in the Knee? Is It a Kind of Stem Cell Therapy? *Arthroscopy.* 35, 1878-1879.

Henriksson, H.B., Hagman, M., Horn, M., Lindahl, A., and Brisby, H. (2012). Investigation of different cell types and gel carriers for cell-based intervertebral disc therapy, in vitro and in vivo studies. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6, 738-747.

Hiyama, A., Mochida, J., Iwashina, T., Omi, H., Watanabe, T., Serigano, K., Tamura, F., and Sakai, D. (2008). Transplantation of mesenchymal stem cells in a canine disc degeneration model. *J. Orthop. Res.* 26, 589-600.

Iatridis, J.C., Weidenbaum, M., Setton, L.A., and Mow, V.C. (1996). Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976).* 21, 1174-1184.

Le Maitre, C.L., Pockert, A., Buttle, D.J., Freemont, A.J., and Hoyland, J.A. (2007). Matrix synthesis and degradation in human intervertebral disc degeneration. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 652-655.

Lei, T., Zhang, Y., Zhou, Q., Luo, X., Tang, K., Chen, R., Yu, C., and Quan, Z. (2017). A novel approach for the annulus needle puncture model of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Am. J. Transl. Res.* 9, 900-909.

Li, Y.Y., Diao, H.J., Chik, T.K., Chow, C.T., An, X.M., Leung, V., Cheung, K.M., and Chan, B.P. (2014). Delivering mesenchymal stem cells in collagen microsphere carriers to rabbit degenerative disc: reduced risk of osteophyte formation. *Tissue Eng. Part A.* 20, 1379-1391.

Lipson, S.J., and Muir, H. (1981). 1980 Volvo award in basic science. Proteoglycans in

experimental intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976)*. *6*, 194-210.

McGirt, M.J., Eustacchio, S., Varga, P., Vilendecic, M., Trummer, M., Gorenssek, M., Ledic, D., and Carragee, E.J. (2009). A prospective cohort study of close interval computed tomography and magnetic resonance imaging after primary lumbar discectomy: factors associated with recurrent disc herniation and disc height loss. *Spine (Phila Pa 1976)*. *34*, 2044-2051.

Mishima, H., Sugaya, H., Yoshioka, T., Aoto, K., Wada, H., Akaogi, H., and Ochiai, N. (2016). The safety and efficacy of combined autologous concentrated bone marrow grafting and low-intensity pulsed ultrasound in the treatment of osteonecrosis of the femoral head. *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* *26*, 293-298.

Naqvi, S.M., and Buckley, C.T. (2015). Differential response of encapsulated nucleus pulposus and bone marrow stem cells in isolation and coculture in alginate and chitosan hydrogels. *Tissue Eng. Part A.* *21*, 288-299.

Nishimura, K., and Mochida, J. (1998). Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus: an experimental study. *Spine (Phila Pa 1976)*. *23*, 1531-1538.

Noriega, D.C., Ardura, F., Hernández-Ramajo, R., Martín-Ferrero, M.Á., Sánchez-Lite, I., Toribio, B., Alberca, M., García, V., Moraleda, J.M., Sánchez, A., et al. (2017). Intervertebral Disc Repair by Allogeneic Mesenchymal Bone Marrow Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation.* *101*, 1945-1951.

Oehme, D., Ghosh, P., Shimmon, S., Wu, J., McDonald, C., Troupis, J.M., Goldschlager, T., Rosenfeld, J.V., and Jenkin, G. (2014). Mesenchymal progenitor cells combined with pentosan polysulfate mediating disc regeneration at the time of microdiscectomy: a preliminary study in an ovine model. *J Neurosurg. Spine.* *20*, 657-669.

Orozco, L., Soler, R., Morera, C., Alberca, M., Sánchez, A., and García-Sancho, J. (2011). Intervertebral disc repair by autologous mesenchymal bone marrow cells: a pilot study. *Transplantation.* *92*, 822-828.

Ouyang, A., Cerchiari, A.E., Tang, X., Liebenberg, E., Alliston, T., Gartner, Z.J., and

Lotz, J.C. (2017). Effects of cell type and configuration on anabolic and catabolic activity in 3D co-culture of mesenchymal stem cells and nucleus pulposus cells. *J. Orthop. Res.* 35, 61-73.

Pettine, K.A., Murphy, M.B., Suzuki, R.K., and Sand, T.T. (2015). Percutaneous injection of autologous bone marrow concentrate cells significantly reduces lumbar discogenic pain through 12 months. *Stem Cells.* 33, 146-156.

Pettine, K.A., Suzuki, R.K., Sand, T.T., and Murphy, M.B. (2017). Autologous bone marrow concentrate intradiscal injection for the treatment of degenerative disc disease with three-year follow-up. *Int. Orthop.* 41, 2097-2103.

Pfirrmann, C.W., Metzdorf, A., Zanetti, M., Hodler, J., and Boos, N. (2001). Magnetic resonance classification of lumbar intervertebral disc degeneration. *Spine (Phila Pa 1976).* 26, 1873-1878.

Polzer, H., Volkmer, E., Saller, M.M., Prall, W.C., Haasters, F., Drosse, I., Anz, D., Mutschler, W., and Schieker, M. (2012). Long-term detection of fluorescently labeled human mesenchymal stem cell in vitro and in vivo by semi-automated microscopy. *Tissue Eng. Part C Methods.* 18, 156-165.

Qian, J., Ge, J., Yan, Q., Wu, C., Yang, H., and Zou, J. (2019). Selection of the Optimal Puncture Needle for Induction of a Rat Intervertebral Disc Degeneration Model. *Pain Physician.* 22, 353-360.

Richardson, S.M., Walker, R.V., Parker, S., Rhodes, N.P., Hunt, J.A., Freemont, A.J., and Hoyland, J.A. (2006). Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells.* 24, 707-716.

Risbud, M.V., Schoepflin, Z.R., Mwale, F., Kandel, R.A., Grad, S., Iatridis, J.C., Sakai, D., and Hoyland, J.A. (2015). Defining the phenotype of young healthy nucleus pulposus cells: recommendations of the Spine Research Interest Group at the 2014 annual ORS meeting. *J. Orthop. Res.* 33, 283-293.

Sakai, D., Mochida, J., Yamamoto, Y., Nomura, T., Okuma, M., Nishimura, K., Nakai, T., Ando, K., and Hotta, T. (2006). Transplantation of mesenchymal stem cells

embedded in Atelocollagen gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials*. 24, 3531-3541.

Sato, M., Uchida, K., Nakajima, H., Miyazaki, T., Guerrero, A.R., Watanabe, S., Roberts, S., and Baba H. (2014). Direct transplantation of mesenchymal stem cells into the knee joints of Hartley strain guinea pigs with spontaneous osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.* 14, R31.

Scaglione, M., Fabbri, L., Dell'Omo, D., Gambini, F., and Guido, G. (2014). Long bone nonunions treated with autologous concentrated bone marrow-derived cells combined with dried bone allograft. *Musculoskelet. Surg.* 98, 101-106.

Serigano, K., Sakai, D., Hiyama, A., Tamura, F., Tanaka, M., and Mochida, J. (2010). Effect of cell number on mesenchymal stem cell transplantation in a canine disc degeneration model. *J. Orthop. Res.* 28, 1267-1275.

Shapiro, S.A., Kazmerchak, S.E., Heckman, M.G., Zubair, A.C., and O'Connor, M.I. (2017). A Prospective, Single-Blind, Placebo-Controlled Trial of Bone Marrow Aspirate Concentrate for Knee Osteoarthritis. *Am. J. Sports Med.* 45, 82-90.

Sobajima, S., Vadala, G., Shimer, A., Kim, J.S., Gilbertson, L.G., and Kang, J.D. (2008). Feasibility of a stem cell therapy for intervertebral disc degeneration. *Spine J.* 8, 888-896.

Strassburg, S., Richardson, S.M., Freemont, A.J., and Hoyland, J.A. (2010). Co-culture induces mesenchymal stem cell differentiation and modulation of the degenerate human nucleus pulposus cell phenotype. *Regen. Med.* 5, 701-711.

Sudo, H., and Minami, A. (2011). Caspase 3 as a therapeutic target for regulation of intervertebral disc degeneration in rabbits. *Arthritis Rheum.* 63, 1648-1657.

Tsujimoto, T., Sudo, H., Todoh, M., Yamada, K., Iwasaki, K., Ohnishi, T., Hirohama, N., Nonoyama, T., Ukeba, D., Ura, K., et al. (2018). An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: A preclinical proof-of-concept study. *EBioMedicine.* 37, 521-534.

- Ura, K., Sudo, H., Iwasaki, K., Tsujimoto, T., Ukeba, D., and Iwasaki, N. (2019). Effects of Intradiscal Injection of Local Anesthetics on Intervertebral Disc Degeneration in Rabbit Degenerated Intervertebral Disc. *J. Orthop. Res.* 37, 1963-1971.
- Vadalà, G., Sowa, G., Hubert, M., Gilbertson, L.G., Denaro, V., and Kang, J.D. (2012). Mesenchymal stem cells injection in degenerated intervertebral disc: cell leakage may induce osteophyte formation. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6, 348-355.
- Wang, H., Zhou, Y., Huang, B., Liu, L.T., Liu, M.H., Wang, J., Li, C.Q., Zhang, Z.F., Chu, T.W., and Xiong, C.J. (2014). Utilization of stem cells in alginate for nucleus pulposus tissue engineering. *Tissue Eng. Part A.* 20, 908-920.
- Xing, W., Mu, D., Wang, Q., Fu, S., Xin, M., and Luan, J. (2016). Improvement of Fat Graft Survival with Autologous Bone Marrow Aspirate and Bone Marrow Concentrate: A One-Step Method. *Plast. Reconstr. Surg.* 137, 676e-686e.
- Yamada, K., Sudo, H., Iwasaki, K., Sasaki, N., Higashi, H., Kameda, Y., Ito, M., Takahata, M., Abumi, K., Minami, A., et al. (2014). Caspase 3 silencing inhibits biomechanical overload-induced intervertebral disk degeneration. *Am. J. Pathol.* 184, 753-764.
- Yamamoto, Y., Mochida, J., Sakai, D., Nakai, T., Nishimura, K., Kawada, H., and Hotta, T. (2004). 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 (Phila Pa 1976).* 29, 1508-1514.
- Yang, S.H., Wu, C.C., Shih, T.T., Sun, Y.H., and Lin, F.H. (2008). In vitro study on interaction between human nucleus pulposus cells and mesenchymal stem cells through paracrine stimulation. *Spine (Phila Pa 1976).* 33, 1951-1957.
- Yoshikawa, T., Ueda, Y., Miyazaki, K., Koizumi, M., and Takakura, Y. (2010). Disc regeneration therapy using marrow mesenchymal cell transplantation: a report of two case studies. *Spine (Phila Pa 1976).* 35, E475-480.
- Zeng, Y., Chen, C., Liu, W., Fu, Q., Han, Z., Li, Y., Feng, S., Li, X., Qi, C., Wu, J., et al. (2015). Injectable microcryogels reinforced alginate encapsulation of mesenchymal

stromal cells for leak-proof delivery and alleviation of canine disc degeneration. *Biomaterials*. 59, 53-65.

Zhang, Y.G., Guo, X., Xu, P., Kang, L.L., and Li, J. (2005). Bone mesenchymal stem cells transplanted into rabbit intervertebral discs can increase proteoglycans. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 430, 219-226.