

令和元年6月14日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01393

研究課題名(和文) iPS細胞技術と内因性シュワン細胞誘導DDS技術を融合したハイブリッド型人工神経

研究課題名(英文) Dual release of stromal cell-derived factor-1 and basic fibroblast growth factor with a nerve conduit accelerates peripheral nerve regeneration

研究代表者

中村 博亮 (Nakamura, Hiroaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60227931

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)：本研究では人工神経を足場とし、成長因子(SDF-1：ストローマ細胞由来因子とFGF：線維芽細胞増殖因子)の二重徐放ドラッグデリバリーシステムを構築し、内因性の神経修復細胞の動員を促し神経再生を促進させる新しい治療法を開発した。SDF-1とbFGFの共徐放ゼラチンを併用した人工神経を作製し、その効果をマウス坐骨神経欠損モデルで検証した。SDF-1とbFGFの共徐放により、下肢機能回復と軸索再生が促進した。人工神経内にはCD34陽性細胞と微小血管が多数認められ、移植後早期ではTGF β の遺伝子発現が上昇していた。複数の因子の共徐放により相乗もしくは相加作用で末梢神経再生が促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって人工神経を足場としたSDF-1とFGFの二重徐放(Dual-release)DDSを構築し、内因性の神経再生促進能を増幅させることで、外的に細胞移植を行わずとも神経再生を促進することが可能であった。この内因性の神経再生力を増幅した治療方法が確立されれば、我々がこれまでに開発した従来の細胞移植(iPS細胞由来神経前駆細胞移植)と組み合わせることによって、神経再生が更に加速した理想的な再生医療が可能になり、現在の標準的治療である自家神経移植に伴う欠点を克服することが可能になり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the efficacy of a nerve conduit coated with stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) and basic fibroblast growth factor (bFGF) for peripheral nerve regeneration. We prepared a nerve conduit containing SDF-1 and bFGF co-sustained-release gelatin, and verified the effects in a mouse sciatic nerve defect model. Co-sustained release of SDF-1 and bFGF in the nerve conduit promoted lower limb function recovery and axonal regeneration. A large number of CD34 positive cells and microvessels were found in the nerve conduit, and TGF β gene expression was elevated early after transplantation. This results suggest that co-sustained release of multiple factors promotes peripheral nerve regeneration with synergy or additive action.

研究分野：末梢神経

キーワード：末梢神経 再生医療 人工神経 iPS細胞 ストローマ細胞由来因子 SDF-1 線維芽細胞増殖因子 bFGF

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

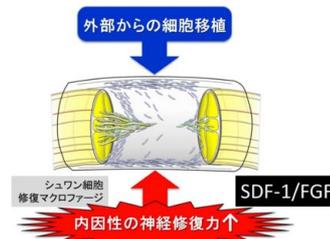
1. 研究開始当初の背景

末梢神経の再生医療において、培養シュワン細胞や骨髄由来間葉系幹細胞、脂肪由来幹細胞など外部から新しく細胞を移植することによって、神経再生を促す基礎研究は数多く存在する。我々もこれまでに、人工神経を足場として iPS 細胞由来の神経前駆細胞を移植するハイブリッド型人工神経の基礎研究を重ね、その有用性について報告してきた(基盤 C 21591904,25350537,25462300,16K01393,16K10872, Uemura T. BBRC. 2012.)。これにより従来の正常神経を犠牲にして移植する自家神経移植に取って代わる、新しい神経再生治療法の可能性を示した。一方、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の発展とともに、体の中に元々存在する内因性細胞の自然治癒力を高めることで、外部からの細胞移植を必要としなくとも組織再生が可能な再生医療も再注目されている。特にケモカインであるストローマ細胞由来因子(SDF-1)が修復マクロファージを動員し、生体組織の再生修復を促進することが既に報告されている(Kimura Y. J Biomater Sci Polym Ed. 2010.)。末梢神経再生においても SDF-1 は、内因性の神経前駆細胞やシュワン細胞を動員することが報告されており、さらに遊走したシュワン細胞は線維芽細胞増殖因子(FGF)の働きで増殖することも明らかとなっている。つまり、SDF-1 で末梢神経再生に重要なシュワン細胞や修復マクロファージを動員し、それら神経修復細胞を増殖させる FGF を与えることで(二重徐放 DDS) 内因性の細胞の神経再生力を増幅しうる可能性がある。しかし、末梢神経の再生医療において、このような内因性の神経修復細胞(シュワン細胞や修復マクロファージ)の動員を促し、神経再生を促進する試みは未だなされていない。

2. 研究の目的

人工神経を足場として SDF-1 と FGF の二重徐放(Dual-release)DDSを構築し、内因性のシュワン細胞と修復マクロファージの遊走と増殖を促進させることで、外的に細胞移植を行わずとも神経再生を促進させるような新しい神経再生の治療方法を開発することを目的とした。この内因性の神経再生力を増幅した治療方法が確立されれば、我々がこれまでに開発した従来の細胞移植(iPS細胞由来神経前駆細胞移植)と組み合わせることで、神経再生が更に加速した理想的な再生医療となり、自家神経移植を凌駕する神経再生が得られる可能性がある。

■ 内因性の修復・自然治癒力をup↑



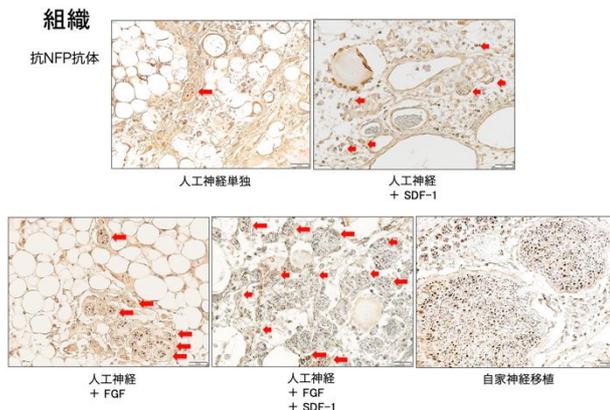
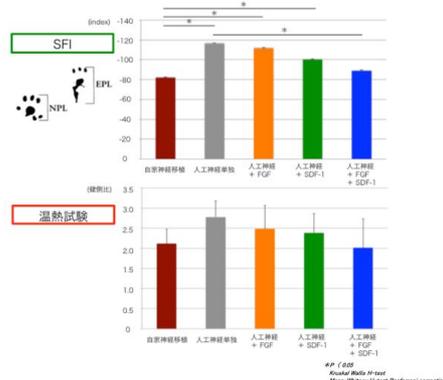
3. 研究の方法

SDF-1/FGF Dual-release 人工神経によるマウス坐骨神経再生および再生メカニズムの解明
6週齢のマウス(C57BL6)の左坐骨神経に長さ5mmの神経欠損を作製し、以下の群-1)人工神経単独、2)SDF-1付加工人神経、3)FGF付加工人神経、4)SDF-1/FGF二重付加工人神経、5)自家神経移植で移植再建を行った。術後12週でマウスの下肢運動機能・知覚機能回復について比較検討した。また電気生理学検査を行い再生神経の神経伝導速度を測定した。神経再生について組織学的に評価するために、術後12週で人工神経または移植自家神経を採取し、中央部横断切片を用いて抗 neurofilament protein(NFP)抗体による免疫染色を行い、画像解析ソフト(Image J)を用いて再生軸索数をカウントした。上記と同じ実験系を用いて、SDF-1/FGF Dual 徐放による神経再生促進メカニズムについて検討した。移植後3、7、21日目に、TNF、IL-6、TGF、IL-10の遺伝子発現をRT-PCRにより解析した。

4. 研究成果

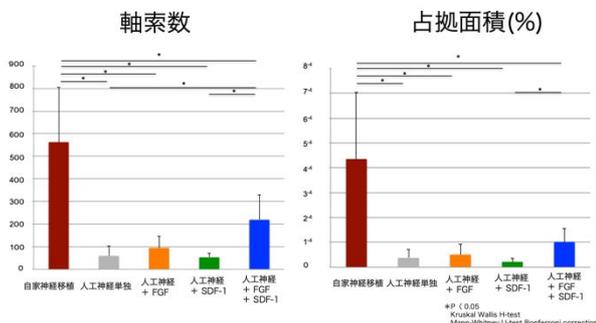
FGF と SDF-1 の二重徐放 DDS を併用した人工神経を作製し、マウス坐骨神経欠損モデルを用いて末梢神経再生を行った。異なる作用をもつ成長因子やケモカインを二重徐放することで、その相乗あるいは相加作用のため神経再生が促進した。

【下肢機能回復結果】運動機能回復・知覚機能回復ともに、FGF および SDF-1 単独の付加に比べて、両者を Dual で付加した人工神経群で、機能回復が促進した。(左下図)



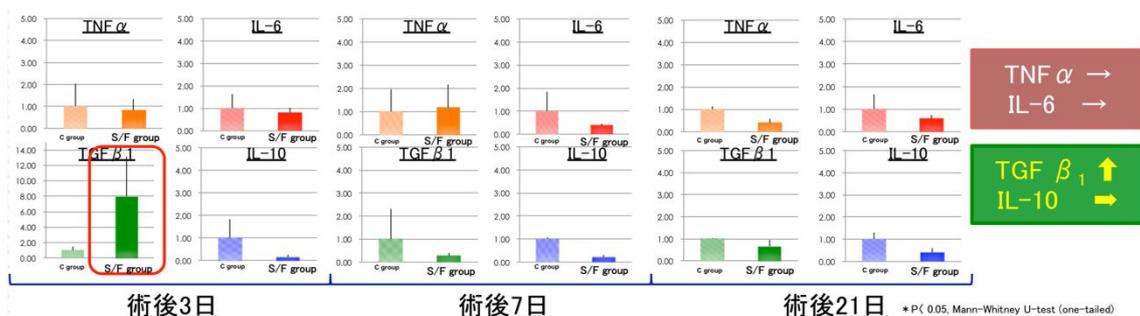
【組織】

人工神経単独に比べて、FGF や SDF-1 を付加することで再生軸索が増加した（右上図）。両者を Dual で付加した人工神経では、さらに再生軸索が増加した。定量結果では軸索数やその占拠面積は、FGF と SDF-1 を Dual で付加することで有意に増大した。（右図）また抗 CD34 抗体による免疫染色で評価した血管内皮細胞は、FGF と SDF-1 を Dual で付加することで増加していた。



【人工神経内での遺伝子発現】

S/F 群は、移植後 3 日目における TGF 遺伝子の発現が有意に上昇していた。



考察

SDF-1 は中枢神経損傷において神経前駆細胞の遊走を司るという報告 (Robin AM. J Cereb Blood Flow Metab. 2006. , Belmadani. J Neurosci. 2005.) や、ラットの脊髄損傷モデルにおいて幹細胞の動員とグリアによる再髄鞘化や血管新生を促進したという報告 (Jaerve A. Stem Cells Transl Med. 2012.) がある。またラットの坐骨神経損傷モデルにおいては再生部位に幹細胞やシュワン細胞をホーミングしたという報告 (Negro S. EMBO Mol Med. 2017. , Sheu ML. J Neurosurg. 2012. , Yang DY. J Neurosurg. 2012.) もある。これまでに骨形成や創傷治癒の動物基礎モデルにおいて、二重徐放 DDS の有効性が証明されている (Kim YH. Adv Drug Deliv Rev. 2015. , Ratanavaraporn J. Biomaterials. 2011. , Kim YH. Adv Drug Deliv Rev. 2015. Nakamura Y. Biomaterials. 2013.)。末梢神経再生においては、NGF と他の成長因子の二重徐放 DDS の報告が、近年、少しずつ報告され始めている (Liu C. Biomed Mater. 2018. , Xia B. Mater Sci. 2018. , Li R. Int J Biol Sci. 2017.)。末梢神経再生における SDF-1 付加効果のメカニズムであるが、Mesenchymal stem cells (MSCs) , hematopoietic stem cells (HSCs) , endothelial progenitor cells (EPCs) などの免疫細胞・幹細胞・前駆細胞を、G-protein-coupled receptor CXCR4 を介して動員すると考えられている (Sheu ML. J Neurosurg. 2012. , Awojodu AO. PNAS. 2013. , Ogle MF. Acta Biomater. 2014. , Krieger J. Biomaterials. 2016.)。本研究において FGF と SDF-1 の二重徐放 DDS を併用した人工神経では、CD34 陽性の新生血管や細胞が多数認められ、軸索再生が促進された。TGF-β1 の遺伝子発現が有意に強くみとめたが、IL-10 では認めなかった。以上のことから、今回の実験系においては、SDF-1 による血管新生効果や軸索再生は、M2 マクロファージなどの免疫細胞よりも、MSCs などの幹細胞の動員が関与していることが推察された。本研究結果をもとに、二重徐放 DDS を用いることで内因性の修復再生を増大させ、さらに今後の展望として、外部から iPS 細胞由来の神経前駆細胞などの細胞移植を併用することで、より理想的な再生医療となる可能性がある。

5 . 主な発表論文等

【雑誌論文】(計 18 件)

上村 卓也、斧出 絵麻、横井 卓哉、新谷 康介、岡田 充弘、高松 聖仁、小西 定彦、中村 博亮、Nerve capping technique with nerve conduit for treating painful digital neuroma: A case report、J Orthop Sci、査読有、2019、S0949-2658(19)30061-2
DOI: 10.1016/j.jos.2019.02.012.

斧出 絵麻、上村 卓也、高松 聖仁、新谷 康介、横井 卓哉、岡田 充弘、中村 博亮、Nerve capping with a nerve conduit for the treatment of painful neuroma in the rat sciatic nerve、J Neurosurg、査読有、8、2019、1-9
DOI: 10.3171/2018.10.JNS182113.

新谷 康介、香月 憲一、米田 昌弘、上村 卓也、岡田 充弘、高松 聖仁、中村 博亮、Computer-Assisted Three-Dimensional Corrective Osteotomy for Malunited Fractures of the Distal Radius Using Prefabricated Bone Graft Substitute、J Hand Surg Asian Pac、査読有、23(4)、2018、479-486
DOI: 10.1142/S2424835518500467.

新谷 康介、上村 卓也、高松 聖仁、横井 卓哉、斧出 絵麻、岡田 充弘、中村 博亮、
Protective effect of biodegradable nerve conduit against peripheral nerve adhesion
after neurolysis, J Neurosurg, 査読有、129(3)、2018、815-824

DOI: 10.3171/2017.4. JNS162522.

横井 卓哉、上村 卓也、高松 聖仁、新谷 康介、斧出 絵麻、岡田 充弘、日高典昭、中村 博亮、
Bioabsorbable nerve conduits coated with induced pluripotent stem cell-derived
neurospheres enhance axonal regeneration in sciatic nerve defects in aged mice,
J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 査読有、106(5)、2018、1752-1758

DOI: 10.1002/jbm.b.33983.

横井 卓哉、上村 卓也、高松 聖仁、中村 博亮、ハイブリッド型人工神経による末梢神経
再生と癒着予防材料への応用、人工臓器、査読有、47 巻 3 号、2018、Page185-188

新谷 康介、上村 卓也、高松 聖仁、横井 卓哉、岡田 充弘、中村 博亮、中空型生体吸収性人工神経による末梢神経の癒着防止効果、日本手外科学会雑誌、査読有、35 巻 2 号、2018、
Page1-5

上村 卓也、高松 聖仁、中村 博亮、整形トピックス iPS 細胞由来神経前駆細胞を付加したハイブリッド型人工神経 免疫応答下での移植細胞による神経再生促進効果、整形外科、
査読有、69 巻 10 号、2018、Page1044

上村 卓也、斧出 絵麻、横井 卓哉、玄 承虎、新谷 康介、中村 博亮、人工神経(リナーブ)による nerve capping で治療した有痛性断端神経腫の 1 例、中部日本整形外科災害外科学会雑誌、
査読有、61 巻 4 号、2018、Page875-876

上村 卓也、高松 聖仁、岡田 充弘、横井 卓哉、新谷 康介、斧出 絵麻、中村 博亮、橈骨動脈穿通枝脂肪弁による正中神経ラッピング、日本マイクロサージャリー学会会誌、査読有、
31 巻 1 号、2018、Page8-12

上村 卓也、高松 聖仁、横井 卓哉、新谷 康介、斧出 絵麻、中村 博亮、埋没した指輪による手指絞扼の 1 例 Embedded ring syndrome. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌、査読有、
61 巻 2 号、2018、Page317-318

横井 卓哉、岡田 充弘、斧出 絵麻、上村 卓也、新谷 康介、中村 博亮、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経絞扼性障害における末梢神経微小血管の描出、日本手外科学会雑誌、
査読有、34 巻 4 号、2018、Page536-539

池田 幹則、岡田 充弘、遠山 雅彦、上村 卓也、高松 聖仁、中村 博亮、Comparison of Median Nerve Cross-sectional Area on 3-T MRI in Patients With Carpal Tunnel Syndrome, Orthopedics, 査読有、
40(1)、2017、e77-e81

DOI: 10.3928/01477447-20160915-04.

上村 卓也、岡田 充弘、横井 卓哉、新谷 康介、斧出 絵麻、中村 博亮、神経鞘腫による末梢神経の電気生理学的変化、末梢神経、査読有、28 巻 1 号、2017、Page73-77

斎藤 公亮、川端 確、阿波 康成、玄 承虎、高松 聖仁、橈骨神経浅枝断端神経腫による肘関節拘縮に対する人工神経を用いた治療経験、中部日本整形外科災害外科学会雑誌、査読有、
60 巻 1 号、2017、Page157-158

斧出 絵麻、高松 聖仁、新谷 康介、横井 卓哉、上村 卓也、岡田 充弘、香月 憲一、中村 博亮、Anatomical Origins of Radial Artery Perforators Evaluated Using Color Doppler Ultrasonography, J Reconstr Microsurg, 査読有、32(8)、2016、594-8

DOI: 10.1055/s-0036-1584217.

新谷 康介、高松 聖仁、上村 卓也、斧出 絵麻、岡田 充弘、香月 憲一、中村 博亮、Planning digital artery perforators using color Doppler ultrasonography: A preliminary report, J Plast Reconstr Aesthet Surg, 査読有、69(5)、2016、634-9

DOI: 10.1016/j.bjps.2016.01.003.

横井 卓哉、上村 卓也、高松 聖仁、新谷 康介、岡田 充弘、中村 博亮、人工神経に付加した iPS 細胞由来神経前駆細胞による末梢神経再生の促進効果、末梢神経、査読有、27 巻 1 号、2016、Page98-102

〔学会発表〕(計 20 件)

上村 卓也 他、iPS 細胞由来神経前駆細胞と人工神経によるマウス末梢神経再生、第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、2018.10.11、奈良春日野国際フォーラム(奈良県)

上村 卓也 他、人工神経と iPS 細胞移植を併用した末梢神経再生における免疫応答と加齢の影響、第 91 回日本整形外科学会学術総会、2018.5.24、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

岡田 充弘 他、蛍光血管造影法による末梢神経内血流に着目した神経上膜剥離術の有効性の検討、第 91 回日本整形外科学会学術総会、2018.5.24、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

上村 卓也 他、人工神経と iPS 細胞移植を併用した末梢神経再生 神経再生における免疫応答と加齢の影響、第 61 回日本手外科学会学術集会、2018.4.26、京王プラザホテル(東京都)

上村 卓也 他、FGF と SDF-1 の Dual release DDS を併用した人工神経 - マウス坐骨神経欠損モデルによる実験的研究 -、第 61 回日本手外科学会学術集会、2018.4.26、京王プラザ

ホテル(東京都)

上村 卓也 他、中空型人工神経による神経保護・癒着防止効果 - ラット坐骨神経癒着モデルによる実験的研究 -、第 61 回日本手外科学会学術集会、2018.4.26、京王プラザホテル(東京都)

岡田 充弘 他、蛍光血管造影法を併用した末梢神経絞扼性障害重症例における神経上膜剥離術の有効性の検討、第 61 回日本手外科学会学術集会、2018.4.26、京王プラザホテル(東京都)

上村 卓也 他、人工神経(リナーブ)による Nerve capping で治療した有痛性断端神経腫の 1 例、第 130 回中部日本整形災害外科学会、2018.4.20、ひめぎんホール(愛媛県)

上村 卓也 他、iPS 細胞由来神経前駆細胞を付加したハイブリッド型人工神経-免疫応答下での移植細胞による神経再生促進効果-、第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017.10.26、沖縄コンベンションセンター(沖縄県)

上村 卓也 他、Entrapment of Digital Nerves due to an Embedded Ring: A Case Report、2017.6.21、ブダペスト(ハンガリー)

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経の血流評価法、第 60 回日本手外科学会学術集会、2017.4.27、名古屋国際会議場(愛知県)

上村 卓也 他、橈骨動脈穿通枝脂肪弁による正中神経ラッピング、第 43 回日本マイクロサージャリ学会学術集会、2016.11.17、リーガロイヤルホテル広島(広島県)

上村 卓也 他、iPS 細胞を用いた運動器疾患治療への挑戦 iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経再生、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016.10.13、福岡国際会議場(福岡県)

上村 卓也 他、神経鞘腫による末梢神経の電気生理学的変化、第 27 回日本末梢神経学会学術集会、2016.8.26、大阪国際会議場(大阪府)

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた蛍光輝度補正による神経内血行評価、第 27 回日本末梢神経学会学術集会、2016.8.26、大阪国際会議場(大阪府)

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経内の微小血行動態の評価法、第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2016.6.9、国立京都国際会館(京都府)

上村 卓也 他、iPS 細胞と FGF を融合したハイブリッド型人工神経 自家神経移植に匹敵する人工神経をめざして、第 37 回日本炎症再生医学会学術集会、2016.6.16、京都勧業館みやこめっせ(京都府)

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経絞扼性障害における神経内血行動態の評価、第 89 回日本整形外科学会学術総会、2016.5.12、パシフィコ横浜(神奈川県)

上村 卓也 他、手外科 Front line iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経再生医療、第 59 回日本手外科学会学術集会、2016.4.21、広島国際会議場(広島県)

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経絞扼性障害における神経内血行動態の評価、第 59 回日本手外科学会学術集会、2016.4.21、広島国際会議場(広島県)

〔図書〕(計 6 件)

上村 卓也 他、南光堂、整形外科、2018、1(1044)

上村 卓也 他、西野一三中外医学社、Annual Review 神経、2017、6(222~227)

上村 卓也、技術情報協会、生体吸収性材料の開発と安全性評価、2017、6(162~167)

上村 卓也 他、化学工業社、化学工業、2017、4(15~18)

上村 卓也 他、ニュー・サイエンス社、細胞、2017、2(36~37)

上村 卓也 他、中外医学社、Clinical Neuroscience、2016、4(1166~1169)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上村 卓也

ローマ字氏名：UEMURA Takuya

所属研究機関名：大阪市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：客員研究員

研究者番号(8桁)：10597321

研究分担者氏名：高松 聖仁
ローマ字氏名：TAKAMATSU Kiyohito
所属研究機関名：大阪市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：客員准教授
研究者番号(8桁)：30295688

研究分担者氏名：岡田 充弘
ローマ字氏名：OKADA Mitsuhiro
所属研究機関名：大阪市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号(8桁)：40309571

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横井 卓哉
ローマ字氏名：YOKOI Takuya

研究協力者氏名：新谷 康介
ローマ字氏名：SHINTANI Kosuke

研究協力者氏名：斧出 絵麻
ローマ字氏名：ONODE Ema

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。