

平成30年6月8日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10441

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞由来三次元管腔組織を用いた神経再生

研究課題名(英文) The efficacy of a scaffold-free Bio 3D conduit on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model.

研究代表者

池口 良輔 (Ikeguchi, Ryosuke)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80437201

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経欠損部に対しては自家神経移植が行われているが、自家神経移植では健常な神経を採取し移植するため、神経採取部の障害が無視できない。3Dプリンターを用いた細胞積層化技術は管腔組織をスcaffoldなしで作成できる技術で近年注目されている。本研究では、線維芽細胞から作成した三次元管腔組織をラット末梢神経欠損部に移植し、神経再生能力を評価した。コントロール群と比較して、動作解析、電気生理学的、組織形態学的にも、良好な神経再生が認められた。本研究の結果から自家神経移植の代替になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Although autologous nerve grafting is the gold standard treatment of peripheral nerve injuries, several alternative methods have been developed, including nerve conduits that use supportive cells. We focused on a novel completely biological, tissue-engineered, scaffold-free conduit. We developed scaffold-free conduits from human normal dermal fibroblasts using a Bio 3D Printer. adult male rats with immune deficiency underwent mid-thigh-level transection of the right sciatic nerve. The resulting 5-mm nerve gap was bridged using 8-mm Bio 3D conduits and silicone tube. Electrophysiological studies revealed significantly higher compound muscle action potential in the Bio 3D group than the silicone group. Histological and morphological studies revealed the presence of many well-myelinated axons in the Bio 3D group. We confirmed that scaffold-free Bio 3D conduits composed entirely of fibroblast cells promote nerve regeneration in a rat sciatic nerve model.

研究分野：整形外科 手外科 マイクロサージャリー リハビリテーション

キーワード：末梢神経 3Dプリンター 細胞

1. 研究開始当初の背景

外傷や悪性腫瘍による末梢神経損傷により神経欠損がおこれば、人としての生活は大きく制限される。欠損部が小範囲の場合は自家神経移植を用いての再建が一般的には行われているが、自家神経移植では採取可能な神経組織に限りがあるため広範な末梢神経欠損の再建は不可能で、この解決法として同種神経移植や人工神経という概念が生まれてきた。小範囲な末梢神経欠損の場合でも、自家神経移植では健全な神経を採取し移植するため、神経採取部の障害も無視できない。末梢神経再生を促進するために人工神経チューブに細胞を投与することが報告されているが、体内に人工物を留置する事は感染などのリスクを有する。

一方、中山らが開発した 3D プリンタ - を用いた細胞性積層化技術は末梢神経、血管などの管腔組織や、軟骨の弾性組織などをスカフォールドなしで作成できる技術である。本研究においては、線維芽細胞から作成した三次元管腔組織を用いて、末梢神経欠損部に神経再生を行う事を目的とする。現在までのところ 3D プリンタ - を用いて作成した三次元管腔組織により末梢神経再生を行った報告はなく、良好な神経再生が獲得できれば、広範囲末梢神経欠損の治療も可能となり、また、自家神経移植の代替にもなるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

(1) ラット坐骨神経欠損モデルを用いて、神経欠損部を線維芽細胞三次元管腔組織により架橋し、神経再生における有用性をコントロール群と比較し統計的に明らかにする。

(2) 足部内転筋での再生神経による電気生理学的評価を行い、神経再生を機能的に明らかにする。

(3) 再生神経の組織切片を作成し、再生軸索数、再生軸索直径などの評価を行い、神経再生を組織形態学的に明らかにする。

(4) 標識した線維芽細胞を用いて同様に実験を行い、再生神経内での同細胞の存在と分化を明らかにする。

3. 研究の方法

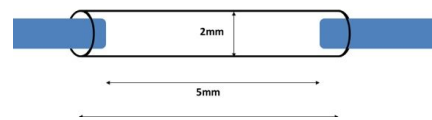
(1) ヒト線維芽細胞から 3D プリンタ - を用いて三次元管腔組織を作成する。具体的には、培養したヒト線維芽細胞を用いて 96 ウェルプレートに細胞を $2 \sim 3 \times 10^4$ cells/well ずつ播種し、2~3 日間培養する。スフェロイド形成を確認後、バイオ 3D プリンター「Regenova」(サイフューズ社)を用いて、内径 2mm 長さ 8mm の三次元管腔組織を作成する。

(2) ラット坐骨神経欠損モデルを用いて、神経欠損部をこのヒト線維芽細胞三次元管腔組織により架橋し、神経再生における有用性を統計的に明らかにする。具体的には、

10 週齢の免疫不全ラットの坐骨神経を用い、ヒト線維芽細胞三次元管腔組織にて 5mm の神経欠損部を架橋する(n=6)。

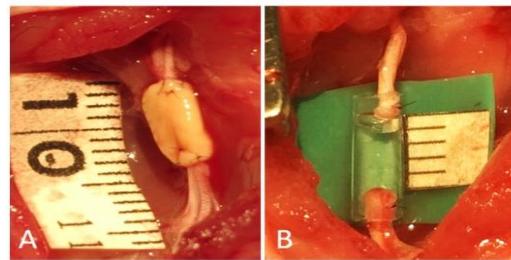
コントロール(n=6)としてシリコンチューブでの架橋を行い、それぞれの週において比較を行う。

ラット坐骨神経に5mmの縫合架橋



Bio 3D 群 (n=6)

シリコン群 (n=6)



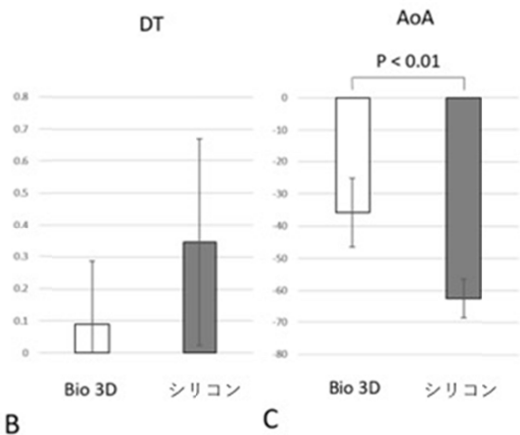
(3) 神経再生の程度を電気生理学的かつ組織形態学的に明らかにする。具体的には、動作解析を行い、移植側の下肢の動きを評価し、ニューロパック(日本光電)を用い足部内転筋での再生神経による電気生理学的評価を行い、神経伝導速度、複合筋活動電位の計測を行う。また前脛骨筋を採取し湿重量を計測する。組織形態学的評価のために再生神経はグルタルアルデヒド固定を行う。TEMを作成し、有髄神経軸索数、有髄神経軸索直径の比較を行う。

(4) 標識したヒト線維芽細胞を用いて移植細胞の存在と分化を明らかにする。

4. 研究成果

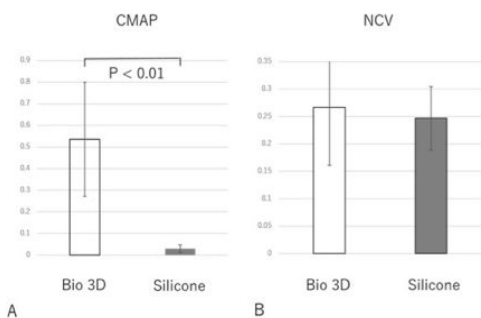
(1) 動作解析ではコントロール群に比べて有意に良好な下肢機能の獲得が認められた。AOA(遊脚終期における中足骨と足趾のなす角)に関して有意差が認められ、コントロー

	Bio 3D 群	シリコン群
DT		
AoA		



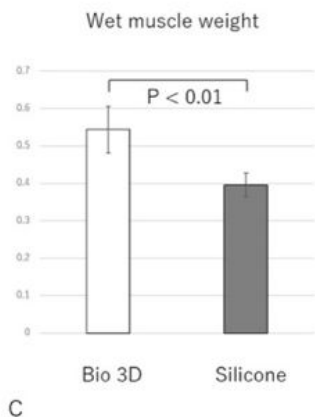
ル群に比べて良好な足趾筋力の回復が認められた。

(2) 電気生理学的では、下肢筋にコントロ



ール群に比べて有意に良好な再生が認められた。足部内転筋での複合筋活動電位がコントロール群と比較し有意に高値であった。

前脛
湿重
コン
ール
比較
意に
であ



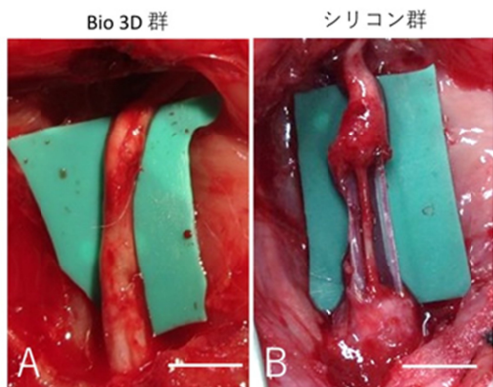
骨筋
量も、
トロ
群とし
有値
った。

(3)
的に
コン
ール
比較
太く

肉眼
は、
トロ
群に
して
良好

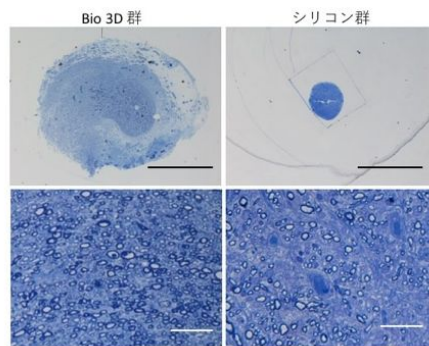
な再生神経が認められた。

(4) 組織学的にはコントロール群に比較し、



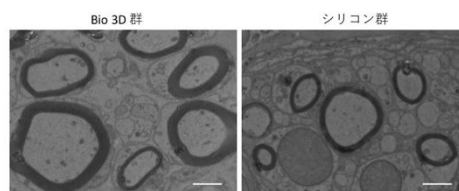
再生神経断面の面積は大きく、多数の有髄神経が認められた。

電顕像 (TEM) ではコントロール群に比べ

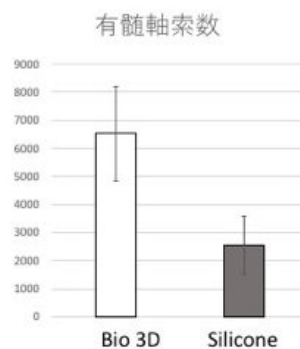


て、多数の有髄軸索と厚いミエリン鞘が認められた。

組織形態学的に評価したところ、有髄神経軸



索数 (6516) ではコントロール群 (2536) と比較し有意に高値であった。



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1件)

Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, Kaizawa Y, Tajino J, Ito A, Ohta S, Oda H, Takeuchi H, Akieda S, Tsuji M, Nakayama K, Matsuda S. The efficacy of a scaffold-free Bio 3D conduit developed from human fibroblasts on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model. PLoS One. 査読有 2017 Feb 13;12(2):e0171448. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0171448> doi:10.1371/journal.pone.0171448. eCollection 2017.

〔学会発表〕(計6件)

淘江 宏文, 池口 良輔, 青山 朋樹, 伊藤 明良, 田中 麻衣, 太田 壮一, 織田 宏基, 竹内 久貴, 光澤 定己, 秋枝 静香, 中山 功一, 松田 秀一 ヒト線維芽細胞を用いた Bio 3D conduit による末梢神経再生メカニズムの検討 第17回日本再生医療学会総会 2018. 3. 21-23 横浜

Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, Tajino J, Ito A, Tanaka M, Ohta S, Oda H, Takeuchi H, Mitsuzawa S, Akieda S, Nakayama K, Matsuda S, The regenerative mechanism of peripheral nerve using a Bio 3D conduit in a rat sciatic nerve model. Orthopaedic Research Society 2018 3.10-13 New Orleans, USA

淘江 宏文, 池口 良輔, 青山 朋樹, 伊藤 朗, 田中 麻衣, 太田 壮一, 織田 宏基, 竹内 久貴, 光澤 定己, 秋枝 静香, 中山 功一, 松田 秀一 ラット坐骨神経欠損モデルにおける Bio 3D Conduit の有用性の検討 第32回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 10.26-27 沖縄

Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, Tanaka M, Tajino J, Kaizawa Y, Ohta S, Oda H, Takeuchi H, Akieda S, Tsuji M, Nakayama K, Matsuda S. The efficacy of a scaffold-free Bio 3D conduit on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model. Federation of European Society for Surgery of the Hand 2017.6.21-24 Budapest, Hungary

Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, Kaizawa Y, Tajino J, Ito A, Ohta S, Oda H, Takeuchi T, Akieda S, Tsuji M, Nakayama K, Matsuda S. Peripheral nerve regeneration using Bio 3D conduit. Orthopaedic Research Society 2017 3.19-22 San Diego USA

Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, Kaizawa Y, Ohta S, Oda H, Tajino J, Xiangkai Z, Akieda S, Tsuji M, Nakayama K, Matsuda S. Peripheral nerve regeneration using Bio 3D conduits. 21th Federation of European Society for Surgery of the Hand 2016. 6.22-25 Santander Spain

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

池口 良輔 (IKEGUCHI, Ryosuke)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 80437201

(2)研究分担者

青山 朋樹 (AOYAMA, Tomoki)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90378886

(3)研究分担者

太田 壮一 (OHTA, Souichi)
京都大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 70592484