



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 [全文の要約]
Author(s)	辻本, 武尊
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2392 他
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/2115/70532
Type	doctoral thesis
File Information	Takeru_Tsujimoto_summary.pdf



学位論文（要約）

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)

2018 年 3 月

北海道大学

辻本 武尊

Takeru Tsujimoto

【背景と目的】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、アレルゲンともなるため、実臨床での生体内利用には適さなかった。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)を開発してきた。

以上より、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のでここに報告する。

【方法】まず *In vitro* 試験として、思春期特発性側弯症手術患者より髄核細胞の供与を受け、市販の細胞培養用ゲル(CAL)および粘調度の異なる2種類のUPAL(AL100, AL500)に包埋した。通常培養後48時間、7, 14, 28日後に蛍光染色を用いた細胞生存率評価、フローサイトメトリーによる細胞生存率、アポトーシスの評価、WST-8を用いた細胞増殖能の評価を行った(n=5)。次に、生体力学試験としてヒツジ屍体腰椎を用いた静的試験(6方向; 6Nm, 軸圧縮; 1000N, n=8)、動的軸圧縮試験(± 300 N, 1Hz, 1000回, n=7)、及び *in vivo* 埋植試験(静的圧縮試験のみ, n=3)を行った。UPAL群に対してはゲルの脱出の有無を確認するため、軸圧縮・回旋・前後屈・側屈の各試験後にデジタルカメラで写真撮影を行った。加えて、*In vivo* 試験として、ウサギとヒツジを用いた埋植試験を行った。ウサギモデルでは、日本白色家兎L2/3, 4/5椎間板の髄核組織を吸引後にUPALを投与し、術後4, 12, 24週後に椎間板変性度評価をMRIおよび組織学的観点から評価した(n=8)。ヒツジモデルはGLP適施設にて実施し、サフォーク種ヒツジに対しUPAL埋植モデルを作製した。L1/2, L2/3, L3/4, L4/5椎間板を無作為化し、無処置control群(n=7椎間板)、椎間板部分摘出群(n=10椎間板)、UPAL群(n=10及び11椎間板)に分けた。椎間板に対し5×3mmの後方繊維輪切開を加え、0.1gの椎間板組織を摘出後にUPALを埋植した。術後4, 12, 24週後に椎間板変性度評価をMRIおよび組織学的観点から評価した。さらに、ISO基準に準拠したGLP下生物学的安全性試験としてウサギを用いた埋植試験により全身(n=12ウサギ)及び埋植局所(n=6ウサギ)への影響を評価した。最後に、UPAL埋植後ウサギ髄核組織凍結切片を作製し、髄核前駆細胞のマーカーであるGD2及びTie2の二重染

色を行った。埋植後 2, 4 週の時点で GD2/Tie2 二重陽性細胞率を算定した。

【結果】まず *in vitro* 試験では、通常培養状態では、いずれの時点でも 3 群間に有意差はなかったが、血清飢餓条件下では UPAL 内髓核細胞は CAL 内髓核細胞に比べて細胞生存率が有意に高かった。粘調度の異なる UPAL 間に有意差はなく、臨床上のハンドリングのしやすさから、粘調度の高い AL500 を選択した。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 評価では、埋植後 4, 12, 24 週いずれの時点でも、UPAL 群は椎間板部分摘出群と比較して椎間板変性が有意に低かった。同様に、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。抗アルギン酸抗体を使用した免疫組織学的所見では、ウサギでは 4-12 週で消失し、ヒツジでは 12-24 週にかけて消失していた。埋植後ヒツジ腰椎を用いた生体力学試験では、椎間板部分摘出群では 4, 12 週で正常群に比べ低値であったが、UPAL 群では、全てのタイムポイントで正常群と同等であった。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 埋植後ウサギ髓核組織凍結切片を用いての GD2 及び Tie2 の二重染色では、埋植後 2, 4 週の時点で、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。

【考察】本研究では、まず、ヒト髓核細胞を用いた *in vitro* 椎間板変性モデルにより評価し、UPAL 内髓核細胞は CAL 内髓核細胞と比較して有意に細胞生存率が高く、アポトーシス細胞率が低かった。次に、ヒツジ屍体腰椎を使用した *in vitro* 生体力学試験を行い、UPAL が埋植部位外に逸脱しないことを確認した。さらに、ウサギ及びヒツジモデルを用いて、本治療法が組織修復を促進し髓核組織の水分含有量を保持することを実証した。さらに、ウサギモデルを用いて ISO 基準に準拠した GLP 下生物学的安全性試験を行ない、その安全性を証明した。最後に、ウサギ髓核組織凍結切片を作製し、髓核前駆細胞陽性率が UPAL 埋植により増加することを確認した。以上より、UPAL を使用した椎間板組織自然再生誘導法は髓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。UPAL 群では埋植後 2, 4 週において GD2/Tie2 二重陽性細胞率が有意に高かった。このことから、髓核摘出術後に内在性の残余髓核細胞が UPAL で充填された創傷治癒部に集積し、同様に、術後早期に髓核前駆細胞が UPAL 内へ集積、増加することで椎間板組織が自然再生した可能性が示唆された。

臨床応用を想定した場合、バイオマテリアル単体使用による椎間板再生医療は、自家細胞移植治療に比べて製品の長期保存が可能であり、時間的な制約もなく 1 期的手術が可能であるといった多くの利点を有する。ただし、重度変性椎間板では、UPAL のみで組織再生を促進するには限界があると考えられる。今後は UPAL と幹細胞を組み合わせた再生医療研究も必要であろう。

【結論】UPAL を使用した椎間板組織自然再生誘導法は髓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。髓核摘出術後に内在性の残余髓核細胞が UPAL で充填された創傷治癒部に集積し、同様に、術後早期に髓核前駆細胞が UPAL 内へ集積、増加することで椎間板組織が自然再生した可能性が示唆された。臨床応用を想定した場合、バイオマテリアル単体使用による椎間板再生医療は、自家細胞移植治療に比べて多くの利点を有し、有用な治療手段となりうることが示唆された。