

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17983

研究課題名（和文）革新的ソフトバイオマテリアルによる椎間板性疼痛の制御

研究課題名（英文）Soft biomaterials for the control of intervertebral disc pain

研究代表者

山田 勝久（Yamada, Katsuhisa）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：20771893

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）：ウサギ腰椎椎間板変性モデルおよびラット尾椎椎間板変性モデルを用いて、高純度硬化性ゲルが椎間板性疼痛に関連するサイトカインと神経成長因子に与える影響を評価した。椎間板の髄核欠損部にゲルを充填し、免疫組織化学染色により炎症性サイトカイン（TNF- α 、IL-6）、神経成長因子受容体TrkAの発現について評価し、ゲル充填群では髄核穿刺吸引群に比べTNF- α 、IL-6、TrkA陽性細胞率が有意に低値であった。さらにラット尾椎椎間板変性モデルではゲルを充填した群で有意に疼痛関連行動が抑制された。本研究結果より高純度硬化性ゲルは椎間板性疼痛に関連するサイトカインと神経成長因子の発現を抑制する効果が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、高純度硬化性ゲルはこれまで報告してきた椎間板組織変性の抑制効果に加え、椎間板性疼痛に関連するサイトカインと神経成長因子の発現を抑制する効果がウサギ腰椎椎間板変性モデルおよびラット尾椎椎間板変性モデルにおいて示された。さらに疼痛関連行動評価においても改善がみられ、椎間板ヘルニア手術後の椎間板内の炎症性サイトカイン産生が高純度硬化性ゲルにより抑制されることで、椎間板損傷部の疼痛軽減に寄与すると考えられた。

これらの結果より、高純度硬化性アルギン酸ゲル埋植は椎間板ヘルニアに対する髄核摘出術後の疼痛軽減などに有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We aimed to investigate whether the bioresorbable ultra-purified alginate (UPAL) gel can alleviate LBP using a rat nucleus pulposus (NP) punch model and a rabbit NP aspirate model. In both models, we assessed TNF- α and IL-6 production and TrkA expression within the IVD by immunohistochemistry. Further, histological analysis and behavioural nociception assay were conducted in the rat model. UPAL gel implantation suppressed TNF- α and IL-6 production, downregulated TrkA expression, inhibited IVD degeneration, and reduced nociceptive behaviour. Our results suggest the potential of UPAL gel implantation as an innovative treatment for IVD herniation by reducing LBP and preventing IVD degeneration after discectomy.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板性疼痛制御 バイオマテリアル 椎間板変性制御

1. 研究開始当初の背景

椎間板変性の代表的疾患として腰椎椎間板ヘルニアがあり、手術治療として神経を圧迫している変性髄核(ヘルニア)摘出術が通常行われる。しかし、本手術では椎間板組織の変性を制御することができず、また手術後に腰痛や下肢痛が十分改善しない症例も存在し、これらの問題点を解決しうる新しい治療が望まれている。

これまで椎間板障害に対するアプローチとして、椎間板組織修復の観点から基礎研究を行い、生体力学的、分子生物学的側面から椎間板組織に対する変性制御の可能性を示してきた(Yamada et al. PLOS ONE 2013、Yamada et al. Am J Pathol 2014、山田勝久・アポトーシス応答機構を標的とした椎間板変性制御に関する統合的研究、若手研究 B、2017-2019 年度)。その一方で、椎間板障害を痛みの観点から評価することは実施してこなかった。

椎間板ヘルニア摘出術後の組織修復を促すソフトバイオマテリアルとして、当教室ではアルギン酸を基盤とした高純度硬化性ゲルを開発した。ヘルニア摘出後の空隙部分に充填すると、髄核細胞や髄核前駆細胞の増殖を刺激し、椎間板の自然修復が起こることを明らかにし(Tsujimoto, Yamada et al. EBioMedicine 2018) 腰椎椎間板ヘルニア手術患者を対象とした探索的医師主導治験を実施している。本臨床試験において、腰椎椎間板ヘルニア摘出術後のゲル充填が、術後早期の腰痛や下肢痛の軽減に寄与する可能性を示唆するデータが集積されている。また近年、ラット尾椎椎間板損傷モデルに対する椎間板内ヒアルロン酸充填において、炎症性サイトカインが抑制されて疼痛が軽減されるという報告がなされた(Mohd Isa et al. Science Advance 2018)。以上の背景から、腰椎椎間板ヘルニア摘出術後の椎間板内への硬化性ゲル充填が、椎間板組織変性を抑制するのみならず、術後の腰痛や下肢痛の軽減にも有用である可能性が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、急性期・亜急性期椎間板障害に起因する腰痛発生の機序である「椎間板組織炎症」と「椎間板への神経侵入」に着目し、高純度硬化性ゲルが炎症性サイトカインや神経成長因子受容体の発現、および疼痛へ与える影響を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 椎間板性疼痛に関連するサイトカインと神経成長因子の評価

申請者らはこれまでウサギ椎間板変性モデルに高純度硬化性ゲルを埋植することで椎間板組織変性抑制効果を確認した(Tsujimoto, Yamada et al. EBioMedicine 2018)。本研究ではさらに、硬化性ゲルが炎症性サイトカインおよび神経成長因子受容体の発現に与える影響を評価する。

日本白色家兎腰椎椎間板に対して、18G 針を穿刺後に髄核を吸引し、椎間板変性モデルを作成する。

26G 針を用いて髄核欠損部に高純度硬化性ゲルを充填する。

術後 1、4、7、28 日目に椎間板を採取し、免疫組織化学染色による炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)、神経成長因子受容体 TrkA の発現について陽性細胞率を評価し、未処置非変性椎間板、髄核吸引椎間板、ゲル充填椎間板の各群で比較する。

(2) ラット疼痛関連行動評価

ラット尾椎椎間板穿刺モデルを用いて、動物種を越えて免疫組織学的評価が一致するかを確認し、併せて疼痛関連行動の評価を行う。

SD ラット尾椎椎間板髄核に 19G 針を穿刺し、椎間板穿刺変性モデルを作成する。

26G 針を用いて髄核欠損部に高純度硬化性ゲルを充填する。

疼痛関連行動の解析を術前、術後に実施する。

- ・ Hargreaves test : 創部の腹側から赤外線による熱刺激を加え、逃避行動を示すまでの潜時を測定する。
- ・ Tail-flick test : 尾の先端から 5cm 近位部の腹側に赤外線による熱刺激を加え、逃避行動を示すまでの潜時を測定する。
- ・ von-Frey test : Dynamic Plantar Aesthesiometer を用いて創部腹側から尾をフィラメントで刺激し、逃避反応を示した時点で加わった力と逃避反応を示すまでの潜時を自動的に計測する。

術後 1、4、7、28 日目に椎間板を採取し、免疫組織化学染色による TNF- α 、IL-6、TrkA の発現について、未処置非変性椎間板、髄核穿刺椎間板、ゲル充填椎間板の各群で比較する。

4. 研究成果

(1) 椎間板損傷後の高純度硬化性ゲル埋植は炎症性サイトカイン産生および TrkA 発現を抑制する

高純度硬化性ゲルが炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)に与える影響を評価した。ウサギ腰椎椎間板変性モデルでは、髄核吸引群の TNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、それぞれ 4 日目および 7 日目にピークを迎え、ゲル充填群の TNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、各時点で髄核吸引群と比較して有意に低かった。ゲル充填群では、各時点での TNF- α 陽性髄核細胞の割合が未処置非変性椎間板に比べて有意に高く、各時点での TNF- α 陽性線維輪細胞の割合は未処置非変性群とゲル充填群との間で同等であった。

ラットモデルでは、髄核穿刺群の TNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、術後 1 日目から 7 日目まで徐々に増加したが、28 日目には減少した。ゲル充填群でも同様の傾向が見られたが、ゲル充填群の TNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、各時点で髄核穿刺群に比べて有意に低かった。TNF- α 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、7 日目の線維輪細胞の割合を除いて、未処置非変性群とゲル充填群で同等であった。同様に IL-6 陽性細胞についても同様の傾向であった。これらの結果は、高純度硬化性ゲル埋植は、ラットおよびウサギの両モデルにおいて、椎間板傷害によって生じる炎症反応を減少させることを示唆していた。

さらに、椎間板損傷後の神経成長因子受容体発現に対する硬化性ゲルの効果を調べるために、TrkA 発現を評価した。ウサギモデルでは、髄核吸引群の TrkA 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は、術後 1 日目から 28 日目にかけて緩やかな増加を示した。未処置群とゲル充填群では術後 1 日目から 28 日目までほぼ変化がなく、各時点でゲル群の TrkA 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は髄核吸引群に比べて有意に低かった。ラットでは、各時点での TrkA 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合は未処置群とゲル充填群との間で有意な差はなかった。また、いずれの群でも 7 日目まではほとんど変化がなく、髄核穿刺群で術後 28 日目に TrkA 陽性髄核細胞および線維輪細胞の割合が有意に増加した。これらの結果は、硬化性ゲル埋植が、ラットおよびウサギの両モデルにおいて、椎間板傷害によって誘導された椎間板内の TrkA 受容体発現を抑制することを示唆していた。

(2) ラット椎間板損傷モデルにおいて UPAL ゲル埋植は疼痛関連行動を減少させる

疼痛関連行動の解析が確立しているラットモデルを使用して、硬化性ゲル埋植の疼痛緩和効果を評価した。

Hargreaves 試験では、術後 2 日から 27 日までの間において、髄核穿刺群では未処置群およびゲル充填群と比較して有意に逃避行動までの潜時が短縮していた。同様に、von Frey 試験では、術後 2 日から 27 日までの間において、髄核穿刺群では未処置群およびゲル充填群と比較して有意に逃避行動までの潜時が短縮していた。Tail flick 試験では、未処置群とゲル充填群の潜時は経時的変化を示さなかったが、髄核穿刺群の潜時は術後に延長し、術後の各時点で未処置群とゲル充填群よりも有意に延長していた。

これらの結果は、硬化性ゲル埋植が椎間板損傷によって誘発される痛みを緩和することを示唆していた。

上記結果のまとめとして、高純度硬化性アルギン酸ゲル埋植により、椎間板障害に起因する炎症性サイトカインや神経成長因子受容体の発現、および、椎間板組織変性が抑制されることが示された。加えて、高純度硬化性アルギン酸ゲル埋植によって、損傷単独の場合と比較して機械的および熱刺激に対する逃避行動出現までの潜時が延長し、損傷部位以外の部位で熱刺激に対する逃避行動出現までの潜時が延長したことから、高純度硬化性アルギン酸ゲル埋植は損傷部の疼痛を抑制し、中枢性の疼痛抑制修飾の一種である広汎性侵害抑制修飾の出現を阻害したと考えられた。これらのことから、高純度硬化性アルギン酸ゲル埋植は、髄核摘出術後の椎間板内の炎症性サイトカイン産生、椎間板組織変性を抑制することによって、椎間板損傷部の疼痛軽減に寄与すると考えられた。また、神経成長因子受容体の発現が抑制されたことから、椎間板への神経新生が阻害される可能性が示唆された。

結論として、高純度硬化性アルギン酸ゲル埋植は、椎間板組織変性の抑制のみならず、椎間板部分切除術後の疼痛の軽減にも有用であると考えられ、高純度硬化性アルギン酸ゲル埋植は椎間板ヘルニアに対する髄核摘出術後の疼痛軽減などに有用である可能性が示唆された。さらに、椎間板ヘルニアに限らず急性椎間板障害に伴う腰痛症に対する治療へも広く臨床として応用できる発展性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamada Katsuhisa, Nagahama Ken, Abe Yuichiro, Murota Eihiro, Hiratsuka Shigeto, Takahata Masahiko, Iwasaki Norimasa	4. 巻 5
2. 論文標題 Unintentional Fusion in Preserved Facet Joints without Bone Grafting after Percutaneous Endoscopic Transforaminal Lumbar Interbody Fusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Spine Surgery and Related Research	6. 最初と最後の頁 390 ~ 396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22603/ssrr.2020-0232	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 -
1. 著者名 Yamada Katsuhisa, Kenichiro Maeda, Ito Yoichi M., Inage Fujio, Isoe Toshiyuki, Yokota Nozomi, Sugita Osamu, Sato Norihiro, Tha Khin Khin, Iwasaki Norimasa, Arato Teruyo, Sudo Hideki	4. 巻 23
2. 論文標題 Exploratory clinical trial on the safety and capability of dMD-001 in lumbar disc herniation: Study protocol for a first-in-human pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Contemporary Clinical Trials Communications	6. 最初と最後の頁 100805 ~ 100805
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.conctc.2021.100805	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 -
1. 著者名 Yamada Katsuhisa, Nagahama Ken, Abe Yuichiro, Hyugaji Yoshinori, Takahata Masahiko, Iwasaki Norimasa	4. 巻 30
2. 論文標題 Morphological analysis of Kambin's triangle using 3D CT/MRI fusion imaging of lumbar nerve root created automatically with artificial intelligence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Spine Journal	6. 最初と最後の頁 2191 ~ 2199
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00586-021-06916-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada Katsuhisa, Sudo Hideki, Iwasaki Norimasa, Chiba Akihiko	4. 巻 45
2. 論文標題 Mechanical Analysis of Notch-Free Pre-Bent Rods for Spinal Deformity Surgery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Spine	6. 最初と最後の頁 E312 ~ E318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/BRS.0000000000003269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ura Katsuro, Yamada Katsuhisa, Tsujimoto Takeru, Ukeba Daisuke, Iwasaki Norimasa, Sudo Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Ultra-purified alginate gel implantation decreases inflammatory cytokine levels, prevents intervertebral disc degeneration, and reduces acute pain after discectomy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 638
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79958-9	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 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yamada K, Nagahama K, Abe Y, Takahata M, Iwasaki N
2. 発表標題 Unintentional facet fusion without bone grafting after minimally invasive lumbar interbody fusion: A retrospective study of percutaneous endoscopic transforaminal lumbar interbody fusion.
3. 学会等名 13th combined meeting of APSS-APPOS (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamada K, Nagahama K, Abe Y, Hyugaji Y, Takahata M, Iwasaki N
2. 発表標題 Percutaneous Endoscopic Transforaminal Lumbar Interbody Fusion (PETLIF) -A New Modified Technique for Treating Degenerative Lumbar Spondylolisthesis-
3. 学会等名 7th world congress of minimally invasive spine surgery & techniques (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田勝久, 高畑雅彦, 伊東学, 長濱賢, 岩田玲, 遠藤努, 百貫亮太, 須藤英毅, 岩崎倫政
2. 発表標題 胸腰椎化膿性脊椎炎に胸腔感染を併発すると感染が遷延する - 経皮的内視鏡下洗浄ドレナージ術84例の後ろ向き観察研究 -
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田勝久, 長濱賢, 安倍雄一郎, 日向寺義則, 高畑雅彦, 岩崎倫政
2. 発表標題 AIにて自動作成した3D腰椎神経根画像を用いたKamin's triangleの形態解析 - 経椎間孔アプローチ手術の安全性向上のために -
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田勝久, 高畑雅彦, 伊東学, 長濱賢, 須藤英毅, 岩田玲, 遠藤努, 辻本武尊, 岩崎倫政
2. 発表標題 膿瘍腔が大きい化膿性椎体椎間板炎は感染遷延・再燃の危険因子である - 経皮的内視鏡下搔爬術55例の後ろ向き観察研究 -
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田勝久, 須藤英毅, 岩崎倫政, 千葉晶彦
2. 発表標題 コバルトクロムnotch-freeプリベントロッドは脊柱変形矯正手術に有用である - 曲げ加工法および金属材料における力学特性の検討 -
3. 学会等名 第93回日本整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田勝久, 長濱賢, 室田栄宏, 平塚重人, 高畑雅彦, 岩崎倫政
2. 発表標題 経椎間孔アプローチ手術におけるsafety working areaの形態計測 - 3D腰椎神経根Volume Rendering画像解析 -
3. 学会等名 第35回日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 椎間板性疼痛抑制用組成物	発明者 須藤英毅、浦勝郎、 山田勝久	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/042482	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------