

PII-42

GFP キメララットを用いた椎間板の変性過程における骨髄由来細胞の動態解析

澤村 和秀¹, 池田 巧¹, 岡本 慎一¹, 長江 将輝³, 三上 靖夫¹,
長谷 齊¹, 梶川 佳照¹, 松田 賢一², 河田 光博³, 久保 俊一¹

¹京都府立医大大学院運動器機能再生外科学(整形外科),

²京都府立医大大学院生体構造科学, ³京都第一赤十字病院

椎間板は変性の進行に伴い、構成細胞や組織構造が変化しますが、その病態は不明な部分が多い。本研究では、移植した骨髄由来細胞の追跡が可能な GFP 骨髄キメララットを用いて、椎間板変性過程における骨髄由来細胞の動態を検討した。

ガンマ線照射により骨髄抑制した Sprague Dawley ラットに Green fluorescent protein 遺伝子導入ラット (GFP ラット) から骨髄細胞を移植し、骨髄キメララットを作製した (15 匹)。この手法により、骨髄細胞のみが GFP 発現することができた。骨髄キメララットの腰椎椎間板 (L2/3、L4/5) を 27G 針で穿刺し、穿刺後 2、4、8、12、24 週の時点で腰椎椎間板複合体を摘出した (椎間板穿刺群)。H-E 染色で椎間板の構成細胞と組織構造を観察し、共焦点レーザー顕微鏡で GFP 陽性骨髄由来細胞を同定した。コラーゲン産生細胞の評価のため、HSP47 の免疫染色を実施した。対照は無処置の骨髄キメララットの腰椎椎間板とした (無処置群)。

椎間板穿刺群では、経時的に髓核細胞は減少し、線維輪の層状構造は破綻した。穿刺後 4 週から髓核に軟骨様細胞が出現した。GFP 陽性骨髄由来細胞は穿刺後 2 週から骨髄および穿刺部の前縦靱帯周囲に出現し、穿刺後 4 週から終板と内層線維輪の血管周囲に出現したが、穿刺後 24 週にわたり髓核内に GFP 信号を認めなかった。骨髄由来細胞は有核細胞で、HSP47 陽性であった。無処置群では H-E 染色で椎間板の変性を認めず、骨髄には多数の GFP 陽性骨髄由来細胞を認めたが、終板と内層線維輪の血管周囲には GFP 陽性骨髄由来細胞をほとんど認めなかった。

椎間板を穿刺することで、経時的に椎間板変性が進行したが、骨髄由来細胞は椎間板変性のシグナルにตอบสนองし、椎間板内の血管周囲に遊走したと考えられた。椎間板変性に伴い出現する軟骨様細胞の起源は骨髄由来細胞である可能性は低く、椎間板再生プロセスに対する細胞動態が明らかとなった。

PII-43

多血小板血漿を用いた椎間板再生に関する MRI・組織細胞化学研究

澤村 和秀¹, 池田 巧¹, 長江 将輝⁴, 三上 靖夫¹, 長谷 齊¹,
岡本 慎一¹, 生駒 和也¹, 山田 哲也¹, 松田 賢一³, 田畑 泰彦²,
河田 光博³, 久保 俊一¹

¹京都府立医大大学院運動器機能再生外科学(整形外科),

²京大再生医科学研究所生体組織工学研究部門生体材料学分野, ³京都府立医大大学院生体構造科学, ⁴京都第一赤十字病院整形外科

血小板は多くの成長因子を含むため、自家多血小板血漿 (platelet-rich plasma : PRP) を変性椎間板内に注入し、内因性の成長因子を髓核内に徐放化させた際の椎間板変性の抑制効果、およびその効果機序について解析した。

日本白色家兔の髓核を一部吸引後、2 週間飼育し、均一な椎間板変性モデルを作製した (108 羽)。これらを PRP 粒子群、PBS 粒子群、PRP 単独群、および SHAM 群の 4 群に分別し (各 27 羽)、PRP 粒子群では、自家 PRP をドラッグデリバリーシステムであるゼラチンハイドロゲル粒子 (粒子) に含浸させ、髓核内に注入した。注入後 2、4、8 週の時点で椎間板組織を摘出し、MR 画像による椎間板変性度の解析、real-time PCR 法による髓核細胞外基質の遺伝子発現量の評価、抗 PCNA 抗体を用いた免疫染色による増殖細胞の同定、および TUNEL 染色によるアポトーシスの評価を施行した。

PRP 粒子群の MR 画像では、椎間板変性の進行が他の群と比べ注入後 8 週にわたり遅かった。PRP 粒子群における proteoglycan core protein と type II collagen の遺伝子発現量は他の群と比較して、注入後 2 週の時点で有意に高値であった。全群で骨髄および穿刺した前縦靱帯周囲には多数の PCNA 陽性細胞を認めたが、髓核および線維輪内層では PCNA 陽性細胞を認めなかった。PRP 粒子群における髓核細胞の総数に対する TUNEL 陽性細胞の総数の割合は、注入後 2 週の時点で他の群と比べ有意に低値であった。

PRP と粒子を組み合わせる椎間板内に注入することにより、徐放化された内因性の成長因子が髓核細胞に作用し、アポトーシスが抑制され、proteoglycan と type II collagen の合成が促進した結果、椎間板変性の進行が抑制されたと考えた。本システムを用いることにより、椎間板再生に対する有用性が組織細胞化学、MR などで認められ、今後の応用に基礎データを提供した。