

Protein extraction and Western blotting. Rat disc cells were placed on ice immediately following treatment, and then washed with ice-cold Hanks' balanced salt solution. All of the wash buffers and the final resuspension buffer included 1X protease inhibitor cocktail (Roche), NaF (5 mM), and Na_3VO_4 (200 μM). Nuclear or total cell proteins were resolved on 8–12% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gels and transferred by electroblotting to PVDF membranes (Bio-Rad). The membranes were blocked with 5% nonfat dry milk in TBST (50 mM Tris, pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) and incubated overnight at 4°C in 3% nonfat dry milk in TBST with anti-Notch-4 antibodies (1:600; Santa Cruz Biotechnology), anti-Jagged-1 antibodies (1:1,000; Cell Signaling Technology), anti-Hes1 antibodies (1:500; Santa Cruz Biotechnology), or anti- β -tubulin antibodies (1:2,000; Developmental Studies Hybridoma Bank). Immunolabeling was detected using an enhanced chemiluminescence reagent (Amersham Biosciences).

Immunofluorescence microscopy. Rat disc cells were plated in flat-bottomed 96-well plates (5×10^3 /well) and cultured under hypoxic conditions for 24 hours. After incubation, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X-100 in PBS for 10 minutes, blocked with PBS containing 5% FBS, and incubated with antibodies against cleaved Notch1 (1:200; Cell Signaling Technology), Notch3 (1:200), Notch4 (1:100), or Hes1 (1:100) (the latter 3 from Neuromics), at 4°C overnight. As a negative control, cells were reacted with isotype IgG under similar conditions. After washing, the cells were incubated with an Alexa Fluor 488–conjugated anti-mouse secondary antibody (Invitrogen), at a dilution of 1:50, for 1 hour at room temperature. Cells were imaged using a laser scanning confocal microscope (Olympus Fluoview).

Transfections and dual luciferase assay. Rat disc cells were transferred, one day before transfection, to 24-well plates at a density of 4×10^4 cells/well. To investigate the effect of Notch-ICD overexpression on CBF1 and Hes1 promoter activity, cells were cotransfected with Notch-ICD (100–300 ng), or appropriate backbone vector, along with 300–350 ng CBF1 or Hes1 reporter and 300–350 ng pRL-TK plasmid. To measure the effect of hypoxia on Notch signaling, cells were transfected with 500 ng of 12xCSL or CBF1 reporter plasmids along with 500 ng pRL-TK plasmid; in some experiments, cells were treated with the Notch inhibitor L685458 (4 μM ; Sigma). Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used as a transfection reagent. For each transfection, plasmids were premixed with the transfection reagent.

Within 48–72 hours after transfection, the cells were harvested and a dual luciferase reporter assay system (Promega) was used for sequential measurements of firefly and *Renilla* luciferase activities. Quantification of the luciferase activities and calculation of relative expression ratios were carried out using a luminometer (TD-20/20; Turner Designs). At least 3 independent transfections were performed, and all analyses were carried out in triplicate.

Assessment of cell proliferation by MTT assay. To measure disc cell proliferation, an MTT assay was carried out as described previously (5). Briefly, after treatment of the rat disc cells, MTT diluted in serum-free DMEM was added to the culture medium, to a final concentration of 0.5 mg/ml. At the end of the incubation period (2 hours at 37°C), the medium

was removed, and the precipitated formazan crystals were solubilized in dimethyl sulfoxide. Product formation was measured by reading the absorbance at 560 nm, using a microplate reader (Tecan; Spectra Flour Plus).

Analysis of cell cycle. Following treatment of the rat annulus fibrosus cells, a single-cell suspension was prepared from cell cultures and fixed in ice-cold 70% ethanol for 1 hour. Cells were washed and resuspended in PBS with 5% FBS, and then incubated with 50 μM propidium iodide for 30 minutes at 37°C. Analysis of the cell cycle was conducted using a Coulter Epics XL-MCL system, with results analyzed using the XL System II software.

Statistical analysis. All measurements were performed in triplicate. Results are presented as the mean \pm SEM. Differences between groups were assessed by analysis of variance. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Transverse sections of skeletally mature rat discs were stained with antibodies to Notch-4 (Figure 1A). Notch-4 was observed to be present in cells of the annulus fibrosus and nucleus pulposus. Staining was evident in the plasma membrane and cytosol, as well as nucleus (Figure 1A).

Expression of select Notch pathway proteins in the rat disc tissue was studied using Western blot analysis. As shown in Figure 1B, the rat nucleus pulposus and annulus fibrosus tissue expressed Notch-4, Jagged-1, and Notch target gene Hes1. Expression of Hes1 was most prominent in the nucleus pulposus (Figure 1B), while that of Jagged-1 was higher in the annulus fibrosus.

To further examine the expression of different Notch receptors and ligands in the disc tissue, messenger RNA (mRNA) expression in the annulus fibrosus tissue was analyzed by RT-PCR (Figure 1C). We observed expression of mRNA for the Notch ligands Jagged1, Jagged2, and Delta1 and Notch receptors 1–4. However, expression of Delta3 was undetectable. Nucleus pulposus tissue elicited a similar pattern of ligand and receptor mRNA expression (results not shown).

In parallel, we measured the relative mRNA expression of Notch receptors in primary cells of the annulus fibrosus and nucleus pulposus. As shown in Figures 1D and E, a raised expression of Notch2, when compared with the other receptors, was observed in both cell types. Moreover, in annulus fibrosus cells, expression of Notch3 was higher than that of Notch1 and Notch4. Immunofluorescence analysis confirmed that Notch1, Notch3, and Notch4, as well as Jagged1, were

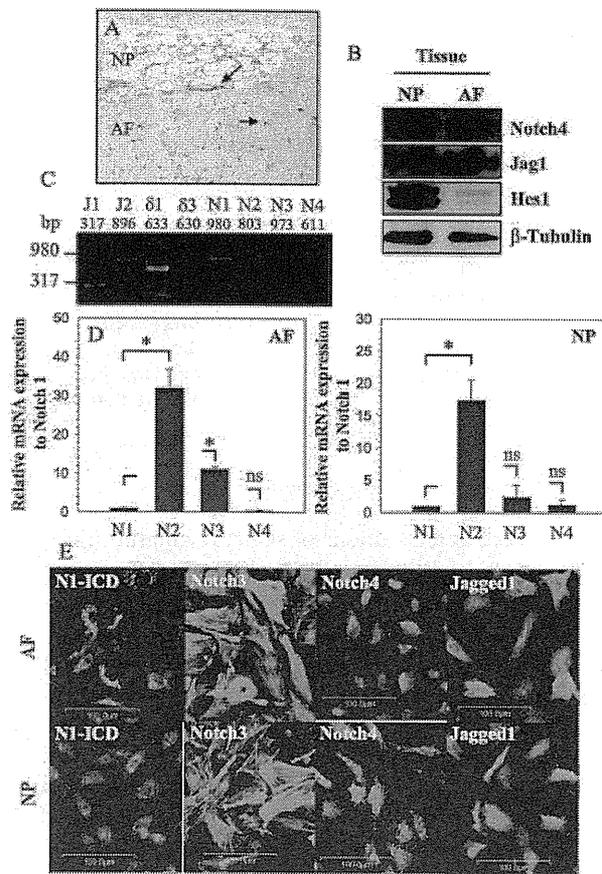


Figure 1. Expression of Notch receptors and ligands, as well as Notch target gene Hes1, in rat intervertebral discs. **A**, Transverse sections of disc tissue from mature rats were treated with anti-Notch-4 antibodies, and expression of Notch-4 was detected in cells of the nucleus pulposus (NP) and annulus fibrosus (AF) (arrows). Original magnification $\times 20$. **B**, Expression of Notch-4, Jagged-1, and Hes1 was assessed in NP and AF tissue by Western blotting; anti- β -tubulin was used as a positive control. **C**, Expression of select Notch ligands (Jagged1 [J1], Jagged2 [J2], Delta1, and Delta3) and Notch receptors (N1–N4) was assessed in AF tissue by reverse transcription–polymerase chain reaction (RT-PCR). **D**, Messenger RNA expression of the 4 Notch receptors was assessed in primary cells of the AF (left) and NP (right) by real-time RT-PCR. Values for Notch2–Notch4 are expressed relative to that of Notch1 and are the mean \pm SEM results from 3 independent experiments. * = $P < 0.05$. NS = not significant. **E**, AF and NP cells were assessed by immunofluorescence analysis for the expression of Notch3, Notch4, and Jagged1, as well as cleaved Notch1 (Notch1–intracellular domain [N1-ICD]). Original magnification $\times 20$.

expressed in annulus fibrosus and nucleus pulposus cells (Figure 1F).

We also examined the relationship between ex-

pression of Notch receptors in disc cells and the oxemic status of the cells. As shown in Figure 2A, when annulus fibrosus and nucleus pulposus cells were cultured under conditions of hypoxia for 8 hours, Notch1 mRNA was induced. In contrast, Notch2 mRNA expression was elevated with hypoxia in nucleus pulposus cells only (Figure 2B). With regard to Notch3 mRNA, expression

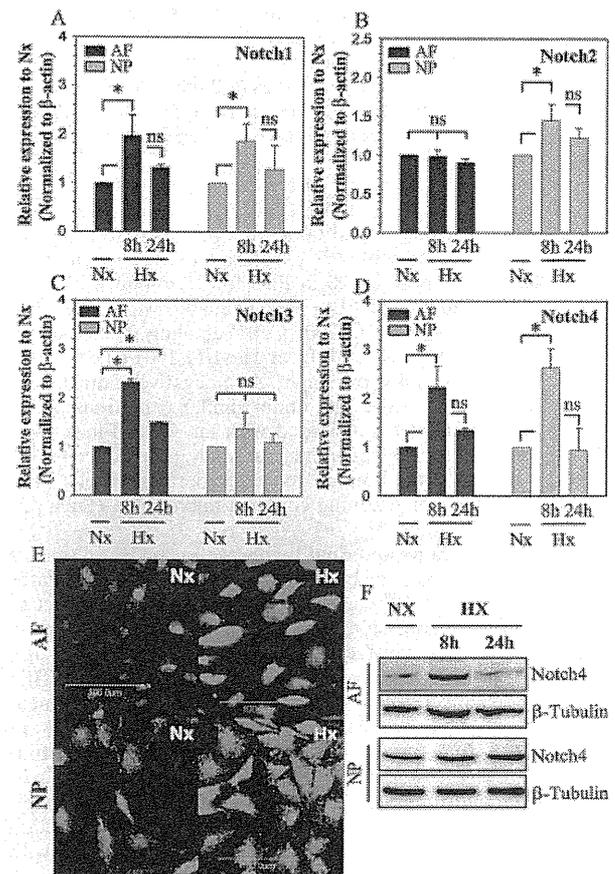


Figure 2. Hypoxic regulation of Notch receptor expression in rat disc cells. **A–D**, AF and NP cells were cultured under conditions of hypoxia (Hx) for 8 or 24 hours, or under normoxic (Nx) conditions, and the response to hypoxia was assessed by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction analysis of mRNA expression for Notch receptors Notch1 (**A**), Notch2 (**B**), Notch3 (**C**), and Notch4 (**D**). Values are the mean \pm SEM results from 3 independent experiments. * = $P < 0.05$. **E** and **F**, Notch-4 protein expression under conditions of hypoxia, or under normoxic conditions, was assessed in AF and NP cells by immunofluorescence analysis (after 24 hours of hypoxia) (**E**) and Western blotting (after 8 and 24 hours of hypoxia) (**F**). Anti- β -tubulin was used as a positive control in Western blots. Original magnification $\times 20$. See Figure 1 for other definitions.

was induced by hypoxia in annulus fibrosus cells but not in nucleus pulposus cells (Figure 2C). Finally, expression of Notch4 mRNA was induced by hypoxia in both cell types (Figure 2D).

To determine whether there was a concomitant elevation in Notch-4 protein expression associated with the oxemic status, the cells were evaluated by immunofluorescence analysis and Western blotting. In both cell types, there was an increase in Notch-4 expression in the hypoxic cultures, as indicated in Figures 2E and F. Protein expression was maximally elevated at 8 hours and returned to baseline levels by 24 hours in annulus fibrosus cells, while in nucleus pulposus cells, protein expression remained elevated up to 24 hours.

We then examined the effect of hypoxia on mRNA expression of the Notch ligands Jagged1 and Jagged2 in disc cells. As shown in Figure 3A, under conditions of hypoxia, there was induction of Jagged1 mRNA in annulus cells but not in nucleus pulposus cells. In contrast, in both annulus fibrosus and nucleus pulposus cells, Jagged2 mRNA expression was highly sensitive to hypoxia (Figure 3B). In both cell types, mRNA expression remained elevated for the first 8 hours; in annulus fibrosus cells, mRNA expression returned to baseline levels by 24 hours. In addition, the effect of hypoxia on Jagged-1 protein expression was examined in annulus fibrosus cells by Western blotting (Figure 3C) and immunofluorescence microscopic analysis (Figure 3D). In the hypoxic environment, a significant increase in the levels of Jagged-1 protein was seen (Figures 3C and D).

To further evaluate the relationship between Notch signaling and oxygen tension, we measured the expression of Notch target gene Hes1 in the rat disc cells under normoxic and hypoxic conditions. In annulus fibrosus cells, expression of Hes1 mRNA was induced after 8 hours of hypoxia and returned to baseline levels by 24 hours (Figure 3E). In contrast, in nucleus pulposus cells, Hes1 mRNA expression was insensitive to hypoxia. Western blot analysis showed that Hes-1 protein expression was also elevated in hypoxia, and stayed high in annulus fibrosus cells under hypoxic conditions for 24 hours (Figure 3F). As expected, Hes-1 protein expression in nucleus pulposus cells remained unchanged (Figure 3F).

To investigate whether Hes1 responds to Notch signaling, we cotransfected annulus fibrosus cells with a Notch-ICD expression plasmid, and then measured Hes1 promoter activity. Induced overexpression of Notch resulted in increased Hes1 promoter activity

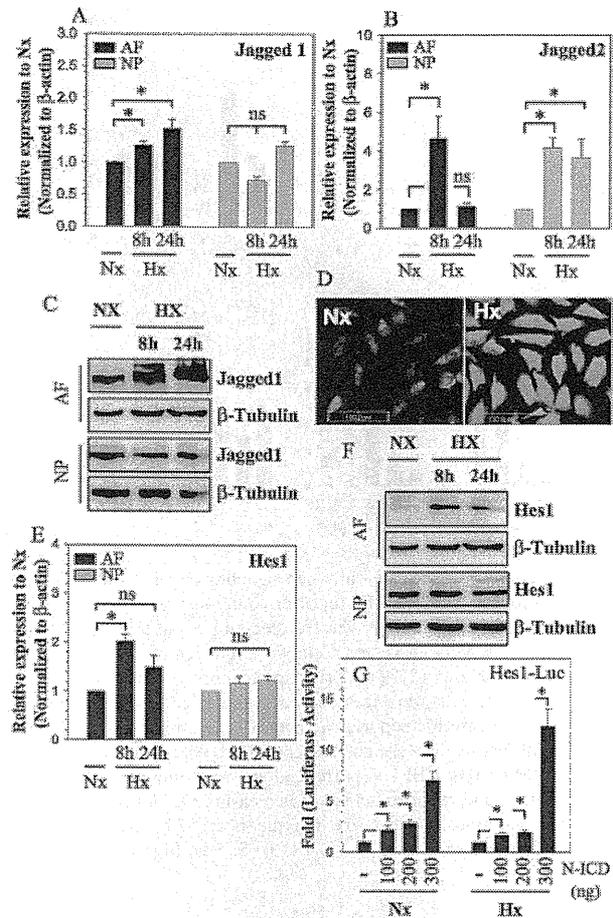


Figure 3. Hypoxic regulation of Notch ligand expression in rat disc cells. A and B, AF and NP cells were cultured under conditions of hypoxia (Hx) for 8 or 24 hours, or under normoxic conditions (Nx), and the response to hypoxia was assessed by real-time RT-PCR analysis of Jagged1 (A) and Jagged2 (B) mRNA expression. C and D, Jagged-1 protein expression under conditions of hypoxia, or under normoxic conditions, was assessed in AF and NP cells by Western blotting (after 8 and 24 hours) (C) and immunofluorescence analysis (after 24 hours) (D). Anti- β -tubulin was used as a positive control in Western blots. Original magnification $\times 20$. E and F, The effect of hypoxia on Hes1 gene expression and promoter activity was assessed in AF and NP cells cultured for 8 or 24 hours under conditions of hypoxia, or under normoxic conditions, using real-time RT-PCR analysis of Hes1 mRNA expression (E) and Western blotting of Hes-1 protein expression, with anti- β -tubulin used as a positive control (F). G, AF cells were cotransfected with a Hes1 reporter (-194/+160 bp) along with increasing doses of Notch1-intracellular domain (N-ICD), and Hes1 reporter activity was measured under normoxic and hypoxic conditions. Values in A, B, E, and G are the mean \pm SEM results from 3 independent experiments. * = $P < 0.05$. See Figure 1 for other definitions.

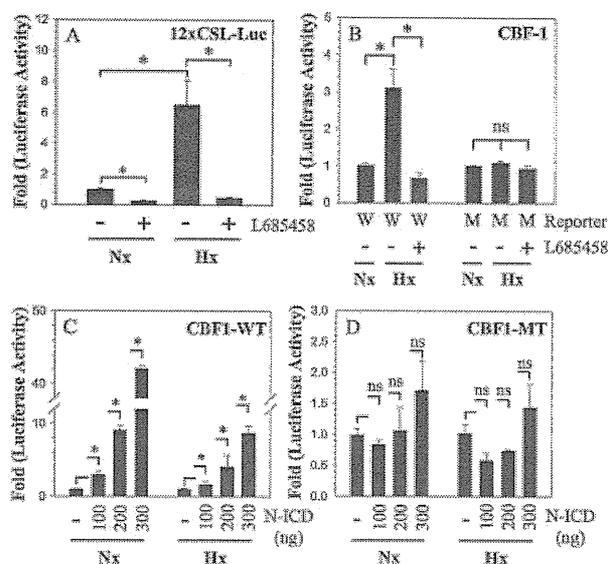


Figure 4. Effect of hypoxia on Notch signaling activity. **A** and **B**, The 12xCSL reporter (**A**) or CBF1 reporter containing a wild-type (W) or mutant (M) RBPJ κ motif (**B**) was transfected into rat annulus fibrosus cells along with pRL-TK vector. Cells were cultured for 24 hours under normoxic conditions (21% O₂) (Nx) or hypoxic conditions (1% O₂) (Hx), and some cells were treated with γ -secretase inhibitor L685458 (4 μ M), and luciferase reporter activity was measured. **C** and **D**, Rat annulus fibrosus cells were cotransfected with wild-type (WT) (**C**) or mutant (MT) (**D**) CBF1 reporters along with increasing doses of Notch1-ICD, and reporter activity was measured under normoxic and hypoxic conditions. Values are the mean \pm SEM results from 3 independent experiments. * = $P < 0.05$. See Figure 1 for other definitions.

under conditions of normoxia, and led to an even greater level of Hes1 promoter activity in the hypoxic state (Figure 3G).

We next evaluated the effect of hypoxia on the activity of the Notch-responsive reporter 12xCSL and Notch target gene CBF1 in annulus fibrosus cells (Figures 4A and B). Hypoxia significantly induced 12xCSL reporter activity. Moreover, induction of reporter activity was completely blocked by the γ -secretase inhibitor L685458. Similarly, hypoxia increased CBF1 promoter activity, and this was also significantly blocked by inhibitor treatment.

A CBF1 promoter harboring a mutation in the Notch-interacting RBPJ κ site is insensitive to both hypoxia and L685458 treatment. To further validate that CBF1 promoter activity is responsive to Notch signaling, we cotransfected annulus fibrosus cells with a plasmid encoding the Notch1-ICD. This plasmid significantly increased wild-type CBF1 promoter activity, under both

normoxic and hypoxic conditions (Figure 4C). The stimulatory effect of Notch-ICD on CBF1 promoter activity was evident in cultures with 100 ng of plasmid, and the effect was further enhanced when the concentration of plasmid was increased to 300 ng (Figure 4C). Moreover, the inductive effect was more pronounced in a state of normoxia. As expected, mutant CBF1 promoter activity was unresponsive to Notch coexpression (Figure 4D).

We also examined the relationship between Notch signaling and proliferation of annulus fibrosus cells. Treatment with γ -secretase inhibitor L685458 re-

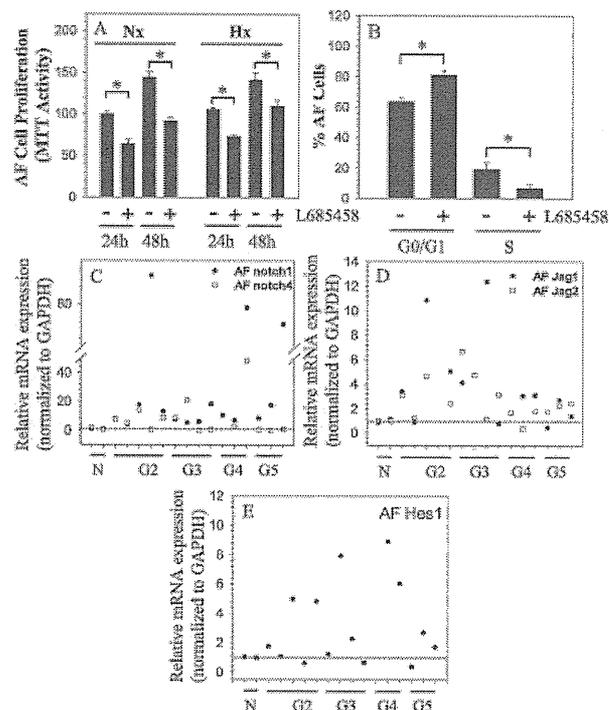


Figure 5. Role of Notch signaling in controlling AF cell proliferation. **A**, AF cells were cultured under normoxia (Nx) or hypoxia (Hx), with or without γ -secretase inhibitor L685458 (4 μ M), for 24–48 hours, and cell proliferation was measured by MTT assay. **B**, The cell cycle of AF cells treated with or without L685458 was determined by flow cytometry, with results expressed as the percentage of AF cells in G0/G1 phase or S phase. Values in **A** and **B** are the mean \pm SEM results from 3 independent experiments. * = $P < 0.05$. **C–E**, Messenger RNA expression of Notch receptors Notch1 and Notch4 (**C**), Notch ligands Jagged1 and Jagged2 (**D**), and Notch target gene Hes1 (**E**) was assessed by real-time RT-PCR in multiple human AF tissue samples in varying degrees of degeneration (Thompson grades 2–5 [G2–G5]) compared with normal controls (N) (controls $n = 2$, G2 $n = 5$, G3 $n = 4$, G4 $n = 3$, G5 $n = 3$). The mean expression of mRNA in normal control samples was set at 1.0 (horizontal line). See Figure 1 for other definitions.

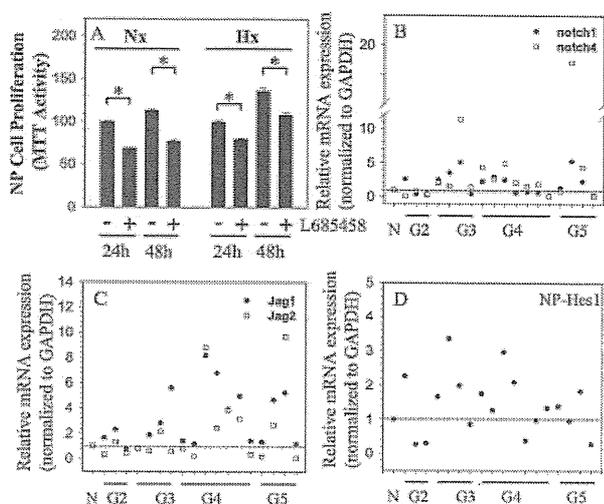


Figure 6. Role of Notch signaling in controlling NP cell proliferation. **A**, NP cells were cultured under conditions of normoxia (Nx) or hypoxia (Hx), with or without γ -secretase inhibitor L685458 ($4 \mu\text{M}$), for 24–48 hours, and cell proliferation was measured by MTT assay. Values are the mean \pm SEM results from 3 independent experiments. * = $P < 0.05$. **B–D**, Messenger RNA expression of Notch receptors Notch1 and Notch4 (**B**), Notch ligands Jagged1 and Jagged2 (**C**), and Notch target gene Hes1 (**D**) was assessed by real-time RT-PCR in multiple human NP tissue samples in varying degrees of degeneration (Thompson grades 2–5 [G2–G5]) compared with normal controls (N) (controls $n = 1$, G2 $n = 3$, G3 $n = 4$, G4 $n = 7$, G5 $n = 4$). The mean expression of mRNA in normal control samples was set at 1.0 (horizontal line). See Figure 1 for other definitions.

sulted in a significant suppression of annulus fibrosus cell proliferation under both normoxic and hypoxic conditions (Figure 5A). With the use of flow cytometry, we determined whether the cell cycle status was affected by L685458 treatment. The number of annulus fibrosus cells in S phase was significantly decreased after treatment with the inhibitor (mean \pm SEM $6.7 \pm 2.8\%$) when compared to the number of untreated control cells in S phase (mean \pm SEM $19.25 \pm 4.4\%$) (Figure 5B). In contrast, there was a greater accumulation of cells in G0/G1 phase after treatment (mean \pm SEM $81.10 \pm 3.3\%$) as compared to control cells left untreated (mean \pm SEM $63.4 \pm 2.9\%$ in G0/G1 phase).

Finally, we evaluated the expression of select Notch receptors, ligands, and the target gene Hes1 in Thompson-graded degenerated human annulus fibrosus tissue (Figures 5C–E). Results of real-time RT-PCR analysis showed that there was a trend toward an increase in expression of Notch1 and Notch4 mRNA (Figure 5C) in degenerated human disc tissue when compared to normal controls. Similarly, both Jagged1

and Jagged2 mRNA exhibited a similar trend in expression in degenerated disc tissue (Figure 5D). Hes1 mRNA expression was also responsive to degeneration, as indicated by a higher mRNA expression level at the earlier Thompson stages (grade 2 and grade 3) (Figure 5E). Not surprisingly, there was a considerable between-patient variation within the same grade.

We also examined the role of Notch signaling in regulating proliferation of nucleus pulposus cells. Similar to the effects on annulus fibrosus cells and irrespective of the oxemic tension, L685458 treatment resulted in a significant inhibition of the proliferation of nucleus pulposus cells (Figure 6A).

Finally, we measured the expression of Notch receptors, ligands, and Hes1 in graded degenerated human disc tissue from the nucleus pulposus (Figures 6B–D). Results of real-time RT-PCR analysis showed that there was a trend toward an increase in mRNA expression of Notch1 and Notch4 (Figure 6B) and Jagged1 and Jagged2 (Figure 6C) in degenerated human disc tissue when compared to normal controls. Similarly, there was a trend toward an increase in the expression of Hes1 mRNA in the degenerated nucleus pulposus (Figure 6D). As in the degenerated tissue of the annulus fibrosus, a considerable between-patient variation in mRNA expression was observed in the degenerated nucleus pulposus, among tissue of the same Thompson grade.

DISCUSSION

The basis for the studies described herein is that progenitor cell populations are present in the hypoxic tissue of the intervertebral disc (10). Accordingly, it would not be unreasonable to assume that the commitment of these cells into functioning cells of the annulus fibrosus and nucleus pulposus is dependent on the highly conserved, hypoxia-sensitive Notch signaling pathway (14,15,21). The present study revealed that there is a hypoxia-dependent increase in expression of specific Notch ligands and receptors and a concomitant increase in Notch signaling activity. In addition, we found that hypoxia induces expression of Hes1, the Notch target gene that is associated with maintenance of the undifferentiated state and determination of cell fate (22,23).

Accordingly, as has also been observed in articular cartilage, the hypoxic status of the disc may serve to conserve cell number and maintain the differentiated state of the cells by regulating Notch signaling activity (18). Our results showed that there is an increase in levels of Notch signaling proteins in degenerated human

disc tissue; however, the response is probably insufficient to maintain cell numbers and preserve the differentiated state of the cells. This observation could explain why there is a gradual age-dependent loss of cells and a decrease in the ability of resident cells to mount a reparative response.

In this study, we examined the expression and localization of Notch receptors and ligands in the intervertebral disc of skeletally mature animals. Both annulus fibrosus and nucleus pulposus tissue expressed Notch receptors (Notch-1–Notch-4) and ligands (Jagged-1, Jagged-2, and Delta-1). The observation that there was robust expression of the Notch target gene, *Hes1*, indicated the presence of an active Notch signaling pathway in the disc, a notion supported by the plethora of receptors and ligands that were present in both tissue types; a similar spectrum of receptors and ligands has been observed in cartilage (24). Consistent with this observation, although the study focused on defining components of the signaling pathway in specific tissues of the intervertebral disc, it would not be surprising to find that ligands from the inner annulus are associated with Notch receptors in the nucleus pulposus; likewise, ligands in the nucleus would serve to activate Notch signaling pathways in the annulus fibrosus. This interaction would be consistent with the notion that the disc itself represents an environmental niche that serves to integrate the functional activities of each of the component tissues (1).

There were marked differences in the pattern of expression of Notch receptors and ligands in the disc. While Notch2 mRNA transcript levels were elevated in both the annulus and the nucleus pulposus, Jagged-1 protein levels were significantly greater in the annulus than in the nucleus pulposus. In both tissues, Notch1 and Notch4 reporter expression was responsive to the level of PO_2 . In nucleus cells, Notch reporter expression was increased with hypoxia.

To examine the premise that hypoxia influences Notch signaling activity, the Notch-responsive reporters 12xCSL and CBF1 were utilized. Our results showed that there was increased activity of both reporters under hypoxic conditions. Moreover, reporter activity was completely inhibited when the hypoxic cells were treated with the γ -secretase inhibitor L685458. We confirmed the involvement of the signaling pathway using a reporter with a mutation in the CSL-binding site. In this case, hypoxic induction of Notch reporter activity was completely blocked. Results of these experiments lend direct support to the hypothesis that hypoxia promotes Notch signaling in disc cells. This result is consistent with observations of activation of Notch signaling in stem

cells and other cell types (16,17) and confirms previous findings showing that the Notch signaling pathway is responsive to hypoxia (14,15,21). Of note, since disc cells function *in vivo* in a low oxemic environment, it is likely that hypoxia is a key factor regulating the activity of this pathway (14,15,21,25).

In addition to the effects of hypoxia on Notch ligands and receptors, we noted that there was a hypoxia-dependent increase in Notch target gene activity. This finding suggests that in disc cells, *Hes1* expression is regulated in a hypoxia-dependent manner. It should be noted that in many types of tissue, *Hes1* is considered to be a key regulator of differentiation (23,26). *Hes1* is expressed by almost all undifferentiated cells and is required for the maintenance of this pool of cells. The observation that a progenitor cell pool is present in the disc, even in degenerated disc tissue (10), adds credence to the view that the hypoxic state enhances the activity of this powerful repressor of differentiation (23,26). Not surprisingly, the response of disc cells to HIF is markedly different from that of myogenic C2C12 cells (7,9,27). In stem cells and many cancer cells, HIF-1 interacts with the Notch coactivator Mastermindlike-1 to increase *Hes-1* promoter activity (25). Possibly, in the disc, HIF-1 α may promote recruitment of the Notch-ICD to the CSL-binding motifs in the *Hes1* promoter (15). While the mechanism by which this type of regulation is achieved is still under examination, functionally, it is more than likely a reflection of the normative environment of hypoxia in the disc.

Although regulation of Notch activity may be tissue specific, the signaling pathway has been shown to modulate cell proliferation and differentiation, as well as self renewal (18,22,23,26). To determine whether the Notch pathway regulates disc cell number, we evaluated nucleus pulposus and annulus fibrosus cell proliferation under normoxic and hypoxic conditions. In both cases, when treated with a γ -secretase inhibitor, a marked decrease in proliferation was observed. We reasoned that this suppressive effect would account for the decrease in cell number that characterizes degenerated human disc tissue (11–13).

Based on this observation, we evaluated major components of the Notch signaling pathway in cells of human discs in varying degrees of degeneration. While the number of control tissue samples was very limited (due to practical difficulties in acquiring normal human discs), measurement of mRNA expression levels suggested that as the tissue became degenerated, there was a rise in expression of Jagged1 and Jagged2 and possibly Notch4 and *Hes1*. Our results are consistent with those of a recent study that showed increased expression of

Notch1, Jagged1, and Hes5 in osteoarthritic cartilage (28). One explanation for the increase is that it possibly represents a compensatory response by resident cells to replace the lost or nonfunctional cells. Indeed, in the disc, as well as cartilage, a clonal proliferative response is a hallmark of degeneration (29–31). In both tissues, aside from the effects of hypoxia, other regulatory elements, including elevated signaling through the transforming growth factor β /Smad3 and Wnt/ β -catenin pathways, are likely to modulate Notch pathway activity (32–35). Thus, although some increase in the levels of Notch signaling proteins may occur, the dysregulated response is insufficient to mount a complete functional recovery and restoration of cell numbers in the tissue.

In terms of pursuing therapeutic strategies, it should be possible to promote tissue repair by 3 different approaches. First, specific ligands and receptors of the Notch signaling pathway may be manipulated to reactivate the surviving endogenous progenitor cells to promote their proliferation and subsequent commitment to the annulus fibrosus and nucleus pulposus cell phenotype. Second, molecules, such as the numb protein, that antagonize Notch signaling activity may be targeted in disc progenitor cells (36). Finally, the oxemic status of the intervertebral niche may be restored using redox-sensitive agents.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors were involved in drafting the article or revising it critically for important intellectual content, and all authors approved the final version to be published. Dr. Risbud had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

Study conception and design. Anderson, Sakai, Mochida, Albert, Shapiro, Risbud.

Acquisition of data. Hiyama, Skubutyte, Markova, Anderson, Yadla.

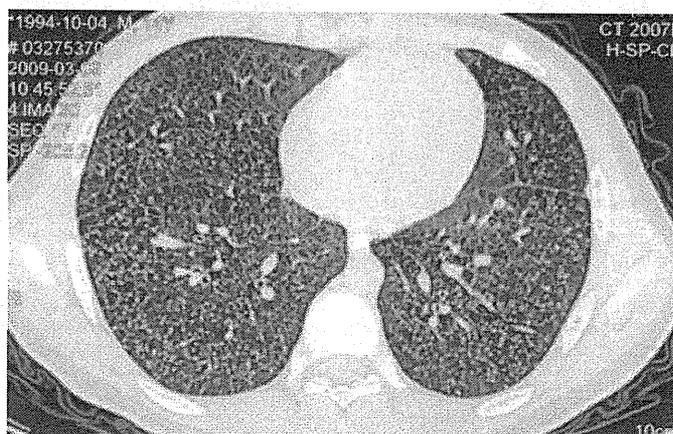
Analysis and interpretation of data. Hiyama, Skubutyte, Markova, Anderson, Yadla, Shapiro, Risbud.

REFERENCES

- Risbud MV, Schipani E, Shapiro IM. Hypoxic regulation of nucleus pulposus cell survival: from niche to notch. *Am J Pathol* 2010;176:1577–83.
- Gruber HE, Ashraf N, Kilburn J, Williams C, Norton HJ, Gordon BE, et al. Vertebral endplate architecture and vascularization: application of micro-computerized tomography, a vascular tracer, and immunocytochemistry in analyses of disc degeneration in the aging sand rat. *Spine* 2005;30:2593–600.
- Hassler O. The human intervertebral disc: a micro-angiographical study on its vascular supply at various ages. *Acta Orthop Scand* 1969;40:765–72.
- Rudert M, Tillmann B. Lymph and blood supply of the human intervertebral disc: cadaver study of correlations to discitis. *Acta Orthop Scand* 1993;64:37–40.
- Bartels EM, Fairbank JC, Winlove CP, Urban JP. Oxygen and lactate concentrations measured in vivo in the intervertebral discs of patients with scoliosis and back pain. *Spine* 1998;23:1–7.
- Lee DC, Adams CS, Albert TJ, Shapiro IM, Evans SM, Koch CJ. In situ oxygen utilization in the rat intervertebral disc. *J Anat* 2007;210:294–303.
- Rajpurohit R, Risbud MV, Ducheyne P, Vresilovic EJ, Shapiro IM. Phenotypic characteristics of the nucleus pulposus: expression of hypoxia inducing factor-1, glucose transporter-1 and MMP-2. *Cell Tissue Res* 2002;308:401–7.
- Agrawal A, Gajghate S, Smith H, Anderson DG, Albert TJ, Shapiro IM, et al. Cited2 modulates hypoxia-inducible factor-dependent expression of vascular endothelial growth factor in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disc. *Arthritis Rheum* 2008;58:3798–808.
- Risbud MV, Guttapalli A, Stokes DG, Hawkins D, Danielson KG, Schaer TP, et al. Nucleus pulposus cells express HIF-1 α under normoxic culture conditions: a metabolic adaptation to the intervertebral disc microenvironment. *J Cell Biochem* 2006;98:152–9.
- Risbud MV, Guttapalli A, Tsai TT, Lee JY, Danielson KG, Vaccaro AR, et al. Evidence for skeletal progenitor cells in the degenerate human intervertebral disc. *Spine* 2007;32:2537–44.
- Bertram H, Nerlich A, Omlor G, Geiger F, Zimmermann G, Fellenberg J. Expression of TRAIL and the death receptors DR4 and DR5 correlates with progression of degeneration in human intervertebral discs. *Mod Pathol* 2009;22:895–905.
- Tschoeke SK, Hellmuth M, Hostmann A, Robinson Y, Ertel W, Oberholzer A, et al. Apoptosis of human intervertebral discs after trauma compares to degenerated discs involving both receptor-mediated and mitochondrial-dependent pathways. *J Orthop Res* 2008;26:999–1006.
- Gruber HE, Ingram JA, Davis DE, Hanley EN Jr. Increased cell senescence is associated with decreased cell proliferation in vivo in the degenerating human annulus. *Spine J* 2009;9:210–5.
- Silvan U, Diez-Torre A, Arluzea J, Andrade R, Silio M, Arechaga J. Hypoxia and pluripotency in embryonic and embryonal carcinoma stem cell biology. *Differentiation* 2009;78:159–68.
- Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, et al. Hypoxia requires Notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 2005;9:617–28.
- Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, et al. Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med* 2008;14:299–305.
- Hilton MJ, Tu X, Wu X, Bai S, Zhao H, Kobayashi T, et al. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nat Med* 2008;14:306–14.
- Karlsson C, Jonsson M, Asp J, Brantsing C, Kageyama R, Lindahl A. Notch and HES5 are regulated during human cartilage differentiation. *Cell Tissue Res* 2007;327:539–51.
- Bao ZZ, Cepko CL. The expression and function of Notch pathway genes in the developing rat eye. *J Neurosci* 1997;17:1425–34.
- Hilibrand AS, Carlson GD, Palumbo MA, Jones PK, Bohlman HH. Radiculopathy and myelopathy at segments adjacent to the site of a previous anterior cervical arthrodesis. *J Bone Joint Surg Am* 1999;81:519–28.
- Diez H, Fischer A, Winkler A, Hu CJ, Hatzopoulos AK, Breier G, et al. Hypoxia-mediated activation of Dll4-Notch-Hey2 signaling in endothelial progenitor cells and adoption of arterial cell fate. *Exp Cell Res* 2007;313:1–9.
- Kobayashi T, Mizuno H, Imaiyoshi I, Furusawa C, Shirahige K, Kageyama R. The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes Dev* 2009;23:1870–5.
- Grogan SP, Olee T, Hiraoka K, Lotz MK. Repression of chondrogenesis through binding of Notch signaling proteins HES-1 and HEY-1 to N-box domains in the COL2A1 enhancer site. *Arthritis Rheum* 2008;58:2754–63.
- Williams R, Nelson L, Dowthwaite GP, Evans DJ, Archer CW. Notch receptor and Notch ligand expression in developing avian cartilage. *J Anat* 2009;215:159–69.
- Chen J, Imanaka N, Chen J, Griffin JD. Hypoxia potentiates

- Notch signaling in breast cancer leading to decreased E-cadherin expression and increased cell migration and invasion. *Br J Cancer* 2010;102:351–60.
26. Akimoto M, Kameda Y, Arai Y, Miura M, Nishimaki T, Takeda A, et al. *Hes1* is required for the development of craniofacial structures derived from ectomesenchymal neural crest cells. *J Craniofac Surg* 2010;21:1443–9.
 27. Agrawal A, Guttapalli A, Narayan S, Albert TJ, Shapiro IM, Risbud MV. Normoxic stabilization of HIF-1 α drives glycolytic metabolism and regulates aggrecan gene expression in nucleus pulposus cells of the rat intervertebral disk. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:C621–31.
 28. Karlsson C, Brantsing C, Egell S, Lindahl A. Notch1, Jagged1, and HES5 are abundantly expressed in osteoarthritis. *Cells Tissues Organs* 2008;188:287–98.
 29. Johnson WE, Eisenstein SM, Roberts S. Cell cluster formation in degenerate lumbar intervertebral discs is associated with increased disc cell proliferation. *Connect Tissue Res* 2001;42:197–207.
 30. Sharp CA, Roberts S, Evans H, Brown SJ. Disc cell clusters in pathological human intervertebral discs are associated with increased stress protein immunostaining. *Eur Spine J* 2009;18:1587–94.
 31. Lotz MK, Otsuki S, Grogan SP, Sah R, Terkeltaub R, D’Lima D. Cartilage cell clusters [review]. *Arthritis Rheum* 2010;62:2206–18.
 32. Tran CM, Markova D, Smith HE, Susarla B, Ponnappan RK, Anderson DG, et al. Regulation of CCN2/connective tissue growth factor expression in the nucleus pulposus of the intervertebral disc: role of Smad and activator protein 1 signaling. *Arthritis Rheum* 2010;62:1983–92.
 33. Hiyama A, Sakai D, Risbud MV, Tanaka M, Arai F, Abe K, et al. Enhancement of intervertebral disc cell senescence by Wnt/ β -catenin signaling–induced matrix metalloproteinase expression. *Arthritis Rheum* 2010;62:3036–47.
 34. Fu Y, Chang A, Chang L, Niessen K, Eapen S, Setiadi A, et al. Differential regulation of transforming growth factor β signaling pathways by Notch in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2009;284:19452–62.
 35. Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, Taketo MM, et al. The Wnt/ β -catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell* 2010;18:938–49.
 36. McGill MA, McGlade CJ. Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J Biol Chem* 2003;278:23196–203.

DOI 10.1002/art.30289

Clinical Image: Development of miliary tuberculosis following one intraarticular injection of etanercept

The patient, a 14-year-old boy with juvenile spondylarthritis, presented to our clinic with a 10-month history of active arthritis in his right knee joint as well as swelling of his heel. The arthritis was refractory to treatment with a combination of nonsteroidal antiinflammatory drugs, sulfasalazine, and a corticosteroid. After we confirmed that the results of a purified protein derivative (PPD) skin test and serum antitubercle bacilli antibodies (using TB-CHECK-1) were negative, a single 25-mg dose of etanercept was injected into his right knee, which resulted in rapid and dramatic improvement of the knee arthritis. Four weeks later, he developed fever (maximum temperature 39°C) and malaise. High-resolution computed tomography (HRCT) of the chest showed innumerable tiny, well-defined, miliary nodules throughout the lungs, pleural surfaces, and bronchovascular structures, which was suggestive of acute miliary pulmonary tuberculosis. Although sputum culture results were negative for *Mycobacterium tuberculosis*, the results of repeat PPD skin test and tests for tuberculosis antibodies were all positive. The patient was treated with a combination of rifampin, isoniazid, and pyrazinamide. The fever resolved after 2 weeks, the miliary nodules had nearly disappeared on repeat HRCT of the chest 3 months later, and the patient completed 1 year of antituberculosis therapy without incident.

Sheng Guang Li, MD
Chinese People's Liberation Army General Hospital
Beijing, China

III. 臨床応用の進歩

椎間板再生

持田 讓 治

An innovative disc repair for the degeneration

Joji Mochida

Department of Orthopaedic Surgery, Surgical Science,
Tokai University School of Medicine**Abstract**

Experimental studies in various animals showed that using a coculture system with direct cell-to-cell contact with mesenchymal stem cells (MSCs) significantly upregulated the biological activity of nucleus pulposus (NP) cells. Activated NP cells can be reinserted into the disc to inhibit intervertebral disc degeneration. In human cells, the positive effects of the coculture system with direct cell-to-cell contact seen in animal studies were also evaluated and cell proliferation, DNA synthesis, and PG synthesis were significantly upregulated. Chromosome abnormalities and tumorigenesis were not observed in the activated NP cells. Then the authors have started the specially designed clinical trial under the control of Ministry of Health, Labour and Welfare and now post operative follow-up has been continued with expected good outcome.

Key words: disc repair, mesenchymal stem cell, nucleus pulposus cell, coculture, clinical trial

はじめに

腰痛を主訴とする患者数は我が国では約800万人といわれる。その原因は多彩であるが、椎間板変性に一次的原因が求められるものと、椎間板変性による二次的関節症などを含めて、全体の約60%が椎間板性腰痛と診断されている。

脊柱には体重の支持、関節、神経のコンテナの3つの機能があるが、通常のカ齢変化に比べて著しい椎間板変性の進行は、これらの機能を大きく損ない、腰痛、下肢神経障害が出現する。椎間板変性の進行がもたらす病態は多彩で

あるが、その変性が過度になり体重の支持機構が破綻した場合、著明な腰痛や不安定感(giving way)の解消のために椎間を固定する手術が行われてきた。椎間固定術の臨床上的即時効果は良好であるが、本来関節機構を有する椎間を固定するために、数年の術後経過で固定椎間の隣接椎間板に新たな変性が生じ、いわゆる多数回手術(multiple operated back)に至る場合がある。1椎間固定時の隣接椎間障害の発生率は報告ごとにより差異が大きいが、東海大学整形外科において1980-88年までに施行されたL3/4, L4/5, L5/S1椎間の前方椎体間固定術48例中、2年以

上の経過観察で画像上の隣接椎間板障害発生は17例(全手術例の35%)であった。このうち12例が保存的治療を要し、無効のため追加手術となった例は7例であった。後方進入椎体間固定術と異なり前方椎体間固定術では、隣接椎間への影響が椎体間固定術による直接的影響としてとらえられるため、この自験例でのデータはmobile segmentとしての椎体間の可動性温存の重要性を示している。

一方、腰椎椎間板ヘルニア手術における椎間板髄核の温存に関しては長期間の議論があった。著者は顕微鏡下椎間板ヘルニア摘出術と経皮的椎間板(髄核)摘出術に関して、母髄核の温存の有無によるprospective studyを行い、両手術法ともに、母髄核を温存する手技が画像上、臨床上優れた結果であることを示した¹⁻³⁾。すなわち、脊椎発生期の遺物であり、誕生後は不要とされた椎間板髄核細胞が、20代前半までは椎間板代謝の制御や変性進行抑制に大きく関与することが判明した。

これら臨床上の検討結果から、脊柱の3つの機能を温存することを目的とし、変性椎間板に対する細胞移植療法にかかわる研究を1994年から継続してきた。プロジェクトは大きく2つに分かれ、骨髄間葉系幹細胞によって活性化された椎間板髄核細胞の移植術と、骨髄間葉系幹細胞そのものの移植術にかかわる研究である。前者は基礎研究から橋渡し研究を経て臨床研究に至っているため、その内容について解説する。

1. 骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着により活性化された椎間板髄核細胞の移植術

a. 動物実験

共同研究者西村⁴⁾は、椎間板髄核細胞が椎間板線維輪細胞を活性化させ、小動物(ラット)に作製した椎間板変性モデルにおいて、自家髄核細胞の変性椎間板への移植術によって、その後の当該椎間板変性の進行が遅延することを示した。大熊⁵⁾は日本白色家兎を用いた*in vitro*の研究で、髄核細胞の線維輪細胞への活性化を共培養(coculture)法で示した。山本⁶⁾は日本白色家

兎の髄核細胞を活性化するために骨髄間葉系幹細胞との共培養を導入し、髄核細胞の単培養に比べ、1髄核細胞あたりDNA活性化が20倍に、また同じく1髄核細胞あたりのプロテオグリカンの活性化が約15倍になることを示した。更に、細胞間接着を伴う共培養法も導入し、通常の共培養に比べDNA活性が1.4倍に、プロテオグリカンの活性化が1.6倍になることを示した。岩品、持田⁷⁾は細胞間接着を伴う共培養で活性化された髄核細胞の変性椎間板への移植実験を大型動物(ビーグル犬)で実施し、単純X線像、MRI画像、組織学的所見から、この方法で活性化された髄核細胞の移植によって、変性椎間板のその後の変性進行の抑制が極めて良好であることを示した。

これら小、中、大型動物での*in vitro*と*in vivo*の研究結果から、骨髄間葉系幹細胞によって体外で活性化された椎間板髄核細胞の変性椎間板への移植術は、その後の椎間板変性進行抑制、あるいは再生方向へのシフトを可能とする方法であることが示された。次の課題は、実験動物とは性質の異なるとされるヒト髄核細胞がヒト骨髄間葉系幹細胞によって活性化されるか否かの検討である。

b. ヒト椎間板髄核細胞での検討

渡辺⁸⁾は、東海大学医の倫理委員会の承認を得て、手術中に摘出したヒト椎間板髄核細胞を同一患者の骨盤腸骨から採取した骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化させる研究を行った(36症例)。自家血清から培養液を作製し、動物実験と同様の細胞間接着を伴う共培養を行った。骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化された髄核細胞のDNA活性は、髄核細胞の単培養と比べ培養7日間で5-7倍、プロテオグリカン活性も約5倍となり、ヒトにおいても実験動物と同様に、骨髄間葉系幹細胞によって髄核細胞が良好に活性化されることがわかった。活性化された髄核細胞の染色体検査を施行し、転座、欠損、倍数体などの異常所見は一切認められなかった。また、免疫不全マウスの皮下への活性化髄核細胞移植では、5カ月から最長13カ月までの経過観察を

表 1 臨床研究対象者の選定基準
(厚生労働省幹細胞臨床研究に関する審査委員会提出書類に準じる)

下記の選定基準を全て満たす患者を対象とする。

- 1) 年齢 20 歳以上 30 歳未満 性別を問わない
- 2) 腰椎椎間板変性疾患(腰椎椎間板ヘルニア, 腰椎分離症, 腰椎椎間板症)のうち腰椎椎体間固定術(前方固定術, 後方進入後方除圧+椎体間固定術)が適応される症例
- 3) 上記対象疾患, 適応術式の内, 移植対象となる下記変性椎間板を有する例が適応となる。すなわち, 腰椎椎間板ヘルニア, 腰椎分離症, 腰椎椎間板症で椎体間固定術を行った際に, その隣接椎間板が固定術を必要としないがすでに画像上の変性変化がある段階まで進行している場合である。すなわち画像上はその固定隣接椎間板が以下の 4 つの基準を満たす例である。
 - ① MRI で Pfirrmann 分類(椎間板ヘルニア例以外で使用)で III, あるいは Mochida 分類(contained 型椎間板ヘルニア例で使用)で moderate の変性像
 - ② 単純 X 線立位側面動態画像で 15 度以内の椎間可動性
 - ③ 単純 X 線立位側面中間位画像で 5 度以内の後方開大
 - ④ 単純 X 線立位側面画像で前方, 後方すべりのないもの

行ったが, 腫瘍化は一切認められなかった。以上より, ヒト椎間板髓核細胞は実験動物と同様に自家骨髄間葉系幹細胞によって活性化され, 細胞学的にも安全な状態であることが判明した。

c. ヒト活性化髓核細胞の臨床研究

2007 年 3 月に東海大学医の倫理委員会にヒト活性化髓核細胞の臨床研究に関する申請を行い承認された。引き続き, 厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会に研究課題名「自家骨髄間葉系幹細胞により活性化された椎間板髓核細胞を用いた椎間板再生研究」を申請した。8 カ月間の審議の結果, その臨床研究の実施が承認された。2009 年 2 月から臨床研究を開始し, 予定 10 例中既に 9 例で移植術が終了し, 現在経過観察中である。経過観察の最長例は 2 年 6 カ月を経過しているが, 全例とも有害事象などは一切なく, 良好な術後経過である。研究結果に関しては, その中間的まとめの論文を現在欧文誌で掲載待ちであり, また厚生労働省の当該委員会への報告書提出前であるため, 詳細なデータなどの記載は本稿では行わない。概略について記載することにとどめる。

1) 臨床研究の対象(表 1)

研究対象は腰椎椎間板変性疾患で椎体間固定術が必要な 20 代の症例であり, その固定隣接椎間板に, 固定術は不要であるが中等度の画像上の変性がある症例とする。

2) 移植術の方法(図 1)

椎体間固定術の際に摘出された椎間板髓核組織から髓核細胞を分散し, 術中に骨盤腸骨から採取した骨髓液より比重分離法で骨髄間葉系幹細胞を多数含む骨髄間質細胞を導出する。

髓核細胞, 骨髄間葉系幹細胞を各々 4 日間単培養後, 両細胞を細胞間接着を伴う共培養(3 日間)し, 骨髄間葉系幹細胞で活性化された髓核細胞を初回手術から 7 日間で, 固定椎間の隣接椎間板内に経皮的な手技にて移植する。移植する髓核細胞数の条件は厚生労働省の審査委員会では 100,000 個以上と条件づけされたが, 実際の工程では, 単位注入量あたり 1,000,000 個として移植された。

3) 移植術後の評価

活性化髓核細胞移植術後 1, 2 週, 1, 3, 6 カ月, 1, 2, 3 年時に血液生化学的検査と画像上の検討(上記移植後 1 カ月から 3 年まで)を行う。画像上, 移植前 MRI の Pfirrmann III の維持あるいは改善, 単純 X 線像上, 動態不安定性なし, 椎間高の 1/3 以上の狭小化なしを画像上の有効群と規定した。

4) 移植術後の経過概略

活性化髓核細胞移植術後の 9 症例では, 最短 6 カ月, 最長 2 年の経過観察が行われている。規定の経過観察時期に, 必要とされる全検討項目が調査されている。全例で移植後の有害事象

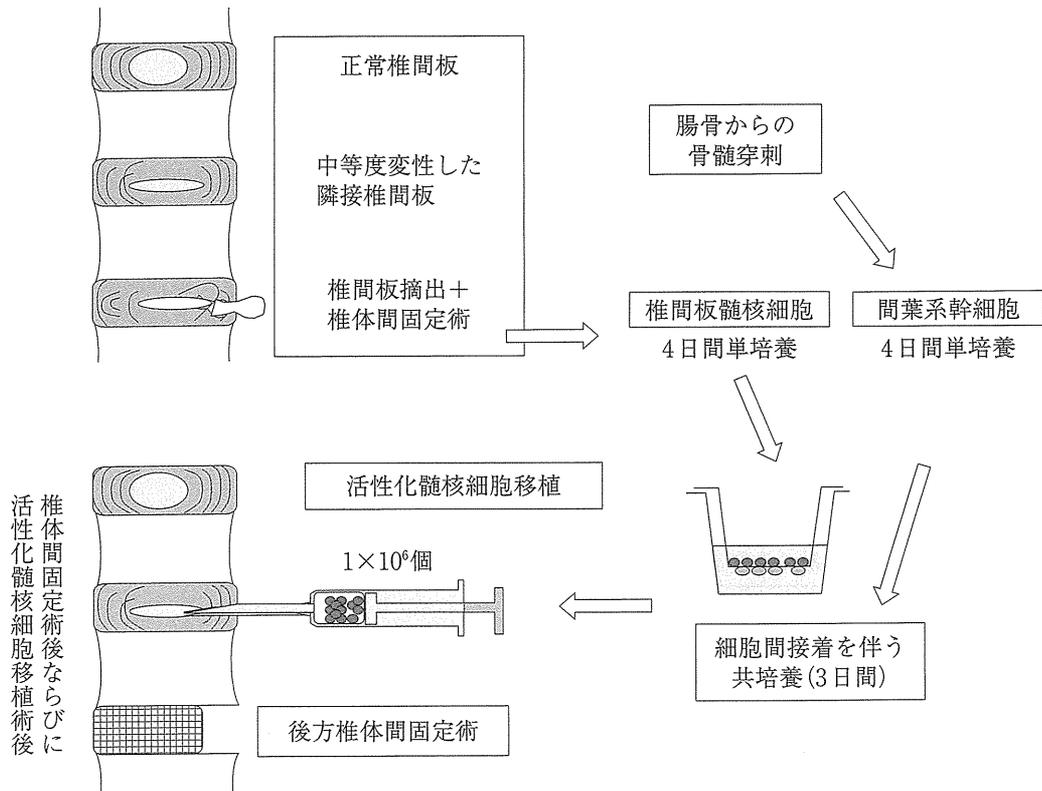


図1 本臨床研究の概要

は一切みられず、血液・生化学的検討における異常所見もみられていない。MRI上の観察で9例中2例でPfirrmann分類の改善像がみられているが、半定量化のデータも含めて移植術後3年までの経時的観察後の結論を待ちたいと考えている。

2. 考 察

椎間板変性に対する再生医学的研究は、成長因子やサイトカインの注入療法、遺伝子療法、細胞移植療法、組織工学的再生、同種間椎間板移植術など多彩に継続されている。しかし、椎間板には加齢に伴う自然の変性過程があり、その場合には多くは無症状である。一方、加齢変化以上に進行した椎間板変性を抑制するためには、成長因子やサイトカインなどの液性成分の注入は効果の持続性も含めて不十分である。遺伝子治療は本疾患が良性疾患であるために、risk versus benefitの観点からはその適応に疑問がある。組織工学的手法はその可能性が未知であり、同種間移植も国際的な概念からは受け入れ

難しい内容である。したがって細胞移植療法の役割が椎間板変性抑制上は大きいと考えられる。

今回紹介した骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化された髄核細胞の移植術は、元々椎間板内の環境にある髄核細胞を体外で活性化し移植する方法であり、細胞学的にも自然で安全性の高い方法といえる。椎間板髄核細胞自体の細胞活性が低い傾向があり、したがって変性椎間板に移植するにはその細胞活性を向上させる必要がある。骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を有する共培養で活性化された髄核細胞の移植術は、骨髄間葉系幹細胞のもつ feeding cellとしての性質を十分に発揮させた優れた方法であり、短期間の培養で髄核細胞に高い細胞学的活性を与えている。体外での7日間の培養過程は細胞処理の専門家を要する高度の手技ではあるが、今回の9例の経験では極めて安定した安全な髄核細胞の活性化に成功している。近々に10例目が予定されており、今後は高度医療を基盤とした臨床適応の拡大とともに、今回の臨床研究で得られた素材を用いた研

究の結果から、より多彩な椎間板変性病態への適応が可能であると考えられる。冒頭で紹介した骨髄間葉系幹細胞そのものを移植細胞源とする基礎研究も別途終了しており、こちらも橋渡しから臨床研究への移行を検討中である。

おわりに

骨髄間葉系幹細胞のもつ feeding cell としての性状と、細胞・組織導出という性状をともに活用した多角的な椎間板再生治療への試みが、今後も継続されると考えられる。

■ 文 献

- 1) Mochida J, et al: Percutaneous nucleotomy in lumbar disc herniation. Patient selection and role in various treatments. *Spine* **18**: 2212-2217, 1993.
- 2) Mochida J, et al: The importance of preserving disc structure in surgical approaches to lumbar disc herniation. *Spine* **21**: 1556-1563, 1996.
- 3) Mochida J, et al: The risks and benefits of percutaneous nucleotomy for lumbar disc herniation. A 10-year longitudinal study. *J Bone Joint Surg Br* **83**: 501-505, 2001.
- 4) Nishimura K, Mochida J: Percutaneous reinsertion of the nucleus pulposus. An experimental study. *Spine* **23**: 1531-1538, 1998.
- 5) Okuma M, et al: Reinsertion of stimulated nucleus pulposus cells retards intervertebral disc degeneration: an in vitro and in vivo experimental study. *J Orthop Res* **18**: 988-997, 2000.
- 6) Yamamoto Y, et al: 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* **29**: 1508-1514, 2004.
- 7) Mochida J: New strategies for disc repair: novel preclinical trials. *J Orthop Sci* **10**: 112-118, 2005.
- 8) Watanabe T, et al: Human nucleus pulposus cells significantly enhanced biological properties in a coculture system with direct cell-to-cell contact with autologous mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* **28**: 623-630, 2010.

椎間板の代謝とバイオロジー

— 椎間板再生への細胞移植法も含めて

Metabolism and biology of the intervertebral disc — Introduction of disc repair with cell therapy



持田 譲治

Joji MOCHIDA

東海大学医学部外科学系整形外科

◎椎間板は人体最大の無血管組織であり、上下の椎体からの拡散機構により栄養の補充と老廃物の除去という代謝を行っている。中心部の髄核組織はとくに酸素分圧が低いが、この過酷な環境で生きる髄核細胞が20歳前後までは椎間板全体の代謝を制御し、変性を抑制する働きを担っている。髄核細胞の起源はいまだに不明な点が多いが、未分化で多分化能をもつ細胞集団が同定されつつあり、椎間板変性進行の抑制や再生研究を進めるうえで重要な知見である。変性椎間板の進行抑制のための活性化椎間板髄核細胞移植術が、厚生労働省“ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針”に準拠して、著者らによりすでに開始されている。



Key word: 椎間板, 髄核細胞, 代謝, 変性, 再生, 細胞移植

脊椎椎骨は、前方を椎間板、後方を椎間関節により上下と連結し、回旋・屈伸運動により三次元的可動性を呈している。椎間板は脊椎長軸方向に加わる圧を緩衝する役割をもち、脊椎の生体力学上も重要な役割を果たしている。椎間板の機能不全は脊柱可動性の低下、支持性の破綻、脊柱全体の配列不良を引き起こし、種々の変性疾患発生につながっていく。腰痛の一次的・二次的原因の多くの部分が腰椎椎間板変性によって引き起こされている。椎間板の変性とその抑制の機序を探ることの意義はきわめて大きい。

椎間板の基本構造

椎間板の構造は特殊である。髄核(nucleus pulposus)、線維輪(annulus fibrosus)、軟骨終板(cartilage endplate)から構成されており、線維輪外層部を除き血行に乏しい、人体最大の無血管組織である。椎間板細胞の起源はいまだに不明な部分が多い。髄核細胞は産生する基質の性状が軟骨細胞に似ているが、プロテオグリカン(PG)の比率や含水量に差がみられる。

椎間板の栄養と代謝経路

椎間板構成細胞の多くが抗血管誘導作用をもつことが分子生物学的手法によって判明している。これは、線維輪最外層部に腰椎分節動脈の枝が分布する10代までの正常椎間板を除いて椎間板内には血管構造がみられない事実と相関している。椎間板内への栄養導入と老廃物の導出という代謝機序は、椎間板と接する上下椎体経由の拡散機構で行われている。軟骨終板がその拡散機序をつかさどるおもな通路とされる¹⁾。

Holm²⁾によれば椎間板の中心部の酸素分圧は0.3~1%前後と著しく低値であり、石原³⁾は好気性代謝と嫌気性代謝の切り替えが酸素供給状態に合わせて行われていると報告した。また、Risbudらはhypoxia induced factor-1 α などの嫌気性を示すマーカーをもつ細胞が髄核中心部に多いことを示し、低酸素分圧で生存する椎間板中心部の細胞の特異的な性状を報告した⁴⁾。

椎間板細胞の特徴

本稿では椎間板変性のinitial triggerであり、また変性抑制と再生研究のターゲットとなる髄核細胞

胞, 髓核組織について詳細に記載する.

髓核細胞は 10 代半ばまでは脊索細胞(notochordal cell), 軟骨様細胞(chondrocyte-like cell), 線維芽細胞様細胞(fibroblast-like cells)など性状の異なる複数の細胞から構成され, その後 20 歳前後で脊索細胞の消失が加速し, 軟骨様細胞が増加してくる(「サイドメモ」参照).

成人髓核組織は髓核細胞とその細胞外基質としての PG, II 型を主としたコラーゲンなどと水分から構成され, 約 8 割が水分であるが, これは PG のムコ多糖であるヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸, ケラタン硫酸などが陰性荷電をおびるためである. 加齢などによって II 型コラーゲンが減少し, それにつれ細胞外基質の PG 量と含水量が減少してくる.

髓核細胞の単培養(monoculture)では紡錘型の線維芽細胞様の形状がめだつが, 近年確立した三次元培養法によって円形を呈する細胞が増加し, コロニー形成が確認できるようになった. この結果, 多種多彩な細胞集団である髓核細胞の本来の姿が示され, 髓核細胞の起源・性状を知るうえで大きな前進となった⁵⁾(図 1).

細胞代謝や変性・再生を評価するうえで, 各種増殖因子や細胞調節蛋白による影響の把握が重要である. 三次元培養法などの新手法の導入によって, これらの液性因子が髓核細胞の増殖能と PG 合成能を制御することが判明してきている. TGF- β (transforming growth factor- β), IGF-I (insulin

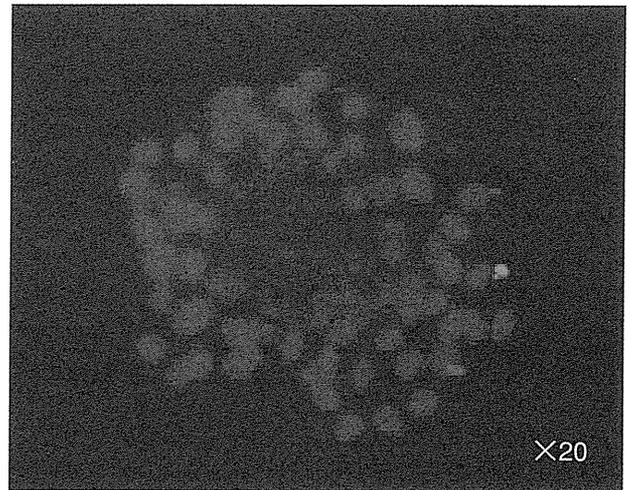


図 1 三次元培養し,コロニー形成したヒト髓核細胞単培養とはまったく異なった形状と性状が示されている.

like growth factor-1), PDGF(platelet derived growth factor), EGF(epidermal growth factor), BMP(bone morphogenetic protein 2, 4, 7(OP-1)), FGF(fibroblast growth factor)などがその代表であるが, 従来は小型から大型に至る実験動物とは性状が大きく異なるとされてきたヒトの椎間板を用いた研究においても, 動物実験と同様の結果が明らかにされている⁶⁾. また, 椎間板内の代謝には MMP(matrix metalloproteinases)1, 2, 3 や TIMP(tissue inhibitor of metalloproteinase), cathepsin D, K などが関与することも判明している. とくに椎間板細胞のアポトーシスへの関与の観点から注目されている.

一方, 髓核細胞の生物学的活性が高いことが新知見として得られている. 文献上, 髓核組織は胎生期の遺物であり, 不要なものとされてきた. しかし, 著者らは腰椎椎間板ヘルニアに対する手術療法において, 母髓核(椎間板構造の中心部分=髓核組織そのもの)の温存が良好な臨床結果につながることを示し, 10 代後半から 20 代前半までは髓核組織が椎間板全体の変性進行を抑制している可能性を報告した^{7,8)}.

この臨床的報告で示された髓核組織の役割は, 2 つの実験動物を用いた研究によってもその正当性が示された. Aguiar ら⁹⁾は脊索細胞と成熟髓核細胞の共培養で, 脊索細胞より分泌される液性因子が脊索細胞以外にその起源をもつ髓核細胞の細

サイド メモ

髓核細胞の起源

髓核細胞の起源は明らかにされていない. 10 代半ばまでは脊索細胞(notochordal cell), 軟骨様細胞(chondrocyte-like cell), 線維芽細胞様細胞(fibroblast-like cells)など性状の異なる複数の細胞から構成され, その様態は三次元培養の発達によって詳細になってきた. 細胞の特性を示す細胞表面マーカーも完全には同定されていない. とくに脊索系細胞では不明な部分が多い. 個体の年齢によって出現する表面マーカーも異なり, 再生された細胞の評価のうえで大きな支障となっている. 未分化で多分化能をもつ細胞が含まれることが最近の分子生物学的手法で明らかになってきている.

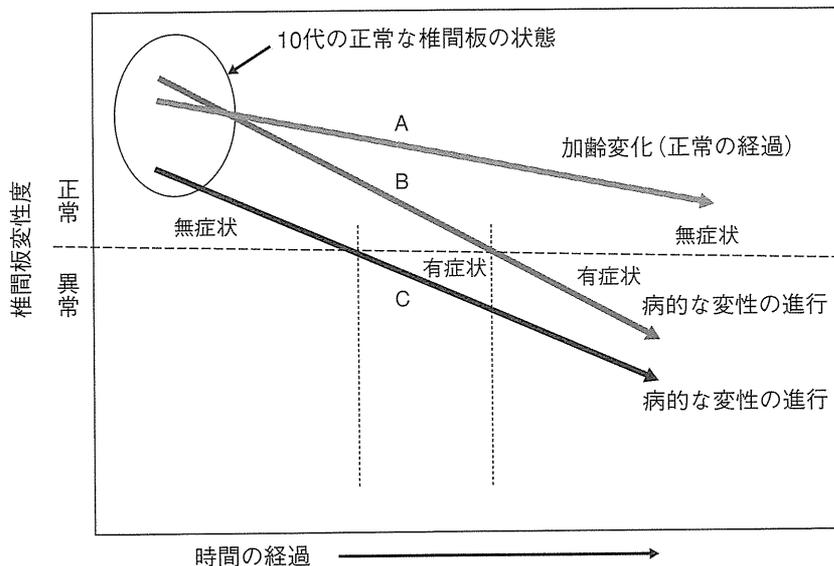


図 2 椎間板の加齢変化と病的な変性進行の違い

両者には組織学的・分子細胞学的には質的差異はないと考えられ、変性進行の速度差が差異を生む大きな要素と考えられる。

胞外基質合成能を亢進させることを示した。Okuma ら¹⁰⁾は日本白色家兎の髓核細胞と線維輪細胞を共培養し、髓核細胞が線維輪細胞に対して細胞増殖性の役割を果たし、とくに基質合成能を著しく亢進させることを示した。著者らのヒト椎間板を用いた *in vitro* の検索でも、髓核細胞が線維輪細胞を明らかに活性化させることが示されている¹¹⁾。

Aguiar, 大熊らの研究結果から、椎間板内各種細胞はたがいに関連しあいながら異化・同化の均衡を保つことが示され、その代謝均衡の破綻が組織レベルでの加齢変化ならびに病的な変性変化につながると考えられる。

椎間板の代謝と変性

年齢変化と病的な変性との違いについては明確に示されていないが、単位時間当りでの変性程度の大きいものが病的椎間板変性進行と考えられる(図2)。椎間板変性は非可逆的過程とされるが、また、細胞レベルでの破綻が組織全体としての変性につながる前の段階で修復される機序も考えられ、今後の変性抑制・再生の研究上は、細胞レベルでの破綻の段階からフォーカスをあてる必要がある。

椎間板の加齢変化は髓核細胞で優位であり、またその出現時期も早い。10代の髓核細胞は脊索細

胞優位であるが、その減少と軟骨様の細胞増加によってPGの減少が生じる。中年以降では線維芽細胞様細胞が増加し、水分含量も30~40%前後まで低下する。椎間板組織の弾性維持に直接反映する水分含量の著しい低下が線維輪構造を破綻させ、生体力学的特性を悪化させる。

椎間板の代謝と変性には炎症性細胞も大きく関与する。変性椎間板内ではNO(nitric oxide), MMPs, interleukin-6, prostaglandin E2などの発現が著明となり、炎症が惹起される。VEGF(vascular endothelial growth factor)などの血管誘導因子により線維輪外層以外の部分へも血管の新生と浸潤が進み、変性性変化が加速する。

椎間板変性の発生やその程度と関連する遺伝子(COL2A, COL9A2, vitamin D3 receptor geneなど)も判明してきているが、複数遺伝子による関与も推察され、未知な部分も多い。

椎間板再生に向けた生物学的治療

椎間板変性抑制、再生をめざし、生物学的治療に向けた研究が盛んに行われている。①椎間板細胞基質の活性を高めるためのサイトカインや成長因子の注入療法、②遺伝子療法、③細胞移植療法、④組織工学的手法による椎間板組織の作成、⑤同種椎骨椎間板椎骨ユニットの移植など、いろいろな取組みが基礎研究、橋渡し研究、臨床研究とし

て行われている。とくに、変性が進行する原因となる髄核細胞の減少に対して髄核細胞活性を高める手法(蛋白注入, 遺伝子治療, 薬物療法など)や, 減少する細胞を補充する手法(組織, 細胞移植)などが, 現在試みられている生物学的再生治療の柱といえる。

すなわち成長因子, bone morphogenetic protein 2, osteogenic protein 1 や growth differentiation factor 5 などの合成蛋白や多血小板血漿, NF- κ B デコイを椎間板細胞活性を高めるために注入する方法, TGF- β や TIMP1 などの遺伝子発現を増強, または減少させることによる遺伝子治療¹²⁾, および CPA-926(エスクレチンプロドラッグ)などの薬物療法¹³⁾である。

著者らの施設では③の細胞移植療法を選択し, 1994 年以来研究を継続してきた。①では変性の比較的軽い椎間板が対象となり, 変性の自然経過例との適応に混乱が予想され, ②では安全性の課題が未解決であり, ④では体外での作成が困難であり, ⑤は同種移植であるためにわが国での実現性が乏しいと考えられる。一方, 椎間板変性は細胞数に依存することが判明しており, また中等度までの変性に対応できる抑制力・再生力をもつことから, ③の細胞移植療法を選択した。髄核細胞を移植細胞として選んだが, これは生物学的に自然なもともとある細胞の還元であり, 高い細胞学的安全性があり, 自家細胞を用いれば組織拒絶反応もなく, 中等度までの椎間板変性に対応可能である。すなわち, 臨床応用を考える際には自家髄核細胞はもっとも現実的な細胞であると判断した。一方, 髄核細胞自体は細胞数が少なく, 細胞活性も低い。このため, 自家骨髄間葉系幹細胞のもつ feeding cell としての力を利用し, 細胞間接着を伴う骨髄間葉系幹細胞との共培養で髄核細胞を活性化することを考案し, 基礎実験を継続した。

小動物実験にてその良好な効果を証明¹⁴⁾し, さらにヒトに近い軟骨異栄養犬種の変性椎間板へ経皮的活性化髄核細胞移植を行った。単純 X 線画像上の椎間板高と MRI での所見や組織学的評価によって線維輪内層構造が良好に保持されていることが確認され, 椎間板変性の進行抑制が可能であることが示された。

動物実験とヒト椎間板細胞を用いた *in vitro* の結果⁶⁾から, より短期間で細胞を体外培養で増幅させうることが証明された。

● 椎間板再生医療に向けた臨床研究

厚生労働省“ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針”に基づき, 2007 年 4 月に“厚生労働省ヒト幹細胞臨床研究に関する審査委員会”に対して, ヒト骨髄間葉系幹細胞との細胞間接着を伴う共培養で活性化されたヒト椎間板髄核細胞を用いた臨床研究を申請し, 2008 年 1 月にその実施が承認された。10 症例に対する第 I 相試験を主眼とした臨床研究として 2009 年 2 月から開始した。すでに 9 症例を終了し経過観察中である。その詳細については別途英文雑誌へ投稿中であり, 本稿ではその詳細は記載できないが, その経過観察期間のすべてにおいて有害事象, 血液生化学的データの異常, 画像上の異常はいっさい生じていない。安全な細胞移植療法であることが示されている¹⁵⁾。

● おわりに

椎間板の代謝や変性を制御する内因・外因については不明な点が多い。しかし, 臨床研究で得られた椎間板髄核組織の役割の重要性が基礎的研究によって追試証明され, その結果, 髄核は椎間板の代謝や変性のコントロールタワーであるとする事実が判明した。その結果から椎間板変性抑制・再生のための橋渡し研究, 臨床研究が継続されているが, 髄核, 線維輪, 軟骨終板という椎間板の構成組織が一個体のライフサイクルのなかで, どの時点でどのような役割を担っているかについての研究がさらに必要である。

本稿では, 人体最大の無血管組織である椎間板組織の代謝と変性のバイオロジーを髄核組織にとくに焦点をあてて解説した。

文献

- 1) 千葉一裕: 腰痛の臨床(戸山芳昭編). メジカルビュー社, 2001, pp.43-46.
- 2) Holm, S. and Nachemson, A.: *Spine*, 8: 866-874, 1983.
- 3) 石原裕和・他: 臨床整形外科, 29: 357-361, 1994.

- 4) Risbud, M. V. et al. : *J. Cell Biochem.*, **98** : 152-159, 2006.
- 5) 酒井大輔, 持田讓治 : 臨床整形外科, **38** : 920-922, 2003.
- 6) Watanabe, T. et al. : *J. Orthop. Res.*, **28** : 623-630, 2010.
- 7) Mochida, J. et al. : *Spine*, **21** : 1556-1563, 1996.
- 8) Mochida, J. et al. : *J. Bone Joint Surg.*, **83B** : 501-505, 2001.
- 9) Aguiar, D.J. et al. : *Exp. Cell Res.*, **246** : 129-137, 1999.
- 10) Okuma, M. et al. : *J. Orthop. Res.*, **18** : 988-997, 2000.
- 11) Mochida, J. : *J. Orthop. Sci.*, **10** : 112-118, 2005.
- 12) Kobayashi, Y. et al. : *Eur. Cell Mater.*, **17** : 15-22, 2009.
- 13) 大熊正彦・他 : 日本整形外科学会雑誌, **79** : S966, 2005.
- 14) Yamamoto, Y. et al. : *Spine*, **29** : 1508-1514, 2004.
- 15) 持田讓治 : 日本再生医療学会雑誌, **9** : 428-432, 2010.

* * *

変性椎間板に対する細胞移植療法*

酒井大輔 持田 譲治**

[整形外科 62 巻 8 号 : 744~748, 2011]

はじめに

脊椎における“motion segment”とは、上下椎体とそれに挟まれる椎間板および後方の椎体関節によって構成される運動単位である。椎間板は椎体にかかる軸圧を分散するとともに椎間関節と連動して脊椎の前後側屈、回旋運動を可能にする一方で、脊柱管を形成し、後方の神経組織を保護する役割を担っている。椎間板にかかる軸圧は臥位時に比べ立位では2倍以上、立位前屈位では4倍以上となり、大きな圧力にも耐えうる予備能力をもつ¹⁾。この耐圧機構を構成しているのが強靱な線維性軟骨で形成される線維輪と、中心部に存在し、含水性の高いプロテオグリカンに富む細胞外基質、それを産生する細胞で占められた髄核である。椎間板の組織変性、機能障害は“motion segment”の不安定性を惹起し、持続的な不安定性は椎間関節の変性変化や椎体間の狭小化、すべりなど二次的変性変化をもたらす。そしてこれらの不可逆的变化の進行過程では椎間板ヘルニア、変性すべり症、脊柱管狭窄症などとして脊椎内を下降する神経組織をしばしば障害し、痛みや運動知覚障害へとつながる。ゆえに著しい日常生活動作（ADL）や生活の質（QOL）の低下なく一生を過ごすためには、椎間板の健康維持が重要である。

椎間板変性に起因する脊椎の二次的変化が及ぼす疾患、すなわち椎間板ヘルニア、変性すべり症、変性側弯症、変形性脊椎症、腰部脊柱管狭窄症の治療については

改めて記すことでもないが、保存的治療で改善しない場合の多くは、諦めてうまく付き合うか、手術となる。手術的治療のコンセプトは、神経圧迫があればその除圧、過度な不安定性や除圧後に生じる不安定性には“motion segment”の人工的な固定、そして脊柱全体のバランス異常にまで及ぶ変形に対しては矯正固定が用いられる。脊椎の自然な老化過程においても“motion segment”は次第に固定されていくことから考えると、固定術は人工的に老化を早めているともとらえられる。さらに、本来可動性がある箇所が固定されることに伴う隣接椎間への負荷増加による障害も起こることから、短期的には有効であっても、脊椎固定術は脊柱全体の長期的恒常性維持の観点からは多くの問題をはらむ。脊椎固定術、矯正術におけるインストゥルメンテーションが進化する一方で、不適合例、インプラント業界主導的な不必要な固定術の普及などの問題もあり、患者にとっても混乱と不利益を招いている。しかしながら、各固定術の適応基準は多因子に影響を受けるため明確に決めることができないことや、固定術後でも長期健康を保てる症例の存在、固定術しか治療手段がない場合があることも事実である。実際には健全な医師-患者関係のもと、互いに納得したうえでの治療が行われることが望ましいと考えられるが、脊椎固定術が技術的に円熟期を迎えた現在、より脊椎の自然に近い状態を維持あるいは回復させる治療法が開発されるべきではないかと考える。

脊椎以外の運動器や運動器以外の疾患についてその治

Key words : intervertebral disc, regenerative medicine, stem cell

* Cell transplantation therapy for intervertebral disc degeneration

** D. Sakai (講師), J. Mochida (教授) : 東海大学整形外科 (Dept. of Orthop. Surg., Surgical Science, Tokai University, School of Medicine, Isehara).

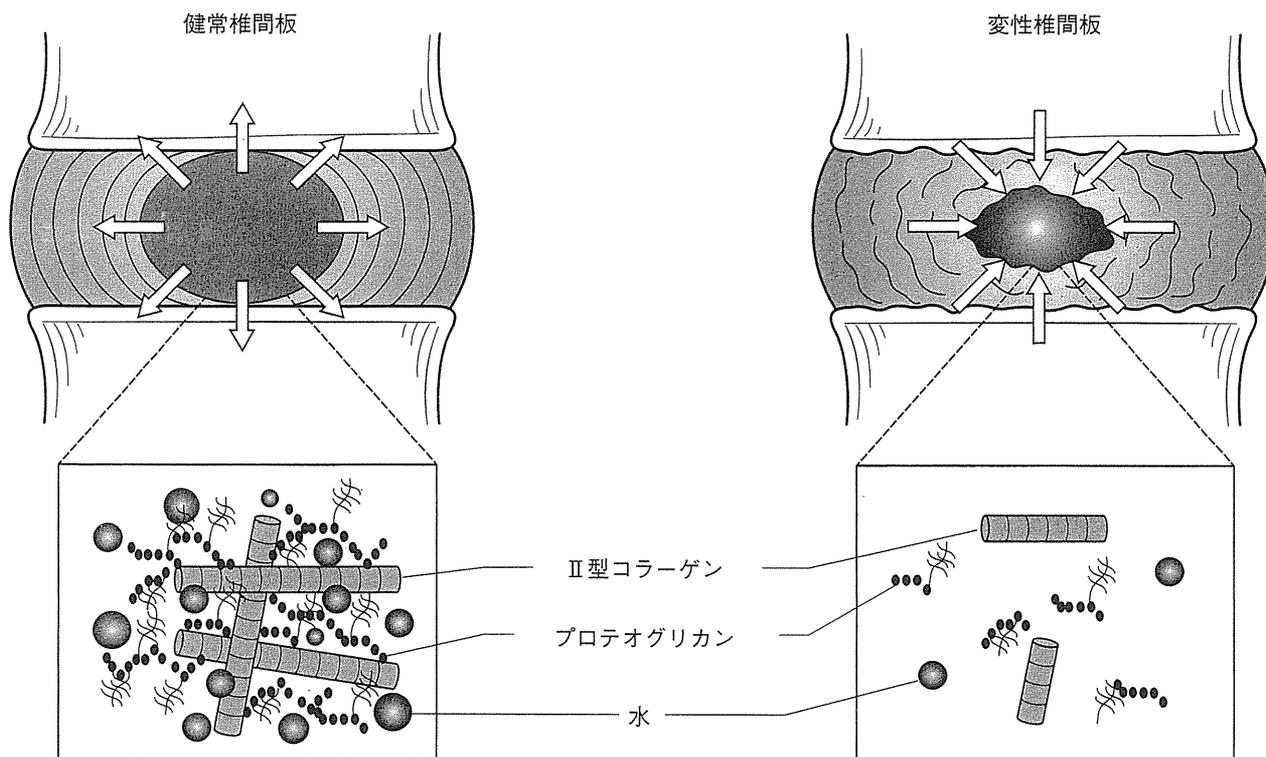


図 1. 変性による椎間板内環境変化

療法開発の変遷をたどると、まずは病態の分子レベルからの理解、その過程で明らかとなったさまざまな分子、細胞、細胞を取り巻く微小環境が新規治療法開発の鍵となってきた。そしてその進行予防、さらには再生へと応用されつつある。椎間板変性に対してもこれらの研究は以前より世界で、特に日本から多く報告されてきたが、残念ながらその量や深度については骨や軟骨に及ばない。

I. 椎間板変性過程に起こる細胞環境変化

個人差は大きいですが、加齢に伴う椎間板変性は髄核部での構成細胞の変化とそれによる基質変化、その後起こる線維輪構造の破綻が強く関係していると考えられる。髄核の細胞構成は、小児期までは形態学的にいわゆる細胞が大きく、空胞をもつ“脊索性”髄核細胞優位であり、細胞数は約4,000個と少なく、10歳代までに脊索性細胞が減少、それに伴って形態学的に軟骨細胞に類似した髄核細胞が増加、プロテオグリカン量が減少、運動的に椎間板内の水分含量も減る(図1)。60歳代以降では細胞数が約5,000個程度まで増加、線維芽細胞様細胞も増殖し、プロテオグリカン含量は10歳代での65%から半分

以下の30%程度まで低下し水分が減少する。線維輪や終板軟骨でも構成細胞に変化は起きるが、髄核ほど顕著ではない。したがって、加齢に伴い髄核内の細胞構成がかわることで水分含量が相対的に減少し、生体力学的特性が減少、機能低下へとつながり外的要因による構造破綻を起こしやすくなる。

II. 椎間板細胞の起源

最近の髄核細胞の起源とその運命についての sonic hedge hog (*Shh*)-Cre トランスジェニックマウスを用いた lineage 研究によると、マウスにおいては細胞の形態はかわるものの、髄核を形成する細胞のほとんどすべてが一生涯脊索に由来することが示された²⁾。また早期に“脊索性”髄核が消失する成牛とヒト髄核細胞の遺伝子発現プロファイリング研究からも、髄核領域に存在する細胞のほとんどが形態のいかにかわらなく、T-box gene brachury といった脊索由来の遺伝子マーカーを発現していることが明らかとなり、以前よりしばしば議論されてきた線維輪内層細胞や終板軟骨細胞が軟骨様細胞として脊索性髄核細胞と置き換わるといった可能性はきわめて少ないことが示された^{3,4)}。古典的には脊索は発