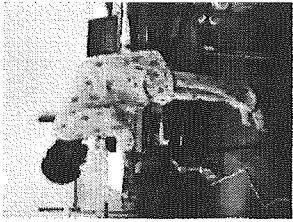
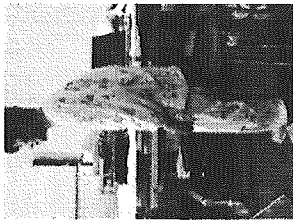
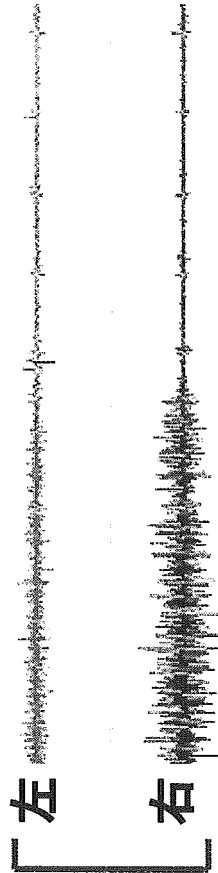


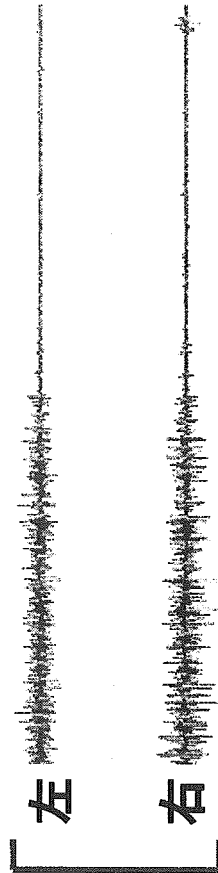
安静立位 継続



上位腰椎
(L1/2)



下位腰椎
(L4/5)

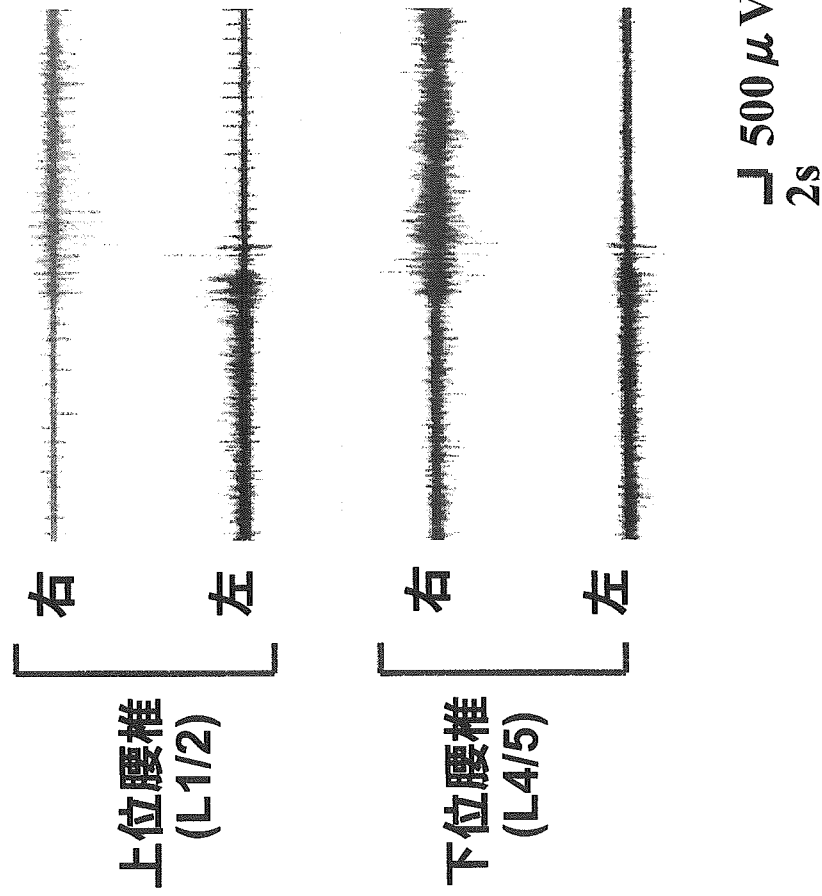


500 μ V
1s

立位での筋放電は、寄りかかると筋の安静が得られた。

安静立位 片手に杖を使用

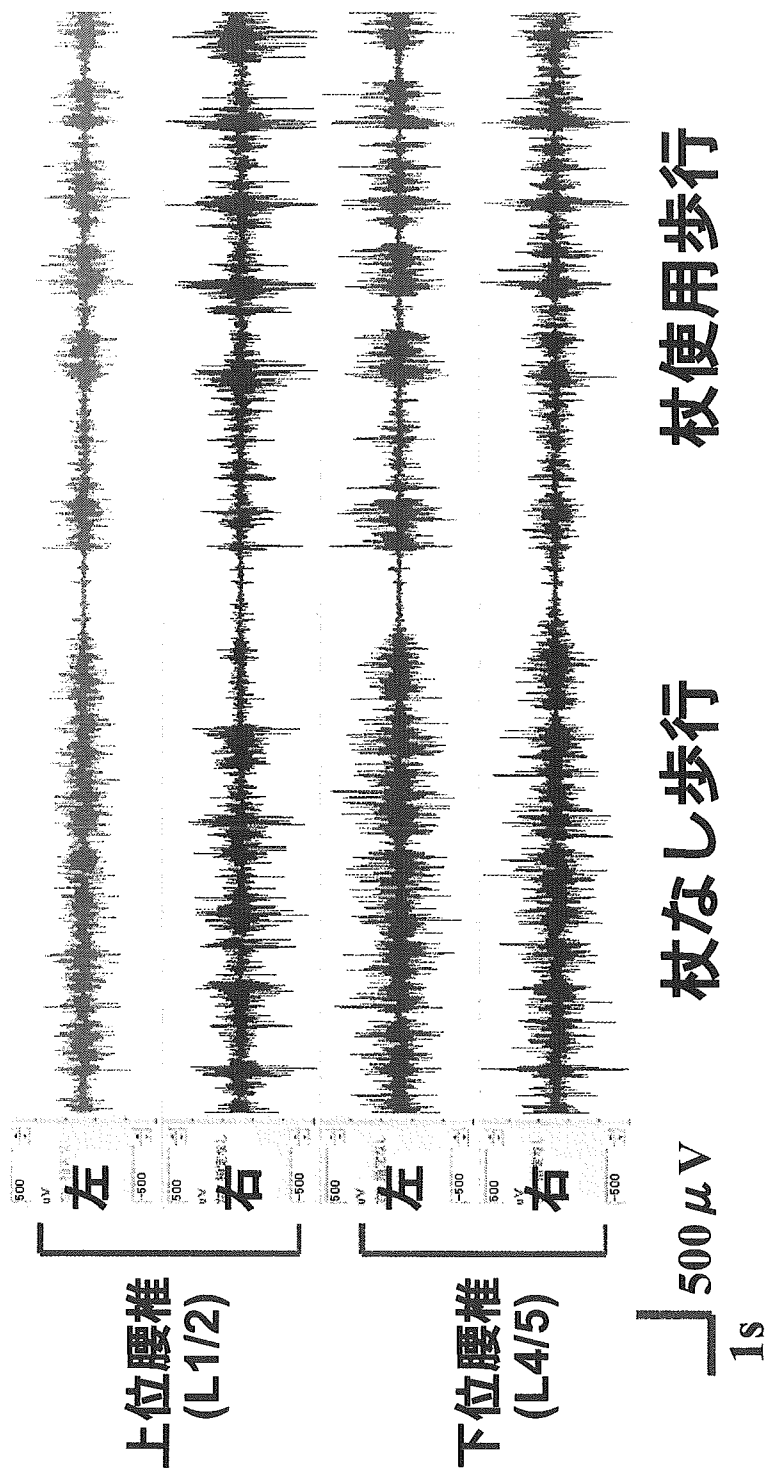
右手杖 左手杖




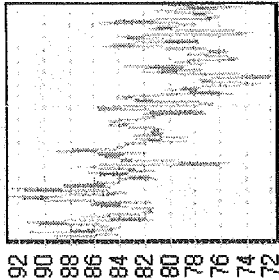
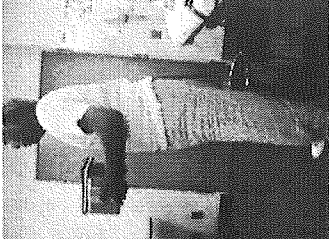
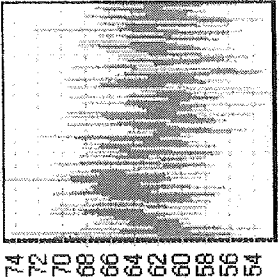
特に杖の使用側で
腰背筋の負荷が軽減された。

杖の効果

63歳女性 腰椎後側弯症（歩行時腰痛+）



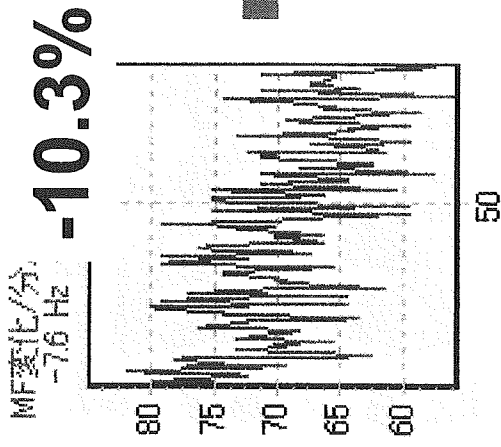
杖を使用することで歩容が安定
腰背筋の筋活動は軽減し、2重支配に近い安定した筋活動が得られた

	MF変化/分	MPF変化/分
 <p>腰痛患者 女性4名 平均67.3歳</p>	-5.3%	<p>MPF変化/分/CH1 0 -74 Hz -8.6%</p>  <p>-4.8%</p>
 <p>対象群 女性2名、男性1名 平均73.7歳</p>	0.56%	<p>MPF変化/分/CH1 0 -14 Hz -21%</p>  <p>-0.14%</p>

腰痛を有する患者では腰背筋の筋疲労度が大きい。

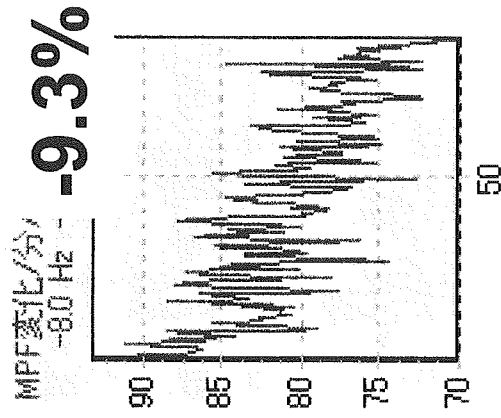
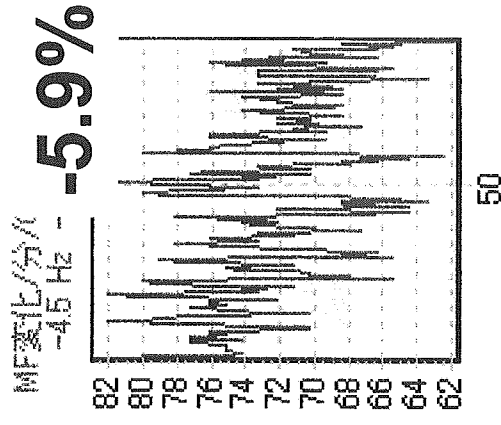
70歳女性
腰痛あり

腰部固定帯なし

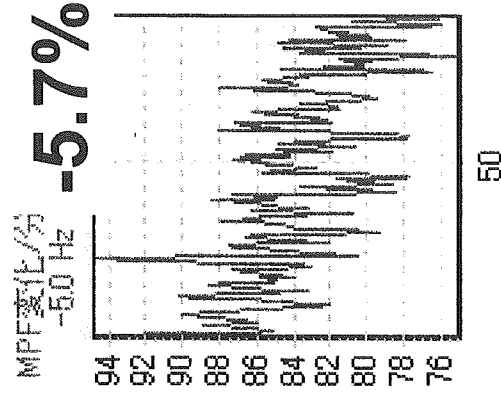


MF変化/分

腰部固定帯使用



MPF変化/分



腰部固定帯によって腰背筋の筋疲労が軽減される。

椎間板変性機序解明に関する生化学的・分子生物学的研究

分担研究者 千葉 一裕 慶應義塾大学整形外科・助教授

研究要旨 腰・下肢痛の原因となる椎間板変性の機序解明を目的として培養椎間板細胞による細胞外基質代謝の生化学的に、また、基質代謝に影響を及ぼすと思われる基質タンパク分解酵素やその阻害因子の遺伝子発現や、各種液性因子による発現への影響につき分子生物学的に解析した。髓核細胞は線維輪細胞に比し細胞周囲基質分画に基質分子集積量が乏しく、加齢によりその集積量はさらに低下した。一方、TGF-1 β や TIMP-3 などの増殖因子ならびに基質分解酵素阻害因子は線維輪に比し髓核でより高度に発現しており、その発現は加齢とともに急速に減少した。以上の結果から、髓核は増殖因子や基質分解酵素阻害因子を発現することで椎間板の恒常性を保っている可能性があること、加齢によるこれら因子発現の減少が髓核細胞の細胞周囲基質における基質集積に影響を及ぼしており、それが椎間板変性の発端となる可能性があることが示唆された。

A. 研究目的

急速な高齢化社会の到来により、腰痛、下肢痛を訴える患者は増加の一途をたどっている。しかし、腰・下肢痛発現の重要な一因とされる椎間板変性の機序は未だに解明されていない。本研究の目的は細胞の形質発現を維持可能な浮遊培養法 (suspension culture) を用いて椎間板細胞を培養し、その基質代謝ならびに代謝に影響を及ぼす種々の因子につき詳細な生化学的解析を行い椎間板変性の機序解明に寄与する知見を得ることである。

また、椎間板細胞の基質代謝にはさまざまな基質分解酵素やサイトカイン、増殖因子などが複雑に関与していると考えられていることから、本研究では椎間板における基質分解酵素と活性阻害因子の遺伝子ならびにタンパクの発現や、その発現に対するサイトカイン、増殖因子の影響を分子生物学的解析し、その椎間板変性における役割と意

義の解明もあわせて行なう。

B. 研究方法

1) 細胞の分離並びに培養法：日本白色家兎から無菌的に採取した髓核ならびに線維輪を 0.4% プロナーゼおよび 0.025% コラゲナーゼにより消化、細胞を分離し、1.2% アルジネートに 2×10^6 /ml の密度で浮遊させた。この細胞浮遊液を注射器に装着した 22 ゲージ針より 102mM 塩化カルシウム溶液内へ滴下し、カルシウム架橋形成により硬化した半固形の球状ビーズを作成した。この細胞を包含したアルジネートビーズを 10% 牛胎児血清添加 DMEM/F-12 培養液内で 37°C、5%O₂ の条件で培養を行った。

2) 細胞外基質の分画化：経時的に一定数のビーズを回収し、カルシウムキレート剤を含む緩衝液でビーズを溶解したのち遠心分離 (1000 回転 x 10

分)により細胞外基質を傍細胞ならびに細胞周囲基質の両者に相当する cell-associated matrix (CM)と細胞間領域基質に相当する further removed matrix (FRM)の2分画に分離した。

3) 細胞外基質成分の定量: 培養後1、2、3、4週と経時的にビーズを回収し、カルシウムキレート剤 (EDTA, クエン酸ナトリウム) を含む緩衝液でゲルを溶解したのち、回収した基質分画あるいは髄核、線維輪組織を蛋白分解酵素パバインにより消化、可溶化した上で、総プロテオグリカンを dimethyl- methylene blue (DMB) 色素法、ケラタン硫酸およびヒアルロン酸量を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)、またコラーゲン量の指標としてヒドロキシプロリン量を、さらにコラーゲン分子内架橋の指標としてピリジノリン量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によりそれぞれ定量した。各時点での DNA 量を Hoechst 33258 色素を用いた蛍光法により測定し、各測定値を標準化した。

4) 椎間板基質合成能の定量: 培養ビーズあるいは椎間板を ^{35}S 硫酸含む培養液中にて一定時間標識した後、上述のごとく細胞あるいは組織を分離、可溶化し、 ^{35}S 標識されたグリコサミノグリカンをアルシアンブルー色素を用いた急速濾過法で定量し、プロテオグリカン合成能を測定した。同様に ^3H プロリンにて標識した後、組織を 6N 塩酸でアミノ酸レベルまで加水分解し、 ^3H -ヒドロキシプロリンを HPLC により定量し、コラーゲン合成能を測定する。

5) プロテオグリカンの性状とコラーゲンサブタイプの分析: 4 M 塩酸グアニジンによりプロテオグリカンを抽出、G-50 カラム、DEAE イオン交換クロマトグラフィーで精製後、Sephrose CL2B カ

ラムにてゲル濾過により、新生プロテオグリカンの分子量を含めた性状解析を行う。組織中のコラーゲンを塩析し、ペプシン消化後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によりサブタイプを決定する。

6) mRNA 発現の分子生物学的解析: (1) 4 週令および 160 週令の日本白色家兎椎間板における TIMP-3 の免疫染色、(2) 半定量的 RT-PCR を用いて、4 週令および 160 週令の家兎椎間板脊索性髄核における TGF- β 1 および TIMP-3 の mRNA 発現、(3) TGF- β 1 および IL-1 を各濃度 (0, 0.1, 1, 10 ng/ml) 存在下に髄核を 24 時間器官培養した後の TIMP-3 mRNA の発現、(4) TIMP-3 各濃度 (0, 0.5, 5, 50 nM) 存在下に髄核を 24 時間器官培養した後の type II collagen および Aggrecan mRNA の発現について検討を行なった

C. 研究結果

日本白色家兎椎間板より分離した、髄核ならびに線維輪細胞はアルジネートゲル内で、3次元形態をよく保ち、活発に細胞外基質産生を行った。また髄核、線維輪細胞ともに細胞に近接した細胞周囲領域基質ならびに細胞より離れた位置に存する領域間基質の2つの異なる分画からなる細胞外基質を形成することが確認された。細胞周囲領域基質には DNA あたりより高濃度のプロテオグリカンならびにコラーゲンが集積した。特に線維輪細胞の細胞周囲基質においてコラーゲンの分子間架橋を形成するピリディノリンおよびデオキシピリディノリンが高濃度に集積した。また髄核細胞は主に2型コラーゲンを、線維輪細胞は1型と2型の両者を産生、細胞周囲に集積した。以上より、アルジネートゲル内に懸架された椎間板細胞はその遺伝形質発現を極めて良好に保持することが確

認められた。また、プロテオグリカン、コラーゲン共に髄核細胞に比し線維輪細胞で合成が盛んであり、プロテオグリカンは主に細胞周囲に、逆にコラーゲンは主に領域間分画に集積する事が判明した。髄核と線維輪細胞では合成直後の新生プロテオグリカンの基質分画間の移動速度が著しく異なり、前者では細胞周囲から領域間分画へ急速に移動したが、後者では細胞周囲に比較的長く保持された。一方でプロテオグリカンの半減期はいずれの細胞でも細胞周囲で著しく短かく(12-14日)、細胞間領域では著しく長かった(80日以上)。コラーゲンは髄核、線維輪細胞いずれにおいても早期に細胞周囲から領域間分画に移行し、さらに急速に培養液中へと放出された。一方で細胞周囲に残存したコラーゲンは定常状態となり著しく長い半減期を有していた。IL-1はプロテオグリカンの分解を早め、基質代謝回転を負に傾け、また逆にBMP-7は椎間板細胞による基質合成能を高め、基質代謝回転率を正に傾けることが判明した。これら生理活性物質の影響は細胞膜に近接して存在する細胞周囲基質においてより顕著であった。

一方、分子生物学的解析実験の結果を要約すると、(1)TIMP-3の免疫染色では4週令の髄核と線維輪の両方に陽性細胞を認めたが160週令では認めなかった。(2)160週令の髄核では4週令と比較し、TGF- β 1およびTIMP-3のmRNAの発現が統計学的に有意に低下していた。(3)TGF- β 1は濃度依存性にTIMP-3 mRNAの発現を増加したがIL-1は明らかな影響を与えなかった。(4)TIMP-3(50nM)はtype II collagenおよびAggrecanのmRNAの発現を統計学的に有意に増加させることが判明した。

D. 考察

髄核細胞で細胞周囲よりプロテオグリカンが早期に失われることは椎間板変性が髄核部より始まることの一因とも考えられた。また、加齢によってもIL-1による細胞周囲分画を主とした基質分解亢進と類似した変化がみられることより、IL-1を含めた何らかのサイトカインが椎間板の加齢現象ひいては変性に関連している可能性が示唆された。また、遺伝子発現の解析結果より、加齢に伴いTGF- β 1とTIMP-3の発現は共に低下しており、さらにin vitroでTIMP-3の発現はTGF- β 1で濃度依存性にupregulateされることから、in vivoでの加齢性変化における脊索性髄核のTIMP-3の発現低下の一因としてTGF- β 1の低下が考えられた。TIMP-3は他のTIMPと性質が異なり細胞外基質への結合親和性が高いこと、またADAMTS4,5やADAM17のinhibitorであることが報告されている。また、TIMP-3は基質分解の抑制のみならず合成維持にも影響し、脊索性髄核でのこれらの因子の発現低下が椎間板変性の引きがねとなる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Buckwalter JA. Spine Update. Aging and degeneration of the human intervertebral disc. Spine 1995;20:1307-14.
- 2) Armour A, Slocombe PM, Webster A, et al. TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. FEBS Lett. 1998;435:39-44.
- 3) Cats-Baril WL, Frymoyer JW. Identifying patients at risk of becoming disabled because of low-back pain. The Vermont Rehabilitation Engineering Center predictive model. Spine 1991;16:605-7.

- 4) Chandrasekhar S, Esterman MA, Hoffman HA. Microdetermination of proteoglycans and glycosaminoglycans in the presence of guanidine hydrochloride. *Anal Biochem* 1987;161:103-8.
- 5) Chelberg MK, Banks GM, Geiger DF,
- 6) Chiba K., Andersson G.B.J., Masuda K. and Thonar E.J.-M.A. : Metabolism of the extracellular matrix formed by intervertebral disc cells cultured in alginate. *Spine* 1997; 22: 2885-2893.
- 7) Chiba K., Andersson G.B.J., Masuda K., Momohara S., Williams J.M., Thonar E.J.-M.A: A comparison of the effectiveness of intervertebral disc tissues and cells exposed to chondroitinase ABC and chymopapain to reform a matrix. *Orthop. Trans.* 22: 150, 1997.
- 8) Chiba K., Andersson G.B.J., Masuda K., Otten L., Pietryla D., Wang L., Momohara S., Thonar E.J.-M.A. : Age-related changes in the metabolism of cells from the nucleus pulposus and annulus fibrosus of adolescent and skeletally mature rabbits. *Orthop. Trans.* 20: 792-793, 1996.
- 9) 千葉一裕：各種科学物質が椎間板およびその周囲組織に及ぼす影響に関する実験的研究：日整会誌 67: 1055-1069, 1993.
- 10) Eyre DR. Biochemistry of the intervertebral disc. *Int Rev Connect Tissue Res* 1979;8:227-91.
- 11) Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol.* 1997;74:111-22.
- 12) Häuselmann HJ, Aydelotte MB, Schumacher BL, Kuettnner KE, Gitelis SH, Thonar EJ. Synthesis and turnover of proteoglycans by human and bovine adult articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Matrix* 1992;12:116-29.
- 13) Humzah MD, Soames RW. Human intervertebral disc: structure and function. *Anat Rec* 1988;220:337-56.
- 14) Johnstone B, Bayliss MT. The large proteoglycans of the human intervertebral disc. Changes in their biosynthesis and structure with age, topography, and pathology. *Spine* 1995;20:674-84.
- 15) Maldonado BA, Oegema TJ. Initial characterization of the metabolism of intervertebral disc cells encapsulated in microspheres. *J Orthop Res* 1992;10:677-90.
- 16) Masuda K, Shirota H, Thonar EJ. Quantification of ³⁵S-labeled proteoglycans complexed to alcian blue by rapid filtration in multiwell plates. *Anal Biochem* 1994;217:167-75.
- 17) McDevitt CA. Proteoglycans of the intervertebral disc. In: P Ghosh, ed. *The Biology of the intervertebral disc.* Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1988:151-70.
- 18) Mok SS, Masuda K, Hauselmann HJ, Aydelotte MB, Thonar EJ. Aggrecan synthesized by mature bovine chondrocytes suspended in alginate. Identification of two distinct metabolic matrix pools. *J Biol Chem* 1994;269:33021-7.
- 19) Pearce RH, Grimmer BJ, Adams ME. Degeneration and the chemical composition of the human lumbar intervertebral disc. *J Orthop Res* 1987;5:198-205.
- 20) Su S, DiBattista JA, Sun Y, et al. Up-regulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 gene expression by TGF-beta in articular chondrocytes

is mediated by serine/threonine and tyrosine kinases. *J Cell Biochem.* 1998;70:517-27.

- 21) Thompson JP, Oegema TJ, Bradford DS. Stimulation of mature canine intervertebral disc by growth factors. *Spine* 1991;16:253-60.
- 22) Thonar EJ, Schnitzer TJ, Kuetner KE. Quantification of keratan sulfate in blood as a marker of cartilage catabolism. *J Rheumatol* 1987;Suppl 14:23-4.
- 23) Vernon-Roberts B. Disc pathology and disease states. In: P Ghosh, ed. *The Biology of the Intervertebral Disc*. Boca Raton: CRC Press Inc., 1988:73-120.

E. 結論

髄核は増殖因子や基質分解酵素阻害因子を発現することで椎間板の恒常性を保っている可能性があること、加齢によるこれら因子発現の減少が髄核細胞の細胞周囲基質における基質集積に影響を及ぼしており、それが椎間板変性の発端となる可能性がある

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 辻崇、千葉一裕、他：家兎椎間板の TIMP-3 発現における加齢性変化 第 17 回日本軟骨代謝学会 (2004.3.12-13、東京)
2. 辻崇、千葉一裕、他：家兎椎間板の TIMP-3 発現における加齢性変化 第 19 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2004.10.21-22、東京)
3. Tsuji, T, Chiba K, et al: Tissue inhibitor of

metalloproteinase-3 maintain the intervertebral disc homeostasis The 44th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (2005.2.19-23, Washington DC)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

平成 17 年度 厚生労働科学研究費補助金（痴呆・骨折臨床研究事業）

分担研究報告書

高齢者の腰痛症に係るより効果的かつ効率的な診断、治療、介護

及びリハビリテーション等の確立に関する研究

研究課題名：高齢者腰痛症の一因を成す椎間板変性に関する分子生物学的解析

分担研究者：千葉一裕 慶應義塾大学医学部整形外科 助教授

研究要旨：ラット椎間板を用いてマイクロアレイをおこない、髄核細胞において CD24 が特異的に発現していることが明らかになった。CD24 は脊索腫にも発現を認めたことから脊索細胞の特異的表面マーカーと考えられ、組織学的診断のみならず再生医療分野における髄核細胞の分化誘導判定などの際に有用な指標となりえると思われた。

A. 研究目的

これまで、家兎、ラットならびにヒトから採取した椎間板細胞を用いて加齢、変性に関与する分子を解析してきた。椎間板を構成する線維輪細胞と髄核細胞は形態的に異なるが、それらを明確に区別できるようなマーカー分子の報告はまだない。そこで、腰痛の原因のひとつである椎間板変性のメカニズムを生物学的に明らかにする目的で、ラット椎間板を用いてマイクロアレイをおこない、髄核細胞において特異的に発現している遺伝子をスクリーニングし機能解析をおこなった。

B. 研究方法

ラット組織における CD24 の発現量の比較と週齢別での発現量の推移を real-time PCR で解析した。また、免疫染色・フローサイトメトリーを用いて髄核における CD24 の発現と胎生期における脊索から髄核にかけての発現を経時的に検討した。さらにラット椎間板ヘルニアモデルの椎間板組織、および 6 症例の脊索腫と 7 症例の軟骨肉腫のヒトサンプルを用いて、免疫染色により CD24 の局在を検討した。

C. 研究結果

CD24 は mRNA レベルでラット髄核に特異的に発現しており、免疫染色ではラット椎間板の脊索

と髄核に局在を認め、その発現量は加齢により変動しなかった。椎間板ヘルニアモデルにおいても CD24 の発現は維持されており、脊索腫では 6 症例中 5 症例に CD24 陽性であったが、軟骨肉腫ではすべて陰性であった。

D. 考察

腰・下肢痛を引き起こす数多くの疾患の発症要因となる椎間板退行変性の病態については、徐々に明らかになっているが、分子生物学的な解析はいまだ不十分である。これまで、3次元細胞および組織培養法を用いて椎間板細胞（髄核細胞と線維輪細胞）の基質代謝について生化学的に解析してきた。今回の結果から、髄核における CD24 の発現は種を超えて特異的に高く、マウスやラットではその発現は胎生期から発現しており、加齢においてもその発現が維持されていた。CD24 は椎間板ヘルニアや脊索腫においてもその発現が確認され、特に脊索腫での発現は本分子が脊索細胞に特異的であることを示唆しているものと思われた。したがって CD24 は脊索細胞の特異的表面マーカーの可能性があり、脊索腫の確定診断のみならず、再生医療分野における髄核細胞の分化誘導判定などの際に有用な指標となりえると思われた。

E. 結論

ラット椎間板を用いてマイクロアレイをおこな
い、髄核細胞において CD24 が特異的に発現して
おり、脊索細胞の特異的表面マーカーと考えられ
た。

F. 健康危険情報

問題なし。

G. 研究発表

1. 論文発表：

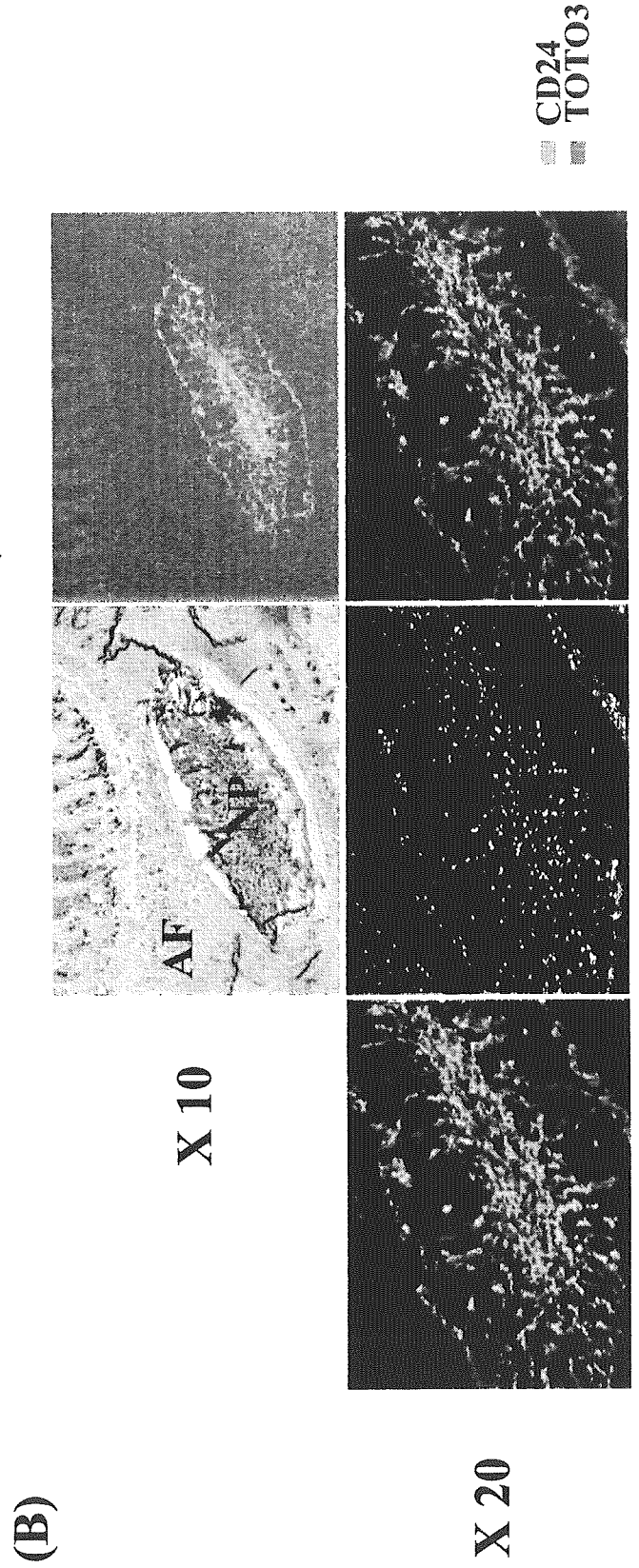
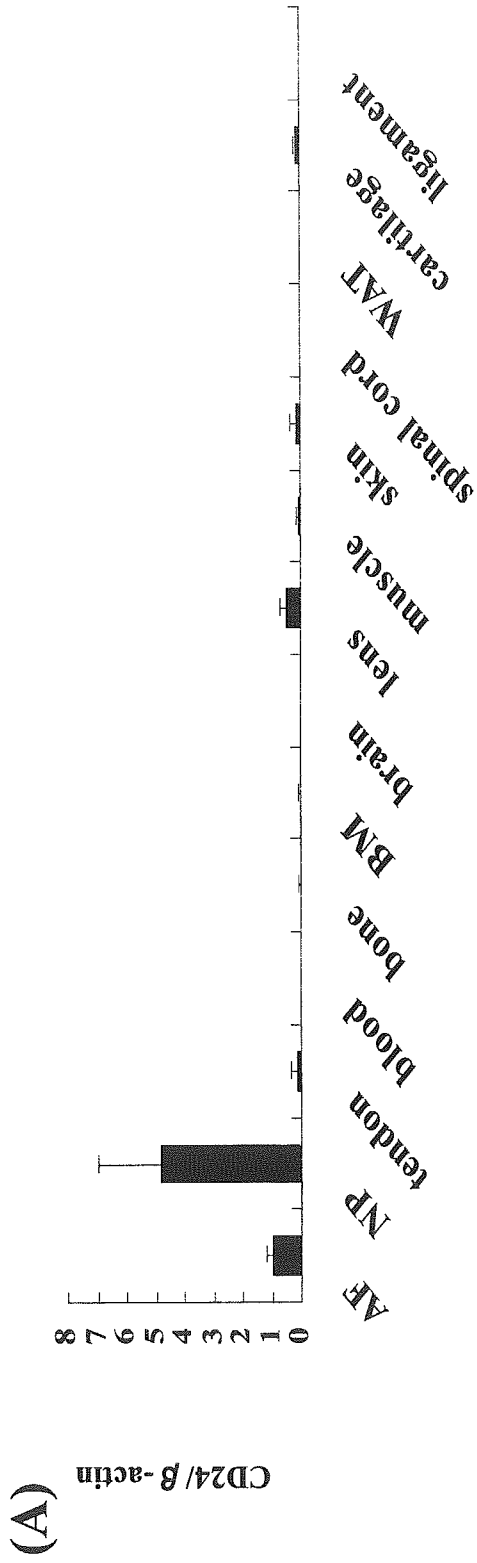
1) Fujita N, Chiba K. et al. CD24 is expressed
specifically in the nucleus pulposus of
intervertebral discs. *Biochem Biophys Res
Commun.* 338(4). 1890-6, 2005

2. 学会発表：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

予定していない。

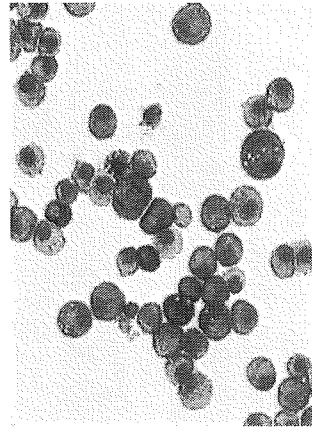
CD24 Expression is Detected in NP (1)



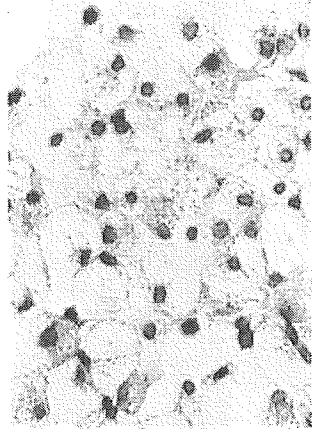
CD24 Expression is Detected in NP (2)

(A)

AF

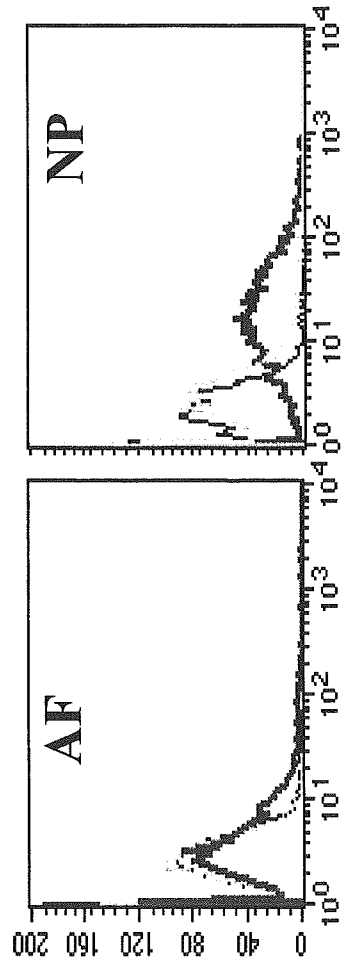


NP



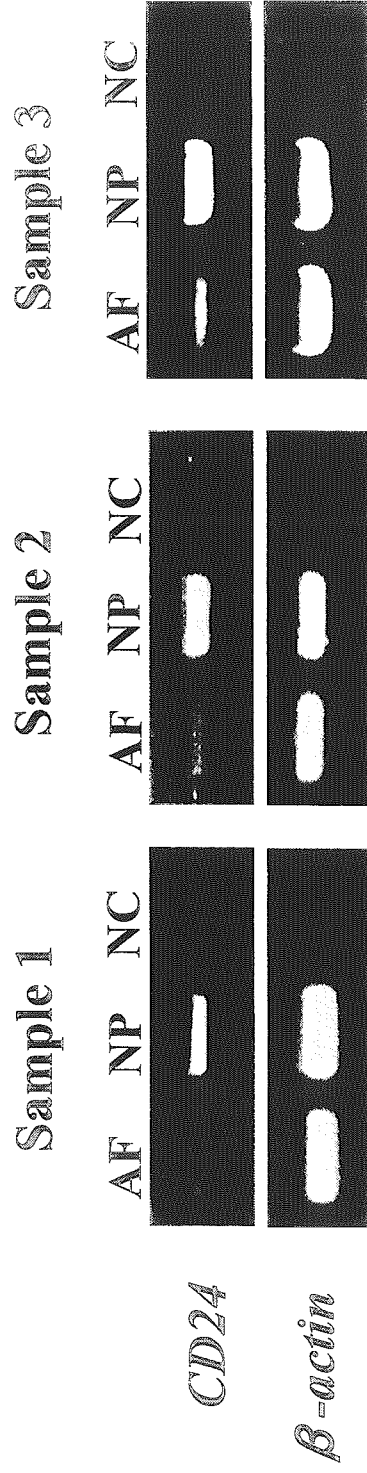
(B)

counts



CD24 unstained
 second antibody alone
 ——— CD24

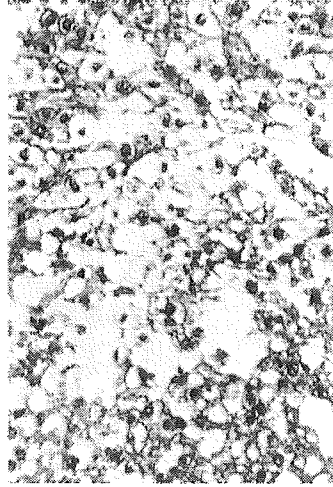
Human Intervertebral Disc



NC: Negative control

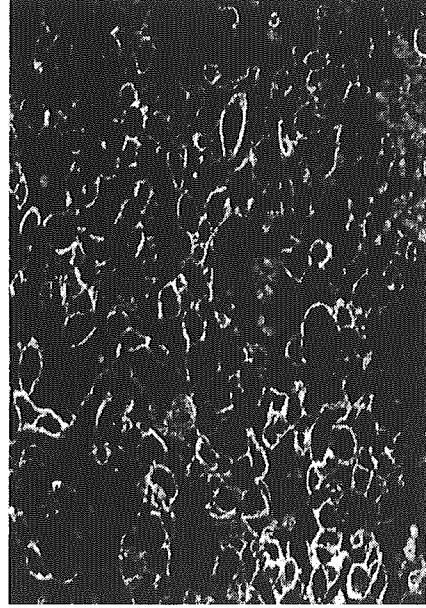
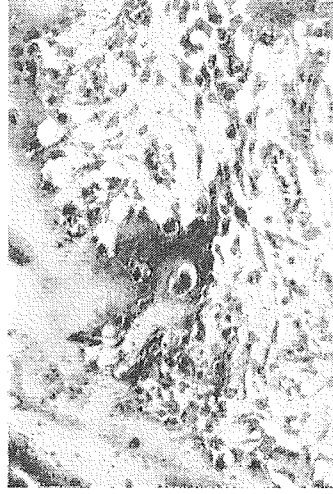
CD24 Expression is Detected in Chordoma, but not in Chondrosarcoma

chordoma

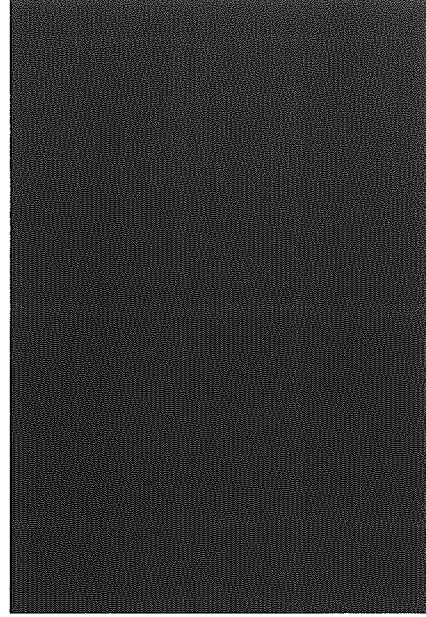


H/E

chondrosarcoma



CD24





CD24 is expressed specifically in the nucleus pulposus of intervertebral discs

Nobuyuki Fujita^{a,b,1}, Takeshi Miyamoto^{a,b,*,1}, Jun-ichi Imai^c, Naobumi Hosogane^{a,b}, Toru Suzuki^{a,b}, Mitsuru Yagi^{a,b}, Kozo Morita^{a,b}, Ken Ninomiya^{a,b}, Kana Miyamoto^{a,d}, Hironari Takaishi^b, Morio Matsumoto^b, Hideo Morioka^b, Hiroo Yabe^b, Kazuhiro Chiba^b, Shinya Watanabe^c, Yoshiaki Toyama^b, Toshio Suda^{a,*}

^a Department of Cell Differentiation, The Sakaguchi Laboratory, Japan

^b Department of Orthopedic Surgery, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

^c Department of Clinical Informatics, Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8519, Japan

^d Department of Medicine and Biosystemic Science, Graduate School of Medicine, Kyushu University, 3-1-1 Maidashi, Fukuoka 812-8582, Japan

Received 8 October 2005

Available online 10 November 2005

Abstract

Intervertebral disc (IVD) consists of a soft gelatinous material in its center, the nucleus pulposus (NP), bounded peripherally by fibrocartilage, annulus fibrosus (AF). Despite the number of patients with IVD degeneration, gene expression analysis has not been undertaken in NP and therefore little is known about the molecular markers expressed in NP. Here, we undertook a microarray screen in NP with the other nine tissues to identify the specific cell surface markers for NP. Five membrane associating molecules out of 10,490 genes were identified as highly expressing genes in NP compared with the other tissues. Among them, we identified CD24, a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor protein as a cell surface marker for NP. CD24 expression was also detected in the herniated NP and chordoma, a malignant primary tumor derived from notochordal cells, while it was absent in chondrosarcoma. Therefore, CD24 is a molecular marker for NP as well as the diseases of IVD.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Intervertebral disc; Nucleus pulposus; CD24

Intervertebral disc (IVD) degeneration and concomitant herniation are the distinguishing anatomical features associated with lumbar disc disease (LDD). The molecular mechanisms leading to the onset of IVD degeneration are not well understood. Recent genetic studies in humans and mice indicate that genetic factors play an important role in the etiology and pathogenesis associated with LDD [1–3].

The IVD is composed of two discrete components termed the nucleus pulposus (NP) and the annulus fibrosus

(AF). The interior structure, NP, is a soft gelatinous avascular cartilage-like tissue, derived from notochord, containing extracellular matrix proteins (ECM) rich in large proteoglycans such as aggrecan and collagens. ECM proteins play a central role in chondrocyte metabolism through regulation of growth factors and appear to be crucial for maintaining IVD homeostasis and integrity [4,5]. A recent genetic study demonstrated the role of cartilage intermediate layer protein (CILP), an ECM that acts as a modulator of LDD susceptibility through deregulation of TGF β signaling [3].

The AF, a fibrous cartilage composed of an inner and outer coaxial lamella, is bound to the periphery of the NP. The onset of degenerative disc disease is marked by mechanical stress-induced apoptosis in the AF resulting

* Corresponding authors. Fax: +81 3 5363 3475.

E-mail addresses: miyamoto@sc.itc.keio.ac.jp (T. Miyamoto), sudato@sc.itc.keio.ac.jp (T. Suda).

¹ These authors contributed equally to this work.

in degeneration and disruption of the outer disc tissue leading to herniation of the NP [6]. This sequelae of events is consistent with the susceptibility to LDD associated with aggrecan and collagen mutations that compromise the response of IVD cells to injury [1,2].

To further delineate the mechanism of NP function in IVD degeneration, we performed a microarray screening and cluster analysis to identify cell factors that were expressed specifically in NP tissue. Based on previous findings about the properties and function of NP cells, we screened several different tissues for comparison in our microarray analysis. These tissues include: avascular tissues such as AF and tendon, mesenchymal tissues such as skeletal muscle, skin, bone, AF, and tendon; and neurogenic tissues including spinal cord and brain. We found that expression of a heat-stable antigen termed CD24, a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell surface protein, was upregulated in NP cells in a tissue specific manner.

CD24 is expressed in neurons, preB cells, T cells, and several cancer cells [7–10]. It also functions in differentiation and activation of granulocytes and B lymphocytes [11]. CD24 deficient mice show no gross physical or behavioral abnormalities, however the homeostatic proliferation of CD24 deficient T cells is reduced indicating that CD24 may be involved in cell proliferation [12].

In this study, we found that CD24 was high in NP and was detected in herniated NP tissue. We also determined CD24 expression was upregulated in chordoma, a malignant primary tumor derived from notochord cells. In contrast, we were unable to detect CD24 expression in chondrosarcoma, malignant tumors derived from mesenchymal cells.

Materials and methods

Microarray analysis. Total RNA was extracted and pooled from 10 different tissues including NP, AF, tendon, skeletal muscle, spinal cord, brain, skin, bone, bone marrow, and peripheral blood of 8-week-old male Wistar rats using TRIzol Reagent (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). To ensure a sufficient amount of Poly(A)⁺ RNA for screening, we pooled NP, AF, and tendon tissue from 50 rats. For the remaining tissues, we pooled tissue from 10 rats. Synthetic polynucleotides (80-mers) representing 11,464 rat transcripts derived from 10,490 independent genes (MicroDiagnostic, Tokyo, Japan) were arrayed with a custom-made arrayer. Two micrograms of poly(A)⁺ RNA was labeled with cyanine 5-dUTP or cyanine 3-dUTP. Hybridization and subsequent washes of arrays were performed with a Labeling & Hybridization Kit (MicroDiagnostic). Hybridization signals were measured with a GenePix 4000A scanner (Axon Instruments, Union City, CA) and then processed into primary expression ratios (ratios of cyanine 5-intensity obtained from each sample to cyanine 3-intensity obtained from the rat common reference RNA), which are indicated as 'median of ratios' by the GenePix Pro 3.0 software (Axon Instruments). Normalization was performed for the median of ratios by multiplying normalization factors calculated for each feature on a microarray by the GenePix Pro 3.0 software. The expression ratios were converted into log₂ values as final expression ratios.

Animals. All animals were purchased from Japan Crea (Tokyo, Japan) or born and kept under pathogen-free conditions, and cared for in accordance with the guidelines of Keio University School of Medicine.

Rat hernia model. Posterior herniations were created between the 5th and 10th tail IVD of 8-week-old male Wistar rats. After a posterior

incision above the IVD was made, the soft tissues such as posterior tendons and ligaments were separated. Then, a small incision was made in AF with subsequent compression between an upper and lower vertebral body to prepare a posterior herniation. Seven days after surgery, rats were sacrificed and the herniated discs with vertebral bodies were removed. For preparation of an IVD section, freshly isolated IVDs were embedded in rat minced liver and frozen using 2-methylbutane (Wako, Osaka, Japan) and liquid nitrogen. Frozen sections of IVD, that had not been decalcified, were obtained using a cryostat (MICROME, model HM505) equipped with a tungsten carbide knife.

Human samples. For the experimental use of the surgical samples, informed consents were obtained from the patients according to the Hospital Ethical Guideline (Keio Hospital #15-52). Specimens of seven chordomas and seven chondrosarcomas diagnosed according to conventional criteria, and three IVD tissues dissected from scoliosis patients as normal IVD were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS, embedded in paraffin, and 4 μm sections were cut.

Cell harvest and flow cytometric analysis. NP and AF cells were macroscopically dissected from the cervical, thoracic, and lumbar IVD of 8-week-old male Wistar rats. NP tissue was digested with pronase E (0.04%) (SERVA, Heidelberg, Germany) for 1 h at 37 °C and then collagenase P (0.025%) (Roche Diagnosis), for 1 h at 37 °C. To isolate AF cells, AF tissue was treated with pronase E (0.4%) for 1 h at 37 °C, followed by collagenase P (0.025%) for 4 h at 37 °C. Cells were then washed with DMEM/F12 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) containing fetal bovine serum (5%) (Equitech-Bio, Kerrville, TX).

Cells were stained with anti-rat CD24 (clone HIS50, BD PharMingen, San Diego, CA) followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG (Biosource, Camarillo, CA). Flow cytometry and cell sorting was performed using FACS Vantage or FACS Calibur (Becton-Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). NP and AF cells were also stained with May-Gruenwald-Giemsa.

Immunohistochemical analysis. Rat IVD were dissected from 8-week-old Wistar rats, fixed in formalin (10%), embedded in paraffin, and cut into 4 μm sections. Deparaffinized sections of paraffin embedded samples or cryosections of rat herniated IVD were stained with anti-rat CD24 (HIS50, BD PharMingen, San Diego, CA, diluted 100-fold) followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG (Biosource, Camarillo, CA, diluted 200-fold) and TOTO3 (Invitrogen, diluted 750-fold) for nuclear staining. Antigen retrieval was achieved on chordomas and chondrosarcoma sections by pressure-cooking in citrate buffer (pH 6.0) for 20 min. Samples were then stained with anti-human CD24 (Ab-2, clone 24C02, Neomarkers, Fremont, CA diluted 100-fold) followed by Alexa Fluor488-conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes, Oregon, USA, diluted 100-fold). Immunoreactivity was detected by fluorescence microscopy (Olympus, Tokyo, Japan).

Real-time RT-PCR assay. Total RNA was extracted from NP, AF, patella tendon, peripheral blood, tibia bone, bone marrow, brain, lens, musculus quadriceps femoris, back skins, spinal cord, white adipose tissue, articular cartilage of femur head, and medial collateral ligaments from the knees of 8-week-old male rats (RNeasy mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) or Trizol (Invitrogen)). First strand cDNA was prepared using the first strand synthesis kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instruction, and cDNAs were amplified using a Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche diagnostics) in a Light Cycler Quick System (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Relative mRNA expression levels are shown by comparison with β-actin mRNA expression. The primers used are shown below:

5'-rat β-actin 5'-TCCTAGCACCATGAAGATC-3',
 3'-rat β-actin 5'-AAACGCAGCTCAGTAACAG-3'
 5'-rat CD24 5'-TGCTTCTGGCACTGCTCCTAC-3'
 3'-rat CD24 5'-GGTGGTAGCATTAGTTGGATTTGG-3'
 5'-human β-actin 5'-CGTGACATTAAGGAGAAGC-3'
 3'-human β-actin 5'-GGAGTTGAAGGTAGTTTCG-3'
 5'-human CD24 5'-GCACTGCTCCTACCCACGCAGATTT-3'
 3'-human CD24 5'-GCCTTGGTGGTGGCATTAGTTGGAT-3'

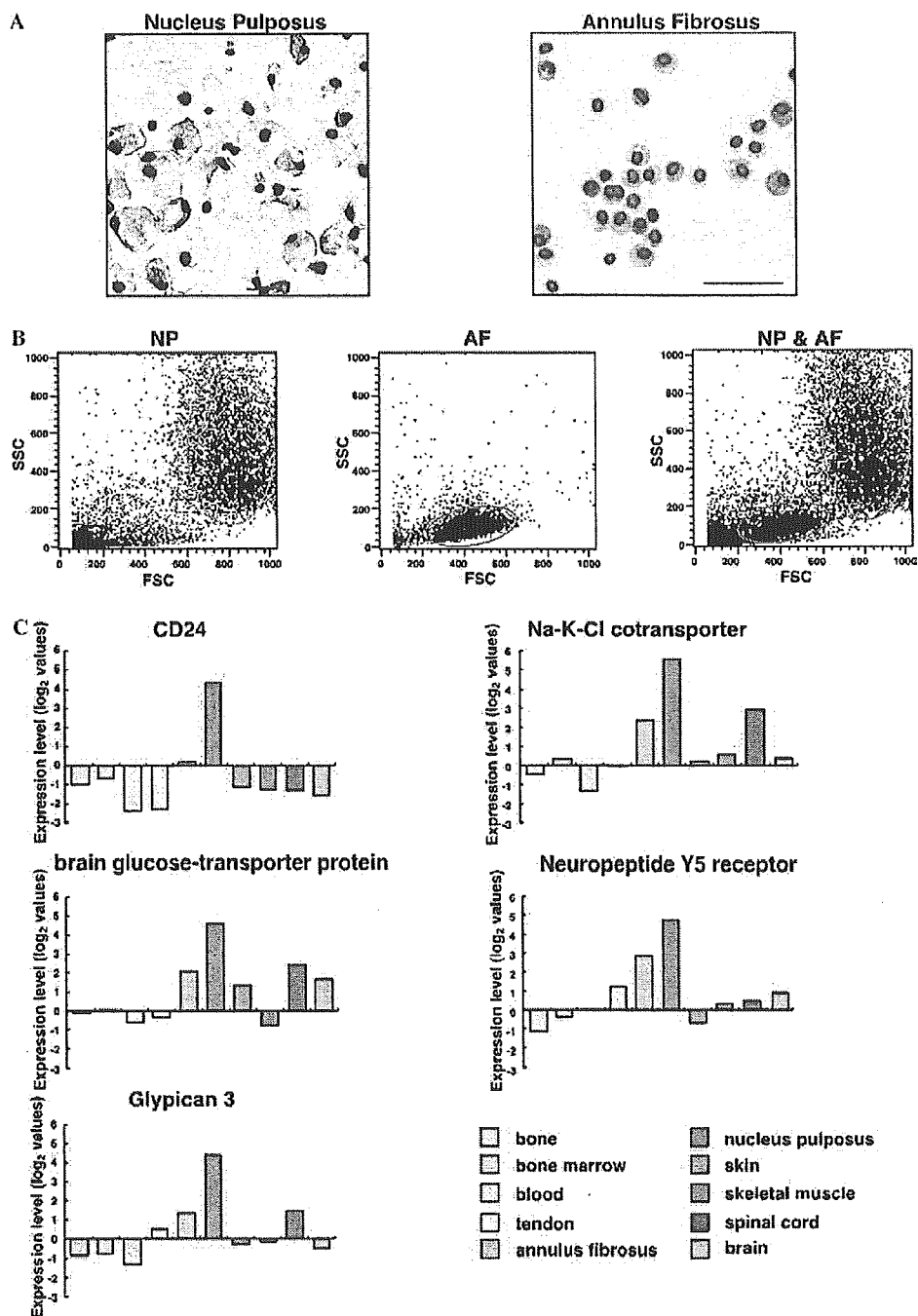


Fig. 1. Identification of NP specific cell surface molecules. Nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus (AF) were isolated from 8-week-old male rat IVD, and their morphology was examined by May-Grunwald-Giemsa staining (A) and flow cytometric analysis (B). Bar = 100 μ m. Red and blue circles represent the NP and AF population, respectively. (C) Ten different tissues, including NP and AF, were dissected from 8-week-old male rats, and DNA array hybridization and cluster analysis were performed. Five genes were identified that were expressed highly in NP cells when compared with the other nine tissues.

Results

Identification of NP specific cell factors

To identify cell factors expressed specifically in NP cells, we performed a comparative microarray analysis of 10,490

genes in NP and AF cells, and in cells isolated from tendon, skeletal muscle, spinal cord, brain, skin, bone, bone marrow, and peripheral blood of 8-week-old male Wistar rats. We isolated NP and AF tissues from lumbar, thoracic, and cervical IVD from more than 50 rats, and pooled tissue samples prior to isolation of poly(A)⁺ RNA. Fig. 1 shows May-Grunwald-Giemsa staining (Fig. 1A), and flow cyto-

metric analysis (Fig. 1B) of cells isolated from NP and AF tissues. As expected, NP cells had a larger cytoplasm (FSC) and a more complex structure (SSC) when compared to AF cells. We isolated the eight other tissues including tendon, skeletal muscle, spinal cord, brain, skin, bone, bone marrow and peripheral blood from 10 rats, and pooled samples from each tissue. Poly(A)⁺ RNA was isolated under protease-free conditions to prevent degradation and ensure that we screened a representative pool of poly(A)⁺ RNA that accurately reflected the levels of expression in cells.

In this report, we focused our efforts on identifying an NP specific cell surface marker that could be utilized to further characterize NP cells. To that end, we chose five cell surface proteins that were specifically expressed at a high level in NP but not in AF cells, or the eight cell types we analyzed (Table 1 and Fig. 1C). These cell factors included: CD24 antigen (NM_012752), Na–K–Cl co-transporter (AF051561), brain glucose-transporter protein (M13979), neuropeptide Y5 receptor (NM_012869), and Glypican 3 (NM_012774). We selected one of the five candidate genes, CD24, for further study since, of the five genes identified, it had the highest level of specific expression in NP cells.

CD24 expression is elevated in NP cells in a tissue specific manner

To determine the relative level of expression of these genes in NP tissue, we used a semi-quantitative real-time PCR assay to determine mRNA expression in NP and AF cells, and the various cell types used in our screen (Fig. 2A). In this experiment we also examined the expression level of CD24 in three additional mesenchymal tissues: white adipose tissue (WAT), articular cartilage, and liga-

ment cells. Our results confirmed that CD24 is specifically expressed in NP cells and that the level of expression was elevated by approximately 4-fold when compared to AF cells. We detected a very low level of CD24 expression in skin and tendon cells, and virtually no expression in the rest of the tissues we examined. We also used a commercially available CD24 antibody to confirm tissue specific expression of CD24 in NP cells using flow cytometry (Fig. 2B), and immunohistochemistry (Fig. 2C). Our results demonstrate that, based on the tissues we examined, CD24 is expressed specifically in NP cells. In addition, CD24 is a useful cell surface marker for identifying NP cells. We have also detected CD24 expression in human NP cells by RT-PCR and immunohistochemical analysis (data not shown).

CD24 is expressed in herniated NP tissue

To further investigate the role of CD24 in IVD disease, we analyzed CD24 expression in a rat model that recapitulates the pathological conditions associated with IVD disease in vivo. Posterior lumbar herniations were created between the 5th and 10th tail IVD. We were able to distinguish herniated protrusions (H) and intact NP (N) (see upper panels Fig. 3). CD24 expression was detected in the herniated protrusion as well as in the remaining NP tissue (lower panels Fig. 3). This result suggests that CD24 may also function in herniated NP tissue.

CD24 is expressed in chordoma cells

Chordoma, a primary malignant tumor of the skeleton, is considered to develop from a remnant of notochordal cells. Chordoma develops mostly in the sacrum region in

Table 1
Microarray identification of highly expressed genes in NP

Accession No.	Tissue									
	Bone	Bone marrow	Blood	Tendon	AF	NP	Skin	Muscle	Spinal cord	Tendon
NM_053518	0.2714	-0.1943	1.4249	0.5499	2.6595	6.3545	-0.2362	-0.6552	0.5039	0.9848
D45920	2.0607	4.421	0	1.6991	1.4552	6.1639	0	0.2857	4.0969	3.1089
AB020019	0.3696	0.2314	1.4082	0.5281	1.8984	5.8966	-0.4461	-0.1219	0.2485	0.585
M13518	0.5917	-0.3147	0.1648	1.542	5.5938	5.8456	-0.1047	-0.484	-0.394	-0.5564
AF051561	-0.454	0.308	-1.3364	-0.0484	2.3934	5.5614	0.2029	0.5763	2.9445	0.3896
NM_031140	1.3829	-0.456	-0.3808	2.6318	1.9309	5.3232	1.0545	-0.255	1.4942	-1.462
XM_217890	0.546	0.9298	0.514	-0.1345	1.301	5.1885	0.5772	0.519	0.4823	0.6012
X62952	1.107	0.5685	-0.8651	2.0374	1.6327	5.0932	0.8891	-0.7298	1.111	-2.0233
AA684960	-0.5951	-0.8135	-0.1959	4.0923	3.3176	4.8973	1.9355	-0.0816	-0.7346	-0.9214
AA686870	-1.9546	-3.2934	-2.7959	4.0689	3.2575	4.886	1.782	-1.2447	-1.7859	-2.0116
AA685376	-0.9828	-1.3808	-0.873	4.1059	2.9635	4.8324	1.9419	-0.0425	-1.152	-1.0262
NM_012869	-1.1392	-0.3696	0.037	1.2284	2.8584	4.7459	-0.6873	0.3208	0.4772	0.9161
AA684929	-0.8034	-0.8288	-0.0499	4.1048	3.2363	4.6141	1.9942	0.0468	-0.9828	-1.0954
M13979	-0.1187	0.0676	-0.606	-0.3364	2.0895	4.5972	1.3437	-0.7984	2.4354	1.6713
NM_012880	2.3417	-4.2379	-4.6439	0.1519	3.4848	4.4875	-3.8783	-4.7959	1.9452	-3.5395
NM_012774	-0.8494	-0.7735	-1.3004	0.514	1.3374	4.4059	-0.2934	-0.1584	1.4626	-0.482
NM_054008	1.9249	0.8237	-0.9296	1.058	0.4823	4.3906	-1.114	-0.7202	0.3161	0.1878
NM_080698	-2.4344	-2.699	-1.1779	4.5453	4.1006	4.3845	-2.9885	0.0014	-2.2042	-1.6943
NM_012752	-0.9799	-0.6804	-2.3884	-2.3004	0.1725	4.3827	-1.1297	-1.2758	-1.3147	-1.5606
AI007530	-0.035	-0.2176	0.704	3.1437	2.5969	4.3677	1.595	-0.2092	-0.3997	-0.3292