

平成21年 6月 11日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591729

研究課題名 (和文) 組織工学的手法による椎間板再生法の確立

研究課題名 (英文) Tissue-engineered intervertebral disc regeneration

研究代表者

三上 靖夫 (MIKAMI YASUO)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：80360030

研究成果の概要：多血小板血漿 (platelet rich plasma:PRP) とゼラチンハイドロゲル粒子 (粒子) を用いた椎間板再生法を臨床応用する前段階として、家兔変性椎間板モデルを用いて、椎間板変性抑制効果のメカニズム解析および治療対象となる椎間板の変性度を評価した。PRP と粒子を組み合わせて椎間板内に注入することにより、髄核細胞への明らかな細胞増殖効果を認めなかったが、アポトーシスが抑制され、髄核細胞の細胞外基質産生が亢進することにより椎間板内の水分含有量が保持された。対象となる椎間板変性度は Pfirrmann 分類で Grade I および II であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医薬歯学

科研究費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎脊髄病学

## 1. 研究開始当初の背景

椎間板は、支持性と運動性を担う脊柱の重要な要素である。椎間板はいったん変性すると、その組織学的特徴から自然治癒の可能性は極めて低く、椎間板の機能を回復させる治療法は未だ確立されていない。腰痛は医療的および社会的に非常に大きな問題となっているが、その原因である多くの腰痛

疾患が椎間板障害に起因していると考えられている。成長因子を用いた椎間板再生法は、簡便性、安全性、有効性の面から臨床応用が非常に期待されている方法である。しかし、生体内への成長因子注入法では、その生理活性を長期にわたり持続することが困難であるという欠点がある。われわれは現在までに、drug delivery system として血小板内成

長因子の徐放可能な粒子を作製し、自己血液から精製したPRPを含浸させて家兎椎間板変性モデルの椎間板内に注入し、血小板内成長因子の徐放による椎間板再生効果を明らかにした(Nagae M, Ikeda T, Mikami Y, et al: Intervertebral disc regeneration using platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres: Tissue Engineering. Volume 13, 2007.)。この結果から、初期の椎間板変性に対する再生法の確立と臨床応用への可能性が示されたが、臨床応用を考える上で、椎間板再生効果のメカニズム解析および対象となる椎間板の変性度の評価は必須である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、家兎変性椎間板モデルを用いて、PRPと粒子を用いた椎間板変性抑制効果のメカニズム解析および対象となる椎間板の変性度を評価することである。

## 3. 研究の方法

全身麻酔下に日本白色家兎の髓核を部分吸引し、2週間飼育することにより家兎変性椎間板モデルを作製した。

PRP含浸粒子群とPRP単独群では、日本白色家兎から採血し、遠心操作を加えてPRPを精製した。

PRP含浸粒子を変性椎間板内に注入したPRP含浸粒子群、phosphate-buffered saline(PBS)含浸粒子を注入したPBS含浸粒子群、PRPを単独で注入したPRP単独群、および穿刺のみを行うSHAM群を作製した。

注入後、経時的に椎間板組織を摘出し、以下の評価を行った。

(1) PRP含浸粒子の椎間板変性抑制効果をMR画像で判定するため、摘出した椎間板のMR T<sub>1</sub>およびT<sub>2</sub>強調画像を撮像し、椎間板の変性度と水分含有量を評価した。

(2) PRP含浸粒子の髓核への細胞外基質産生に及ぼす効果を評価するために、髓核からRNAを抽出し、cDNAを合成後、髓核における主要な細胞外基質であるプロテオグリカン(PG)コアプロテイン、II型コラーゲンの遺伝子発現量をreal time PCR法で解析した。遺伝子発現量はハウスキーピング遺伝子として、ribosomal RNAの遺伝子発現量を測定し、標準化した。同体重の日本白色家兎の無処置椎間板(L2/3, 4/5, 6/7)から測定した細胞外基質の遺伝子発現量をコントロールとした。

(3) PRP含浸粒子の髓核細胞に対する増殖効果を評価するため、注入後2週の時点で椎間板複合体を摘出後、パラフィン切片を作製し、Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)免疫染色を実施した。

(4) PRP含浸粒子の髓核細胞へのアポトーシス抑制効果を評価する目的で、注入後2週の時点でパラフィン切片を作製し、TUNEL染色を実施した。また、全髓核細胞におけるTUNEL陽性細胞の比率を測定した。

## 4. 研究成果

(1) PRP含浸粒子群のMR T<sub>1</sub>強調画像における椎間板高およびMR T<sub>2</sub>強調画像における椎間板内の信号強度は他の群と比べ、注入後8週にわたり維持された(図1)。また、PRP含浸粒子を注入した時点における椎間板の変性度はPfarrmann分類でGrade IおよびIIであった。

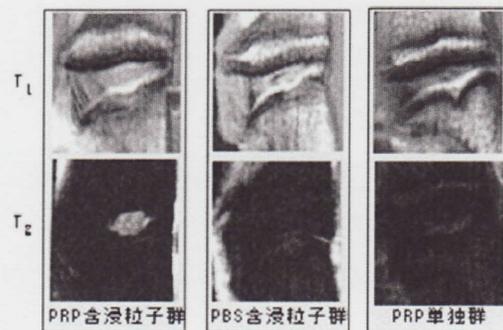


図1 MR画像(注入後8週)

(2) 注入後2週の時点における、PRP含浸粒子群でのPGコアプロテインとII型コラーゲンは他の群と比較し、有意に高値であった(\*:  $p < 0.05$ )(図2, 3)。注入後4週および8週の時点では明らかな有意差を認めなかった。

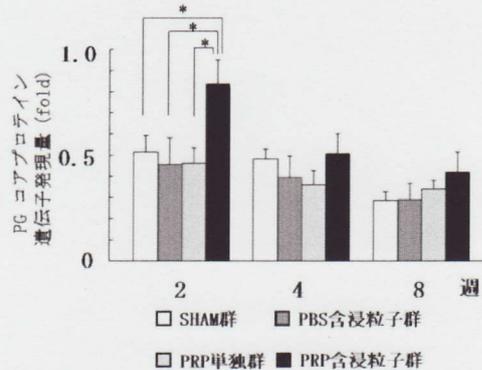


図2 PGコアプロテイン遺伝子発現量

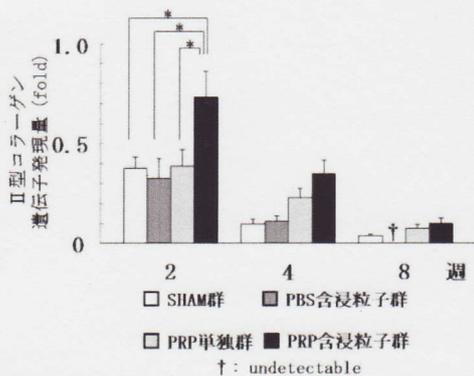


図3 II型コラーゲン遺伝子発現量

(3) 全群で骨髄、穿刺した前縦靭帯、および最外層線維輪にPCNA陽性細胞を認めたが、髄核および内層線維輪にPCNA陽性細胞を認めなかった。

(4) 全群で髄核にTUNEL陽性細胞を認め、PRP含浸粒子群のTUNEL陽性細胞の比率は、他の群と比べ有意に低値であった。

遺伝子発現量の結果から、PRPと粒子を組み合わせることで椎間板内に注入することにより、PRP中の成長因子が髄核細胞に作用し、注入後初期の段階でPGコアプロテインとII型コラーゲンの合成が亢進したと考えた。

PGは高い水親和性を有し、MR T<sub>2</sub>強調画像における信号強度と椎間板内の水分含有量が相関することが報告されている。MR画像の結果から、産生されたPGが維持され、椎間板内の水分含有量および椎間板高が保持されたと考えた。

PCNA免疫染色とTUNEL染色の結果から、PRP中の成長因子による髄核細胞の細胞増殖効果を認めなかったが、PRP中の成長因子は髄核細胞のアポトーシスの抑制に関与している可能性があると考えた。

以上から、PRPを粒子と組み合わせることで変性椎間板内へ注入することで、髄核細胞におけるPGコアプロテインとII型コラーゲンの合成が亢進し、さらに髄核細胞のアポトーシスが抑制された結果、椎間板の変性の進行が抑制されたと考えた。また、本法による椎間板再生効果を望める変性椎間板のMR画像のGradeはPfirrmann分類でIおよびIIであった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文] (計1件)

Sawamura, K., Ikeda, T., Nagae, M., Okamoto, S., Mikami, Y., Hase, H., Ikoma, K., Yamada, T., Sakamoto, H., Matsuda, K., Tabata, Y., Kawata, M., and Kubo, T. Characterization of in vivo effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel microspheres on degenerated intervertebral discs: Tissue Engineering. (In press, 2009)

### [学会発表] (計8件)

- ① 長江将輝: 多血小板血漿を用いた椎間板再生法におけるゼラチンハイドロゲル粒子の有用性の検討. 第36回日本脊椎脊髄病学会, 金沢, 2007.4.27.
- ② 澤村和秀: Drug delivery systemを用いた多血小板血漿の椎間板変性抑制効果の検討. 第28回日本炎症・再生医学会, 東京, 2007.8.3.
- ③ 長江将輝: 多血小板血漿と Drug Delivery System を用いた椎間板再生法の検討. (パネルディスカッション) 運動器の再生: 椎間板の変性と再生. 第22回日本整形外科学会基礎学術集会, 浜松, 2007.10.26.
- ④ Sawamura, K.: A study of the effects of platelet-rich plasma and biodegradable gelatin hydrogel on the degenerated intervertebral disc. World forum for spine research first Japanese meeting, Kyoto, Japan, 2008.1.23-26.
- ⑤ 澤村和秀: 多血小板血漿含浸ゼラチンハイドロゲル粒子による椎間板変性抑制効果の検討. 第37回日本脊椎脊髄病学会, 東京, 2008.4.24.
- ⑥ 澤村和秀: 多血小板血漿と生分解性ゼラチンハイドロゲル粒子の変性椎間板内投与による椎間板変性抑制機序の検討. 第29回日本炎症再生医学会, 東京, 2008.7.9.
- ⑦ 澤村和秀: 多血小板血漿による椎間板変性抑制のメカニズム解析. 第23回日本整形外科学会基礎学術集会, 京都, 2008.10.24.

- ⑧ Sawamura, K.: MECHANISMS OF REGENERATIVE EFFECTS OF PLATELET-RICH PLASMA ON THE DEGENERATED INTERVERTEBRAL DISC IN VIVO. 53th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, Las Vegas, USA, 2009. 2. 22-25.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三上 靖夫 (MIKAMI YASUO)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：80360030

(2) 研究分担者

長谷 齊 (HASE HITOSHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号：80360030

(3) 連携研究者

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)  
京都大学・再生医科学研究所・教授  
研究者番号：50211371

(4) 研究協力者

池田 巧 (IKEDA TAKUMI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教

澤村 和秀 (SAWAMURA KAZUHIDE)  
京都府立医科大学・医学研究科・大学院

岡本 慎一 (OKAMOTO SHIN-ICHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・大学院