

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03313

研究課題名（和文）自家骨髄濃縮液による低侵襲椎間板組織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）Intervertebral disc regenerative therapy using bone marrow aspirate concentrate combined with in situ forming bioresorbable ultra-purified alginate gel

研究代表者

須藤 英毅（Sudo, Hideki）

北海道大学・医学研究院・特任教授

研究者番号：30374367

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：生体内における椎間板の再生能力は著しく低く、我々はこれまでに家兎椎間板変性モデルを対象に、アルギン酸を基盤とした高純度硬化性ゲルと骨髄濃縮液（BMAC）の併用による組織再生効果と力学的安定性を示してきた。本研究では、臨床応用を見据えた橋渡し研究として、大動物モデル（ビーグル犬）を対象とした性能評価試験を行なった。その結果、BMACとゲルの併用が髄核摘出およびゲル単独と比較して有意に変性が抑制されていたことから、大動物における本法の椎間板組織修復効果が示された。本研究における橋渡し研究の成果が示されたことから今後の臨床への応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内における椎間板の再生能力は著しく低く、椎間板ヘルニアに対するヘルニア摘出術は術後変性を来す要因となる。我々はこれまでに家兎椎間板変性モデルを対象に、アルギン酸を基盤とした高純度硬化性ゲルと骨髄濃縮液（BMAC）の併用による組織再生効果と力学的安定性を示してきた。本研究では、臨床応用を見据えた橋渡し研究としての性能評価試験を行なった。

細胞培養操作を伴う幹細胞移植に比べて一期的処置が可能な本法は、生体侵襲やコスト軽減効果が高く、実臨床における新たな椎間板再生治療法としての有用性は高いと言える。本研究における橋渡し研究の成果が示された。

研究成果の概要（英文）：The regenerative ability of intervertebral discs (IVDs) is restricted due to the poor nutritional supply. We have demonstrated the regenerative effect of implantation of bone marrow aspirate concentrate (BMAC) combined with ultra-purified alginate gel (UPAL gel) for degenerated IVDs in a rabbit model. The purpose of this study is to assess the effectiveness of the implantation of BMAC combined with UPAL gel after discectomy in beagle dogs as a large animal model. Implantation of the BMAC combined with UPAL gel suppresses IVD degeneration after discectomy. In addition, type II collagen positive cells were significantly higher in the BMAC group, suggesting that the implantation of BMAC combined with UPAL gel promoted spontaneous IVD repair. These results support that BMAC combined with UPAL gel implantation after discectomy may be applied in clinical settings as one-step cell-based regenerative therapy for IVD herniation.

研究分野：整形外科

キーワード：椎間板再生 自家骨髄濃縮液

様式 C-19、F-19-1 (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、アレルギーともなるため、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。さらに、家兎椎間板変性モデルを対象に高純度硬化性ゲルと骨髓濃縮液 (Bone marrow aspirate concentrate; BMAC) の併用による組織再生効果と力学的安定性を示してきた。

2. 研究の目的

臨床応用を見据えた橋渡し研究として、大動物モデル (ビーグル犬) を対象とした性能評価試験を行うこととした。

3. 研究の方法

まず *In vitro* 試験として、ウサギ骨髓液を対象に、記載の3種の市販キットを使用して BMAC を作成し、細胞濃縮能を評価した。未濃縮骨髓液と BMAC における単位量あたりの間葉系幹細胞の細胞数を免疫染色およびセルソーターにて測定し、細胞濃縮率を計測した。その結果、BIO CUE および Smartperp で濃縮率が高い傾向にあり、動物実験では Smartprep キットを使用する方針とした。

続いて GLP 準拠下の *in vivo* 試験では、ビーグル犬を対象に骨髓液を採取後、BMAC を作成し、髄核摘出後にゲル単剤またはゲルと BMAC を移植した。コントロール、髄核摘出、ゲル単独、ゲルと BMAC の4群に分けた。経後腹膜アプローチにて髄核摘出を行ない、摘出部にゲルまたはゲルと BMAC を埋植した。埋植24週後に MRI 評価と組織学的、免疫組織学的評価による変性定量評価を行った。

4. 研究成果

MRI 評価では、Pfarrmann 分類および MRI index の両評価において、BMAC 群は髄核摘出群およびゲル群と比較して有意に高信号が保持されていた。組織学的評価では、BMAC 群は摘出群およびゲル群と比較して変性スコアが有意に低値であった。免疫組織学的評価では Type II collagen および Type I collagen の陽性細胞率を算出した。その結果、Type II collagen では BMAC 群が摘出群およびゲル群と比較して有意に高値であった一方で、Type I collagen においては有意に低値であった。

前試験においては家兎椎間板変性モデルを対象に、ゲルと BMAC による力学的安定性と有効性を証明した。本試験では、ゲルと BMAC の併用は、髄核摘出およびゲル単独と比較して椎間板変性が有意に抑制されていた。これらの結果から大動物モデルにおいて、高純度硬化性ゲルと BMAC の併用はゲル単独と比較して椎間板組織修復を促すという仮説が実証された。

椎間板細胞治療における幹細胞利用の課題として、二期的手術による患者負担、細胞培養に伴うコスト高、移植経路からの細胞漏出が挙げられる。一方で、BMAC は一期的処置が可能で、患者負担やコスト軽減が可能であり、ゲルと組み合わせることで細胞漏出を防ぐことが可能となる。実臨床における有用性は高く、橋渡し研究の成果が示されたことで今後の臨床応用が期待される。

【結論】 一期的治療が可能な本法は新たな椎間板再生治療法として有用性が高いと考えられ、臨床への応用が期待される。

本研究成果については、第 96 回日本整形外科学会学術総会にて最優秀口演賞を受賞している。

Intervertebral disc regenerative therapy using bone marrow aspirate concentrate combined with in situ forming bioresorbable ultra-purified alginate gel

INTRODUCTION: The regenerative ability of intervertebral discs (IVDs) is restricted due to the poor nutritional supply. The defect within the IVD produced by discectomy, the current surgical procedure of choice for IVD herniation, predisposes patients to further IVD degeneration. We have demonstrated the regenerative effect of implantation of bone marrow aspirate concentrate (BMAC) combined with ultra-purified alginate gel (UPAL gel) for degenerated IVDs in a rabbit model. Additionally, we showed the mechanical stability that the BMAC embedded in the UPAL gel does not alter the mechanical characteristics of the gel [1]. The purpose of this study is to assess the effectiveness of the implantation of BMAC combined with UPAL gel after discectomy in beagle dogs as a large animal model for clinical application in the future.

METHODS: Seven beagle dogs (19-month-old, 12 kg) were operated complying with the Good Laboratory Practice (GLP) regulations. The L1/2, L2/3, L3/4, and L4/5 discs were divided into four groups, Intact control group (n = 6), Discectomy group (n = 6), UPAL group (n = 8), and BMAC + UPAL group (n = 8). First, we removed 45 mg of nucleus pulposus tissue from the treated discs except for Intact control IVDs under general anesthesia. In BMAC + UPAL group, approximately 25 ml of bone marrow was harvested from the iliac crest using a 15-gauge needle and centrifuged using a commercially available system (SmartPrep® System, Terumo BCT, Inc, Lakewood, Colorado, USA) to obtain BMAC (Figure 1a). The mixture of BMAC and UPAL solution (Figure 1b) or acellular UPAL solution (approximately 100 μ l) were filled into the IVD cavity in the UPAL or BMAC+ UPAL groups (Figure 1c). The treated dogs were euthanized 12 weeks after surgery, and IVDs were qualitatively analyzed for assessment of IVD degeneration, using a 3-Tesla magnetic resonance imaging (MRI). Subsequently, the sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis and stained with Safranin-O for analysis of proteoglycans. Immunohistochemical (IHC) staining was also performed to detect Type I and Type II collagen. All data are presented as the means \pm standard deviation (SD). One-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey-Kramer post hoc test were conducted for multigroup comparisons. Student's t-test were used for two-group comparisons.

RESULTS: In MRI analysis, Pfirrmann grades assigned in the BMAC + UPAL group was significantly lower than those in the Discectomy and UPAL groups. In addition, the MRI index in the BMAC + UPAL group was significantly higher than those of two groups (Figure 2). In histological analysis, we evaluated the degree of collapse of inner annulus fibrosus. The histological degeneration score of the BMAC + UPAL group was significantly lower than those of the Discectomy and UPAL groups. In IHC analysis, type I and II collagen-positive cells were counted in 5 independent fields selected at random. The percentage of type II collagen positive cells was significantly higher in the BMAC + UPAL group than in the Discectomy and UPAL groups. On the other hand, the percentage of Type I collagen positive cells was significantly lower in the BMAC + UPAL group than in the Discectomy and UPAL groups.

DISCUSSION: In this study, implantation of the BMAC combined with UPAL gel suppresses IVD degeneration after discectomy in a beagle model. In addition, type II collagen positive cells were significantly higher in the BMAC group, suggesting that the implantation of BMAC combined with UPAL gel promoted spontaneous IVD repair. These results indicate that the regenerative effect of BMAC + UPAL gel implantation would be expected in a large animal model. We also previously showed the sufficient biomechanical properties of implanted UPAL gels combined with BMAC without material protrusion after discectomy [1]. This treatment strategy has a possibility of the effective treatment option as a one-step surgical procedure with mechanical safety for IVD regeneration in the future.

SIGNIFICANCE/CLINICAL RELEVANCE: These results support that BMAC combined with UPAL gel implantation after discectomy may be applied in clinical settings as one-step cell-based regenerative therapy for IVD herniation.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Suzuki H, Ura K, Ukeba D, Suyama T, Iwasaki N, Watanabe M, Matsuzaki Y, Yamada K, Sudo H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Injection of Ultra-Purified Stem Cells with Sodium Alginate Reduces Discogenic Pain in a Rat Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells12030505.	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 Ukeba D, Yamada K, Suyama T, Lebl DR, Tsujimoto T, Nonoyama T, Sugino H, Iwasaki N, Watanabe M, Matsuzaki Y, Sudo H.	4. 巻 76
2. 論文標題 Combination of ultra-purified stem cells with an in situ-forming bioresorbable gel enhances intervertebral disc regeneration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 103845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2022.103845.	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 該当する

1. 著者名 Ohnishi T, Iwasaki N, Sudo H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Causes of and Molecular Targets for the Treatment of Intervertebral Disc Degeneration: A Review.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 394
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11030394.	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 K, Iwasaki N, Sudo H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Biomaterials and Cell-Based Regenerative Therapies for Intervertebral Disc Degeneration with a Focus on Biological and Biomechanical Functional Repair: Targeting Treatments for Disc Herniation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11040602.	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 Ohnishi T, Homan K, Fukushima A, Ukeba D, Iwasaki N, Sudo H.	4. 巻 12
2. 論文標題 A Review: Methodologies to promote the differentiation of mesenchymal stem cells for the regeneration of intervertebral disc cells following intervertebral disc degeneration	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12172161	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 Sudo H	4. 巻 13
2. 論文標題 Intervertebral disc degeneration and regeneration: New molecular mechanisms and therapeutics	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells13020153	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 Ukeba D, Ishikawa Y, Yamada K, Ohnishi T, Tachi H, Iwasaki N, Sudo H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Bone Marrow Aspirate Concentrate Combined with Ultra-Purified Alginate Bioresorbable Gel Enhances Intervertebral Disc Repair in a Canine Model: A Preclinical Proof-of-Concept Study	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells13110987	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9件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 須藤 英毅
2. 発表標題 生体力学的観点からみた椎間板再生医療への取り組み: 超高純度生体吸収性バイオマテリアルと同種骨髄由来間葉系幹細胞を用いた臨床研究
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木久崇、浦勝郎、山田勝久、岩崎倫政、伊佐次三津子、渡部正利喜、松崎有未、須藤英毅
2. 発表標題 超高純度間葉系幹細胞とアルギン酸ナトリウムの椎間板内投与は椎間板性疼痛を軽減する
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木久崇、浦勝郎、山田勝久、岩崎倫政、伊佐次三津子、渡部正利喜、松崎有未、須藤英毅
2. 発表標題 超高純度間葉系幹細胞とアルギン酸ナトリウムの椎間板内投与は椎間板性疼痛を軽減する
3. 学会等名 第71回東日本整形災害外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠場大介、陶山隆史、山田勝久、辻本武尊、岩崎倫政、渡部正利喜、松崎有未、須藤英毅
2. 発表標題 超高純度同種間葉系幹細胞と硬化性ゲルを用いた変性椎間板に対する細胞治療法の開発
3. 学会等名 第140回北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤英毅、笠場大介、陶山隆史、山田勝久、辻本武尊、岩崎倫政、渡部正利喜、伊佐次三津子、松崎有未
2. 発表標題 超高純度同種間葉系幹細胞と硬化性ゲルを用いた変性椎間板に対する細胞治療法の開発
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Ukeba, Katsuhisa Yamada, Takashi Suyama, Takeru Tsujimoto, Norimasa Iwasaki, Masatoki Watanabe, Yumi Matsuzaki, Hideki Sudo
2. 発表標題 Combination of highly-purified mesenchymal stem cells with bioresorbable alginate gel as a regenerative therapy for degenerated intervertebral discs
3. 学会等名 2022 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Daisuke Ukeba, Yoko Ishikawa, Katsuhisa Yamada, Khin Khin Tha, Norimasa Iwasaki, Hideki Sudo
2. 発表標題 Intervertebral disc regenerative therapy using bone marrow aspirate concentrate combined with in situ forming bioresorbable ultra-purified alginate gel
3. 学会等名 2023 Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 笠場大介 石川蓉子 山田勝久 Khin Khin Tha 岩崎倫政 須藤英毅
2. 発表標題 高純度硬化性アルギン酸ゲルと骨髄濃縮液を併用した椎間板再生治療法の開発
3. 学会等名 第96回 日本整形外科学会 学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須藤英毅
2. 発表標題 研究者・ベンチャー企業・橋渡し拠点のそれぞれの立場からみた再生医療等製品の開発
3. 学会等名 AMED革新的医療技術創出拠点令和5年度成果報告会パネルディスカッション講演(招待講演)
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 椎間板再生用組成物	発明者 須藤英毅、他6名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-167913	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 椎間板再生用組成物	発明者 須藤英毅、他6名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/004342	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 椎間板再生用組成物	発明者 須藤英毅、他6名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、TW111104138	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

https://www.hokudaiseikei.jp/pdf/20230404sudo.pdf 脊椎・脊髄先端医学分野
--

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
研究分担者	山田 勝久 (Yamada Katsuhisa) (20771893)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究分担者	岩田 玲 (Iwata Akira) (10374373)	北海道大学・大学病院・その他 (10101)	削除：2021年11月12日

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			
米国	Hospital for Special Surgery	Cornell University		