

学位論文

「GFP 骨髄キメラマウスを用いた椎間板傷害後に増加する
マクロファージの起源解析」

DM18009 川久保 歩

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程
臨床医科学群 整形外科学
指導教授 高相 晶士

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

論文要旨

<背景>

腰痛の生涯罹患率は約 85%と報告されており、性・年齢階級別にみた症状別有訴率においても高齢になるほど男性女性ともに腰痛の有訴率が高い。疼痛が3ヶ月以上継続する慢性腰痛の多くは既存の薬物治療には抵抗性であり治療にしばしば難渋する。慢性腰痛の原因として椎間板由来の疼痛が注目されている。近年変性が進んだ椎間板内にマクロファージが存在することが示されている。我々は過去の研究で傷害された椎間板ではマクロファージが増加し、炎症を介して椎間板の変性に関与する可能性を明らかにしてきた。これまですべてのマクロファージは骨髄に由来し、組織障害などの環境変化により動員されると考えられていた。しかし最近の研究で内在性マクロファージが骨格筋や末梢神経などの組織に存在し組織の恒常性に寄与していることが示されている。マクロファージには炎症性サイトカインを発現する M1 マクロファージと抗炎症や組織修復に関与する M2 マクロファージが存在し、そのどちらもがヒト椎間板に存在していると報告されている。しかし、椎間板傷害後に増加するマクロファージが動員性マクロファージによるものか内在性マクロファージなのかについては明らかになっていない。本研究では緑色蛍光タンパク質 (GFP) トランスジェニック骨髄キメラマウスを用いて、椎間板傷害におけるマクロファージの起源を検討した。

<対象と方法>

10週齢の雄の C57BL/6J マウスと GFP トランスジェニック C57BL/6J マウスを用いた。C57BL/6J マウス骨髄から有核細胞を採取後、100 ng/ml 単球コロニー刺激因子 (monocyte colony-stimulating factor, M-CSF) 含有培地で培養し、骨髄由来マクロファージ(Bone marrow-derived macrophage, BMM)を得た。また、C57BL/6J マウスから椎間板を採取し、酵素処理後、抗 F4/80 抗体を用いた椎間板由来マクロ

ファージ (disc-derived macrophages, DM) を採取した。BMM, DM を IL-4, IL10, IL4+IL10, LPS+IFN- γ で刺激し、BMM, DM の M1, M2 マクロファージへの分化能 Real time PCR で検討した。C57BL/6J マウスに 10.5 Gy 放射線照射後、GFP トランスジェニックマウス骨髄より採取した有核細胞を移植した。移植 2 か月後、末梢血を用いたキメラ率を検討後、27G 針を用いてマウスの尾椎椎間板傷害モデルを作製した。椎間板を傷害させない群を傷害 0 日として椎間板を採取し、さらに傷害後 1 日、3 日、7 日、14 日に採取した。フローサイトメトリーを用いて骨髄由来マクロファージ (GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞) と内在性マクロファージ (GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞) の割合を検討した。また、骨髄由来、内在性マクロファージにおける CD86 (M1 マクロファージマーカー) および CD206 (M2 マクロファージマーカー) の陽性率を検討した。

<結果>

BMM, DM ともに IFN / LPS 刺激により M1 マクロファージマーカーである *Cd86*, *Inos* の発現が増加した。また、両細胞ともに IL-10 刺激により *Cd86* の発現が抑制された。M2 マクロファージマーカーである *CD206* の発現は両細胞ともに IL-4 刺激、IL10 刺激で増加し IL-4 / IL-10 刺激でさらに増加し、*Fizz1* の発現は IL-4 / IL-10 刺激により増加した。また、両細胞ともに IFN / LPS 刺激により *Cd206* の発現が抑制された。末梢血の GFP キメラ率はいずれの個体も 97% 以上であった。傷害後 1 日目から 14 日目まですべて、F4/80+ CD11b+ 細胞は増加した。傷害 0 日目では GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞が GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞に比べ有意に多かった。傷害後 1 日目から GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞は増加し、その割合は GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞に比べ有意に多かった。CD86+ 細胞の割合は椎間板傷害後 3 日目から 14 日目まで GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞で有意に増加していたが、GFP- F4/80+ CD11b+ 細

胞では椎間板傷害後 1 日目から 14 日まで有意に減少していた。一方、GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞および GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞における CD206+ 細胞は傷害後 7 日目から 14 日目まで増加したが、その割合は GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞で有意に多かった。

<考察>

マウス椎間板内在マクロファージは骨髄マクロファージのように M1、M2 分化能を有する可能性が示唆された。GFP 骨髄キメラマウスにおいて GFP+ 細胞と CD86+ GFP+ 細胞は椎間板傷害後より増加した。CD206+ 細胞は GFP- 細胞で多く認められた。以上より M1 マクロファージは動員性、M2 マクロファージは内在性マクロファージに由来することが明らかになった。M1 マクロファージは炎症性変化に関与し、M2 マクロファージは抗炎症や組織修復に重要な役割を果たすことが知られている。マクロファージ動員に関与するケモカイン、サイトカインは新たな治療標的になり得る。また、内在性マクロファージは炎症抑制や修復促進のための重要な細胞標的かもしれない。

<結語>

本研究において、骨髄由来マクロファージ、椎間板内在性マクロファージは *in vitro* において双方 M1、M2 マクロファージの分化能を有するにも関わらず、椎間板傷害で増加する M1 マクロファージは動員性由来、M2 マクロファージは内在性由来であることが示唆された。

目次

	頁
1. 序論	1
2. 方法	
2-1. 使用動物	2
2-2. 椎間板内在性マクロファージと骨髄由来マクロファージの作成	2
2-3. Real - Time PCR	3
2-4. GFP 骨髄トランスジェニックキメラマウスの作成	4
2-5. 椎間板傷害モデルの作成およびフローサイトメトリー法	4
2-6. 統計	5
3. 結果	
3-1. 椎間板内在性マクロファージと骨髄由来マクロファージの分化能の 検討	5
3-2. IVD 傷害後の M1 マクロファージの起源の検討	6
3-3. IVD 傷害後の M2 マクロファージの起源の検討	7
4. 考察	7
5. 結語	9
6. 今後の課題	9
7. 謝辞	9
8. 引用文献	10
9. 業績目録	13
10. 図表	16

1. 序論

腰痛の生涯罹患率は約 85%と報告されており、性・年齢階級別にみた症状別有訴率においても高齢になるほど男性女性ともに腰痛の有訴率が高い。圧迫骨折や椎間板ヘルニアなど、診察所見や画像所見等で原因がわかる特異的腰痛は腰痛患者の約 15%と言われており、その他 85%は、はっきりと原因が特定できない非特異的腰痛である。しばしば問題となる腰痛としては発症から 3 ヶ月以上腰痛が持続する慢性腰痛がありその多くが非特異的腰痛に分類される。慢性腰痛は既存の薬物治療に抵抗性であり治療に難渋する。また、患者の ADL を低下させ健康寿命に影響を及ぼすと考えられる。そのため新たな治療ターゲットの検討は極めて重要である。

慢性腰痛の主な原因として椎間板 (intervertebral disc, IVD) の変性や傷害が報告されている¹。傷害の原因となっている細胞として注目されているのがマクロファージである。マクロファージには M1 または M2 の表現型が存在し、M1 マクロファージは炎症性サイトカインを発現し、M2 マクロファージは抗炎症や組織修復に関与する^{2,3}。また、マクロファージが変性 IVD 内に存在する報告が散見され、IVD の病態において重要な役割を果たす可能性があることを示唆している^{4,5,6}。

以前はすべてのマクロファージは骨髄に由来し、組織傷害などの環境変化により動員されることが考えられていた。近年、骨格筋や心筋、坐骨神経など複数の組織に常在し、組織の恒常性に寄与している内在性マクロファージが存在することが明らかになってきた^{7,8,9}。最近の研究では、変性ヒト IVD で M1 および M2c マクロファージの両方が増加したことが報告されている^{10,11}。また、IVD は人体で最大の無血管組織であるが、正常な椎間板にマクロファージ様細胞が存在することがいくつかの研究で報告されている^{10,11}。しかし椎間板傷害後の増加する M1、M2 マクロファージが動員性に由来するものか内在性に由来するものかは明らかになっていない。

今回我々は、マウスの IVD 傷害後に増加するマクロファージの起源について緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP) 骨髄トランスジェニックキメラマウスを用いて検討した。

2. 方法

2-1. 使用動物

10 週齢の雄の C57BL/6J マウスおよび GFP トランスジェニック C57BL/6J マウスを用いた。マウスは、研究期間中は 12 時間の明暗サイクル下で、 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\% \pm 10\%$ に維持された半バリア動物収容システムで維持した。すべての実験プロトコルは、北里大学医学部動物管理委員会によって承認された (承認番号: 2019125)。

2-2. 椎間板内在性マクロファージと骨髄由来マクロファージの作成

内在性マクロファージの分化能を評価するために、10 週齢 C57BL/6J マウスの IVD から椎間板由来マクロファージ (disc-derived macrophages, DM) を単離した。正常なマウスの椎間板には $3.6\% \pm 0.6\%$ の F4/80+ 細胞が含まれており、ほぼ全ての F4/80+ 細胞 ($99.1\% \pm 0.1\%$) は CD45+ CD11b+ 細胞であった。そのため、抗 F4/80 抗体を用いて IVD からマクロファージを単離した。5 匹のマウスから IVD を抽出し、各 IVD ($n = 5$) を $2 \text{ mg} / \text{mL}$ のタイプ I コラゲナーゼ (Sigma, St. Louis, MO) で 37°C 、16 時間処理し、 $100 \mu\text{m}$ のフィルター (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) で濾過した。得られた単核細胞を、ビオチン標識抗 F4/80 抗体 (Biolegend, San Diego, CA) を含む 1 mL リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered-saline, PBS) に懸濁した。 4°C で 30 分間インキュベーションした後、細胞をまず PBS で洗浄した。ストレプトアビジン標識磁性粒子 (BD

IMag Streptavidin Particles Plus-DM; BD Biosciences, 東京) と混合し、インキュベートした。IMag 分離システム (BD Biosciences) で 30 分間氷上に置いた。結合していない(F4/80-)細胞を除去した後、10%ウシ胎児血清を含む 2 mL の α -MEM (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY) を添加し、磁気支持体からチューブをはずした後、F4/80+細胞を回収し、椎間板内在性マクロファージを得た。

骨髄由来マクロファージ (bone-marrow macrophages, BMM) は骨髄細胞をマウスの大腿骨から単離し、次いで 100 ng / mL の M-CSF (BioLegend) の存在下で α -MEM 中で培養した。4 日目に、非付着細胞を除去し、新鮮な M-CSF の存在下でさらに 3 日間培養した。

M1 および M2 マクロファージの分極をもたらすために、DM および BMM を、10 ng / mL リポポリサッカライド (LPS) (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY) + 50 ng / mL インターフェロン γ (IFN γ)、10 ng / mL IL-4、10 ng / mL IL-10 (すべて BioLegend)、および IL 4+IL-10 でそれぞれ 24 時間刺激した。 α -MEM で 24 時間インキュベートしたものをコントロール群として用いた。

2-3. Real - Time PCR

作成した DM、BMM を TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて細胞から RNA を抽出した、SuperScript™ III 逆転写酵素 (Invitrogen) を用いて相補的 DNA を合成した。M1 マクロファージマーカーである *Cd86*、*Inos* と M2 マクロファージマーカーである *Fizz1*、*Cd206* の発現を Real - Time PCR にて検討した。2 μ l の相補的 DNA、特異的プライマーセット (最終濃度 0.2 μ M)、および 12.5 μ l の SYBR Premix Ex Taq (Takara, Kyoto, Japan) を混合し、反応液として用いた。各プライマーの塩基配列は(表 1)に示す。定量 PCR はリアルタイム PCR 検出システム (CFX-96; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて行った。PCR

反応は、95°Cで60秒、その後、95°Cで5秒間、および60°Cで30秒間を40サイクルとした。標的遺伝子のmRNA発現レベルはグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ(*Gapdh*)を用いて標準化した。相対発現はすべてのコントロールサンプルの平均を使用して計算した。

2-4. GFP 骨髄トランスジェニックキメラマウスの作成

GFP トランスジェニックマウス (C57BL/6J バックグラウンド) 20 匹をドナーとして使用した。10%ウシ胎児血清、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加した α -MEM 培地を用いて大腿骨および脛骨を切除し骨髄細胞を採取した。レシピエントとして C57BL / 6J マウス 60 匹使用した。レシピエント C57BL / 6J マウスに累積放射線量をモニターするためのフィルター (Cu, 0.5 mm; Al, 2 mm) を装備した MBR-1505R X 線照射装置 (日立メディコ、東京、日本) を用いて 10.5 Gy 照射した。大腿骨および脛骨から採取した GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を、放射線照射後のレシピエントマウスの脛骨に注入し GFP 骨髄トランスジェニックキメラマウスを作成した。移植後 4 週目に尾静脈から採取した末梢血細胞において、フローサイトメトリーを用いてキメラ率を確認した。

2-5. 椎間板傷害モデルの作成およびフローサイトメトリー法

GFP 骨髄トランスジェニックキメラマウスを用いて椎間板傷害モデルを作成した。イソフルランによる吸入麻酔後、ミダゾラム、ドミトール (塩酸メドトミジン)、およびベトルファー (酒石酸ブトルファノール) の 1 : 3 : 2 混合物を上肢筋肉内に注射した (0.05 ml / 100g 体重)。その後尾骨 (Co) 5-6 および Co 6-7 IVD を 27 ゲージの針で 10 回穿刺し、IVD 損傷モデルを作成した。また、尾椎を損傷しない群をコントロール群 (post injury day 0, PID0) とした。椎間板傷害モデルは椎間

板損傷後 1 (PID1)、3 (PID3)、7 (PID7)、14 (PID14) 日目に椎間板組織を採取した。
(各時点で $n = 5$)。2 mg / ml の I 型コラゲナーゼ (Sigma, St. Louis, MO) で 18 時間 37°C でコラゲナーゼ処理をし、100 μ m フィルター (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) で濾過した。椎間板由来の細胞を brilliant violet 421 標識抗 F4 / 80 抗体 (BioLegend, San Diego, CA)、PE / Cy7 標識 CD45 抗体 (BioLegend)、APC/Cy 標識 CD11b 抗体 (BioLegend) で染色し、M1 マクロファージマーカーとして APC 標識抗 CD86 抗体 (BioLegend) で染色し 4°C で 45 分間インキュベートした。M2 マクロファージマーカーとしては APC 標識抗 CD206 抗体 (BioLegend) を同様に染色した。リン酸緩衝液で 2 回洗浄した後、フローサイトメトリー (FACSVerse™, BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて細胞集団の解析を行った。データ分析には Flow Jo 10.0 (Tree Star, Ashland, OR) を使用した。

2-6. 統計手法

統計は、SPSS 11.0 ソフトウェア (SPSS Inc., Chicago, IL) を用いて行った。2 群間の比較には t-test を用いた。3 群以上の比較には一元配置分散分析と Bonferroni の事後多重比較検定を用いた。p < 0.05 を有意差ありとした。すべての結果は Mean \pm SEM で示した。

3. 結果

3-1. 椎間板内在性マクロファージと骨髄由来マクロファージの分化能の検討

DM, BMM ともに IFN / LPS 刺激により M1 マクロファージマーカーである *Cd86*、*Inos* の発現が増加した (*Cd86*, $p = 0.016$, $P = 0.005$; *Inos*, $p = 0.010$, $p = 0.005$, 図 1A-D)。また、両細胞ともに IL-10 刺激により *Cd86* の発現が抑制された ($p = 0.025$, $p = 0.033$ 図 1A,B)。M2 マクロファージマーカーである *Fizz1* の発現は両

細胞ともに IL-4 / IL-10 刺激により増加した ($p = 0.048$, $p < 0.001$ 図 1 E,F)。

Cd206 の発現は両細胞ともに IL-4 刺激、IL10 刺激で増加し IL-4 / IL-10 刺激でさらに増加した (IL-4, $p = 0.024$, $p = 0.006$; IL-10, $p = 0.025$, $p = 0.015$; IL-4 / IL-10, $p = 0.015$, $p < 0.001$ 図 1 G,H)。また、両細胞ともに IFN / LPS 刺激により *Cd206* の発現が抑制された ($p < 0.001$, $p < 0.001$ 図 1 G,H)。

3-2. IVD 傷害後の M1 マクロファージの起源の検討

末梢血の GFP キメラ率はいずれの個体も $97\% \pm 0.5\%$ であった (図 2A)。

IVD 傷害後の椎間板における F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は、傷害後 1 日目から 14 日目まですべてで増加した (PID1, $p = 0.015$; PID3, $p < 0.0001$; PID7, $p < 0.0001$; PID14, $p < 0.001$; 図 2 B, C)。GFP- F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は傷害 0 日目と比べ、椎間板傷害後 3 日目で有意に増加した ($p < 0.001$; 図 2 D) が、障害後 7 日目、14 日目は有意に減少した (PID7, $p = 0.034$; PID14, $p = 0.031$; 図 2 D)。GFP+ F4/80+ CD11b+ 細胞は傷害 0 日目と比べ、傷害後 1 日目から 14 日目まで有意に増加した (PID1, $p = 0.015$; PID3, $p < 0.001$; PID7, $p < 0.001$; PID14, $p < 0.001$; 図 2 D)。GFP- 細胞集団における F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は傷害 0 日目において GFP+ 細胞集団における F4/80+ CD11b+ 細胞の割合よりも有意に高かった ($p = 0.021$; 図 2 D)。GFP+ 細胞集団における F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は傷害後 1 日目、3 日目、7 日目、14 日目において GFP- 細胞集団における F4/80+ CD11b+ 細胞の割合よりも有意に高かった (PID1, $p < 0.001$; PID3, $p < 0.001$, PID7, $p = 0.010$; PID14, $p < 0.001$; 図 2 D)。

CD86+ F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は傷害後 0 日目と比べ、障害後 3 日目、7 日目、14 日目における GFP+ 細胞集団において有意に増加した (PID3, $p < 0.001$, PID7, $p < 0.001$; PID14, $p < 0.001$; 図 3 A,B)。対照的に、GFP- 細胞集団におけ

る CD86+ F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は傷害後 1 日目、3 日目、7 日目、14 日目において有意に減少した (PID1, $p = 0.009$; PID3, $p < 0.001$; PID7, $p < 0.001$; PID14, $p = 0.002$; 図 3 A,B)。GFP+ 細胞集団における CD86+ F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は、傷害後 1 日目、3 日目、7 日目、14 日目において GFP- 細胞集団よりも有意に高かった (PID1, $p < 0.001$; PID3, $p < 0.001$; PID7, $p < 0.001$; PID14, $p < 0.001$; 図 3 A,B)。

3-3. IVD 傷害後の M2 マクロファージの起源の検討

CD206+ F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は、傷害後 7 日目、および 14 日目において、傷害 0 日目と比較して GFP- 細胞集団内で有意に増加した (PID7, $p = 0.001$; PID14, $p = 0.038$; 図 4 A,B)。また、GFP+ 細胞集団においても傷害後 7 日目で有意に高かった ($p = 0.007$; 図 4 A,B)。しかしながら、GFP- 細胞内の CD206+ F4/80+ CD11b+ 細胞の割合は、傷害後 3 日目、7 日目および 14 日目における GFP+ 細胞内の割合と比較して有意に増加した (PID3, $p = 0.011$; PID 7, $p = 0.011$; PID 14, $p = 0.010$; 図 4 A,B)。

4. 考察

DM, BMM ともに IFN / LPS 刺激により M1 マクロファージマーカーである *CD86*、*iNOS* の発現が増加し、M2 マクロファージマーカーである *Fizz1*、*CD206* の発現は両細胞ともに IL-4 / IL-10 刺激により増加した。以上より *in vitro* では DM、BMM 両細胞とも M1 および M2 マクロファージの分化能を有していることが示唆された。

GFP 骨髄キメラマウスにおいて、椎間板傷害後 1 日目から 14 日目までマクロファージの増加が認められた。また、傷害後 1 日目から GFP+ 細胞は増加し、その

割合は GFP⁻ 細胞に比べ有意に多かった。CD86⁺ 細胞は椎間板傷害後 3 日目から 14 日目まで GFP⁺ 細胞で有意に増加していたが、GFP⁻ F4/80⁺ CD11b⁺ 細胞では椎間板傷害後 1 日目から 14 日まで有意に減少していた。過去の報告で M1 マクロファージは IVD 傷害後に増加し、TNF- α および IL-1 β 産生を介して変性過程に寄与することが示されている^{12,13,14,15}。TNF- α は、培養された椎間板髄核細胞において、ADAMTS-4、-5、MMP-1、-3、-13 の発現を上昇させた^{14,15}。また、IL-1 β はヒト IVD 細胞において MMP-3、-13、ADAMTS-4 の発現を刺激した¹²。GFP 骨髄キメラマウスを用いた我々の研究では、M1 マクロファージは主に GFP⁺ 細胞であることが示され、M1 マクロファージは主に動員性由来であることが示唆された。単球のリクルートを阻害することは、IVD の炎症や変性を防ぐための治療戦略となる可能性がある。

一方、GFP⁺ 細胞および GFP⁻ 細胞における CD206⁺ 細胞は傷害後 7 日目から 14 日目まで増加したが、その割合は GFP⁻ F4/80⁺ CD11b⁺ 細胞で有意に多かった。M1 マクロファージは動員性由来であったのに対して、M2 マクロファージは内在性由来であることが示唆された。骨格筋や脂肪組織において内在性マクロファージは M2 様の表現型を示すことが明らかになっている^{7,16}。M2 様の組織内在性マクロファージは IL-10 や TGF- β を産生し、炎症および組織恒常性の維持に関与していることが報告されている^{17,18}。肺や心臓、脳においても組織内在性マクロファージが炎症環境に暴露された後も自己再生や増殖の能力を有する^{19,20}。例えば、マウスの心筋梗塞モデルでは IL-4 の投与により CD206 陽性 M2 マクロファージが増加し組織修復に関与し、肺障害モデルにおいても M2 マクロファージへの分化の促進は炎症の抑制に寄与すると報告されている²⁰。我々の研究では椎間板傷害後に増加する M2 マクロファージは内在性由来であることが示唆され内在性マクロファージは炎症抑制や修復促進のための重要な細胞標的かもしれない。マクロファージの動員

の制御や M2 分化制御因子の検討、M2 分化促進による疼痛・変性の抑制を検討することで腰痛に対する治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

本研究にはいくつかの限界点がある。腰痛とマクロファージとの関連性については明らかではない。腰椎穿刺モデルを用いた評価が必要である。内在性マクロファージの局在や機能については明らかになっていない。

5. 結語

本研究において、骨髄由来マクロファージ、椎間板内在性マクロファージは *in vitro* において双方 M1、M2 マクロファージの分化能を有するにも関わらず、椎間板傷害で増加する M1 マクロファージは動員性由来、M2 マクロファージは内在性由来であることが示唆された (図 5)。今回の研究結果は、IVD 変性およびマクロファージをターゲットとした腰痛の治療法の開発に寄与すると考えられる。

6. 今後の課題

本研究で IVD 損傷後に椎間板にて増加するマクロファージの起源について解明したが、椎間板傷害を制御するためには M1 マクロファージの動員の制御や M2 マクロファージ分化制御因子や分化促進についてのさらなる研究が必要である。

7. 謝辞

本研究を終えるにあたり、ご指導いただきました北里大学医学部整形外科学 高相晶士教授、井上玄診療教授、内田健太郎講師、宮城正行講師に感謝いたします。また動物実験をする際には動物実験センターの皆様方に大変お世話になりました。最後に、この調査の一部は、北里大学学術奨励研究費、整形災害外科学研究助成 373、JSPS 科研費 JP17K16700、けやき会助成からの助成を受けたものです。

8. 引用文献

1. Schwarzer AC, Aprill CN, Derby R, Fortin J, Kine G, Bogduk N. The prevalence and clinical features of internal disc disruption in patients with chronic low back pain. *Spine (Phila Pa 1976)* 1995;20:1878–83.
2. Takano S, Uchida K, Inoue G, Miyagi M, Aikawa J, Iwase D et al. Nerve growth factor regulation and production by macrophages in osteoarthritic synovium. *Clin Exp Immunol.* 2017;190:235-43.
3. Takano S, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Fujimaki H, Aikawa J, et al. Nerve growth factor regulation by TNF - alpha and IL - 1beta in synovial macrophages and fibroblasts in osteoarthritic mice. *J Immunol Res* 2016:5706359
4. Kawaguchi S, Yamashita T, Yokogushi K, Murakami T, Ohwada O, Sato N. Immunophenotypic analysis of the inflammatory infiltrates in herniated intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)* 2001;26: 1209–14.
5. Miyagi M, Uchida K, Takano S, Fujimaki H, Aikawa J, Sekiguchi H, et al. Macrophage-derived inflammatory cytokines regulate growth factors and pain - related molecules in mice with intervertebral disc injury. *J Orthop Res* 2018;36:2274–9.
6. Yang H, Liu B, Liu Y. Secreted factors from intervertebral disc cells and infiltrating macrophages promote degenerated intervertebral disc catabolism. *Spine.* 2019;44:E520 - E529.
7. Brigitte M, Schilte C, Plonquet A, Baba-Amer Y, Henri A, Charlier C, et al. Muscle resident macrophages control the immune cell reaction in a mouse model of notexin - induced myoinjury. *Arthritis Rheum.* 2010;62:268 - 279.

8. Liao X, Shen Y, Zhang R, Sugi K, Vasudevan N, Alaiti A, et al. Distinct roles of resident and nonresident macrophages in nonischemic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018:E4661 - E4669.
9. Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, Hickey WF, Imai Y, Kiefer R. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol*. 2001;159:2187 - 2197.
10. Nakazawa KR, Walter BA, Laudier DM, Krishnamoorthy D, Mosley GE, Spiller KL, et al. Accumulation and localization of macrophage phenotypes with human intervertebral disc degeneration. *Spine J* 2017;18: 343–56.
11. Nakawaki M, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Kawakubo A, Satoh M, et al. Changes in Nerve Growth Factor Expression and Macrophage Phenotype Following Intervertebral Disc Injury in Mice. *J Orthop Res*. 2019 Aug;37(8):1798-1804.
12. Le Maitre CL, Freemont AJ, Hoyland JA. The role of interleukin - 1 in the pathogenesis of human intervertebral disc degeneration. *Arthritis Res Ther*. 2005;7:R732 - R745.
13. Séguin CA, Pilliar RM, Madri JA, Kandel RA. TNF - alpha induces MMP2 gelatinase activity and MT1 - MMP expression in an in vitro model of nucleus pulposus tissue degeneration. *Spine*. 2008;33:356 - 365.
14. TNF - alpha and IL - 1beta promote a disintegrin - like and metalloprotease with thrombospondin type I motif - 5 - mediated aggrecan degradation through syndecan - 4 in intervertebral disc. *J Biol Chem*. 2011;286:39738 - 39749.
15. Wang X, Wang H, Yang H, Li j, Cai Q, Shapiro I, Risbud M. Tumor necrosis

- factor - alpha - and interleukin - 1beta - dependent matrix metalloproteinase - 3 expression in nucleus pulposus cells requires cooperative signaling via syndecan 4 and mitogen - activated protein kinase - NF - kappaB axis: implications in inflammatory disc disease. *Am J Pathol.* 2014;184: 2560 - 2572.
16. Schipper HS, Prakken B, Kalkhoven E, Boes M. Adipose tissue-resident immune cells: key players in immunometabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(8):407-415.
17. Mantovani A, Sica A, Locati M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity.* 2005;23(4):344-346.
18. Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao CT, Scurr MJ, Brombacher F et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun.* 2013;4:1886.
19. Shintani Y, Ito T, Fields L, Shiraishi M, Ichihara Y, Sato N et al. IL-4 as a Repurposed Biological Drug for Myocardial Infarction through Augmentation of Reparative Cardiac Macrophages: Proof-of-Concept Data in Mice. *Sci Rep.* 2017;7(1):6877.
20. Wang L, Zhang H, Sun L, Gao W, Xiong Y, Ma A et al. Manipulation of macrophage polarization by peptide-coated gold nanoparticles and its protective effects on acute lung injury. *J Nanobiotechnology.* 2020;18(1):38.

9. 業績目録 -----

1. Kawakubo A, Uchida K, Miyagi M, Nakawaki M, Satoh M, Sekiguchi H, Yokozeki Y, Inoue G, Takaso M. Investigation of resident and recruited macrophages following disc injury in mice. *J Orthop Res.* 2020 Aug; 38 (8): 1703-1709.

2. Saito W, Inoue G, Shirasawa E, Imura T, Nakazawa T, Miyagi M, Kawakubo A, Uchida K, Kotani T, Akazawa T, Takaso M. Limitations of posterior spinal fusion to L5 for flaccid neuromuscular scoliosis focusing on pelvic obliquity. *Spine Deform.* 2020 Oct 2. doi: 10.1007/s43390-020-00214-1.

3. Yokozeki Y, Uchida K, Miyagi M, Murata K, Koyama T, Kuroda A, Kawakubo A, Nanri Y, Inoue G, Takaso M. Short-Term Impact of Staying Home on Bone Health in Patients With Osteoporosis During a State of Emergency Declaration Due to COVID-19 in Kanagawa, Japan. *Cureus.* 2020 Sep 6;12(9):e10278. doi: 10.7759/cureus.

4. Miyagi M, Uchida K, Takano S, Nakawaki M, Sekiguchi H, Nakazawa T, Imura T, Saito W, Shirasawa E, Kawakubo A, Akazawa T, Inoue G, Takaso M. Role of CD14-positive cells in inflammatory cytokine and pain-related molecule expression in human degenerated intervertebral discs. *J Orthop Res.* 2020 Aug 28. doi: 10.1002/jor.24839.

5. Nakawaki M, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Kawakubo A, Kuroda A, Satoh M,

- Takaso M. Sequential CCL2 Expression Profile After Disc Injury in Mice. *J Orthop Res.* 2020 Apr;38(4):895-901.
6. Nakazawa T, Inoue G, Imura T, Miyagi M, Saito W, Shirasawa E, Kawakubo A, Takaso M. Regression of Retro-odontoid Pseudotumor Using External Orthosis without Atlantoaxial Fusion: A Case Report. *JBJS Case Connect.* 2019 Jul-Sep;9(3):e0329.
 7. Tazawa R, Uchida K, Fujimaki H, Miyagi M, Inoue G, Sekiguchi H, Murata K, Takata K, Kawakubo A, Takaso M. Elevated leptin levels induce inflammation through IL-6 in skeletal muscle of aged female rats. *BMC Musculoskelet Disord.* 2019 May 10;20(1):199.
 8. Nakawaki M, Uchida K, Miyagi M, Inoue G, Kawakubo A, Satoh M, Takaso M. Changes in Nerve Growth Factor Expression and Macrophage Phenotype Following Intervertebral Disc Injury in Mice. *J Orthop Res.* 2019 Aug;37(8):1798-1804.
 9. Uchida K, Takano S, Inoue G, Iwase D, Aikawa J, Takata K, Tazawa R, Kawakubo A, Sekiguchi H, Takaso M. Increase in mast cell marker expression in the synovium of obese patients with osteoarthritis of the knee. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2019 Mar 21;12:377-382.
 10. Hori Y, Hoshino M, Inage K, Miyagi M, Takahashi S, Ohyama S, Suzuki A,

Tsuji T, Terai H, Dohzono S, Sasaoka R, Toyoda H, Kato M, Matsumura A, Namikawa T, Seki M, Yamada K, Habibi H, Salimi H, Yamashita M, Yamauchi T, Furuya T, Orita S, Maki S, Shiga Y, Inoue M, Inoue G, Fujimaki H, Murata K, Kawakubo A, Kabata D, Shintani A, Ohtori S, Takaso M, Nakamura H. ISSLS PRIZE IN CLINICAL SCIENCE 2019: clinical importance of trunk muscle mass for low back pain, spinal balance, and quality of life-a multicenter cross-sectional study. Eur Spine J. 2019 May;28(5):914-921.

症例報告

1. 川久保歩、白澤栄樹、井上玄、宮城正行、齋藤亘、井村貴之、中澤俊之、高相晶士. 胸椎浸潤を伴う腎細胞癌肋骨転移に対して肋骨・椎体部分切除を施行した 1 例. 関東整形災害外科学会雑誌, 2018 年, 49 卷 4 号, 216-220 頁

10. 図表

表 1 本研究において用いたプライマーの塩基配列

Primer	Sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>Cd86-F</i>	CTCAGATGCTGTTTCCGTGG	71
<i>CD86-R</i>	TTGTAAATGGGCACGGCAGA	
<i>Inos-F</i>	TACCGCACCCGAGATGGTC	106
<i>Inos-R</i>	TGACACTTCGCACAAAGCAG	
<i>Fizz1-F</i>	ACTGCTACTGGGTGTGCTTG	101
<i>Fizz1-R</i>	GCAGTGGTCCAGTCAACGA	
<i>Cd206-F</i>	TGGCAATTCAGGAGAGGCAG	109
<i>Cd206-R</i>	AGTGGTTGGAGAAACAGGCA	

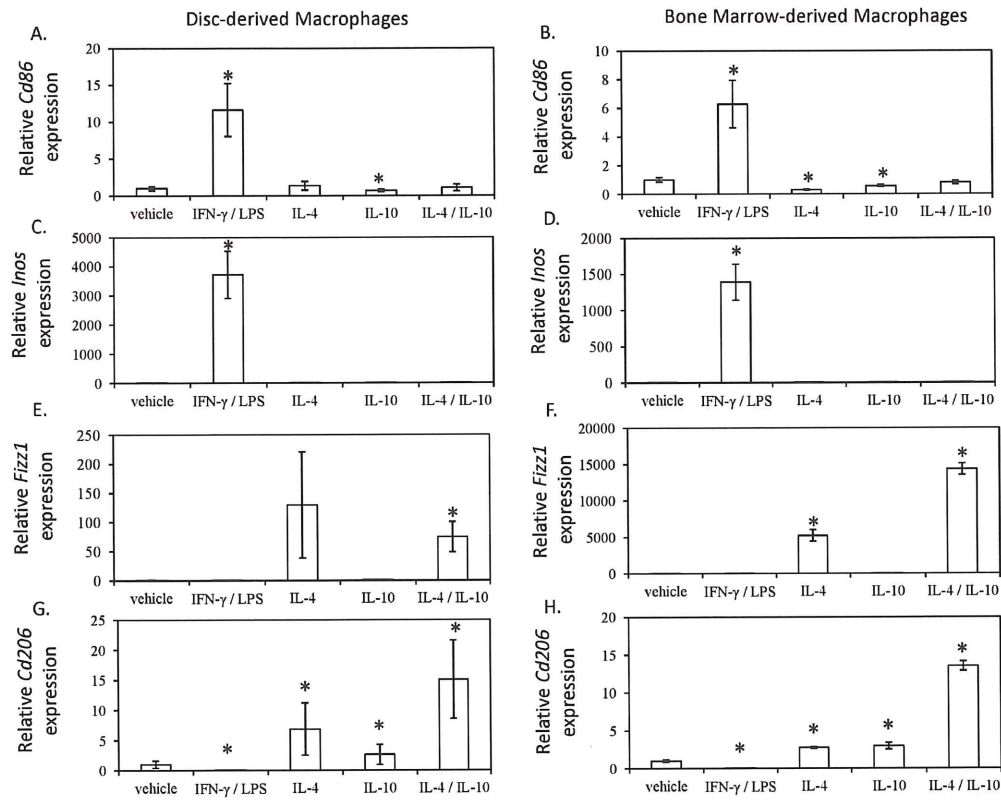


図 1 : DM、BMM を、LPS (10 ng / mL) + IFN γ (50 ng / mL)、IL-4 (10 ng / mL)、IL-10 (10 ng / mL)、および IL 4 + IL-10 でそれぞれ 24 時間刺激した。

A: DM における各刺激での *Cd86* mRNA 発現

B: BMM における各刺激での *Cd86* mRNA 発現

C: DM における各刺激での *Inos* mRNA 発現

D: BMM における各刺激での *Inos* mRNA 発現

E: DM における各刺激での *Fizz1* mRNA 発現

F: BMM における各刺激での *Fizz1* mRNA 発現

G: DM における各刺激での *Cd206* mRNA 発現

H: BMM における各刺激での *Cd206* mRNA 発現

(n = 5)

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。*は溶媒対照群 (vehicle) とサイトカイン刺激群との有意差を示す (p < 0.05)。

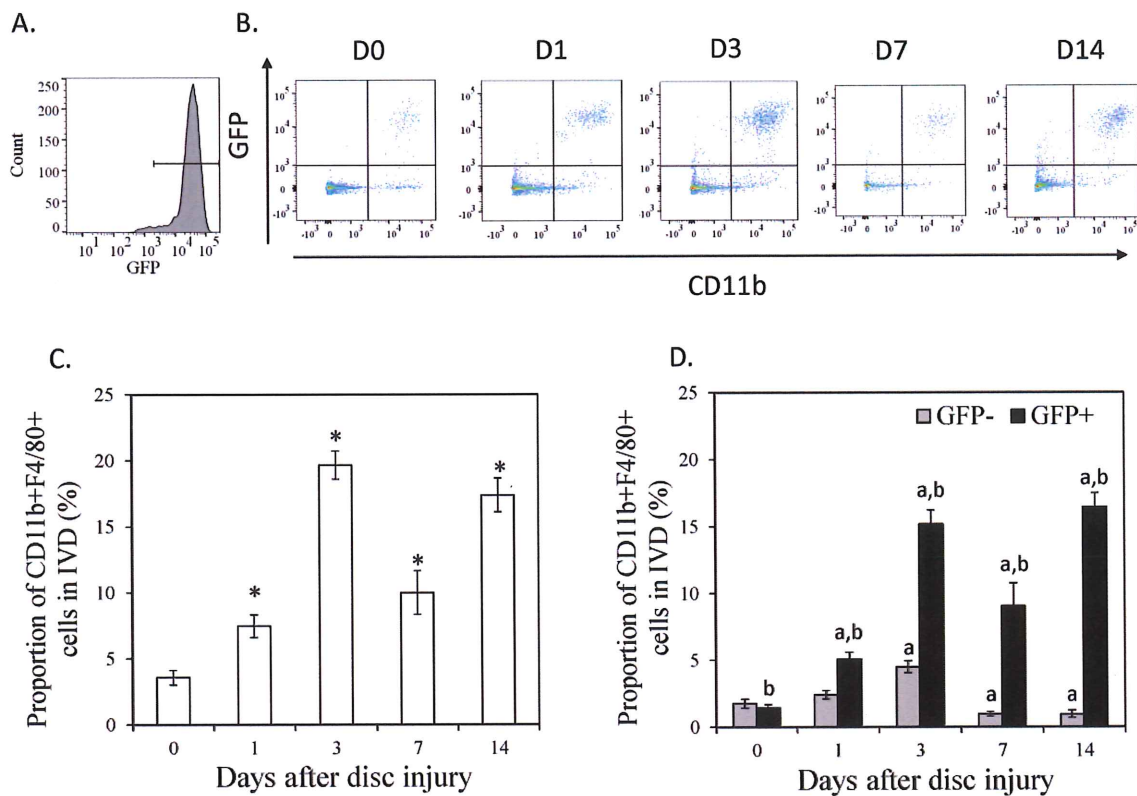


図 2: GFP 骨髄トランスジェニックキメラマウスにおける IVD 傷害後の F4/80 + CD11b + 細胞のフローサイトメトリー分析

A: 末梢血における GFP の発現。

B: GFP+ および GFP- CD11b + 細胞のドットプロット。X 軸は CD11b、Y 軸は GFP を示す。

C: IVD に存在する全細胞に占める CD11b + F4/80 + 細胞の割合 (n = 6)。

D: IVD に存在する全細胞に占める GFP+ および GFP- CD11b + F4/80 + 細胞の割合 (n = 6)

すべてのデータは平均値 ± 標準誤差で示した。* は 0 日目と傷害群との有意差を示す (p < 0.05)。^a 0 日目と比較して有意差を示す (p < 0.05)。^b 各傷害後日数における GFP- 集団と比較して有意差を示す (p < 0.05)。

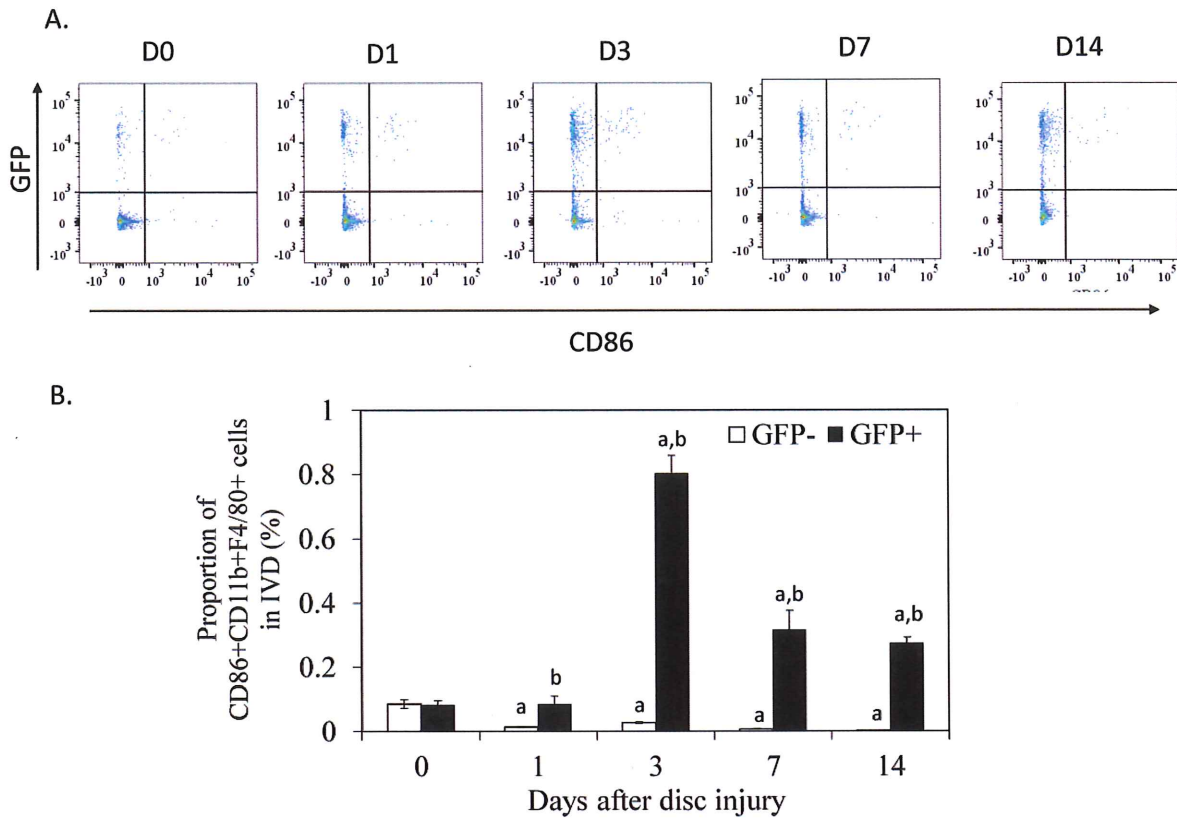


図 3 : GFP 骨髄トランスジェニックキメラマウスにおける IVD 傷害後の CD86 + CD11b + F4 / 80 + 細胞のフローサイトメトリー分析

A: GFP+および GFP- CD86 + 細胞のドットプロット。X 軸は CD86、Y 軸は GFP を示す。

B: IVD に存在する全細胞に占める GFP+および GFP- CD86 + CD11b + F4 / 80 + 細胞の割合 (n = 6)

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。a 0 日目と傷害群との有意差を示す (p < 0.05)。b 各傷害後日数における GFP- 集団と比較して有意差を示す (p < 0.05)。

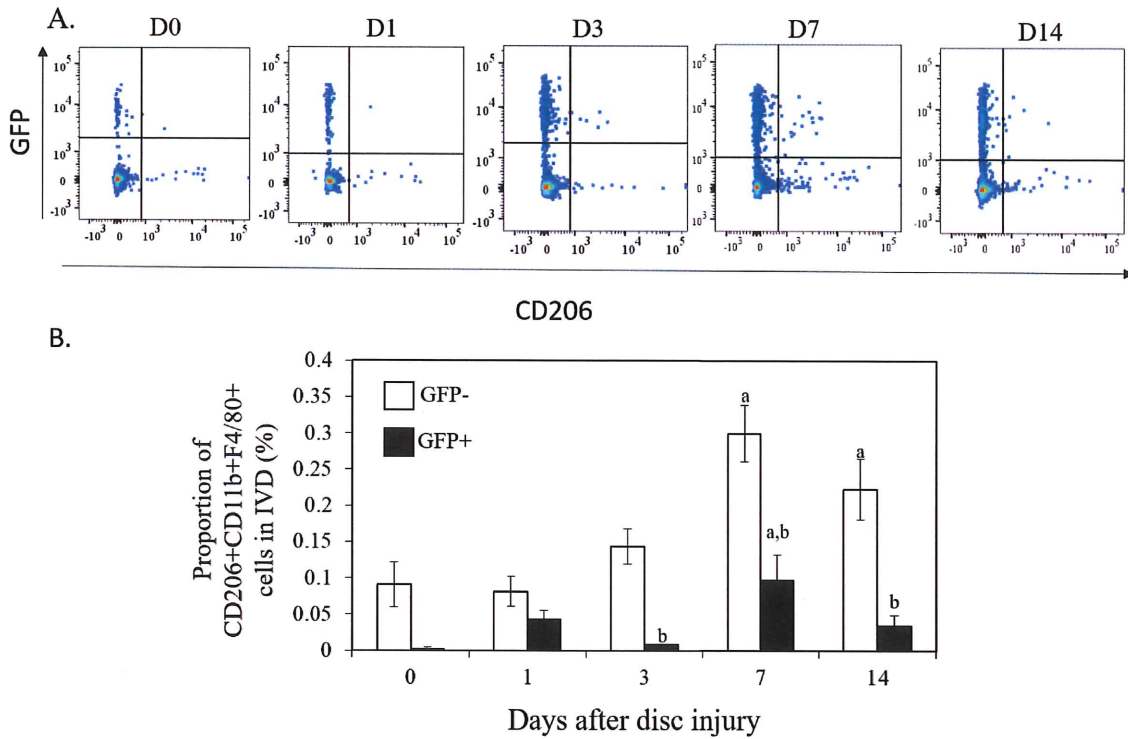


図 4: GFP 骨髄トランスジェニックキメラマウスにおける IVD 傷害後の CD206 + CD11b + F4 / 80 + 細胞のフローサイトメトリー分析

A: GFP+およびGFP- CD206 + 細胞のドットプロット。X 軸は CD206、Y 軸は GFP を示す。

B: IVD に存在する全細胞に占める GFP+および GFP- CD206 + CD11b + F4 / 80 + 細胞の割合 (n = 6)

すべてのデータは平均値±標準誤差で示した。a 0 日目と傷害群との有意差を示す (p < 0.05)。b 各傷害後日数における GFP- 集団と比較して有意差を示す (p < 0.05)。

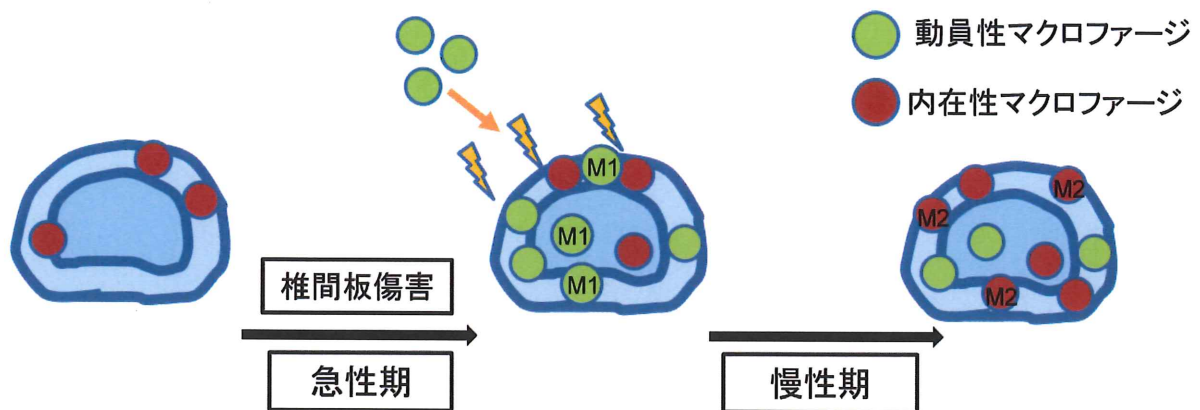


図 5: 椎間板傷害後に増加する M1, M2 マクロファージの起源

急性期には骨髄から単球が遊走され、M1 マクロファージに分化する。慢性期には内在性マクロファージが M2 マクロファージに分化する。