

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10823

研究課題名(和文) 進化分子工学と先端接着技術による損傷椎間板の治療法の開発と実用化に向けた検討

研究課題名(英文) Development and analysis of practical application of damaged intervertebral disc treatment using advanced molecular engineering and bounding technology

研究代表者

荒瀧 慎也 (Arataki, Shinya)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：40714994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット椎間板変性モデルを用い、培養した椎間板線維輪細胞と可視光硬化型ゼラチンを併用した新規椎間板再生治療の有用性について検討した。移植した細胞は移植箇所への生着を認めたが、線維輪構造の再生を認めることはできなかった。再生治療に用いる成長因子として、過去に報告のあるBMP-7につき検討したが、今回の検討では線維輪においてはむしろ変性に傾く可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えた本邦において、運動器障害によるロコモティブシンドロームは増加し、健康寿命延伸の障害要素となっている。腰痛の原因の一つである椎間板の変性や椎間板ヘルニアに対する現在の治療法には、保存的治療や椎体間固定術、ヘルニア摘出術が挙げられるが、線維軟骨の変性や断裂の根本的な治療法は確立されていない。一方、近年細胞工学の進歩や新しい生体材料の開発により、多くの軟骨再生の研究が行われ、臨床応用されるようになってきた。本研究では可視光硬化型ゼラチンに加え、成長因子や細胞と組み合わせ、骨髄由来間葉系幹細胞の軟骨細胞への分化誘導能の確認ならびにラット椎間板損傷モデルを用いて椎間板再生能を検討した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the usefulness of new intervertebral disc regeneration treatment using intervertebral disc degeneration model of rats in combination with cultured disc annulus fibrosus cells and novel, visible light-induced, rapidly cross-linkable gelatin scaffold. Transplanted cells were found to engraft on the transplanted site, but regeneration of the annulus fibrosus was not identified. As a growth factor used for regenerative therapy, we studied BMP-7 that has been reported in the past, but this study suggested the possibility of contribution to degeneration in the annulus fibrosus.

研究分野：脊椎外科

キーワード：椎間板再生 可視光硬化型ゼラチン 成長因子

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた本邦において、運動器障害によって要介護状態になるロコモティブシンドロームは急増しており健康寿命延伸の阻害要素となっている。腰痛は有訴者率が高く、多くの患者において通院の原因となっており、国民病と言える。椎間板障害は腰痛の主な原因の一つである。椎間板内で髄核を取り囲む線維輪は線維軟骨であり、無血管組織であることから一旦損傷が生じると治癒機転が働きにくく、自己修復能は極めて乏しい。さらに軟骨変性が進行し断裂すると髄核が脱出し、椎間板ヘルニアへと進行したり、脊柱変形を生じる。椎間板の変性や椎間板ヘルニアに対する現在の治療法には、保存的治療や椎体間固定術、ヘルニア摘出術が挙げられるが、椎間板内で髄核を取り囲む線維輪を構成する線維軟骨の変性や断裂の根本的な治療法は確立されていない。

近年、細胞工学の進歩や新しい生体材料の開発により、多くの施設で軟骨再生の研究が行われ、一部では臨床応用されるようになってきた。その一つとして組織工学的な手法を用いた組織再生が注目されている。これは細胞や成長因子をその足場(scaffold)と組み合わせて行なわれる。現在使用されている scaffold はコラーゲンゲルやフィブリン糊などであるが、接着性や力学的強度などの問題を抱えている。これまでに申請者らは理化学研究所との共同研究で新たな scaffold として可視光硬化型ゼラチンを開発した。この材料は生体に接着し、有機溶媒を用いないため、細胞や、成長因子などの薬剤の担体になりうる。我々のこれまでの研究で、この可視光硬化型ゼラチンに骨髄間質細胞(Bone marrow stromal cell :BMSC)を加えることで、骨軟骨欠損動物モデルにおいてその効果を確認している(図1)。本研究では、この先端材料を用いて、革新的な椎間板の再生技術を開発する。

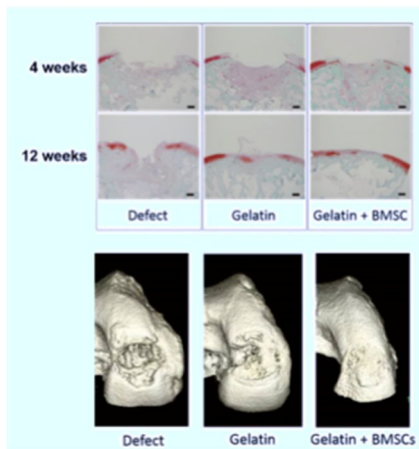


図1：ウサギ軟骨欠損モデルにおける可視光硬化型ゼラチンと BMSC を用いた研究。Gelatin+BMSC 群で良好な骨再生を認めた。

2. 研究の目的

医療技術の進歩が著しい今日においても、軟骨再生における有効な治療法はいまだ確立されていない。これは、無血管組織である軟骨再生に必要な細胞や成長因子を適切に患部へ集積させる技術が開発されていないことに起因する。申請者らは軟骨再生という整形外科の抱える最大級の医療ニーズを解決すべく、理化学研究所の先端技術を応用し、可視光硬化型ゼラチンを開発した。本材は生きた細胞を封入することができ、骨や軟骨に接着するという軟骨再生を図る上で理想的な性質を有している。本研究では可視光硬化型ゼラチンと細胞に加えて成長因子を付与することにより椎間板における革新的な軟骨再生治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) ラット尾椎椎間板から線維輪細胞を抽出、培養を行った。細胞の産生する基質を維持しつつ細胞を移植するため、特殊なディッシュを用いた細胞シート技術を応用し、線維輪細胞シートを作成した。ラット尾椎椎間板の線維輪を一部切除し椎間板変性モデルを作成、細胞シートを移植し、それを被覆するように可視光硬化型ゼラチンを移植した(図2)。

術後4週で sacrifice を行い、組織学的に評価を行った。

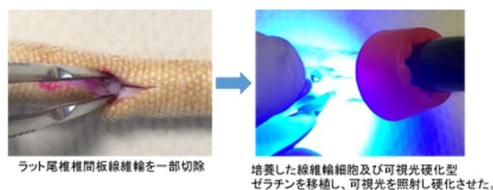


図2：ラット椎間板変性モデルを用いた実験

(2) 椎間板再生に用いる成長因子の同定

椎間板の再生に用いる成長因子として、過去には BMP-7(OP-1)を用いた報告が散見される。今回、ラット線維輪細胞に BMP-7 を投与した群と非投与群を PCR 法で比較した。またヒト椎間板線維

輪組織に対し BMP-7 抗体を用いた免疫染色を行い、高齢者の変性椎間板と若年の健常椎間板で比較した。

4. 研究成果

(1) 可視光硬化型ゼラチンのみ移植した群では移植したゼラチン内に線維芽細胞様の組織の増生がみられたが、椎間板線維輪の層状構造の再生はみられなかった(図3)。また、線維輪細胞シートと可視光硬化型ゼラチンを移植した群は、細胞の生着及び硝子軟骨様の組織の増生はみられたが、やはり椎間板線維輪の層状構造の再生はみられなかった(図4)。

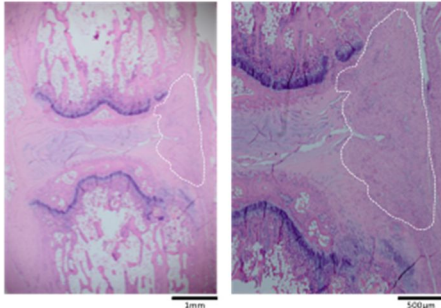


図3：椎間板線維輪の切除部分に可視光硬化型ゼラチンのみ移植したラット尾椎椎間板。ゼラチンを移植した箇所(点線部)に線維芽細胞様の組織増生を認めた。

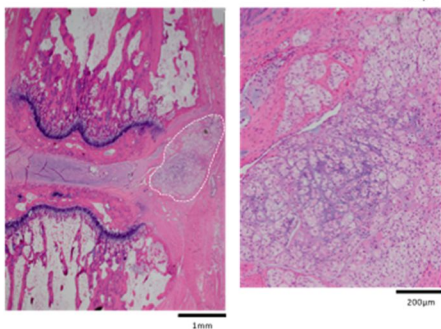


図4：椎間板線維輪の切除部分に線維輪細胞シートと可視光硬化型ゼラチンを移植したラット尾椎椎間板。移植した箇所(点線部。右図はその拡大)には細胞の生着及び硝子軟骨様の組織の増生がみられた。

(2) ラット椎間板線維輪細胞に対し、24時間及び48時間 BMP-7 を投与した群は、それぞれ非投与群と比較し、Mkx 及び Col1a1 は低下傾向、Sox-9 は上昇を認めた(図5)。Mkx 及び Col1a1 は本来は椎間板内層の髄核よりも外層の線維輪に発現することが知られており、逆に Sox-9 は線維輪よりも髄核に発現することが知られている。また、ヒト椎間板線維輪における BMP-7 抗体を用いた免疫染色では、健常椎間板よりも変性椎間板の線維輪細胞の一部で、BMP-7 の発現を認めた(図6)。このことから、BMP-7 投与は線維輪の再生には寄与せず、むしろ変性に傾いてしまう可能性が考えられた。

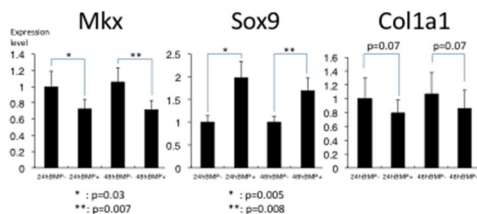


図5：ラット椎間板線維輪細胞に BMP-7 を投与した群と非投与群の PCR 法を用いた比較。24時間及び48時間 BMP-7 を投与した群は、それぞれ非投与群と比較し、Mkx 及び Col1a1 は低下傾向、Sox-9 は上昇を認めた。

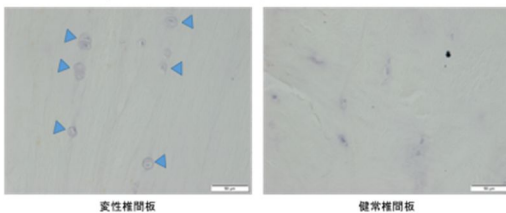


図6：ヒト椎間板線維輪組織に対する BMP-7 抗体を用いた免疫染色での比較。高齢者の変性椎間板における線維輪細胞では、若年者の健常椎間板と比較し BMP-7 の発現をみとめた(矢頭部)。

本研究において、椎間板変性モデルを用いた検討では、可視光硬化型ゼラチンを用いることで移植した細胞の生着を得ることはできたが、通常の椎間板組織にみられるような層状の線維輪の再生を得ることはできなかった。最近の報告で、線維輪の内層は軟骨組織に近く、外層は腱及び靭帯組織に近いとする報告がある。今後は線維輪の内層と外層を別個に考えた再生方法を検討する予定である。また、BMP-7 は線維輪においては再生よりも寧ろ変性に関与している可能性も考えられたことから、例えば椎間板における BMP の発現をブロックすることで変性を抑制する方法なども検討していく予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

1. Watanabe N, Sugimoto Y, Tanaka M, Mazaki T, Arataki S, Takigawa T, Kataoka M, Kunisada T, Ozaki T. Neurological Recovery after Posterior Spinal Surgery in Patients with Metastatic Epidural Spinal Cord Compression. Acta Med Okayama. 2016;70(6):449-453. 査読有 DOI: 10.18926/AMO/54807
2. Yamane K, Takigawa T, Tanaka M, Sugimoto Y, Arataki S, Ozaki T. Impact of Rotation Correction after Brace Treatment on Prognosis in Adolescent Idiopathic Scoliosis. Asian Spine J. 2016;10(5):893-900. Epub 2016. 査読有 DOI: 10.4184/asj.2016.10.5.893
3. Shinohara K, Takigawa T, Tanaka M, Sugimoto Y, Arataki S, Ito Y, Ozaki T. Biomechanical Comparison of Posterior Fixation Using Spinal Instrumentation and Conventional Posterior Plate Fixation in Unstable Vertical Sacral Fracture. Acta Med Okayama. 2016;70(2):97-102. 査読有 DOI: 10.18926/AMO/54188
4. Shinohara K, Takigawa T, Tanaka M, Sugimoto Y, Arataki S, Yamane K, Watanabe N, Ozaki T, Sarai T. Implant Failure of Titanium Versus Cobalt-Chromium Growing Rods in Early-onset Scoliosis. Spine (Phila Pa 1976). 2016;41(6):502-7. 査読有 DOI:10.1097/BRS.0000000000001267.
5. Tanaka M, Sugimoto Y, Arataki S, Takigawa T, Ozaki T. Computer-assisted Minimally Invasive Posterior Lumbar Interbody Fusion without C-arm Fluoroscopy. Acta Med Okayama. 2016;70(1):51-5. 査読有 DOI: 10.18926/AMO/54004
6. Yamane K, Sugimoto Y, Tanaka M, Arataki S, Takigawa T, Ozaki T. Laminar closure rates in patients with cervical myelopathies treated with either open-door laminoplasty with reattachment of spinous processes and extensor musculature or Hirabayashi open-door laminoplasty: a case-control study. Eur Spine J. 2016;25(6):1869-74. Epub 2016. 査読有 DOI: 10.1007/s00586-016-4398-3.

〔学会発表〕(計1件)

荒瀧 慎也, 高畑 智宏, 渡邊 典之, 上甲 良二, 前原 孝、胸腰椎化膿性脊椎炎に対する低侵襲脊椎安定術の応用、第49回中国・四国整形外科学会、2016年10月22日-23日、アスティとくしま(徳島県徳島市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：尾崎 敏文

ローマ字氏名：(OZAKI, toshifumi)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学院医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：4029445

研究分担者氏名：松川 昭博

ローマ字氏名：(MATSUKAWA, akihiro)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学院医歯薬学総合研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：90264283

研究分担者氏名：内野 崇彦

ローマ字氏名：(UCHINO, takahiko)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号(8桁)：80803121

研究分担者氏名：吉村 将秀

ローマ字氏名：(YOSHIMURA, masahide)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号(8桁)：70751858

研究分担者氏名：宇川 諒

ローマ字氏名：(UGAWA, ryo)

所属研究機関名：岡山大学

部局名：大学病院

職名：医員

研究者番号(8桁)：30756656