

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09080

研究課題名(和文)末梢神経再生に向けたヒトiPS細胞を用いたハイブリッド型人工神経の開発

研究課題名(英文) Peripheral nerve regeneration using purified stem cells of neural crest-like cells derived from human induced pluripotent stem cells

研究代表者

佐藤 和毅 (SATO, Kazuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：60235322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞を神経堤様細胞に誘導し、NCAM、LNGFR、THY-1の3種細胞表面マーカーによる選定を行った。移植細胞の効果確認のため、コラーゲンのみを含むシリコンチューブを用い、免疫不全マウスの急性期坐骨神経欠損モデルへ移植した。移植細胞の回収効率を評価後、マウス坐骨神経欠損部に移植した。その再生効果を各種画像検査、運動機能評価検査、電気生理学的検査等を用いて評価した。細胞移植により、組織学的再生、機能的再生共に自家神経移植と比較して差のない再生を認めた。今後は、移植媒体の作成及び、動物媒体を大きくすることを考えており、次世代の実験を目指し、新規チューブの作成を開始した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経の欠損は、高度外傷や悪性腫瘍の切除、さらには手術の全合併症の2割に及ぶ神経の損傷に対して治療手段が模索されている。現在のスタンダードな治療である自家神経移植は、採取部位の機能欠損や、採取可能な長さの規定など様々なデメリットがある。人工神経による有用な再生が現在も待望されている。本研究の目的である自家神経移植と同等以上の機能回復を示すヒトiPS細胞を用いたハイブリッド型人工神経の開発が実現すれば、これらの欠損部位への治療戦略において大きな解決が期待される。

研究成果の概要(英文)：We induced hiPSCs to neural crest like cells and purified them by triple cell surface markers. To observe the efficacy of these cells, embedded into silicon conduit only with collagen. Transplantations were performed in the mice sciatic nerve defect models. We evaluated the efficiency of purifying and gathering the triple positive cells. Then, we measured function potential, electrophysiological potential, and histological potentials of the regeneration nerves. These results were as well as those of the autograft transplantation. We have just started to make new implant for transplantation and to transplant in larger animals.

研究分野：整形外科(末梢神経)

キーワード：再生治療 ヒトiPS細胞 末梢神経 神経再生 人工神経

## 1. 研究開始当初の背景

四肢の欠損型末梢神経損傷は、外傷や悪性腫瘍摘出後、また不適切な外科的処置などによりしばしば発生する病態である。その結果として感覚障害のほか、支配筋麻痺による四肢の機能障害が生じ、日常生活に多大な影響を与える。このような神経損傷の治療として、欠損がない例に対しては顕微鏡下に神経断端を直接縫合する一次縫合が行われ、その治療成績は比較的良好である。しかし、臨床において欠損を有するケースは多く、その治療は難しく、大きな問題を有する。現在、欠損型神経損傷に対して、重要度のより低い自己の他神経を犠牲にする自家神経移植や神経移行が行われており、「元通り」にはならないが、一定の機能回復を得ることができる。しかし、一方でドナーとなる神経の脱落症状は不可避であり、また、採取できる神経の長さに限界があること、さらに損傷した神経が太い場合にそれにマッチする太い神経を採取することが出来ない、などの問題を有する。さらにドナー神経の採取は手術時間を延長し、身体に新たな侵襲を加え、醜状痕を増やすことにも繋がる。このような背景から、近年、種々の人工素材を用いたチューブ型の人工神経が開発された。一部は製品化され、臨床で使用することが出来るようになり、本研究者たちも実際に使用している。これらの人工神経を使用することにより自己の神経を犠牲する問題点は解決されたが、一方で、その治療成績、つまり神経の機能回復は限定的で、自家神経移植術の代替えとなるほど良好な臨床成績を得られないのが実状である。

## 2. 研究の目的

申請者のグループは、慶應義塾大学整形外科学教室および生理学教室が長年行っている脊髄再生研究で蓄積した知見、技術を動員し、これまでにない新しい人工神経の開発を行っている。私どもの研究の目的は、末梢神経再生に向けて自家神経移植術と同等以上の機能回復を示すハイブリッド型人工神経を開発することである。その実現には、欠損長が長くても再生する力があること。組織学的に、有髄神経として再生していること。中枢の末梢神経の損傷を想定し、運動神経線維の回復、機能的回復が得られること。最後に、ヒトへの移植を将来的に想定できることがあげられる。

## 3. 研究の方法

私どもは、本目標を以下小目標の達成を通して行う予定である。小目標を「移植細胞」、「移植媒体 (scaffold)」、「周囲環境 (動物、液性因子、急性期と慢性期の違いなど)」に分けた。本研究課題実施期間(2018-2020年度)では「移植細胞」を遂行した。

移植には慶應義塾大学で樹立、または国立研究開発法人理化学研究所バイオリソースセンターより入手、もしくは京都大学iPS研究所(CiRA)より入手したヒトiPS細胞由来の細胞を用い、科学的根拠に立脚した、移植ヒト細胞の能力を付加した人工神経の確立を目指した。

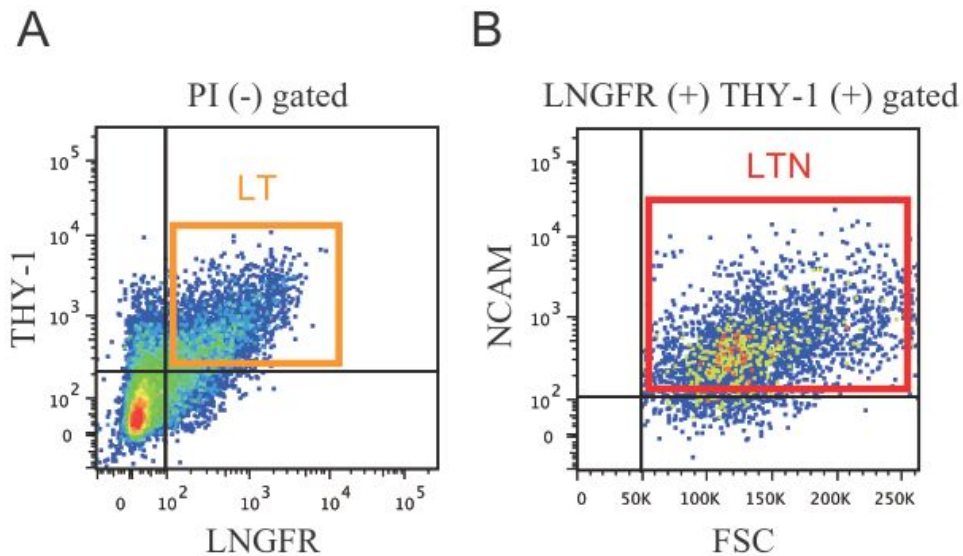
本研究では、まず細胞株としてヒトiPS細胞の中でWD39株と201B7株を用いた。これらを神経再生に有利と思われる細胞表面マーカーであるLNGFR、THY-1、NCAMで純化分離を行った。また、細胞培養中に発光・蛍光たんぱく質であるffLucを細胞に遺伝子導入して、生体時に細胞活動を可視化した。移植モデルには、NOD-SCIDマウス(免疫不全マウス)の坐骨神経6mm欠損モデルマウスへと移植した。コントロール群として、コラーゲンチューブのみのNC群、自家神経移植のAuto群、健常神経PC群とした。

in vitroではフローサイトメトリーによる細胞性質の検討を行い、in vivoでは、IVIS,神経伝導検査、組織学的評価を4週毎に施行した。免疫学的染色、電気顕微鏡による観察も行い、移植に適した細胞であるか否かを評価することとした。

## 4. 研究成果

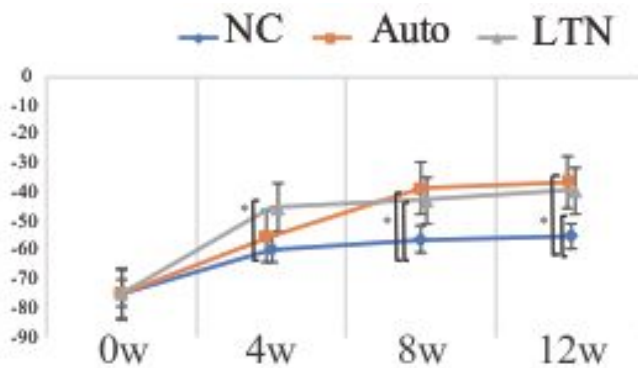
(1)神経細胞へと分化傾向を持つと考えられる、ヒト細胞由来神経堤様細胞を文献通りに誘導した。[1] LNGFR及びTHY-1細胞の陽性率及び、その細胞集団内のNCAMの発現率を測定した。

LNGFR及びTHY-1両陽性細胞の回収からNCAM陽性細胞の回収効率は、80%程度と回収効率に優れていた。WD39株及び201B7株共に同等の結果であり、良好なLNGFR,THY-1,NCAM陽性ヒトiPS細胞由来神経堤様細胞(LTN細胞)は、培養、分離過程で移植に適した特徴を持っていると考えられた。



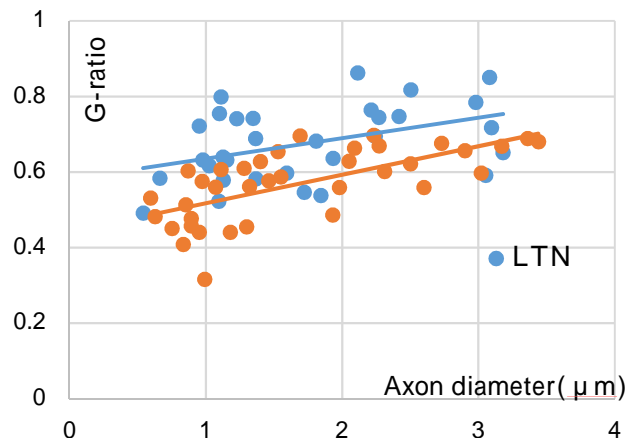
- A) 全神経堤様細胞(NCLCs)のうち、LNGFR +、THY-1 + 細胞の分布を見ている。  
 B) LNGFR +、THY-1 + 細胞群における、NCAM 陽性細胞の比率は非常に多い。80%程度であった。

(2)機能的回復の評価のため、4週毎の歩行時のFoot printを撮影した。Sciatic functional indexでは、4週時点でLTN群は回復が有意に見られ、8週、12週とAuto群同等の回復結果であった。この結果より、LTN群はAuto群に匹敵する機能的な回復が得られる可能性が見られた。



(3)組織学的な回復を評価目的に、回復神経線維の軸索断面積を評価すると、NC群に比し有意にLTN群で広がった。電気顕微鏡で評価したG-ratioでもAuto群と差が見られず、良好な有髄神経再生が得られた。

成熟髄鞘を染めるPOもNC群より優位にLTN群で多く、Auto群に相当していた。組織学的にも、良好な再生が得られたと考えられた。



(4)生体内での細胞動向を評価した。ffLuc によりおこなった IVIS の結果では、4 週までの増殖傾向が見られ、その後は次第に減衰する経過が見られた。組織染色の結果でもヒト細胞の染色数は、8 週以後減少しており、細胞増殖の指標である Ki67 陽性比率の減少も確認された。これらの結果より、生体移植後の生着と、最終的な腫瘍化リスクの低さを示唆された。

<引用文献>

1. Ouchi, T., et al., *LNGFR(+)THY-1(+) human pluripotent stem cell-derived neural crest-like cells have the potential to develop into mesenchymal stem cells*. Differentiation, 2016. **92**(5): p. 270-280.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>雨宮 剛, 木村 洋朗, 岩本 卓士, 佐藤 和毅         |
| 2. 発表標題<br>NCAM陽性ヒトiPS細胞由来純化神経堤様細胞を用いた末梢神経再生 |
| 3. 学会等名<br>第64回日本手外科学会学術集会(パネルディスカッション)      |
| 4. 発表年<br>2021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 | 中村 雅也<br>(NAKAMURA Masaya)<br>(30217898)  | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授<br><br>(32612)   |    |
| 研究分担者 | 名越 慈人<br>(NAGOSHI Narihito)<br>(10383837) | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師<br><br>(32612)   |    |
| 研究分担者 | 芝田 晋介<br>(SHIBATA Shinsuke)<br>(70407089) | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・訪問教授<br><br>(32612) |    |
| 研究分担者 | 黄地 健仁<br>(OUCHI Takehito)<br>(30803564)   | 慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教<br><br>(32612)   |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|