

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10951

研究課題名(和文)同種神経基底膜と骨髄幹細胞移植による人工神経の作成

研究課題名(英文)Artificial nerves containing allogenic basal lamellae scaffold and bone marrow derived stem cells

研究代表者

柿木 良介 (KAKINOKI, Ryosuke)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20314198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経欠損を伴う末梢神経損傷の治療は、重要な機能を果たしていない末梢神経を自己の体から採取し、その神経欠損に移植する自家神経移植術が一般的である。この方法では、移植できる神経量に限りがあり、また神経採取部に神経麻痺を起こす。本実験では、免疫学的に不寛容であるラットから採取した坐骨神経を免疫反応を避けるため脱細胞化し、そこにシュワン細胞に分化する可能性のある自家骨髄間葉系幹細胞を移植したものを、ポリグリコール酸線維外套管に挿入して作成した人工神経を作成した。この人工神経ではラット坐骨神経で自家神経の70-80%の末梢神経再生を獲得でき、臨床応用可能と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回実験で用いた外套管は、柔軟性があり生体分解性があるため、神経再生後外套管を除去する必要がなく、また屈伸する関節部にも移植できる。

以前の実験(Kaizawa Y. Cell Transplant 2017)では、外套管内に血管茎を挿入していたが、本実験の外套管の毛細血管透過性のため、血管は外套管の外を沿わずだけで再生神経に良好な血流を付与する事がわかった。また血流の良い場所に移植するのであれば、外套管の周囲に血管茎を沿わず必要が無い。脱細胞化同種神経は、ほぼ完全にcell debrisを取り除けて、抗原性を示さず、また細胞外マトリックスを保持でき、移植したBMSCを誘導管内に保持していた。

研究成果の概要(英文)：Autogenous nerve grafting is a gold standard for repair of peripheral nerve deficits. However, that is associated with limit of nerve source and followed by neurological deficits in the area innervated by the donor nerves. In the current study, a 20 mm gap created in a rat sciatic nerve model was bridged using the vascularized polyglycolic acid (PGA) tube containing the decellularized allogenic basal lamellae (DABL) with implantation of isogenic cultured bone marrow derived mesenchymal stem cells (BMSCs) and 20-mm long autogenous nerve graft (Auto group). The DABL was not involved by immunological rejection. Some transplanted BMSCs were differentiated into Schwann cell-like cells. Nerve regeneration in our PGA tube was about 70-80% of that in the Auto group at 24 weeks. Our PGA artificial nerve is applicable to clinical use in near future.

研究分野：整形外科、末梢神経外科、末梢神経再生

キーワード：人工神経 末梢神経再生 同種神経基底膜 骨髄間葉系幹細胞 血流

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は神経チューブが長くなれば、チューブ内中央部が疎血環境になることに着目し、腓腹動静脈を挿入したシリコンチューブでラット坐骨神経を架橋する、血管含有チューブ(VCT)モデルを作成した。その結果、VCTでは、神経再生速度を増加させ(Kakinoki R. et al. Neurosci Res 1994)、神経再生距離を25mmまで延長させたが(Kakinoki R. et al. Int Orthop 1997)、最終的な神経再生は、血管茎を含有しないチューブと有意差がないこともわかった。VCT内は血流に富み、かつその両端に縫合された神経断端より様々な神経好性、神経栄養因子が分泌されている。我々は、そのような環境に骨髄間葉系幹細胞(BMSC)を移植すれば、細胞はその豊富な血流と神経因子により、神経系細胞に分化、増殖し、神経再生を促進するのではないかと仮説を立て、ラット坐骨神経の15mm欠損を、VCT内にBMSCを移植したシリコンチューブ(VBT)で架橋するモデルを作成した。その結果VBTでは、VCTや線維芽細胞を移植したVCTに比較して、有意に良好な神経再生を示した(Yamakawa T, Cell Transplant 2004)。しかしヌ尺骨神経30mm欠損を、VBTで架橋する実験では、VBT内での神経再生は、自家神経移植内での神経再生には及ばないことがわかった(Kaizawa Y. et al. Microsurgery 2015)。そこで我々は、神経誘導管内での神経再生をより自家神経移植に近づけるには、移植した骨髄間葉系幹細胞や神経断端からチューブ内へ移動したシュワン細胞の足場の必要性に着目した。DAラット(RT-1<sup>a</sup>, inbred)より坐骨神経を採取し、凍結解凍を繰り返して脱細胞性神経基底膜片を作成した。凍結解凍処理した末梢神経片は、細胞成分が除去されて抗原性も少なくなる一方、basal lamina, extracellular matrixが残存するため、末梢神経再生の足場、移植細胞の有利な足場になると考えた。DAラットとmajor histocompatibility mismatchの関係にあるルイスラット(RT-1<sup>1</sup>, inbred)の坐骨神経に作成した20mm神経欠損を、DAラットより採取した凍結解凍処理同種脱細胞性神経片(DABL)を用いて架橋し、さらに腓腹動静脈を含有したシリコンチューブで同種脱細胞神経片をwrapし、最後に同種脱細胞神経片内に $3 \times 10^6$ 個のBMCを注入して、BMC移植DABLと血管茎を含有したチューブ(VBST)を作成した。ルイスラットの坐骨神経20mm欠損をVBSTで架橋した群(VBST群)と20mm長の坐骨神経を切離、反転させて架橋した自家神経移植群(AN群)の比較では、移植後24週でVBST群は、再生軸索総数、軸索直径、足部内転筋でのM波の振幅、神経伝導速度のすべてにおいてAN群の平均値を上回った(Kaizawa Y et al. Cell transplant, 2016)。しかし今回VBSTの臨床応用を考えたところ、以下のような問題点が浮かび上がった。1) 凍結解凍して作成したDABLには、組織のdebrisが残存し、donorからrecipientへの病原体の移行の可能性が完全に否定できない。2) シリコンチューブでは、弾性が強すぎて、関節部や皮下組織の薄い組織では、皮膚より突出する可能性が否定できず、神経鞘は、ある程度の弾力性があり、関節運動によりチューブ全体がしなる構造を持ち、かつ生体分解性のある物質が適当と考えた。3) ex vivoにより培養されたBMCを生体に戻す事には、病原体の混入も否定できないし、培養BMCの発癌性も否定できない。これらの問題を解決し、VBSTを改良することで、VBSTの高等動物への応用、さらには臨床応用を視野に、本研究を実施することになった。

### 2. 研究の目的

日本国内で臨床応用されているNerbridge<sup>®</sup>の外套管は、flexibilityがあり、biodegradableである。本研究の目的は、この外套管を用いてVBSTを作成し、ラット坐骨神経20mm欠損を架橋し、その神経再生を自家神経移植術と比較検討することである。Nerbridge<sup>®</sup>の外套管で作成したVBSTは、ラット坐骨神経20mm欠損モデルで、自家神経と同等もしくはそれに近い神経再生が起こるのではないかと仮説を立てた。

### 3. 研究の方法

実験1: Nerbridge<sup>®</sup> (Toyobo Co. Ltd, Osaka, Japan)の外套管内の毛細血管透過性に関する実験  
外套管の毛細血管透過性を検討し、あわせて外套管内の神経再生をも検討する。

#### (1)手術と実験群

ラット坐骨神経の5mm欠損を長さ8mm、直径3mmの外套管で架橋する。続いて下腿より0.5cmX0.5cmの皮弁をつけた腓腹動静脈茎を採取する(Kakinoki R. et al. Neurosci Res 1994)。

E-tube群: ラット坐骨神経の5mm欠損を架橋した外套管の外側に腓腹動静脈茎を沿わせる。

I-tube群: ラット坐骨神経の5mm欠損を架橋した外套管に縦方向のslitを作成し、tube内に腓腹動静脈茎を挿入し、slitを10-0 nylon糸で縫合閉鎖する。

N-tube群: ラット坐骨神経の5mm欠損を架橋した外套管周囲に血管茎をおかない。

全てのグループで外套管と坐骨神経を20X20X0.1mmのシリコン膜で覆う。

#### (2)Nerbridge<sup>®</sup>外套管の毛細血管透過性に関する検討

E-tube, I-tube, N-tubeそれぞれ3匹のラットを使用。術後4週で、それぞれのtubeの中央部より凍結切片を採取し、RECA-1染色を行い、RECA-1陽性細胞数を測定し、再生神経内の毛細血管形成を比較検討する。

#### (3)電気生理学的、組織形態学的検討

術後12週で外套管内の神経再生を神経伝導速度、足部内転筋CMAP amplitudeの測定した(Kakinoki R. et al. Neurosci Res 1994)。遠位の外套管と坐骨神経の遠位縫合部の遠位5mmで採取した神経切片をトルイジンブルー染色して、平均有髄軸索直径、平均有髄軸索数、平均髄鞘厚を測定した

(Kakinoki R. et al. Neurosci Res 1994).

実験2: Nerbridge<sup>R</sup> 外套管にルイスラット骨髄間葉系細胞 (BMSC) を移植したルイスラットと major histocompatibility mismatch のある DA ラットより採取した作成した同種脱細胞性神経基底膜 (DABL) を挿入した神経誘導管で、ルイスラット坐骨神経 20mm 欠損を架橋し、自家神経にて架橋した群とその神経再生を電気生理学的、組織形態学的に比較検討する。

(1) DABL の組織学的検討

DA ラットより採取した坐骨神経を界面活性剤処理し、さらに 線照射を加えた後に凍結乾燥処理した DABL 片 20mm (Szykaruk et al. 2013) を作成し、凍結融解を3回繰り返して作成した DABL 片 (Ide et al. 1983) と電子顕微鏡的にその形態を比較する。また抗ラミニン抗体をもちいて DABL 内の細胞外マトリックスの残存について検討する (Kaizawa Y et al. Cell transplant, 2016)。

(2) 骨髄間葉系細胞 (BMSC) の作成

GFP 陽性ルイスラットから BMC 採取し、5-7 継代する。

(3) 実験群の作成

TubeC+ 群: 長さ 22mm 直径 3mm の Nerbridge<sup>R</sup> の外筒管のなかに  $3 \times 10^6$  個の BMSC を移植した 20mm 長の DABL を挿入して作成した神経誘導管で、ルイスラットの坐骨神経を 15mm 切除して作成した 20mm の神経欠損を架橋する。続いて下腿より翻転した腓腹動静脈茎を外套管に沿わせるように移植する。

TubeC- 群: Tube C+ group と同様に作成するが、DABL 内に BMSC の移植をしない群。

Auto 群: 20m 長のルイスラット坐骨神経を切離し、近位端と遠位端を翻転し直ちに縫合する自家新鮮神経移植群。

Allo 群: 20mm 長の DA ラット坐骨神経を切離し、近位端と遠位端を翻転し直ちにルイスラット坐骨神経に作成した 20mm 神経欠損を縫合架橋する同種新鮮神経移植群。

(4) 電気生理学的、組織形態学的検索

TubeC+群, TubeC-群, Auto 群を 16 匹ずつ作成し、8 匹ずつ術後 12, 24 週に実験1と同様の電気生理学的と組織形態学的解析をおこない、これら 3 群間での神経再生を比較検討する。

(5) 脱細胞性同種神経片の拒絶反応

脱細胞性同種神経片の拒絶反応をみるため、TubeC+, TubeC-, Auto, Allo 群のラット (各3匹づつ) より移植後 4 週間後に tube 中央より切片を採取し、抗 CD8 免疫染色をおこない CD8 陽性細胞数をカウントし、各群間で比較検討する (Kaizawa Y et al. Cell transplant, 2016)。

(6) 移植した BMSC 細胞の Schwann cell-like cell への分化

偏向顕微鏡で TubeC+群で GFP 陽性細胞が再生神経内に残存している事を確認するとともに、抗 s-100 抗体で免疫染色を行い移植した BMSC が glia 系細胞へ分化しているかを確認する。(5 匹)

## 4. 研究成果

### 実験1

E-tube, I-tube では神経再生をみとめたが、N-tube では神経再生は認められなかった。

(1) Nerbridge<sup>R</sup> 外套管の毛細血管透過性に関する検討

E-tube, I-tube 群での RECA-1 陽性細胞数は、それぞれ  $175 \pm 37$ ,  $162 \pm 29$  でこの2群間に有為差は無かった。Nerbridge<sup>R</sup> 外套管内に、外づけ血管より良好な毛細血管形成がみとめられた。Tube のなかに血管茎を入れ他場合と Tube への外付け血管で、tube 内の毛細血管形成に有意差はなく、Nerbridge<sup>R</sup> 外套管を神経誘導管として用いる場合は、神経誘導管内に血管を通す必要が無いことがわかった。

(2) 電気生理学的、組織形態学的検討

E-tube 群, I-tube 群ともに平均有髄軸索直径位、平均有髄軸索数、平均髄鞘厚に有為差は無かった。(表1)

### 実験2

(1) DABL 片の組織学的検討

凍結融解で作成した DABL 片では、細胞の debris、変性したミエリン鞘をみとめた。界面活性剤で作成した DABL 片には、ほとんど完全に細胞成分が除去されていた。

(2) DABL 片の細胞外マトリックスの評価

凍結融解で作成した DABL 片および界面活性剤で作成した DABL 片ともに抗ラミニン抗体陽性で、界面活性剤で作成した DABL 片にもラミニンの残存が確認できた。

(3) 電気生理学的検索

12 週の時点では、運動神経伝導速度は Auto 群が、TubeC-, TubeC+群より有為に速かったが、TubeC-群と TubeC+群の間に有意差を認めなかった。

足部内転筋の CMAP amplitude については、3群間に有為差は認めなかった。(表2)

24 週の時点では、Auto 群は、TubeC-群より有為に高値で、Auto と TubeC+群間、TubeC+ と TubeC- 群間に有意差を認めなかった。(表2)

(4) 組織形態学的検索

12 週の時点の平均有髄軸索数と平均有髄軸索直径は、Auto 群が、TubeC-, TubeC+群より有為に高値であったが、TubeC-群と TubeC+群の間に有意差は認めなかった。平均髄鞘厚については、Auto 群が、TubeC-群より有為に高値であったが、TubeC-と TubeC+群間、TubeC+と Auto 群間に有意差は認めなかった。(表3)

24 週時点で、平均有髄軸索数と平均有髄軸索直径は、Auto 群が、TubeC-, TubeC+群より有為に高値で、TubeC+群は TubeC-群より有為に高値であった。平均髄鞘厚については、Auto 群が、TubeC-, TubeC+群より有為に高値であったが、TubeC-群と TubeC+群の間に有意差は認めなかった。(表3)

(5) DABL 片の拒絶反応について

TubeC+, TubeC-, Auto, Allo 群での平均 CD8 陽性細胞数は、 $32 \pm 10$ ,  $40 \pm 9$ ,  $66 \pm 11$ ,  $123 \pm 34$  であった。Allo 群は他の3群より有為に CD8 陽性細胞数が多く、のこりの3群間に有意差はなかった。この結果より TubeC+, TubeC-群の DABL には、明らかな免疫学的拒絶反応は認めなかった。

(6) 移植した BMSC 細胞の Schwann cell-like cell への分化

偏向顕微鏡観察で、TubeC+群で再生神経内に GFP 陽性細胞が残存していた。また抗 s-100 染色で、抗 s-100 抗体陽性かつ GFP 陽性細胞が再生神経内に存在し、DABL 内に移植した BMSC が glia 系細胞に分化していることが確認できた。

表 1.  
I-Tube and E-Tube 群での電気生理学的、組織形態学的  
検査結果 (12 weeks)

| Parameters                         | I-Tube          | E-Tube          | p value |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|---------|
| MNCV                               | $0.34 \pm 0.11$ | $0.48 \pm 0.18$ | 0.56    |
| CMAP                               | $0.12 \pm 0.04$ | $0.11 \pm 0.03$ | 0.08    |
| Axon Number                        | $6162 \pm 1867$ | $5712 \pm 930$  | 0.53    |
| Axon Diameter ( $\mu\text{m}$ )    | $2.19 \pm 0.28$ | $2.17 \pm 0.42$ | 0.9     |
| Myelin Thickness ( $\mu\text{m}$ ) | $0.74 \pm 0.15$ | $0.69 \pm 0.09$ | 0.35    |

Note: MNCVs (神経伝導速度) と足部内転筋の CMAP amplitudes は、対側のパーセントで表示した。

表 2  
TubeC+, TubeC- Auto 群の電気生理学的検査結果  
(12, 24 weeks)

| 12W  | TubeC+          | TubeC-          | Auto            |
|------|-----------------|-----------------|-----------------|
| MNCV | $0.34 \pm 0.09$ | $0.29 \pm 0.08$ | $0.48 \pm 0.08$ |
| CMAP | $0.17 \pm 0.09$ | $0.12 \pm 0.02$ | $0.19 \pm 0.09$ |
| 24W  | TubeC+          | TubeC-          | Auto            |
| MNCV | $0.58 \pm 0.15$ | $0.56 \pm 0.15$ | $0.63 \pm 0.09$ |
| CMAP | $0.58 \pm 0.15$ | $0.38 \pm 0.16$ | $0.69 \pm 0.17$ |

MNCVs (神経伝導速度) と足部内転筋の CMAP amplitudes は、対側のパーセントで表示した。Brackets: statistical significance.

表3  
TubeC+, TubeC- Auto群の組織形態学的検査結果  
 (12, 24 weeks)

| 12W                                | <u>TubeC+</u> | <u>TubeC-</u> | Auto      |
|------------------------------------|---------------|---------------|-----------|
| Axon Number                        | 2199±512      | 2048±648      | 3794±481  |
| Axon Diameter ( $\mu\text{m}$ )    | 2.37±0.55     | 2.28±0.57     | 3.23±0.42 |
| Myelin Thickness ( $\mu\text{m}$ ) | 0.46±0.22     | 0.40±0.21     | 0.66±0.15 |
| 24W                                | <u>TubeC+</u> | <u>TubeC-</u> | Auto      |
| Axon Number                        | 4662±711      | 3471±439      | 5974±1205 |
| Axon Diameter ( $\mu\text{m}$ )    | 2.85±0.41     | 2.37±0.26     | 3.86±0.61 |
| Myelin Thickness ( $\mu\text{m}$ ) | 0.79±0.15     | 0.64±0.06     | 1.15±0.12 |

Brackets : statistical significance.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中寛樹 赤木将男 柿木良介                     |
| 2. 発表標題<br>骨髄間葉系細胞及び同種基底膜移植により作成した人工神経鞘に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>第30回日本末梢神経学会学術集会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中寛樹 柿木良介 大谷和裕 赤木将男                |
| 2. 発表標題<br>骨髄間葉系細胞及び同種基底膜移植により作成した人工神経鞘に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>第29回日本末梢神経学会学術集会                   |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>貝澤幸俊 柿木良介 池口良輔 太田壮一 野口貴志 織田宏基 野尻正憲 大塚和史 佐藤充彦 武井大輔 松田秀一 |
| 2. 発表標題<br>局所血管柄を導管内に含む人工神経による末梢神経再生                              |
| 3. 学会等名<br>第33回日本整形外科学会基礎学術集会                                     |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>貝澤幸俊 柿木良介 池口良輔 太田壮一 野口貴志 大塚和史 松田秀一 |
| 2. 発表標題<br>骨髄間葉系幹細胞を移植した血管柄含有神経導管における神経再生     |
| 3. 学会等名<br>第36回中部日本手外科研究会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中寛樹 柿木良介 赤木将男                     |
| 2. 発表標題<br>骨髄間葉系細胞及び同種基底膜移植により作成した人工神経鞘に関する研究 |
| 3. 学会等名<br>第36回中部日本手外科研究会                     |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)              | 備考 |
|-------|--|------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 赤木 将男<br><br>(AKAGI Masao)<br><br>(00273441) | 近畿大学・医学部・教授<br><br><br><br>(34419) |    |