

論文の内容の要旨

論文題目「大動物椎間板変性モデルにおける凍結ヒト椎間板髄核細胞の移

植方法の検討」

学位申請者 平石 駿介

キーワード： 椎間板変性、細胞移植、椎間板髄核細胞、凍結保存、前培養

【背景】椎間板は、体幹を支持する脊椎の前方に位置し、その安定性の大部分を担っている。退行性変化とともに変性、変形が進行すると、椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄症を発症し疼痛や神経障害がみられる。また、椎間板変性は腰痛の原因にもなりうる。これらは日常生活に大きな支障を与え、多くの患者が整形外科を受診する。病態が進行した椎間板ヘルニアや腰部脊柱管狭窄症に対しての治療は行われているが、椎間板変性に対する確立された治療法は未だない。椎間板変性に対する治療の研究には様々なものが検討されているが、そのなかでも細胞移植療法は有効性が多くの研究で示唆されている。特に椎間板髄核細胞の移植は、これまでに動物実験やヒト臨床試験が行われ、椎間板の変性度を抑制する効果があることが明らかにされている。しかし、新鮮で活性の高いヒトの椎間板髄核細胞の入手は困難である。これまで解凍後の椎間板髄核細胞をイヌ椎間板変性モデルへ移植した研究もあるが、他細胞と同様に移植前の培養を前提としている。移植ドナー細胞の汎用性、コストを考えると解凍保存された細胞製品をそのまま移植する OTS (Off-the Shelf) 製剤で移植が可能となれば、製造や投与に関わる時間的制限に縛られず、コストの削減ができる。

【目的】本研究では、同種新鮮屍体ドナーから製造した OTS 製剤の安全性、有効性を大動物モデルで評価した。

【方法】確立されているイヌ椎間板変性モデルを用いて、解凍後に前培養した椎間板髄核細胞 (CUL 群)、解凍直後の椎間板髄核細胞 (OTS 群)、および生理食塩水 (Sham 群) を注入し、変性の経過を評価した。L6/7 には変性処置を行わず、対照群 (Control 群) とした。椎間板高指数 (Disc Height Index: DHI) を経時的に観察し、12 週後に磁気共鳴映像法 (MRI) と、組織学的評価を行った。組織学的評価は hematoxylin/eosin (HE) と Safranin-O、免疫蛍光染色を行った。また、イヌの椎間板における組織学的評価法である Bergknut scoring system を用いて数値化した。

【結果】椎間板変性の導入のため髄核吸引処置を行い、DHI は有意な低下を認めた。移植後の DHI は、OTS 群、CUL 群ともに Sham 群と比較し維持された。組織学的評価においても、OTS 群と CUL 群では Sham 群に比べて細胞外基質特性の有意な改善が認められ、Bergknut score にも有意差を認めた。免疫蛍光染色では、椎間板内に移植細胞の生存が全移植群で認められた。MRI は、移植後 12 週では有意な差は認めなかった。OTS-LOW 群は、DHI や Bergknut score で最も Control 群に近い値が認められた。OTS 群は前培養を行わなかったにもかかわらず、CUL 群と同等以上の有効性を示した。

【考察】過去に行われた研究でも、同じイヌモデルを使い、他種細胞の移植でも DHI の減少率を抑制もしくは阻止できることがわかっているが、椎間板高の回復までは認められなかった。一方、本研究の OTS-LOW 群では DHI の改善傾向が認められ、12 週目で Sham 対照群に比べて有意に高く、OTS-LOW 群による椎間板の回復傾向を示唆している。CUL-LOW 群意外に、OTS-HIGH 群、CUL-HIGH 群にても、椎間板高の安定化が 8 週目程でみられており、変性の進行を止められたと考えられる。組織学的所見においても DHI の変化と同様の傾向が確認された。変性導入の確認は、Bergknut score も用いた。一方で、OTS 群、CUL 群とともに Bergknut score の改善がみられ、椎間板髄核細胞移植による結果、健全な髄核組織の特性が維持されたと考えられた。そして、上記 4 群では HLA 陽性細胞が確認され、移植細胞集団の一部が変性椎間板の中で生存する能力を有したと考えられた。全体として、解凍

後の椎間板髄核細胞移植は、組織学的にも椎間板変性を抑止する能力を有すると考えられた。しかし、CUL-LOW 群では他の 3 群と比較して、Bergknut score は高値であり、もっとも信頼性の高い組織学的評価においては、有効な効果をえるには細胞数が不十分であった可能性が考えられた。また、OTS-HIGH 群および CUL-HIGH 群では、それぞれ 1 例で Sham 群の平均値に近い値を認めた。一方、OTS-LOW 群では、椎間板髄核の組織特性と Safranin-O 染色のいずれも維持された。

細胞移植の実用化において凍結保存技術は非常に重要であり、その効果についてはこれまでも多くの研究がなされている。凍結保存が MSC および HSC に及ぼす影響として、細胞の生存率および生物活性に関する影響は軽微であることが示されている。たとえば、脂肪組織に由来する MSC の凍結保存は、形態、増殖率、核型、またはマーカー発現に影響するが、刺激に対する反応性や分化能には影響しない。また、Tanaka らの研究は、凍結保存された椎間板髄核細胞は *in vitro* での共培養後の細胞外基質産生能や増殖率が非凍結のものと同等であることを示している。さらに Nukaga らは、凍結保存後に再活性化された椎間板髄核細胞をイヌ椎間板変性モデルに移植した結果、同様の椎間板再生効果が得られたことを報告している。いずれの研究も、椎間板髄核細胞が冷凍保存後も細胞活性を維持することを示しているが、凍結保存後に細胞活性を促進するために再活性化用の共培養系を使用している。本研究では、OTS 群は、2 週間の前培養を行った理想的と考えられる状態の細胞をしのぐ有効性を示した。過去の研究に一致して、凍結保存が細胞能力に与える影響は限定的であることを追認するものと考えられる。

OTS 群が CUL 群より優れていた理由として、培養期間の短縮が挙げられる。培養の長期化により椎間板髄核細胞の特性に変化が生じることは、これまでもさまざまな研究で指摘されている。そして、培地に液性因子が補充されていないことがそれを助長している。細胞特性を維持するには、その細胞の従来のニッチ環境を分析し、培地成分を調整する必要があるが、椎間板髄核細胞においてはそのような培地は確立されていない。椎間板髄核細胞の細胞群内に幹細胞や前駆細胞表現型の細胞がいることは指摘されており、それらの細胞の成熟や cell senescence によって移植時の結果に大きな変化をもたらしたと考えられる。しかし、仮に、増殖因子を追加補充したとしても生産コストが上昇し、培養時間を要するため細胞移植の行程に課題が生まれる。したがって、椎間板髄核細胞において OTS 製剤を細胞移植に直接使用することは、椎間板変性に対する有効な手段と考えられる。

最後に、移植細胞の細胞密度が効力を発揮するための重要な因子となることが報告されている。Serigano らによって、細胞数が多すぎても少なすぎても再生効果が限定されてしまうことが示されている。椎間板は無血管組織であるため、酸素および栄養素の供給に制限がある。細胞集団を追加導入すれば栄養素の需要がさらに増加し、移植細胞および自己細胞の細胞活性や生存性が限定される可能性がある。本研究では、いずれの細胞密度でも DHI 減少率が遅延された。DHI 維持に関しては LOW 群が最も有効と思われるが、組織学的所見では、OTS-LOW 群が CUL-LOW 群よりも有意に変性を抑制したと考えられた。

また、椎間板髄核細胞移植により全身性の有害事象は生じなかった。椎間板髄核細胞移植は、変性の進行を抑制し組織学的特性を維持させた。特に、椎間板髄核細胞の OTS 製剤の低用量直接移植は、DHI 減少に有意な抑制効果を示し、変性していない椎間板と同等の組織学的評価スコアを達成した。

【結論】 OTS 製剤から解凍させたヒト椎間板髄核細胞をイヌ椎間板変性モデルに移植し、椎間板高の狭小化の抑制や、生体組織の細胞外基質特性の維持などが示された。椎間板髄核細胞の OTS 製剤において、解凍後に前培養を用いない細胞移植法の安全性と有用性が大動物の椎間板変性モデルにて確認された。