

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592193

研究課題名(和文) 椎間板修復治療の臨床応用 - 生物学的修復治療の開発 -

研究課題名(英文) Clinical application of intervertebral disc repair: development of biological 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：椎間板変性を有する椎間板性疼痛患者に対する、多血小板血漿注入療法の安全性と有効性を評価した。約12ヶ月の経過観察中に明らかな有害事象は認めなかった。約85%の症例で臨床上有意な腰痛の低下を認めた。

椎間板バイオマテリアルの候補材料である硫酸化ジェランは、その硫酸化率のより椎間細胞の基質代謝を調節する可能性が示された。家兎椎間板変性モデルへ硫酸化ジェランを注入することで、その高い組織親和性が示され、椎間板変性に対する有効な生体材料となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We report the results of a prospective feasibility clinical trial for the use of an intradiscal injection of PRP-releasate in patients with degenerative disc disease (discogenic low back pain). First, no adverse effects were identified following treatment. The intradiscal injection of PRP-releasate has potential to reduce clinical LBP scores in 85% subjects.

The results of this study showed that gellan-sulfate, candidate for disc biomaterial, has potential to affect the matrix metabolism of intervertebral disc cells dependent on the ratio of sulfation. In vivo animal study showed that gellan-sulfate has high tissue compatibility, suggesting the possibility that gellan-sulfate would be effective biomaterial for intervertebral disc degeneration.

研究分野：椎間板再生

キーワード：椎間板変性 組織再生 多血小板血漿 生体材料

1. 研究開始当初の背景

椎間板は豊富な細胞外マトリックス(主にプロテグリカン、コラーゲン)と比較的少ない椎間板細胞(髄核および線維輪細胞)より構成されており、脊椎前方支持組織として重要な役割を担っている。椎間板が変性すると、プロテグリカンやコラーゲンは変性、分解されることにより弾力性、衝撃吸収能が著しく低下することにより、脊椎の生体力学的バランスに不均衡を生じ、様々な変性疾患を生じやすい環境へと変化すると考えられている。椎間板変性が進行すると椎間板組織は断裂、裂隙形成を認めるようになり、脊椎不安定症、変性円弧症といった変性疾患を発症させる可能性が出てくる。しかしながら、椎間板内には血管が存在しないため、組織修復・再生能力が乏しく、変性・断裂した組織の修復は限定的である。このことが椎間板治療を困難なものにしており、脊椎外科治療の将来を見据えた挑戦的な領域となっている。これに対し、分子生物学・生体組織工学を駆使し、様々な基礎研究が行われている。我々は、椎間板の細胞外基質の代謝を生物学的アプローチにて制御することにより変性椎間板を修復させる試みを重ねてきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は椎間板修復治療の臨床応用を行うことである。椎間板変性が初期の椎間板症(椎間板性疼痛)患者に対する、多血小板血漿注入療法により、安全性と有効性が確認し、本治療法の確立を目指す。変性が進行し組織断裂・裂隙形成した段階においては、椎間板バイオマテリアル充填療法を考えており、バイオマテリアルの候補材料として硫酸化ゼランに注目している。硫酸化ゼランの組織親和性、基質代謝活性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 多血小板血漿 (PRP) 注入療法

以下の条件を満たした症例を本研究の対象者とする。1. 年齢が18歳以上、2. 腰痛が3ヶ月以上続いており、下肢痛を認めない症例、3. 腰椎MRI画像診断にて、L3/4-L5/S1レベルにおいて椎間板変性や椎体終板異常を認める症例、4. 腰椎椎間板造影および椎間板ブロックにて椎間板性疼痛と診断された症例、5. 腰椎単純X線側面像にて椎間板高狭小化の程度が1/2未満の症例。

PRP抽出・活性化の準備: 被検対象者より採取した自己血200mlを用いて、遠心後分離(3,000xg)し、赤血球分画を分離する。残ったBuffy coat層を低回転(150xg)でさらに遠心し、PRPを分離する。貯血時に追加採血した全血10mlを用いて自己血清を分離する。採取したPRPに自己血清と塩化カルシウム溶液を加え活性化(ゲル化)し、PRPゲルを遠心分離した上清(PRP上清)を冷蔵保存する。

椎間板内注入: 治療は放射線透視室にて行

う。経皮的に23Gスパイラル針を椎間板正中に挿入し、自己PRP血清(2-3ml)を変性椎間板の中心部に注入する。

治療効果判定: 治療後1年間に亘り、以下の方法にて治療効果を判定する。疼痛健康関連評価(以下の項目を2ヶ月おきに調査する) a. VAS, b. Roland-Morris Disability Questionnaire

画像解析: 1. 腰椎単純X線正面、側面像(治療前、治療後2ヶ月おきに撮影): 腰椎単純X線側面像を用いて経時的に椎間板高を計測する。椎間板高指数(DHI)を算出し、経時的变化を定量化する。2. 腰椎MRI(T2-mapping)(治療前、治療後3-6ヶ月、12ヶ月に撮影, Achieva 3.0T, PHILIPS, Amsterdam, The Netherlands)。治療前後のMRI T2-mapping画像を用いて、矢状断、横断像における髄核および線維輪組織の部位別平均輝度を定量化する。

PRP含有タンパク質の同定

我々が用いているPRP上清に含まれているタンパク質の同定を行う。iTRAQタンパク質発現・相対定量解析(Filgen社)を行った。PRP上清および自己血清の2サンプルをAB SCIEX Triple TOF 5600システムにて解析を行った。また、PDGF-BBおよび可溶性TNF-受容体(1型、2型)の濃度はELISA法にて測定した。

(2) 椎間板バイオマテリアル充填療法

硫酸化ゼランのヒト椎間板細胞の基質代謝への影響:

椎間板細胞を牛尾部椎間板より採取し、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、3次元アルジネートビーズを作製した。硫酸化率、濃度の異なるGS溶液を含む培養液にてアルジネートビーズを培養し、培養開始1週、2週後の時点で細胞増殖活性、プロテオグリカン蓄積量の評価を行った。実験群は、硫酸化率6.2%のGS(GS 6.2%)、硫酸化率32%のGS(GS 32%)をそれぞれ1µg/ml、10µg/ml、100µg/mlの濃度とし、control群は10%FBS溶液単独投与群とした。細胞増殖活性は、bisbenzimidazole fluorescent dye法にて、各群のビーズに含まれるDNA量を定量化し、プロテオグリカン蓄積量は、dimethylmethylene blue microdetermination assay法にて定量化して評価を行った。

家兔椎間板変性モデルへのIGS注入試験 NZW種7羽を用いて、椎間板(L2/3, L4/5)を18G針にて穿刺した。穿刺後、40に保温されたIGSをL2/3, L4/5椎間板内に注入した。L3/4は無穿刺群とした。術後2週毎にレントゲン撮影し、椎間板高を計測した。手術後4週で屠殺し、組織学的評価を行った。対照群は椎間板穿刺のみとした。

4. 研究成果

(1) 多血小板血漿 (PRP) 注入療法

3ヶ月以上腰痛が持続し、腰椎MRI画像、椎

間板ブロックにて椎間板性疼痛と診断した14症例(男性8例、女性6例、平均年齢33.8歳)を対象とした。治療前の平均疼痛関連スコア(VAS 7.5 ± 1.3 , RDQ 12.6 ± 4.1)は治療後1ヶ月にて著しく低下し、治療12ヶ月(VAS 2.9 ± 2.8 , RDQ 2.8 ± 3.9)に亘って低値を維持した。単純X線上の椎間板高、前彎角は経過観察期間中、明らかな変化を認めなかった。MRI画像解析では、髄核および線維輪のT2値は治療前後で有意な変化を示さなかった。術前MRI所見(椎間板変性度、disc bulge、high intensity zone (HIZ)の有無)とVASおよびRDQ値の低下に明らかな関連性を認めなかった。経過観察中に下肢神経症状、椎間板炎を認めた症例はなかった。また、2症例で腰痛の再発を認めたが、治療前と比べると改善しており、腰痛が悪化した症例は認めなかった。

PRP内の成長因子(PDGF-BB)は自己血清と比較し、2.1倍高い濃度であった。一方、抗炎症作用を有する可溶性TNF-受容体(1型、2型)の濃度はPRP内にそれぞれ、平均3.1 ng/ml(1型)、平均8.3 ng/ml(2型)含まれており、自己血清と同程度の濃度が確認された。PRP含有タンパク質の同定に関しては、iTRAQタンパク質発現・相対定量解析(Filgen社)を行った。PRP上清および自己血清の2サンプルをAB SCIEX Triple TOF 5600システムにて解析を行った。両サンプル共に944タンパクが同定された。抗炎症性サイトカインおよび抗炎症性蛋白に関しては、PRPおよび自己血清内に同程度含まれていた。

(2) 椎間板バイオマテリアル充填療法

椎間板の細胞増殖活性において、髄核、線維輪ともにGS 32% 100 μ g/ml群にて対照群と比較して有意な増加を認めた。また、プロテオグリカン蓄積量においても、髄核、線維輪ともにGS 32% 100 μ g/ml群で有意な増加を認めた。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。

40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、対照群では経時的に椎間板高の狭小化(4週後: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。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。また、椎間板内への炎症細胞浸潤は認めなかった。

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6件)

1. Min Han Z, Nagao N, Sakakibara T, Akeda K, Matsubara T, Sudo A, Kasai

Y. Adult traumatic atlantoaxial rotatory fixation: a case report. *Case Rep Orthop*.2014. 査読有り
doi: 10.1155/2014/593621.

2. Akeda K, Matsunaga H, Imanishi T, Hasegawa M, Sakakibara T, Kasai Y, Sudo A. Prevalence and countermeasures for venous thromboembolic diseases associated with spinal surgery: a follow-up study of an institutional protocol in 209 patients. *Spine (Phila Pa 1976)*.39(10):791-797.2014. 査読有り
doi:10.1097/BRS.0000000000000295.
3. Nishimura A, Akeda K, Kato K, Asanuma K, Yamada T, Uchida A, Sudo A. Osteoporosis, vertebral fractures and mortality in a Japanese rural community. *Mod Rheumatol*. 24(5):840-3.2014. 査読有り
doi: 10.3109/14397595.2013.866921.
4. Asanuma Y, Fujimoto H, Nakabayashi H, Akeda K, Asanuma K, Tanaka M, Nagakura T, Miura Y, Iino T, Ogawa K, Kasai Y, Sudo A. Extradural cryptococcoma at the sacral spine without bone involvement in an immunocompetent patient. *J Orthop Sci*. 19(6):1040-5.2014. 査読有り
doi: 10.1007/s00776-013-0413-2.
5. Obata S, Akeda K, Imanishi T, Masuda K, Bae W, Morimoto R, Asanuma Y, Kasai Y, Uchida A, Sudo A. Effect of autologous platelet-rich plasma-releasate on intervertebral disc degeneration in the rabbit annular puncture model: a preclinical study. *Arthritis Res Ther*. 14(6):R241,2012. 査読有り
doi: 10.1186/ar4084.
6. Uemura T, Tsujii M, Akeda K, Iino T, Satonaka H, Hasegawa M, Sudo A. Transfection of nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotide protects against ischemia/reperfusion injury in a rat epigastric flap model. *J Gene Med*. 14(11):623-31,2012. 査読有り
doi: 10.1002/jgm.2677.

[学会発表](計15件)

1. Takegami N, Akeda K, Imanishi T, Murata K, Hasegawa M, Sakakibara T, Kasai Y, Sudo A. An Efficacy Study of Institutional Protocol for Deep Vein Thrombosis Associated with Spinal Surgery. **American Academy of Orthopaedic Surgeons (March 11-15, 2014 New Orleans, USA)**
2. Murata K, Akeda K, Takegami N, Sakakibara T, Kasai Y, Sudo A. New

- Morphological Classification of Intervertebral Disc Rupture. **Orthopaedic Research Society (March 15-18, 2014 New Orleans, USA)**
3. Takegami N, Akeda K, Murata K, Sudo A. Expression of the RANK / RANKL / OPG System in the Rat Intervertebral Disc. **41st The International Society for the Study of the Lumbar Spine (June 3-7, 2014 Korea, Republic of Korea)**
 4. Akeda K, Murata K, Takegami N, Sudo A. Immunohistochemical Analysis of the Radiolucent Zone around Pedicle Screws after Spinal Fusion Surgery. **41st The International Society for the Study of the Lumbar Spine (June 3-7, 2014 Korea, Republic of Korea)**
 5. 明田浩司、村田耕一郎、今西隆夫、舛田浩一、Won Bae、竹上徳彦、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広 多血小板血漿を用いた椎間板内治療の開発 - 組織修復を目的とした腰椎治療 - **第 43 回日本脊椎骨髄病学学会学術集会、平成 26 年 4 月 17-19 日、国立京都国際会館 (京都)**
 6. 村田耕一郎、明田浩司、竹上徳彦、今西隆夫、須藤啓広 腰椎虚血が椎間板内基質代謝に与える影響 - 低酸素・糖代謝関連因子による免疫組織学的検討 - **第 43 回日本脊椎骨髄病学学会学術集会、平成 26 年 4 月 17-19 日、国立京都国際会館 (京都)**
 7. 明田浩司、加藤俊宏、竹上徳彦、村田耕一郎、須藤啓広 脊椎椎体骨折による椎体変形の進行様式 - 地域住民追跡コホート調査 - **第 43 回日本脊椎骨髄病学学会学術集会、平成 26 年 4 月 17-19 日、国立京都国際会館 (京都)**
 8. 明田浩司、竹上徳彦、山田淳一、舛田浩一、Won Bae、村田耕一郎、榊原紀彦、須藤啓広 椎間板性疼痛に対する多血小板血漿を用いた椎間板修復治療 **第 22 回日本腰痛学会、平成 26 年 11 月 15-16 日、幕張メッセ国際会館 (千葉)**
 9. Akeda K, Murata K, Imanishi T, Ohishi K, Masuda K, Uchida A, Sakakibara T, Kasai Y, Sudo A. Intradiscal Injection of Autologous Platelet-Rich-Plasma releasate for the Treatment of Discogenic Low Back Pain-Preliminary Prospective Clinical Trial of 12 cases-. **59th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (January 26-29, 2013 San Antonio, USA)**
 10. 明田浩司、村田耕一郎、今西隆夫、森本亮、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広 多血小板血漿を用いた椎間板修復治療 JOABPEQ を用いた治療効果判定

第 42 回日本脊椎骨髄病学学会、平成 25 年 4 月 25-27 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄)

11. 今西隆夫、明田浩司、村田耕一郎、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広 糖鎖高分子技術を用いた椎間板バイオマテリアルの開発 **第 42 回日本脊椎骨髄病学学会、平成 25 年 4 月 25-27 日、沖縄コンベンションセンター (沖縄)**
12. Imanishi T, Akeda K, Obata S, Sudo A. Ligation of lumbar arteries induces extracellular matrix changes in intervertebral discs as shown by MRI T2-mapping and histology. **The International Society for the Study of the Lumbar Spine (May 28-June 1, 2012 Rai Amsterdam, Amsterdam)**
13. 今西隆夫、明田浩司、長谷川正裕、宮本啓一、飯野隆大、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広 硫酸化ジェランの椎間板基質代謝への影響 **第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、平成 24 年 10 月 26-27 日、名古屋国際会館 (愛知)**
14. 明田浩司、今西隆夫、榊原紀彦、笠井裕一、須藤啓広 多血症板血漿を用いた椎間板修復治療 椎間板性疼痛患者に対する臨床研究 - **第 41 回日本脊椎骨髄病学学会、平成 24 年 4 月 19-21 日、石橋文化センター (福岡)**
15. 明田浩司、今西隆夫、大石晃嗣、舛田浩一、榊原紀彦、笠井裕一、内田淳正、須藤啓広 多血症板血漿を用いた椎間板修復治療 - 椎間板性疼痛患者に対する臨床試験 - **第 85 回日本整形外科学会学術総会、平成 24 年 5 月 17-20 日、国立京都国際会館 (京都)**

〔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：
 出願年月日：
 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

(2) 研究分担者

宮本 啓一 (MIYAMOTO, Keiichi)
三重大学・工学(系)研究科(研究院)・
准教授
研究者番号：70252343

(3) 連携研究者

()

研究者番号：