

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03176

研究課題名(和文) 高純度硬化性ゲルによる椎間板組織自然再生誘導法の開発と組織再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair

研究代表者

須藤 英毅 (Sudo, Hideki)

北海道大学・医学研究院・特任准教授

研究者番号：30374367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板は生体内における自然再生能力が著しく低く、例えば椎間板ヘルニアに対する手術治療では、摘出部に生じた空隙は術後容易に変性を来す要因となる。そこで、アルギン酸ナトリウムを基盤とした高純度硬化性ゲルを椎間板ヘルニア術後の椎間板修復を促す組織修復材として開発した。ウサギ及びヒツジ椎間板部分欠損モデルにゲルを埋植すると、欠損のみの場合に比べて椎間板の組織修復効果が確認された。その他、生体力学試験においてもゲルの安定性が証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

椎間板は自然再生能力が低く、例えば椎間板ヘルニアに対する手術治療では摘出部の空隙は変性を来す要因となる。そこで、生体内における組織修復環境を最適化することで組織再生が促進されるという仮説のもと、エンドトキシン含有量を極限まで排除した高純度硬化性ゲルを用いた無細胞移植椎間板組織自然再生誘導法を検討した。本治療戦略に対する組織修復メカニズムや橋渡し研究の成果が証明されたことで、探索的医師主導治療へと進むことができた。

研究成果の概要(英文)：The current surgical procedure of choice for lumbar intervertebral disc (IVD) herniation is discectomy. However, defects within IVD produced upon discectomy may impair tissue healing and predispose patients to subsequent IVD degeneration. This study aimed to investigate whether the use of an acellular bioresorbable ultra-purified alginate (UPAL) gel implantation system is safe and effective as a reparative therapeutic strategy after lumbar discectomy.

The UPAL gel was biocompatible with human IVD cells and promoted extracellular matrix production after discectomy, demonstrating sufficient biomechanical characteristics without material protrusion.

The present results indicate the safety and efficacy of UPAL gels in a large animal model and suggest that these gels represent a novel therapeutic strategy after discectomy in cases of lumbar IVD herniation.

研究分野：整形外科

キーワード：生体機能材料 再生医学 椎間板再生 生体力学 医工連携 脊椎脊髄病 整形外科

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

椎間板は体幹を支える脊柱の基本構成要素であるが、その変性により椎間板ヘルニアや脊柱管狭窄症、脊柱変形などの多くの脊柱疾患を惹起する。通常は鎮痛剤投与や手術療法が行われるが、対症療法の域を出ていないのが現状である。例えば、椎間板ヘルニアの手術は、脊髄神経を圧迫している脱出髄核を摘出するが、髄核摘出後の椎間板組織は内部が空洞になるため組織再生が進みにくく、椎間板変性を起こしやすい。さらに摘出術後の再発は、術後半年以内に起こることが多く、再発を繰り返す症例では脊椎固定術が必要になることもある。こうした背景から、術後の再発を予防し、椎間板変性を抑制/再生する新規治療法の確立が期待されている。

変性した椎間板組織では髄核内の水分含有量及び細胞外マトリックスが減少する。椎間板の抑制/再生治療戦略では、これらを保持することが必要不可欠であるが、他の多くの組織再生と同様に、椎間板再生でも組織特異的表現型を持った細胞を保持することが非常に困難である。髄核組織は glycosaminoglycans, proteoglycans, type II collagen といった細胞外マトリックスが豊富に存在し、多量の水分を有することで脊柱から伝達される力学負荷を吸収する役割を担っており、細胞密度は極めて低い。さらに、椎間板は無血管野であり周囲からの拡散により栄養状態を維持している特殊な組織であるため、血管を介した間葉系幹細胞の増殖にも適していない。

近年、組織工学的手法による椎間板再生医療が試みられており、アルギン酸による組織再生能を基盤とした椎間板再生研究が散見される。しかしながら、従来の培養用アルギン酸は細胞毒性を有する不純物を多く含有しており、アレルゲンともなるため、実臨床での生体内利用には適さなかつた。そこで我々は、毒性を従来の1万分の1以下に低減し、組織再生能を有した新規医療用マテリアルとして高純度硬化性アルギン酸ゲル (Ultra-purified alginate gel; UPAL) を開発した。

2. 研究の目的

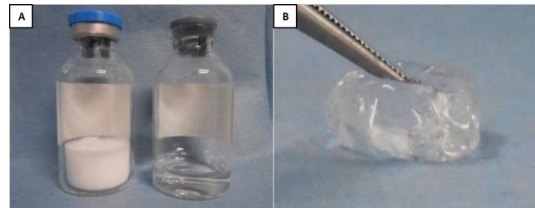
椎間板内における組織修復環境を最適化し、組織再生が促進されるという仮説のもと、UPALを使用した椎間板組織自然再生誘導法の効果について検証した。臨床的には、髄核摘出術後の椎間板欠損部に無細胞で本マテリアルのみを充填することで、椎間板修復を可能にすることを目的としている。

3. 研究の方法

ヒト髄核細胞三次元培養モデル

本研究は、北海道大学大学院医学研究院医の倫理委員会の承認のもと実施した。北海道大学病院において脊椎前方矯正固定術を行った思春期特発性側弯症患者および家族の同意の元、術中採取した非変性椎間板組織より髄核組織を取り出した。術前に全ての椎間板はMRIを撮像し、椎間板の変性がないことを確認した。

ヒト髄核組織から髄核細胞を単離、得られた髄核細胞を培養した。三次元培養用アルギン酸ゲル(下図)として粘調度の異なる2種類のUPAL (Mochida Pharma. Co. Ltd., Tokyo, Japan); AL100 (粘調度 100-200 mPa/s) 及び AL500 (粘調度 400-600 mPa/s) と、培養用アルギン酸ゲル (commercial-grade alginate gel; CAL) (Wako, Osaka, Japan) を準備した。すべてのゲルは2%濃度で使用した。2 継代した細胞を分離、 4×10^6 (cells/ml) の濃度で2%アルギン酸水溶液に懸濁した。アルギン酸水溶液中の細胞を22-gauge (G)の注射針を付けたシリンジから、102 mMの塩化カルシウム水溶液中に滴下して、直径約2mmのアルギン酸ゲルビーズ内に包埋した。塩化カルシウム溶液中に滴下してから10分後に出来上がったビーズ(約40,000細胞/ビーズ)を回収し、0.9%生理食塩水で1回、培養液で2回洗浄を行った。ビーズは培養液中で28日間培養した。



蛍光染色を用いた細胞生存率評価

アルギン酸ゲルビーズに包埋された状態における髄核細胞の生存率を評価するために、calcein-AMとPIを使用した。通常培養後48時間、7、14、28日後に、アルギン酸ゲルビーズ内に包埋された髄核細胞を $5 \mu\text{M}$ のcalcein-AMと $1.5 \mu\text{M}$ のPIで30分間染色した。染色されたビーズは、PBSで洗浄後にメスで半割してプレパラート上に静置し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮像した。各々15個以上の細胞を含む4視野の画像を取得し、画像をImage Jで処理し生細胞と死細胞を計測した(n=5)。

フローサイトメトリーによる細胞生存率、アポトーシスの評価

通常培養後48時間、7、14、28日後に、アルギン酸ゲルビーズを $55 \mu\text{M}$ のクエン酸ナトリウムと0.15Mの塩化ナトリウム混合溶液に4、20分間浸した後、遠心分離して細胞を回収した。細胞はAnnexin V-FITC Apoptosis detection kit IIを使用してFITCとPIで標識し、フローサイトメーターを用いて細胞分布を評価した。FITC陽性/PI陰性を早期アポトーシス、FITC陽性/PI陽性を晩期アポトーシス、FITC陰性/PI陰性細胞を生細胞とし、早期と晩期アポトーシスを併せたものをアポトーシス細胞として算定した。得られたフローサイトメトリーのデータはFlow Joを用いて解析した(n=5)。

WST-8 を用いた細胞増殖能の評価

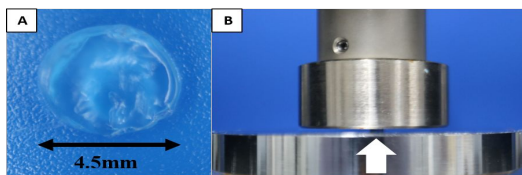
通常培養後 3 時間、3、7 日後に、アルギン酸ゲルビーズを EDTA 水溶液に 37℃、10 分間浸した後、遠心分離 (4℃, 900rpm, 10 分間) して細胞を回収した。細胞は Cell Counting Kit-8 を使用して Water soluble Tetrazolium salts-8 (WST-8) に暴露した。2 時間後にマイクロプレートリーダーで 450nm の波長を照射し、得られた吸光度から細胞増殖能を算定した (n=5)。

ヒト髄核細胞血清除去モデルによる評価

髄核細胞の栄養飢餓状態を再現するため、in vitro 血清除去モデルを採用した。通常培養後 7 日後のアルギン酸ビーズを PBS で 2 回洗浄後、血清を含まない DMEM、1% penicillin/streptomycin, 1.25 µg/ml fungizone 培地を加え、インキュベートを行った (血清除去細胞)。対照群として、10%FBS を含む DMEM、1% penicillin/streptomycin, 1.25 µg/ml fungizone 培地を用い、同条件でインキュベートを施行した (非血清除去細胞)。血清除去後 6 及び 48 時間後に上述のように蛍光染色を用いた細胞生存率評価、フローサイトメトリーによる細胞生存率、アポトーシスの評価を行った (n=5)。

非拘束性圧縮試験によるゲル弾性率の評価

直径 4.5mm、厚さ 2mm の CAL 及び UPAL の検体を準備し非拘束性圧縮試験を行った (下図)。検体を試験機 (Autograph AG-X, Shimadzu, Kyoto, Japan) に設置し、100N のロードセルを使用して毎分 0.5mm の速度で歪み率 95% まで試験を施行した。得られた応力 ひずみ曲線の歪み率 10 - 20% 間の直線を用いてヤング率を算出した (n=4)。



ヒツジ屍体腰椎を用いた生体力学試験

雄サフォーク種ヒツジ (2 歳, 体重 40-60kg) 屍体腰椎 24 体を使用し生体力学試験を行った。15 体の屍体腰椎は in vitro 埋植試験 (8 体: 静的試験、7 体: 動的試験) として使用し、残り 9 体は in vivo 埋植試験 (静的圧縮試験のみ) として使用した。検体を L1/2、L3/4、L5/6 の椎体 椎間板 椎体 (functional spinal unit; FSU) の分節に分け、棘上 棘間靭帯は切除し関節包、横突起間靭帯は温存するように軟部組織を除去した。各検体の上位椎体頭側部及び下位椎体尾側部に 3mm 径 screw を刺入し、歯科用レジンで固定した。

静的試験: 軸圧縮・前後屈・側屈・回旋試験

実験前に室温で検体を解凍し、左椎弓部分切除、黄色靭帯切除を行った。各検体を無作為に control 群、discectomy 群、UPAL 群 (各 n=8) に分け、discectomy 群および UPAL 群椎間板には 5×3mm の後方繊維輪切開を加え、0.2g の椎間板組織 (髄核組織) を摘出した。UPAL 群では椎間板欠損部に UPAL 水溶液を充填し、102mM 塩化カルシウム水溶液でゲル化させ 5 分間静置した。5 分後に生理食塩水で洗浄し、1 時間待機し安定化したものを使用モデルとした。検体を試験機 (INSTRON5943, Instron, MA, USA) に設置し、頭尾側方向にクロスヘッド速度 1mm/min で 300N の軸圧縮力を加えて椎間板の荷重変位曲線を計測した後、左右回旋試験を行った。回旋モーメントは 6Nm とし、左右の可動域 (range of motion; ROM) を測定した。次に自作の負荷装置を用いて、前後屈・左右側屈試験を行った。各モーメントは 6Nm とし、それぞれ ROM を測定した。その後、検体を前述の試験機に再度設置しクロスヘッド速度 1mm/min で 1000N までの軸圧縮力を加えて椎間板の荷重変位曲線を計測した。最大圧縮力の 60-100%、及び 400-600N の間の曲線から圧縮剛性を算出した。UPAL 群に対してはゲルの脱出の有無を確認するため、軸圧縮・回旋・前後屈・側屈の各試験後にデジタルカメラ (EOS M3, Canon, Tokyo, Japan) で写真撮影を行った。

また、in vivo 埋植試験は、軸圧縮試験 (1000N) のみを施行し、最大圧縮力の 60-100% 間の曲線から圧縮剛性を算出した。

動的試験: 繰り返し軸圧縮 伸張試験

ヒツジ屍体腰椎 7 体を上述の軸圧縮・前後屈・側屈・回旋試験と同様に検体を準備した (各 n=7)。検体を INSTRON5943 に設置し、頭尾側方向に 1 Hz の速度で 300N から 300N までの正弦波繰り返し軸圧縮・伸張力を負荷し荷重変位曲線を計測した。UPAL 群に対しては繰り返し 200 回終了後にゲルの脱出がないことを確認し、その後 1000 回まで試験を行った。200 回、1000 回終了後にデジタルカメラで写真撮影を行った。各群に対し、1000 回目の荷重変位曲線の 200N から 300N 間の曲線から圧縮剛性を算出した。

髄核摘出術及び UPAL 埋植試験

【ウサギモデル】

本実験のために実施した動物実験は北海道大学動物実験に関する規定に従って実施した。はじめに、4-5 か月齢雄日本白色家兎 (3.2-3.5kg) を使用し UPAL 埋植モデルを作成した。ペントバルビタール (30mg/kg) による静脈麻酔とセボフルランによる吸入麻酔を併用して手術を施行した。経後腹膜アプローチにより展開、椎間板を露出後、L2/3 及び L4/5 椎間板繊維輪を 18G 注射針で 5mm の深度まで穿刺し、10ml シリンジで髄核吸引を行った。L3/4 椎間板は無処置 control として使用した。次に 25G 注射針及びマイクロシリンジ (Hamilton, Reno, NV, USA) を

使用して椎間板空内に UPAL 水溶液を 20 μ l 注入し、102mM 塩化カルシウム水溶液で表層をゲル化し、5 分後に生理食塩水で洗浄した。直後、ウサギをペントバルビタール過量投与により安楽死させ、腰椎切除後に椎間板を軸位面で切断し埋植されたゲルを確認した。

次に、40 羽のウサギを使用し *in vivo* 試験を行った。24 羽は椎間板変性の定量評価 (MRI、組織学的評価、免疫組織学的評価) に使用し、計 72 個の椎間板を無処置 control, aspirate, UPAL の 3 群に分けた (各 n=8 椎間板)。残り 16 羽は GD2/Tie2 二重染色評価に使用し、計 48 個の椎間板を前述の 3 群に分けた (各 n=8 椎間板)。前述と同様に髄核吸引及び UPAL 埋植を行った。椎間板変性の定量評価は埋植後 4、12 及び 24 週で行い、GD2/Tie2 二重染色評価は埋植後 2、4 週で行った。

【ヒツジモデル】

雄サフォーク種ヒツジ (2 歳, 体重 40-60kg) 21 頭に対し、UPAL 埋植モデルを作成した。動物の飼育管理・麻酔については GLP 適合施設 (HAMRI, Ibaraki, Japan) にて実施した。L1/2, L2/3, L3/4, L4/5 椎間板を無作為化し、無処置 control 群 (n=7 椎間板) discectomy 群 (n=10 椎間板) UPAL 群 (n=10 及び 11 椎間板) に分けた。塩酸ケタミン (0.2mg/kg) 及びキシラジン (20mg/kg) の 4:1 混合液を 0.5 mL/kg の割合で筋肉内投与して導入麻酔を行い、イソフルランを用いて維持麻酔を行った。手術は右経後腹膜アプローチにて展開し椎間板を露出後、discectomy 群及び UPAL 群椎間板には 5 \times 3mm の後方繊維輪切開を加え、0.1g の椎間板組織を摘出した。UPAL 群椎間板に対しては椎間板欠損部に 2%UPAL 水溶液を充填し、102mM 塩化カルシウム水溶液でゲル化させた。術後 4 週, 12 週及び 24 週にペントバルビタールで安楽死させた。

MRI 評価

椎間板変性を評価するため、ウサギモデルでは 7.0-Tesla MR scanner (Unity Inova, Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, USA)、ヒツジモデルでは 3.0-T MR scanner (MAGNETOM Prisma, Siemens, Germany) を用いて T2 強調矢状断を撮像した。椎間板変性度を評価するため、Pfirschmann 分類を用いてスコア化した。本分類は MRI における椎間板変性度を 5 段階 (1: normal ~ 5: highly degenerative) に評価している。また、Analyze 10.0 software (AnalyzeDirect) を用いて、MRI index (髄核の平均信号強度と髄核面積の積) を測定し定量的に評価した。手術群における MRI index を、control 群の MRI index に対する割合で評価した。

組織切片の作製・椎間板の組織学的評価

MRI 撮像後、10%ホルムアルデヒドでサンプルを固定、10% EDTA (pH 7.5) で脱灰処理し、パラフィンに包埋。矢状断 5- μ m 厚のパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし、アルコール処理、水洗いした後、Hematoxylin & Eosin (HE) 染色、Safranin-O 染色を施した。椎間板変性の重症度はウサギモデルでは 1 点 (normal) ~ 5 点 (highly degenerative) のスコア、及びヒツジモデルでは 0 点 (normal) ~ 36 点 (highly degenerative) のスコアを用いて評価した。

4. 研究成果

ヒト髄核細胞は *in vitro* の UPAL 内で有意に高い生存能を示す

まず、UPAL がヒト髄核細胞に与える影響について *in vitro* で評価した。ヒト非変性髄核細胞を 2%濃度の各 UPAL 水溶液、及び CAL 水溶液に混濁し、三次元培養を 28 日間行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞生存率評価、フローサイトメトリーによる細胞生存率、アポトーシスの評価、WST-8 による細胞増殖能の評価を行った。この実験では、粘調度の異なる 2 種類の UPAL; AL100 (粘調度 100-200 mPa/s) 及び AL500 (粘調度 400-600 mPa/s) を使用した。細胞生存率、アポトーシス細胞率はすべての評価時点で 3 群間に有意差はなかった。同様に、WST-8 暴露後の吸光度測定による細胞増殖能評価でも各評価点で 3 群間に有意差はなかった。

次に、すでに確立された *in vitro* 椎間板変性モデルとして、髄核細胞血清除去モデルを用いて評価を行った。ヒト髄核細胞をアルギン酸ビーズ内で 7 日間通常の三次元培養後、血清を除去し飢餓状態で 48 時間培養した。共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞生存率評価では CAL 群と AL500 群に有意差はなかったが、フローサイトメトリー解析では AL500 群では CAL 群と比較して有意に細胞生存率が高く、アポトーシス細胞率が低かった。一方、AL100 群と AL500 群間の比較では 2 群間に有意差は認められなかった。これらの *in vitro* 実験の結果から、临床上のハンドリングのしやすさを考慮し、粘調度の高い AL500 を使用することに決定した。

UPAL 埋植は髄核摘出術後の荷重により椎間板外に逸脱しない

非拘束性圧縮試験を行い UPAL の力学的特性を評価した。直径 4.5mm、厚さ 2mm の CAL、及び UPAL を作製し、非拘束圧縮を行った。UPAL のヤング率は 18.5 \pm 9.2 kPa であり、CAL のヤング率 (18.8 \pm 8.5 kPa) 及び正常ヒト椎間板のヤング率と同様であった。

次に、ヒツジ屍体腰椎から採取した FSUs を使用し、非破壊性生体力学試験を行った。静的試験では埋植ゲルの後方逸脱は認められなかった。静的軸圧縮試験 (400-600N) から算出した圧縮剛性や ROM 値について control 群、discectomy 群、及び UPAL 群の 3 群間で有意差はなかった。

動的試験でも埋植ゲルの後方逸脱は認められなかった。1000 回の繰り返し軸圧縮 伸張負荷 (\pm 300N, 1Hz) 後の平均圧縮剛性は control 群で 1331.3 \pm 308.0 N/mm discectomy 群で 934.1 \pm 204.3 N/mm, UPAL 群で 1159.0 \pm 270.6 N/mm であった。Discectomy 群では control 群と比較して有意に低い圧縮剛性を示したが、UPAL 群では control 群と差がなかった。

UPAL は髄核摘出術後の椎間板修復を惹起した

MRI を用いて矢状断 T2 強調像におけるウサギ椎間板の変性変化を評価した。手術群では髄

核の信号変化の低下を認めたが UPAL 群では aspirate 群と比較して埋植後 4、12、24 週いずれの時点でも信号強度が強かった。UPAL 群では aspirate 群と比較して埋植後 4、12、24 週いずれの時点でも Pfirrmann 分類のスコアが有意に低く、MRI index が有意に高かった。同様に、MRI を用いて矢状断 T2 強調像におけるヒツジ椎間板の変性変化を評価した。UPAL 群では discectomy 群と比較して Pfirrmann 分類のスコアが低く、MRI index が高い傾向にあった。

ウサギ椎間板組織学的評価で、control 群では内層線維輪の圧壊はなく、髄核組織特徴的な楕円形パターンを示した。Aspirate 群ではすべての評価点で内層線維輪構造は圧壊しており、髄核組織の線維化所見を認めた。一方、UPAL 群では aspirate 群と比較して相対的に内層線維輪構造が保たれており、髄核組織の線維化もわずかであった。組織学的変性スコアでは、UPAL 群は aspirate 群と比較して埋植後 4、12、24 週いずれの時点でも有意に低かった。ウサギモデルと同様に、ヒツジモデルにおいて discectomy 群では癒痕組織や好酸性顆粒の増加を認めたが、UPAL 群では discectomy 群と比較して相対的な変性変化所見が少なかった。組織学的変性スコアでは、UPAL 群は discectomy 群と比較して術後 4、12、24 週いずれの時点でも有意に低かった。

免疫組織学的所見に関し、ウサギ及びヒツジモデルともに、UPAL 群椎間板は aspirate 群あるいは discectomy 群椎間板と比較して埋植後 4、12、24 週いずれの時点でも type II collagen 陽性細胞率が有意に高かった。

抗 alginate 抗体を使用した免疫組織学的評価では、ウサギモデルにおいて埋植後 4 週ではアルギン酸の残存を認めたが、埋植後 12 週にはアルギン酸は消失していた。ヒツジモデルでは、埋植後 4 週ではアルギン酸は残存していたが、埋植後 12 週から 24 週にかけて消失していた。

UPAL 埋植は内在性髄核前駆細胞を増殖させる

最後に、ウサギ髄核組織の凍結切片を作製し、髄核前駆細胞のマーカーである GD2/Tie2 二重陽性細胞を評価した (n=8 椎間板)。UPAL 群では aspirate 群と比較して術後 2、4 週いずれの時点でも GD2/Tie2 二重陽性細胞率が有意に高かった。

上記結果のまとめとして、本研究では、まず、ヒト髄核細胞を用いた *in vitro* 椎間板変性モデルにより評価した。UPAL 内髄核細胞は CAL 内髄核細胞と比較して有意に細胞生存率が高く、アポトーシス細胞率が低かった。次に、ヒツジ屍体腰椎を使用した *in vitro* 生体力学試験を行い、UPAL が埋植部位外に逸脱しないことを確認した。さらに、ウサギ及びヒツジモデルを用いて、本治療法が組織修復を促進し髄核組織の水分含有量を保持することを実証した。最後に、ウサギ髄核組織凍結切片を作製し、髄核前駆細胞陽性率が UPAL 埋植により増加することを確認した。以上より、UPAL を使用した椎間板組織自然再生誘導法は髄核摘出単独と比較して有効な治療法であることが実証された。

これまでに研究開発されているゲルは、優れた生物学的特性を有することが示唆されているが、力学的安定性を示すには限界があった。体温でゲル化するハイドロゲルは、液体状態で注入されてから硬化するまでに時間を要するため、椎間板内圧により椎間板外へ逸脱する可能性が高い。また、ヒツジ屍体腰椎を使用した生体力学試験において、ポリグルコール酸 ヒアルロン酸複合体が、髄核摘出後の脊柱安定性を獲得し、逸脱もなかったと報告されているが、この研究では静的試験 ($\pm 7.5\text{Nm}$, 屈曲 伸展負荷)のみしか実施していない。脊柱金属固定材評価のように、ヒトの日常生活動作を模擬し、実臨床に直結した荷重を考慮した生体力学試験は、バイオマテリアルに関しては報告されていない。本研究では、静的試験 (6 方向負荷; $\pm 6\text{Nm}$, 圧縮負荷; $\sim 1000\text{N}$) だけでなく、動的試験 ($\pm 300\text{N}$ 圧縮 伸展, 1000 回) も実施した。その結果、髄核摘出術後の UPAL 埋植により、UPAL が逸脱することはなかった。

アルギン酸は非熱性反応でゲル化する特性があるため、通常 *in vivo* で埋植する場合には埋植前に *in vitro* で重合反応を行うが、椎間板において、その埋植法は確立されていない。アルギン酸を高濃度カルシウムイオンに暴露することでアルギン酸ゲルの強度を上げることは実証されているが、被爆細胞のアポトーシスを誘導することになる。実臨床でのアルギン酸ゲル使用を考慮した場合、宿主細胞への塩化カルシウム毒性の影響を最小限に留める一方で、ゲルの力学的安定性を得る必要がある。我々の開発した新たな埋植戦略では、椎間板欠損部に水溶液状の UPAL を充填し、塩化カルシウムを表面にのみ短時間 (5 分間以内) 暴露させて硬化させる。UPAL は欠損部に水溶液状態で充填するため、外部からのカバーや線維輪縫合は必要とせず、様々な形状に対応してそのままの形状の硬化性ゲルとして機能する。

アルギン酸ゲルは本来、哺乳類にその消化酵素が存在しないため劣化せず、それゆえに埋植椎間板を長期間力学的に支持する可能性がある。しかしながら、本研究では、UPAL は埋植後 12 ~ 24 週時点で観察されなかった。この結果は、二価イオンが一価イオンに置換されることや、生理水による加水分解、再生細胞による吸収などが原因となりアルギン酸基質のマテリアルが経時的に消失したことを示唆している。

近年、筋骨格系組織再生分野では幹細胞移植を主体とした cell-based medicine に関する研究が実施されている。しかしながら、免疫拒絶反、病原体伝播や腫瘍化の可能性、移植細胞の生着の課題など超えるべきハードルは高い。一方、ell-based medicine とは対称的に、matrix-based medicine で使用する無細胞バイオマテリアルは、移植細胞よりも長期保存、貯蔵が可能であり、手術回数も 1 回で済む利点がある。髄核摘出術後の椎間板再生治療としても時間的な制約がなく、いつでも使用することができる。

本研究において、MRI 評価および組織学的評価において UPAL が髄核摘出術後の椎間板変性を抑制したことを示し、免疫組織学的評価では type II collagen 陽性細胞率が有意に高く、UPAL

が椎間板組織の自然再生を誘導したことが示唆された。さらに、実験に必要な数を得られず長期評価はできなかったが、UPAL 群では埋植後 2、4 週において GD2/Tie2 二重陽性細胞率が有意に高かった。これまでに、椎間板変性過程において椎体骨髄由来間葉系幹細胞の椎間板内集積は認められたが、椎間板は無血管組織であるためにその効果はごく限定的であった事が報告されている。また、髄核前駆細胞は type II collagen 及び aggrecan 陽性の楕円形コロニーを形成し、多能性クローンであり、間葉系各系統及び髄核組織への分化能を有していることが報告されている。これらの事実から、髄核摘出術後に内在性の残余髄核細胞が UPAL で充填された創傷治癒部に集積し、同様に、術後早期に髄核前駆細胞が UPAL 内へ集積、増加することで椎間板組織が自然再生した可能性がある。以上の成果から、本治療戦略に対する組織修復メカニズムや橋渡し研究の成果が証明されたことで、探索的医師主導治験へと進むことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tsujimoto T, *Sudo H, Iwasaki N, et al. An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc repair: A preclinical proof-of-concept study. EBioMedicine. 査読有, 37:521-534, 2018

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Tsujimoto T, Sudo H, Iwasaki N, et al. A cellular Ultra-purified Alginate Gels for Intervertebral Disc Regeneration in a Preclinical Animal Model. Orthopaedic Research Society. 2018 annual meeting of the Orthopaedic Research Society. Mar 10-13-2018, Hyatt Regency New Orleans /New Orleans, LO, USA
2. 須藤 英毅、岩崎 倫政 他, 椎間板再生治療における組織修復材の開発, 第 17 回日本再生医療学会, 2018 年 3 月 21 日, パシフィコ横浜, 横浜市
3. 須藤 英毅、岩崎 倫政 他, 椎間板再生治療における組織修復材の開発, 第 39 回日本バイオマテリアル学会, 2017 年 11 月 20 日, タワーホール船堀, 東京都
4. 須藤 英毅、岩崎 倫政 他, 椎間板再生治療における組織修復材の開発, 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017 年 10 月 26 日, 沖縄コンベンションセンター, 宜野湾市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

取得状況 (計 1 件)

名称: 椎間板治療用組成物

発明者: 須藤英毅, 辻本武尊, 岩崎倫政, 清水賢, 伊佐次美津子

権利者: 北海道大学, 持田製薬株式会社

種類: 特許

番号: 6487110

出願年: 2016 年

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 岩崎 倫政

ローマ字氏名: IWASAKI NORIMASA

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 医学研究院

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 30322803

研究分担者氏名: 東 秀明

ローマ字氏名: HIGASHI HIDEAKI

所属研究機関名: 北海道大学

部局名: 人獣共通感染症リサーチセンター

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20311227

(2) 研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。