

令和 2 年 7 月 18 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16659

研究課題名（和文）細胞低接着性コラーゲンLASCoIを用いた脊椎椎間板再生

研究課題名（英文）Regeneration of the intervertebral disc in the spine by Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCoI)

研究代表者

由留部 崇 (YURUBE, Takashi)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：10514648

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では新規に開発された細胞低接着性コラーゲン（Low Adhesive Scaffold Collagen：LASCoI）による脊椎椎間板再生の可能性について検討した。ヒト椎間板細胞はLASCoI上でのみ細胞凝集塊の形成と椎間板表現型・前駆細胞マーカーと細胞外基質の発現増大を示した。ラット椎間板髄核摘出モデルにLASCoIを埋植したところ、X線で椎間板高の維持、MRIで椎間板輝度の残存、さらに組織学的検討で椎間板表現型を有する細胞外基質産生細胞のLASCoI内への浸潤を認めた。本研究結果からLASCoIが凝集塊の形成を介して組織再生の活性化を促す新たな椎間板再生材料となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腰痛や関連した神経痛は世界的な健康問題であり、脊椎椎間板変性はその主たる要因である。現状の治療には限界があり、新たな戦略が必要と考えるに至った。破壊が進行した組織の再建には足場となる生体材料が重要であるが既存の材料は椎間板再生能を有していない。そのため本研究では新規に開発された細胞低接着性コラーゲン（Low Adhesive Scaffold Collagen：LASCoI）による椎間板治療の可能性について検討した。結果、LASCoI自体の細胞・組織誘導能を認め、椎間板再生への有用性が示された。得られた知見から新たな治療剤の開発に繋がる可能性があり、学術的・社会的に有意義であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to clarify effectiveness of the Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCoI) for intervertebral disc regeneration. The LASCoI is a new collagen type I-based scaffold through actinidain hydrolysis with a high 3D spheroid-forming capability, water-solubility, and biodegradability and low antigenicity. In human disc cells surgically obtained, time-dependent spheroid formation with increased phenotypic markers and matrix components was observed on LASCoI. In a rat tail nucleotomy model, LASCoI-injected discs presented radiographic and MRI damage control. Then, LASCoI decelerated histological disc disruption, showing aggrecan-positive and collagen type II-positive endogenous cell migration and macrophage infiltration. Reduced nucleotomy-induced disc disruption through spontaneous spheroid formation by LASCoI warrants further investigations of whether it may be an effective treatment without stem cells and/or growth factors for intervertebral disc disease.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板変性 椎間板ヘルニア LASCoI 脊椎 整形外科

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

腰痛は早急に解決すべき世界的な健康問題である。椎間板変性は腰痛の主な要因であり、経過により椎間板ヘルニアを呈し、青壮年者の就労やスポーツ活動に大きな支障を来す。さらに高齢者では脊柱管狭窄を来し、難治性の神経痛や間欠跛行、膀胱直腸障害などの重篤な症状へと繋がる。変性椎間板に対する現在の治療は外科的切除が主体であり、椎間板を破壊して本来の機能を失うこととなる。そのため椎間板組織・機能が温存可能な新たな治療法の開発が急務であり、成長因子の投与や遺伝子導入、幹細胞移植といった生物学的治療が日々研究されているが、これまでに有効性が証明されたヒト椎間板再生治療法はない。

破壊が進行した組織の再生には足場が重要であり、過去にゼラチン、キトサン、ヒアルロン酸、アルジネート、アテロコラーゲンなどを用いた報告があるが、これら既存の生体材料は椎間板再生能を有していない。そのため今回、I型コラーゲンに特殊な酵素処理(アクチニダイン)を施すことで新たに開発された細胞低接着性コラーゲン(Low Adhesive Scaffold Collagen: LASC<sub>o</sub>l)を用いることで、足場自体が細胞・組織誘導能をもつ、安全性の高い、革新的で独創的な脊椎椎間板治療法を樹立できる可能性があると考え、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はヒトへの臨床応用を目指し、LASC<sub>o</sub>lを用いた脊椎椎間板再生の可能性について、まずは細胞実験と動物実験より明らかにすることであった。

## 3. 研究の方法

本研究では具体的に以下の2つの実験を行った。

### ヒト椎間板細胞を用いた細胞実験

ヒト脊椎手術検体より抽出した椎間板髄核・線維輪細胞をLASC<sub>o</sub>lゲル上で培養し、細胞形態と細胞表現型・多分化能・細胞外基質発現度の観点からLASC<sub>o</sub>lの有用性について検討した。

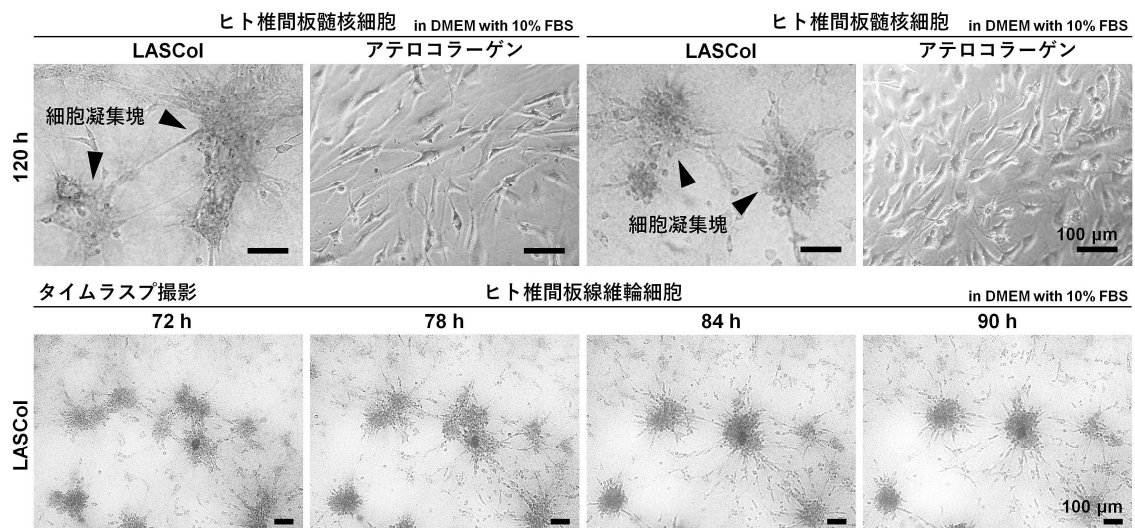
### ラット椎間板摘出モデルを用いた動物実験

骨成熟を来した雄 Sprague-Dawley ラットの尾椎椎間板で髄核を全摘出後にLASC<sub>o</sub>lゲルを埋植し、経時的にX線・MRI・組織学的検討を行い、椎間板組織再生能の有無について検討した。

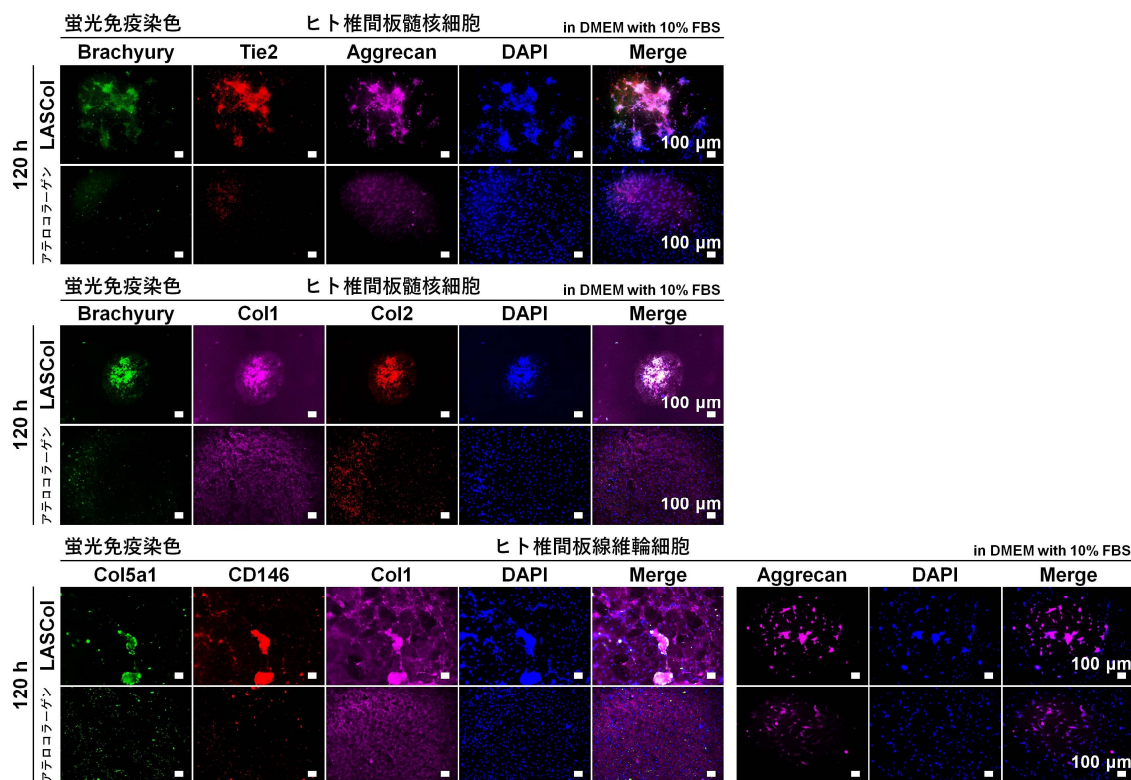
## 4. 研究成果

### ヒト椎間板細胞を用いた細胞実験

まずは実験群としてLASC<sub>o</sub>lを用い、対照群としてアテロコラーゲンを用いた細胞実験を行った。LASC<sub>o</sub>lゲル上もしくはアテロコラーゲンゲル上でヒト椎間板髄核・線維輪細胞を培養したところ、どちらの細胞型でもLASC<sub>o</sub>lゲル上でのみ細胞が凝集して三次元構造を呈する細胞凝集塊を形成することを観察した。



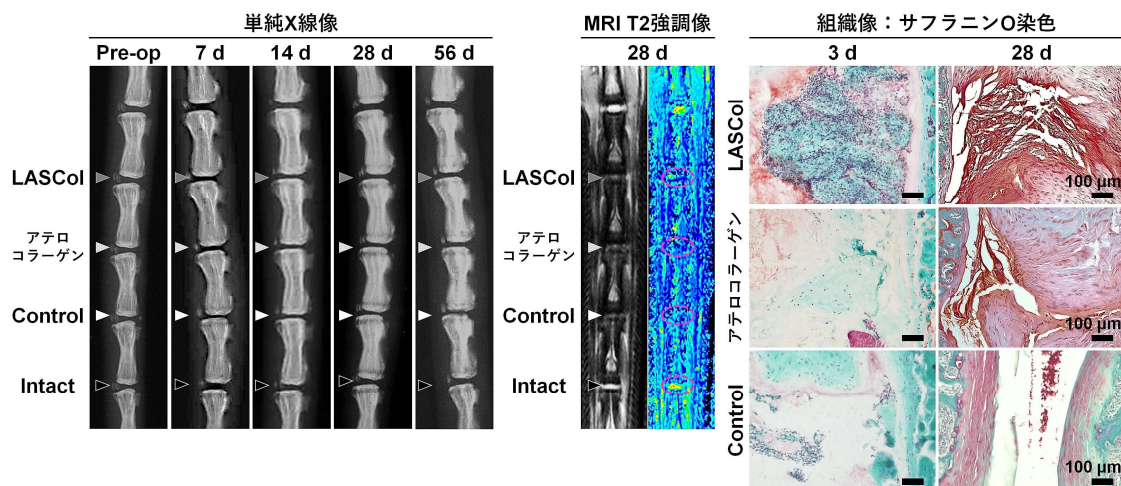
次に多重蛍光免疫染色による椎間板髄核細胞の評価では、髄核表現型マーカー (Brachyury)・前駆細胞マーカー (Tie2)・細胞外基質 (Aggrecan・Collagen type II [Col2]) の発現増大を認めた。線維輪細胞の評価では、線維輪表現型マーカー (Collagen type V alpha 1 [Col5a1]・CD146)・細胞外基質 (Collagen type I [Col1]) の発現がやはり増大していた。



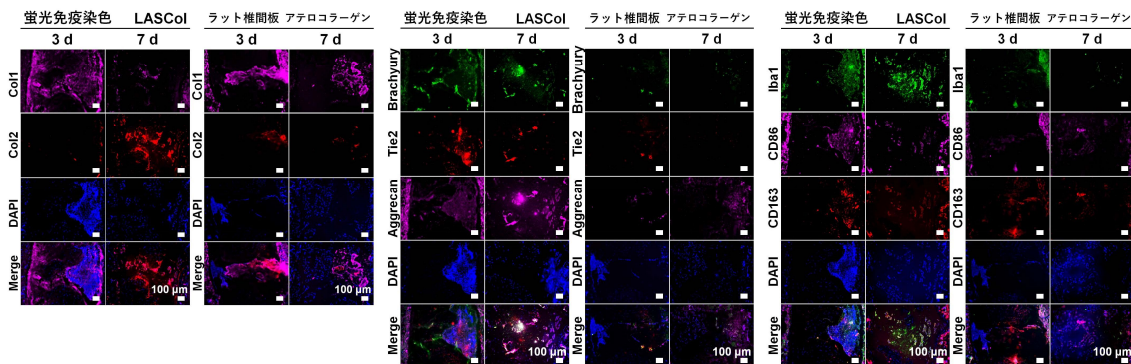
細胞実験から、LASCole が細胞凝集塊の形成を介して細胞表現型の維持、多分化能の活性化、細胞外基質の産生増大に有用である可能性が示唆された。

#### ラット椎間板髄核抽出モデルを用いた動物実験

ラット椎間板髄核抽出モデルへ LASCole ゲルもしくはアテロコラーゲンゲルを埋植する動物実験を行った。結果、X 線像で椎間板高の回復、MRI で椎間板輝度の改善、組織像で細胞浸潤が豊富な細胞外基質の増生を認めた。細胞浸潤はアテロコラーゲンゲルでは殆ど観察されず、LASCole による「生きた」組織の再生の可能性が示唆された。



次に経時的な多重蛍光免疫染色では、LASCole (Col1 陽性) への椎間板細胞 (Brachyury・Tie2 陽性) とマクロファージ (Iba1 陽性) の浸潤を認めた。マクロファージの多くが組織修復を促す M2 型 (CD163 陽性) であった。LASCole 自身 (Col1 陽性) は早期に分解され、椎間板髄核に本来存在する Aggrecan と Col2 が豊富な細胞外基質が誘導されていた。埋植早期からの積極的な細胞浸潤は LASCole による「生きた」組織再生の可能性をやはり支持する結果であった。



動物実験から、LASColl が周囲残存組織から細胞表現型・多分化能を有する椎間板髄核細胞を誘導し、細胞凝集塊の形成を介して細胞外基質産生の活性化を促す可能性が示唆された。同時に自身は浸潤した M2 型を主体とするマクロファージによって早期から分解され、組織修復に寄与する可能性が示唆された。尚、本研究を通じて異物反応や重篤な合併症はみられず、LASColl の安全性が観察される結果であった (LASColl はブタ由来であるが抗原性試験が陰性であり、本研究でも免疫不全動物の使用は不要とされた)。

我々が適切と考える再生材料には、組織再生能をもつ、再生が短期間で完了する、再生後は生体に適合して速やかに消失する、欠損に合わせた裁断や成型が容易である、元来の組織と同等の初期強度を有する、材料の安全性、品質の均一性、供給の安定性が担保されている、などの特性が望まれる。LASColl は細胞接着性が低く、周囲から細胞を呼び込み細胞凝集塊を形成し、生体内に近い微小環境の保持が可能である。かつ LASColl 自体は浸潤細胞により容易に分解され、周囲組織に置換される。この細胞・組織誘導能は足場として革新的であり、細胞移植や成長因子の投与を要しない組織再生へと繋がりうる。幹細胞や成長因子への安全性の懸念や高コスト、施設基準、法規制などが回避できれば、本治療法は効果が均一で安全かつ簡便な方法として広く普及する可能性があり、医療経済学的観点からも研究意義が高い。LASColl はブタ真皮の I 型コラーゲン由来であり、供給安定性が確保されている。LASColl は臨床応用済である同材料のアテロコラーゲンよりも低抗原提示性であり、人体への悪影響の可能性は低い。コラーゲン材料は柔軟性を有し、手術時の裁断・成型や注射時のハンドリングが容易である。かつ LASColl は高純度・高濃度・高密度加工能を有し、アテロコラーゲンと比較して高濃度ゲルが作成可能である。熱反応性も改善され、体温でゲル化が進み、インジェクタブル・ゲルとして利用できる。上記の特徴はいずれも LASColl の椎間板再生材料としての有用性を支持している。本研究に関連した知見は新規性があると考え、国内・国際 (PCT) 特許出願を行っており、科学研究費助成事業の支援により研究をさらに進めることができた。

今回得られた知見から軟骨再生など他領域への応用が進み、変形性関節症の治療にも繋がる可能性がある。LASColl を用いた再生医療の実現を目指して、今後も研究を継続していく所存である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeoka Yoshiki, Yurube Takashi, Morimoto Koichi, Kunii Saori, Kanda Yutaro, Tsujimoto Ryu, Kawakami Yohei, Fukase Naomasa, Takemori Toshiyuki, Omae Kaoru, Kakiuchi Yuji, Miyazaki Shingo, Kakutani Kenichiro, Takada Toru, Nishida Kotaro, Fukushima Masanori, Kuroda Ryosuke	4. 巻 235
2. 論文標題 Reduced nucleotomy-induced intervertebral disc disruption through spontaneous spheroid formation by the Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCOL)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 119781 ~ 119781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2020.119781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 武岡由樹、由留部崇、國井沙織、森本康一、深瀬直政、竹森俊幸、垣内裕司、伊藤雅明、神田裕太郎、角谷賢一朗、高田徹、黒田良祐、西田康太郎
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲン (Low Adhesive Scaffold Collagen : LASCOL) による脊椎椎間板再生の可能性
3. 学会等名 第47回日本脊椎脊髄病学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeoka Yoshiki, Yurube Takashi, Kunii Saori, Morimoto Koichi, Fukase Naomasa, Takemori Toshiyuki, Kakiuchi Yuji, Ito Masaaki, Kanda Yutaro, Kakutani Kenichiro, Takada Toru, Kuroda Ryosuke, Nishida Kotaro
2. 発表標題 Regenerative potential of the intervertebral disc by using the Low Adhesive Scaffold Collagen (LASCOL)
3. 学会等名 The 45th Annual Meeting, International Society for the Study of the Lumbar Spine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武岡由樹、由留部崇、國井沙織、森本康一、竹森俊幸、深瀬直政、垣内裕司、角谷賢一朗、黒田良祐
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲン (Low Adhesive Scaffold Collagen : LASCOL) による脊椎椎間板再生
3. 学会等名 第55回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武岡由樹、由留部崇、森本康一、國井沙織、深瀬直政、竹森俊幸、垣内裕司、角谷賢一朗、高田徹、黒田良祐、西田康太郎
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲン ( Low Adhesive Scaffold Collagen : LASCoI ) を用いた脊椎椎間板再生の試み
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森本康一、國井沙織、武岡由樹、由留部崇、尾前薫、黒田良祐
2. 発表標題 椎間板組織再生のための細胞低接着性コラーゲンゲルの開発
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武岡由樹、由留部崇、國井沙織、森本康一、深瀬直政、竹森俊幸、垣内裕司、辻本龍、角谷賢一朗、高田徹、黒田良祐、西田康太郎
2. 発表標題 細胞低接着性コラーゲン ( LASCoI ) を用いた脊椎椎間板再生の可能性
3. 学会等名 第8回DDS再生医療研究会・第10回多血小板血漿 ( PRP ) 療法研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeoka Yoshiki、Yurube Takashi、Kunii Saori、Morimoto Koichi、Fukase Naomasa、Takemori Toshiyuki、Kakiuchi Yuji、Kanda Yutaro、Tsujiimoto Ryu、Kakutani Kenichiro、Takada Toru、Kuroda Ryosuke、Nishida Kotaro
2. 発表標題 Regenerative potential of the damaged intervertebral disc by the Low Adhesive Scaffold Collagen ( LASCoI )
3. 学会等名 The 65th Annual Meeting, Orthopaedic Research Society ( 国際学会 )
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 椎間板変性の治療剤および椎間板細胞培養剤	発明者 由留部 崇、武岡 由樹、森本 康一、 國井 沙織、尾前	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-015541	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 椎間板変性の治療剤および椎間板細胞培養剤	発明者 由留部 崇、武岡 由樹、森本 康一、 國井 沙織、尾前	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2019/151444A1	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----