



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高純度硬化性ゲルによる無細胞移植椎間板組織自然再生誘導法の検討 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	辻本, 武尊
Description	配架番号 : 2392
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13013号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70530
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takeru_Tsujimoto_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 辻 本 武 尊

	主査	教授	石 田 晋
審査担当者	副査	教授	山 本 有 平
	副査	教授	荒 戸 照 世
	副査	教授	近 藤 亨

学 位 論 文 題 名

高純度硬化性ゲルによる無細胞移植椎間板組織自然再生誘導法の検討
(An acellular bioresorbable ultra-purified alginate gel promotes intervertebral disc
regeneration via nucleus pulposus progenitor cells)

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。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。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）を開発してきた。本研究では、椎間板内における組織修復環境を最適化し、組織再生が促進されるという仮説のもと、UPAL を使用した椎間板組織自然再生誘導法の効果を検証した。

まず *in vitro* 試験では、通血清飢餓条件下では UPAL 内髄核細胞は CAL 内髄核細胞に比べて細胞生存率が有意に高かった。生体力学試験では、静的及び動的試験後ともに UPAL が椎間板外へ逸脱せず、UPAL 群は椎間板摘出群より高い脊柱剛性を示した。加えて、*in vivo* 試験では、埋植手術後の MRI 評価及び病理組織にて、UPAL 群は椎間板部分摘出群に比べ椎間板変性スコアが有意に低かった。免疫組織学的評価では、UPAL 群は椎間板部分摘出群に比べ Type I collagen 陽性細胞率が有意に低く、Type II collagen 陽性細胞率は有意に高かった。さらに、ISO 基準に準拠した GLP 下生物学的安全性試験では、全身主要臓器及び局所椎間板ともに UPAL 埋植後の毒性はなく、その安全性を確認した。UPAL 埋植後ウサギ髄核組織凍結切片を用いての GD2 及び Tie2 の二重染色では、UPAL 群は椎間板部分摘出群に比べ GD2/Tie2 二重陽性細胞率が有意に高かった。以上より、UPAL を使用した椎間板組織自然再生誘導法は髄核摘出単独と比較して安全かつ有効な治療法であることが実証された。

審査に当たり副査荒戸教授より、従来研究されてきた UPAL を用いた膝軟骨再生医療と本研究とのメカニズムの違いについて質問があった。申請者は、膝軟骨は骨髄組織と近接した組織であるため、骨髄間葉系幹細胞が再生細胞として関与するメカニズムが想定されるが、椎間板では椎体終板が存在するため、骨髄間葉系幹細胞よりも残存髄核細胞や髄核前駆細胞が再生細胞として

関与した可能性がある」と回答した。次いで副査山本教授より、UPAL が他の scaffold 用マテリアルより優れている点について質問があった。申請者は、UPAL は種々の形状に合わせて注入可能であり、その後簡易な操作でゲル化ができることから、椎間板ヘルニア手術の狭い術野でも取り扱いが容易であると回答した。また、細胞外マトリックス評価をタイプ II コラーゲンだけで評価している点の妥当性について質問があった。申請者は、サフラニン O 染色によるプリテオグリカン産生も評価しているため妥当であると考えられると回答した。副査近藤教授からは、*in vitro* 試験の細胞染色による生存細胞率評価では CAL と UPAL に有意差がないのに対し、フローサイトメトリー上で有意差を認めた点についての質問があった。申請者は、細胞染色では生細胞と死細胞のみ評価しているのに対し、フローサイトメトリーではアポトーシス細胞も評価しているため相違が生じたと考えられると回答した。主査石田教授からは、今後の臨床展開を考えるうえでの課題について質問があった。申請者は、変性椎間板組織に対しては UPAL 単独使用では限界があると考えられ、今後は幹細胞等と UPAL を組み合わせたコンビネーションプロダクトによる研究の必要性があることや、臨床応用に向けて UPAL 埋植後の炎症性サイトカインや痛み物質評価の必要性があると考えられると回答した。

この論文は、UPAL を使用した椎間板組織自然再生誘導法は髄核摘出単独と比較して安全かつ有効な治療法であることが示唆された。これらのメカニズムに関するさらなる詳細な研究が必要であるが、本手法は椎間板ヘルニア術後の椎間板変性に対し、今後有用な治療手段となりうると期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院過程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有すると判定した。