

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10960

研究課題名(和文) 末梢及び中枢神経再生のための人工基質と成長因子の応用

研究課題名(英文) Application of artificial material and growth factor for the regeneration of peripheral and central nerves

研究代表者

平井 達也 (HIRAI, Tatsuya)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・研究員

研究者番号：50465952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに私達は、脊髄損傷と末梢神経障害の治療として、人工材料を用いて神経軸索の伸長を試みてきた。この人工材料にヘパリンを共有結合させることで、ヘパリン結合性蛋白である塩基性線維芽細胞成長因子を結合させることを可能にした。これにより塩基性線維芽細胞成長因子を徐々に放出することが可能となり、塩基性線維芽細胞増殖因子の効果を持続させることに成功した。その結果、脊髄損傷後の空洞化の周りを囲んでいるアストロサイトのプロセスを越えて神経軸索が伸長していることを観察できた。また末梢神経でも離断した坐骨神経から腓骨神経と脛骨神経で、神経が再生していることが観察できた。

研究成果の概要(英文)：We previously reported the artificial material which induces the extension of axonal sprout in the injured spinal as well as peripheral nerves. In the present study, the artificial material was first covalently bond with heparin, and then combined with heparin-affinity growth factor, basic Fibroblast Growth Factor (bFGF). In this setting, the material could gradually release bFGF into the surround region. As the results, in the injured spinal cord, axonal sprouts effectively extended beyond astrocytic wall. In case of injured peripheral sciatic nerve, effective extension of myelinated axon was similarly observed toward peroneal and tibial nerves. Our study indicates that combining of the artificial material with bFGF is the effective way to regenerate injured spinal as well as peripheral nerves.

研究分野：再生医療

キーワード：中枢神経障害 末梢神経障害 人工材料 成長因子 再生医療

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は、交通事故や、運動中の事故などにより、我が国では毎年 5000 人以上の件数が報告されている。殊に、その受傷時期が早いほど、長い年月を車椅子での生活、若しくはベッドから離れられない生活を強いられている。更に、以前までは神経細胞は再生しないものとされていた時期があり、治療の確立には未だ確固たるものがない。然し、近年では世界各地で神経細胞の再生実験が行われ、今後の臨床応用の期待が持たれる。私達は、特許をとっている組織再生の為に特殊生体用ゲルを利用し、そこへ成長因子を加えることで、更なる神経細胞の再生の増強を促し、その有効性と、動物実験による安全性の確認を行い、臨床治療への応用へと誘う。

a) 成長因子として

既に b-FGF は、褥創、熱傷潰瘍、下腿潰瘍、などの治療に利用されており、その安全性も確立されている。又、神経再生としての実験での効果も報告されており (Rabchevsky AG, et al. b-FGF functional recovery following severe spinal cord injury to the rat. *Exp Neur.* 2000; 164:280-91.) その効果にも期待できる。現在、私達は人工マトリックスに b-FGF を加えて神経成長のための環境の増強を調べている。更には、HIF-1 を含めた成長因子の検討を行うことで大きな効果を得ることを目標としている。

b) 生体用特殊ゲルとして

現在、人工コラーゲンの開発、臨床応用が行われているが、人工コラーゲンの臨床使用が我が国で承認されていない時から、私達はヘパリン/アルギン酸ゲルを用いてその成果を報告してきた。臨床例では外傷後の指神経欠損、神経バイオプシ - 後の欠損症例、動物実験では、末梢神経回復と神経細胞軸索突起の伸長を確認することができた (K.Kataoka, et al. Alginate enhances elongation of early regeneration axons in spinal cord of young rats. *Tissue Engineering.* 2004;10:493-503) などの報告もある。

2. 研究の目的

細胞再生の為に人工材料と成長因子を用いて中枢神経及び末梢神経の軸索突起再生を目指す

3. 研究の方法

(1) 亜急性脊髄損傷モデル樹立と治療方法

正常 SD 系ラットを用いる。

イソフルランを使ったガス麻酔装置により深麻酔科で以下の処置を行う。

脊髄の部分切除は、1x1x1mm の範囲で片側のみを実態顕微鏡下の微小手術で行う。

1x1x1mm のヘパリン/アルギン酸ゲルに b-FGF を加え、切除部位に移植する。

移植、縫合後、翌日より約 2 ヶ月間、行動の観察と病理学的検索を行う。

(2) 末梢神経障害モデル樹立と治療方法

正常 SD 系ラットを用いる。

イソフルランを使ったガス麻酔装置により深麻酔科で以下の処置を行う。

坐骨神経、腓骨神経、脛骨神経の分岐部を 8mm の長さで切断

10x10x1mm のヘパリン/アルギン酸ゲルに b-FGF を加え、切除部位に移植する。

移植、縫合後、翌日より約 2 ヶ月間、行動の観察と病理学的検索を行う。

4. 研究成果

これまでに私達は、脊髄損傷と末梢神経障害の治療として、人工材料を用いて神経軸索の伸長を試みてきた。この人工材料にヘパリンを共有結合させることで、ヘパリン結合性蛋白である塩基性線維芽細胞成長因子を結合させることを可能にした。これにより塩基性線維芽細胞成長因子を徐々に放出することが可能となり、塩基性線維芽細胞増殖因子の効果を持続させることを可能とした。その結果、脊髄損傷後の空洞化の周りを囲んでいるアストロサイトのプロセスを越えて神経軸索が伸長していることを観察できた。また末梢神経でも離断した坐骨神経から腓骨神経と脛骨神経で、神経が再生していることが観察できた。

脊髄損傷の治療として、重要な問題点の一つが亜急性期以降に起こる脊髄損傷部位の組織の空洞化である。私達は、この空洞を補うための人工材料としてアルギン酸を利用して来た。このアルギン酸にヘパリンを共有結合させることで、ヘパリン結合性蛋白である塩基性線維芽細胞成長因子を結合することができた。生体内で徐々に吸収されるアルギン酸に塩基性線維芽細胞成長因子を結合させたことで長期間の塩基性線維芽細胞成長因子の効果を持続させることが可能となった (Fig1a-c)

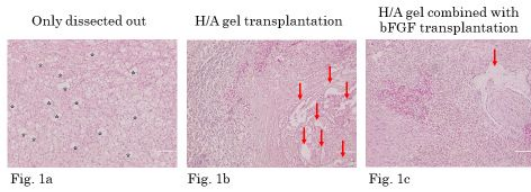


Fig. 1a Fig. 1b Fig. 1c

(a) Multiple small cavities were formed without implantation of H/A sponge one week after spinal cord dissection as shown by star (*). (b) cavity formation was blocked by implantation of H/A gel without bFGF, but small amounts of gel remained as shown by red arrow. (c) the cavity formation was blocked and most of gels were absorbed and disappeared when H/A gel combined with bFGF one week after implantation.

bar: 100µm

術後 4 週では全く処置をしていない群では損傷部脊髄組織の空洞化が観察され、一部の組織では神経軸索伸長を認めることができたが、人工材料を用いた群では及び人工材料に塩基性線維芽細胞成長因子を加えた群では空洞化組織中の人工材料中へ向かって多数の神経軸索伸長を認めることができた (Fig. 2a-c)。

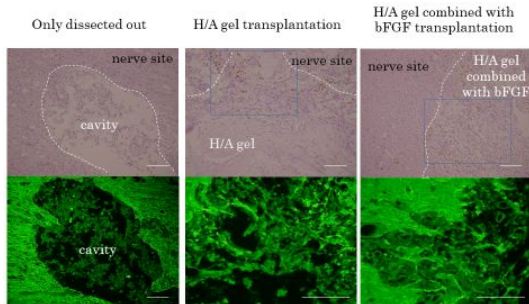


Fig. 2a Fig. 2b Fig. 2c

Fig. 2a, b, c. green: axon bar: 100µm

術後 8 週では処置をしなかった群では神経軸索伸長は認められず、人工材料のみの群では神経軸索伸長は僅かに認められた。人工材料に塩基性線維芽細胞成長因子を加えた群ではアストロサイトの壁を越えて神経軸索の伸長を認めることができた (Fig. 3a-c)。

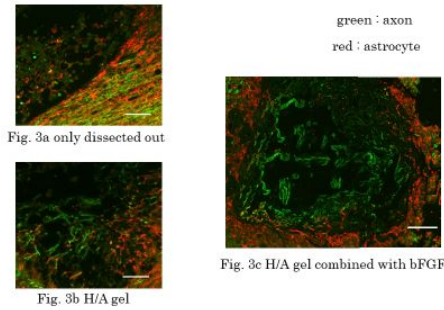
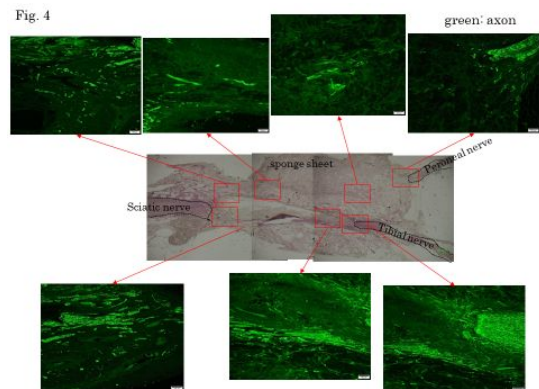


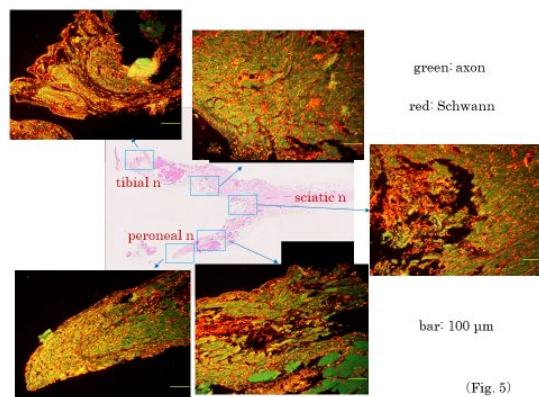
Fig. 3a, b, c. green: axon red: astrocyte bar: 100µm

次に末梢神経であるが坐骨神経から腓骨神経と脛骨神経の分岐部を切断 (Fig. 4) し、塩基性線維芽細胞成長因子を加えた人工材料を移植した。これにより坐骨神経から腓骨神経と脛骨神経へとそれぞれに神経が伸長するかどうかを検討した。

術後 2 週では、中枢側から神経軸索が、末梢側の残存しているミエリンに向かって伸長していた (Fig. 4)。



術後 8 週では、肉眼的にも神経は完成しており、顕微鏡観察においてはミエリンを持った神経軸索を確認することができた (Fig. 5)。



(Fig. 5) bar: 100 µm

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)

[学会発表](計2件)

平井 達也、鈴木 義久、石川 奈美子、井出 千束、
シート状人工材料を用いた離断末梢
経再生の評価
第16回日本再生医療学会総会、2017
平井 達也、鈴木 義久、石川 奈美子
中江 有希、谷原 正夫、井出 千束、
bFGF結合人工材料を用いたラット急性
期脊髄損傷に対する神経軸索突起伸長
の評価
第24回日本形成外科学会基礎学術総会、
2015

6. 研究組織

(1)研究代表者

平井 達也 (HIRAI, Tatsuya)

公益財団法人田附興風会・医学研究所第5研
究部・研究員

研究者番号：50465952

(2)研究分担者

鈴木 義久 (SUZUKI, Yoshihisa)

公益財団法人田附興風会・医学研究所第5研
究部・研究主幹

研究者番号：30243025