

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791374

研究課題名（和文）椎間板バイオマテリアルの開発－椎間板変性に対する革新的治療戦略に向けて－

研究課題名（英文）Development of novel biomaterial for intervertebral disc repair

研究代表者

明田 浩司（Akeda Koji）

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20422826

研究成果の概要（和文）：

グリコサミノグリカンに類似した化学構造を有し分解性の低いバイオマテリアルである、硫酸化ジェランの椎間板細胞の基質代謝への影響を検討した。GS（硫酸化率 32%）は、椎間板細胞の細胞増殖活性およびプロテオグリカン合成量を著しく促進した。また、局所への投与を可能にしたインジェクタブル硫酸化ジェラン（IGS: Injectable Gellan Sulfate）を家兔変性椎間板へ注入したところ、椎間板高の狭小化が有意に抑制された。組織学的検討より、IGS の高い組織親和性および基質代謝の活性作用が確認された。

研究成果の概要（英文）：

Aggrecan (large proteoglycan) is one of the main extracellular matrix molecules of intervertebral disc (IVD). Gellan sulfate is a polysaccharide-biomaterial, whose chemical structure is similar to glycosaminoglycan. The purpose of this study was (1) to examine the effect of gellan sulfate (GS) on the extracellular matrix metabolism of bovine intervertebral disc (IVD) cells *in vitro* and (2) to evaluate the effect of injectable-GS on the progression of IVD degeneration in the rabbit IVD degeneration model. GS (32% sulfation rate) significantly stimulated the cell proliferation and proteoglycan synthesis of bovine IVD cells. Intradiscal injection of injectable-GS significantly inhibited the progression of disc height narrowing in the rabbit IVD degeneration model. Histological analysis showed that the injectable-GS had a high tissue affinity and increased the activation of matrix metabolism of rabbit IVD tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊椎・椎間板変性・生体材料

1. 研究開始当初の背景

椎間板は、上下椎体骨の間に軟骨終板を介して外層の線維輪、内層の髄核が一体となった複合組織で、椎体間の荷重の伝達に加え、伸展、屈曲、捻りに対する柔軟性に寄与し、脊椎の生理、力学的機能にきわめて重要な役割を担っている。椎間板は、年齢、機械的ストレス、遺伝性、栄養などのいろいろな原因によって変性すると考えられているが、生化学的变化からみると椎間板組織における細胞外基質の産生と分解（新陳代謝）のバランスが崩壊し、細胞外基質が進行的に崩壊していく病態である。椎間板変性が進行すると、髄核組織内のプロテオグリカン、II型コラーゲン含有量は著しく低下し、組織の線維化が進行する。これらの変化は組織の弾力性を低下させ、外的ストレスにより容易に椎間板の亀裂、断裂を生じさせ、腰痛さらには腰椎椎間板ヘルニア、腰椎すべり症などの脊椎変性疾患を発症させると考えられている。したがって椎間板変性に対する治療法を開発することは、医学の進歩にとどまらず、社会的且つ経済的に多大な貢献をもたらすことは間違いない。正常の髄核組織の7-8割は水分であり、髄核細胞が産生する高い飽水能を有する高分子プロテオグリカン（アグリカン）がヒアルロン酸と連結しながら、II型コラーゲンを主体としたコラーゲン繊維の間を埋め尽くすように存在し、組織の弾力性に寄与している。アグリカンにはコンドロイチン硫酸、ケラタン硫酸などの高い硫酸化率を有するグリコサミノグリカンが結合しており、数多くの水分子を保持出来る性質を有している。また、これらのグリコサミノグリカンには成長因子などの重要な機能タンパクと結合し、相互作用を有することも知られている。一方、変性した椎間板では、局所で発現した炎症性サイトカインにより誘導された蛋白分解酵

素により、椎間板組織内のプロテオグリカンは分解され、飽水能および成長因子結合能が著しく低下しており、これらの機能低下が椎間板変性を進行させると考えられている。

2. 研究の目的

椎間板変性は腰痛や脊椎変性疾患を発症させるため、重要な問題である。椎間板組織に含まれる主要なプロテオグリカンは多数のグリコサミノグリカンを有しており組織の高い水分保持能力、弾力性に寄与している。しかし、変性した椎間板では、プロテオグリカンは分解、崩壊しており、これらの機能は著しく低下している。そこで、我々はグリコサミノグリカンに類似した化学構造を有し分解性の低いバイオマテリアルである、硫酸化ジェランに注目し、椎間板変性に対する治療に応用することを考え出した。現在、三重大学工学部分子素材工科とインジェクタブル硫酸化ジェラン (IGS: Injectable Gellan Sulfate)を共同開発しており、本研究の目的はGSの椎間板細胞の基質代謝への影響、IGSの椎間板内での組織親和性および再生・修復効果を検討し、世界に通用する新規性の高い機能性バイオマテリアルの開発を目指すことである。

3. 研究の方法

①硫酸化ジェランの椎間板細胞の細胞増殖活性、基質代謝へ与える影響

椎間板細胞アルジネート3次元培養: 椎間板細胞は牛尾部腰椎椎間板より採取した。椎間板組織を髄核と線維輪を別々に酵素処理し、それぞれの細胞を分離、抽出した。細胞をアルジネート中に浮遊（細胞濃度; $4.0 \times 10^6/\text{ml}$ ）させ、21G針先端より一定速度にてアルジネートを培養液内に滴下させることにより、椎間板細胞含有アルジネートビーズを作製した。9個のビーズを400 μl の培養液(DMEM/F12 + 10% ウシ胎仔血清 [FBS])に

て培養した。前培養（7日間）後、硫酸化率6.2%、32%の硫酸化ジェラン（濃度1 µg/ml、10 µg/ml、100 µg/ml）を含む培養液にて7、14日間培養し、生化学的解析を行った。

細胞増殖活性の評価：細胞増殖活性は、ミトコンドリア NADH/NADPH 依存脱水素酵素の活性を指標として用いた(CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Progema)。培養液中の formazan dye の濃度を吸光度計にて計測した。

プロテオグリカン蓄積量の評価：アルジネートビーズ内に蓄積されたプロテオグリカンの蓄積量を、DMMB assay (Dimethylmethylene blue microdetermination assay)法にて定量化した。

② インジェクタブル硫酸化ジェラン (IGS) の椎間板内注入の効果

家兎椎間板変性モデルへの IGS 注入の効果：家兎線維輪穿刺モデルを用いて、変性椎間板に IGS を注入し、X線像および組織学的な評価を行い、椎間板再生および修復効果を検討した。

ー研究プロトコル

(A) New Zealand White (NZW) 種の家兎7羽を用いた。ケタミン(25mg/kg)とキシラジン(5mg/kg)を筋注し、椎間板高に影響しない十分な筋弛緩を得てから右側臥位にて術前にレントゲン撮影を行った。その後、イソフルレンの吸入麻酔下に右側臥位で左側より経後腹膜的にアプローチし椎間板を露出した。椎間板 (L2/3, L4/5) を18G針にて穿刺後、IGS群 (n=8) では、椎間板 (L2/3, L4/5) の正中にIGSを20 µlを注入した。コントロール群 (n=6) では、PBSを同レベルの椎間板に注入した。L3/4は無注入対照群とした。手術後、2週毎にX線撮影により椎間板高を

計測する。注入後4週に屠殺し、組織学的検討を行った。組織は、椎間板組織の正中矢状断面をサフランin-O およびヘマトキシリンにて染色した。

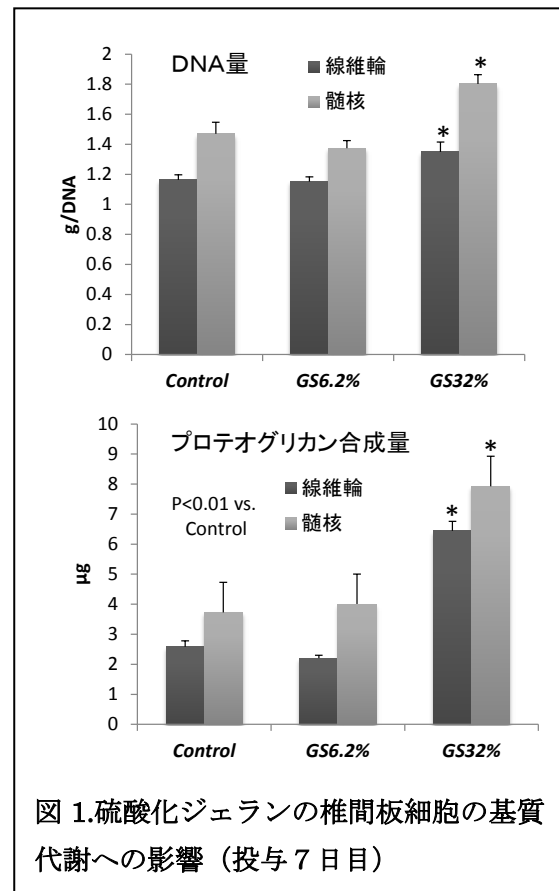


図1.硫酸化ジェランの椎間板細胞の基質代謝への影響（投与7日目）

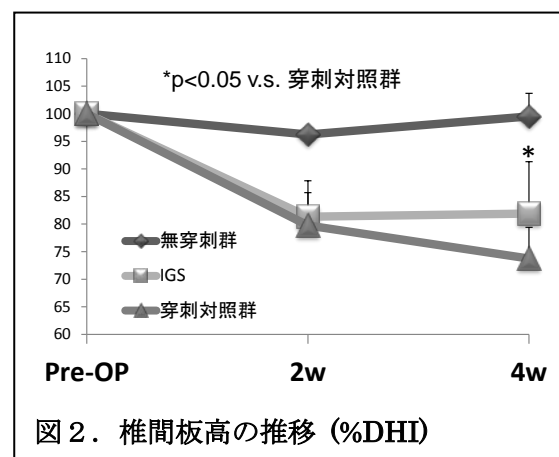


図2. 椎間板高の推移 (%DHI)

4. 研究成果

①硫酸化ジェランの椎間板細胞の細胞増殖活性、基質代謝へ与える影響（図1）

線維輪細胞の細胞増殖活性は、硫酸化ジェランの投与7日目ではGS 32% 100 µg/ml群で著しく増強していた (P<0.01)。また、14日

目では、GS 32% 1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml 群の各群共に対照群と比較して有意な増加を認めた (GS 32% 1 μ g/ml: $P < 0.05$, 10 μ g/ml: $P < 0.05$, 100 μ g/ml 群: $P < 0.01$)。一方、髄核細胞の細胞増殖活性は、硫酸化ジェラン投与 7 日目で著しく増加していた ($P < 0.01$)。また、プロテオグリカン蓄積量は、硫酸化ジェラン投与 7, 14 日時点において髄核、線維輪ともに GS 32% 100 μ g/ml 群で対照群と比べ有意な増加を認めた ($P < 0.01$)。GS 6.2%群においては、細胞増殖活性、プロテオグリカン蓄積量とも明らかな差は認めなかった。

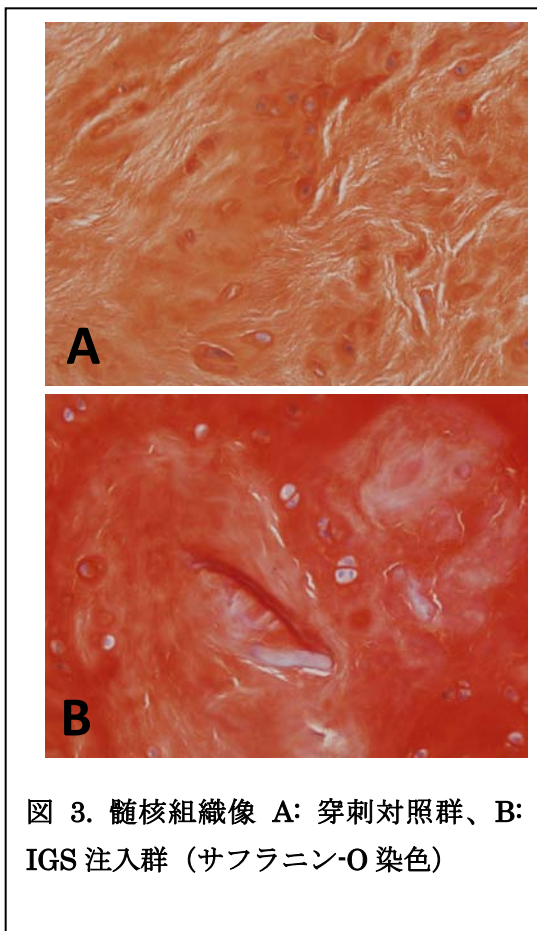


図 3. 髄核組織像 A: 穿刺対照群、B: IGS 注入群 (サフラニン-O 染色)

②インジェクタブル硫酸化ジェラン (IGS) の椎間板内注入の効果

40°Cに保温した IGS は椎間板内に注入され、生体内でゲル化することが確認された。X 線

学的検討では、対照群の椎間板高は経時的な狭小化 (4 週後: %DHI 73%) を認めたが、IGS 群では穿刺後 4 週で椎間板高は術前の 82%に維持されていた (図 2)。組織学的検討では、椎間板内に注入された IGS は髄核および内側線維輪組織に分布しており、細胞外基質間に浸潤するように存在していた。IGS を注入した椎間板の髄核組織では、細胞分裂像が多数確認された。また、コントロール群と比較し、サフラニン-O の染色性が著しく増強していた。IGS 注入椎間板において、椎間板組織内への炎症細胞浸潤は認めなかった (図 3)。

結語:

本研究結果は、硫酸化ジェランが椎間板細胞の細胞増殖活性およびプロテオグリカン合成量を著しく促進させることを示した。また、インジェクタブル硫酸化ジェランは、家兎椎間板内で高い組織親和性を有するとともに、基質代謝を活性化させることが示された。硫酸化ジェランは組織再生、修復効果を有する機能性椎間板バイオマテリアルとして用いることが出来ると考えている。

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 4 件)

1. Satonaka H., Kusuzaki K., Akeda K., Tsujii M., Iino T., Uemura T., Matsubara T., Nakamura T., Asanuma K., Matsumine A., Sudo A. Acridine orange inhibits pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma. *Anticancer Res* 31, 4163-4168. (査読有り) 2011
2. Tagawa T., Akeda K., Asanuma Y., Miyabe M., Arisaka H., Furuya M., Yoshida K., Sakuraba S. Upper airway obstruction associated with flexed cervical position after posterior occipitocervical fusion. *J Anesth* 25, 120-122. (査読有り) 2011
3. Nakoshi Y., Hasegawa M., Akeda K., Iino T., Sudo A., Yoshida T., Uchida A. Distribution and role of tenascin-C in human osteoarthritic cartilage. *J Orthop Sci* 15,

- 666-673. (査読有り) 2010
4. Nishimura A., Akeda K., Matsubara T., Kusuzaki K., Matsumine A., Masuda K., Gemba T., Uchida A., Sudo A. Transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide suppresses pulmonary metastasis by murine osteosarcoma. *Cancer Gene Ther* 18, 250-259. (査読有り) 2010

[学会発表] (計 27 件)

1. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会
平成 23 年 10 月 20 日、21 日 群馬県前橋市
多血小板血漿由来血清を用いた生物学的椎間板治療 - 椎間板性疼痛患者に対する臨床トリアール -
明田浩司、今西隆夫、小畑秀司、中村知樹、大石晃嗣、舛田浩一、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広
2. 第 19 回日本腰痛学会 2011 年 9 月 2 日 - 3 日 札幌
多血小板血漿を用いた生物学的椎間板内治療 - 若中年者の椎間板性疼痛患者に対する臨床トリアール -
明田浩司、今西隆夫、大石晃嗣、舛田浩一、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広
3. The International Society for the Study of the Lumbar Spine, Gothenburg, Sweden, June 14-18, 2011
Effect of diminished flow in rabbit lumbar arteries on intervertebral disc matrix changes: evaluation with T2 values using 3T - MRI
Imanishi, T, Akeda, K., Sudo, A: Tsu, Japan
4. The International Society for the Study of the Lumbar Spine, Gothenburg, Sweden, June 14-18, 2011
Intradiscal injection of autologous serum isolated from platelet - rich - plasma for the treatment of discogenic low back pain: Preliminary prospective clinical trial
Akeda, K., Imanishi, T, Ohishi, K, Masuda, K, Uchida, A, Sakakibara, T, Kasai, Y, Sudo.
5. 第 40 回日本脊椎脊髄病学会 Web 開催 平成 23 年 4 月 21 日 - 5 月 9 日
多血小板血漿由来血清を用いた椎間板治療の開発 - 椎間板性疼痛患者に対する臨床試験 -
明田浩司、今西隆夫、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広
6. 第 40 回日本脊椎脊髄病学会 Web 開

催 平成 23 年 4 月 21 日 - 5 月 9 日
腰動脈狭窄による腰椎椎間板基質代謝への影響
今西隆夫、明田浩司、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広

7. 第 11 回海部整形外科医会総会 平成 23 年 2 月 26 日 (土) 海部休日診療所
椎間板変性の病態と最新研究
明田浩司

8. AAOS 2011 Annual Meeting February 15-19, 2011, San Diego, California
Effect of Platelet-rich Plasma-Serum on the Intervertebral Disc Degeneration: A Preclinical Study
Akeda, Koji; Obata, Shuji; Masuda, Koichi; Morimoto, Ryo; Asanuma, Yumiko; Kasai, Yuichi; Sudo, Akihiro

9. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (January 13-16, 2011, Long Beach)
Risk Factors for Lumbar Intervertebral Disc Height Narrowing -Ten Years Retrospective Cohort Study
Akeda, Koji; Yamada, Tomomi; Inoue, Nozomu; Kasai, Yuichi; Sudo, Akihiro

10. 57th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (January 13-16, 2011, Long Beach)
Effect of Autologous Platelet-rich Plasma-serum on the Rabbit Anular Needle Puncture Model: Preclinical Study for Intervertebral Disc Degeneration
Obata, Shuji; Akeda, Koji; Masuda, Koichi; Morimoto, Ryo; Imanishi, Takao; Kasai, Yuichi; Sudo, Akihiro

11. 第 74 回東海脊椎脊髄病研究会学術集会 (平成 22 年 12 月 4 日) 名古屋市
多血小板血漿由来血清を用いた生物学的椎間板治療の開発 - 椎間板性疼痛患者に対する臨床経験 -
明田浩司、今西隆夫、小畑秀司、大石晃嗣、舛田浩一、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広

12. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 (平成 22 年 10 月 14 日、15 日 京都市)
自己多血小板血漿ゲルの作製と成長因子解析 - 整形外科手術への応用に向けて -
中村知樹、明田浩司、小畑秀司、大石晃嗣、辻井雅也、若林弘樹、長谷川正裕、松峯昭彦、須藤啓広

13. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会

(平成22年10月14日、15日 京都市)

椎間板バイオマテリアルの開発 –糖鎖高分子技術の応用–

明田浩司、小畑秀司、長谷川正裕、宮本啓一、須藤啓広

14. 第115回中部整形外科・災害外科学会・学術集会(平成22年10月8日・9日) 大阪市

後頭骨頸椎固定術後に発症した上気道閉塞 –後頭骨軸椎角をパラメーターとした検討–

明田浩司、浅沼由美子、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広

15. 第39回日本脊椎脊髄病学会(平成22年4月22-24日、高知市)

腰椎椎間板高狭小化の進行に関わる危険因子解析 –地域住民の追跡コホート調査–

明田浩司、笠井裕一、山田知美、井上望、須藤啓広

16. 第39回日本脊椎脊髄病学会(平成22年4月22-24日、高知市)

組織レニン-アンジオテンシン系シグナルはラット椎間板細胞の基質代謝を調節する
森本亮、明田浩司、小畑秀司、笠井裕一、須藤啓広

17. 第39回日本脊椎脊髄病学会(平成22年4月22-24日、高知市)

多血小板血漿由来血清を用いた椎間板変性治療の開発 –臨床前研究としての試み–
小畑秀司、明田浩司、森本 亮、笠井裕一、浅沼由美子、須藤啓広

18. The International Society for the Study of the Lumbar Spine, Auckland, New Zealand, April 13-17, 2010

The Intradiscal Injection of Autologous Platelet-rich Plasma-serum induced the Restoration of Disc Height in the Rabbit Anular Needle Puncture Model

Obata, Shuji; Akeda, Koji; Morimoto Ryo; Asanuma, Yumiko; Masuda, Koichi; Kasai, Yuichi; Uchida, Atsumasa; Sudo Akihiro

19. The International Society for the Study of the Lumbar Spine, Auckland, New Zealand, April 13-17, 2010

Risk factors for lumbar intervertebral disc height narrowing –Ten years retrospective cohort study–
Koji Akeda, Yuichi Kasai, Nozomu Inoue, Tomomi Yamada, Atsumasa Uchida, Akihiro Sudo

20. The International Society for the Study of the Lumbar Spine, Auckland, New Zealand, April 13-17, 2010

Expression of the Tissue Renin-Angiotensin System in Rat Intervertebral Disc –Implication for Disc Degeneration–

Morimoto, R; Akeda, K; Kasai, Y; Iida, R; Nishimura, A; Obata, S; Iino, T; Uchida, A; Sudo, A

21. 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (March 6-9, 2010, New Orleans)

Function of the Tissue Renin-angiotensin System in Rat Intervertebral Disc Cells

Morimoto, Ryo; Akeda, Koji; Kasai, Yuichi; Nishimura, Akinobu; Obata, Shuji; Iino, Takahiro; Uchida, Atsumasa

6. 研究組織

(1) 研究代表者

明田 浩司 (Akeda Koji)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20422826