

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09559

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞シートを用いた神経束移植における新規治療法の確立

研究課題名(英文) Hybrid Autologous Nerve Fabrication by Combining Mesenchymal Stem Cell Sheets and Tissue Transplantation

研究代表者

田中 康仁 (Tanaka, Yasuhito)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30316070

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)：人工神経は、近年自家神経に代わる新たなマテリアルとして開発されているが、iPS細胞や各種成長因子を添加させても自家神経移植に及ばない。自家神経移植についても再生可能な距離は限界があり、長い欠損部やレシピエント側の神経が太い場合には移植片内部に供給される血流を確保できない。臨床では、重要な機能を担う主幹神経を再建する場合には、細い自家神経を3～5本ほど束ねて移植する『神経束移植(cable graft法)』が有用とされるが、移植神経の中央部が壊死に陥る可能性が増加する。移植自家神経に良好な血管新生を促すために、再生医療技術の応用が有効である可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経が損傷された場合に、最も再生が期待できるマテリアルは自家神経であるが、再生可能な距離は数cmと限界があり、長い欠損部やレシピエント側の神経が太い場合には移植片内部に供給される血流を確保できない。最も再生能に優れた神経移植は、自家神経に栄養血管を付加させた『血管柄付き神経移植』である。しかし、遊離血管柄付き神経移植術は極めて高度な技術が必要であり、一般的には臨床応用が進んでいないのが現状である。再生医療技術で作成した細胞シートを自家神経と組み合わせることで、太い神経においても神経再生の新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nerve regeneration induction tubes have been developed in recent years as new materials to replace autologous nerves, but even with the addition of iPS cells and various growth factors, they are still not as good as autologous nerve grafts. The distance that can be regenerated by an autologous nerve graft is limited to a few cm. In clinical practice, autologous nerves that can be harvested are relatively thin, and the "cable graft method," in which three to five thin autologous nerves are grafted together, is considered useful for reconstructing the main nerve, which performs an important function. However, the possibility of central necrosis of the grafted nerve increases as the number of nerve reconstructions increases. In order to promote good angiogenesis in the grafted autologous nerve, regenerative medicine technology may be used to add blood flow to the autologous nerve graft to improve axonal regeneration.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞シート 末梢神経 神経再生 血管柄付き神経 自家神経移植

## 1. 研究開始当初の背景

神経再生誘導管(以下人工神経)や同種神経は、近年自家神経に代わる新たなマテリアルとして開発され、ひろく臨床応用されている。しかし、軸索再生には、移植片におけるシュワン細胞の分化と増殖が必要とされることから、これらのマテリアルは単独では自家神経と比較して軸索再生能が劣る。これらを補うために、iPS細胞から神経前駆細胞に分化誘導させ、人工神経に搭載する試みや、成長因子である維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor; FGF)を付加させる試みなどが行われているが、いずれの方法も自家神経の軸索再生能を超えることができていないのが現状である(上村ほか、Peripheral Nerve, 2015, 右図)。

自家神経はシュワン細胞を含んでいるが、欠損部の長さやレシピエントの太さが増大するにつれてその軸索再生能は低下する。移植後の自家神経は、移植床から供給される『血流』にその生着を依存しており、移植床が血行良好である場合、移植後約3日目から血行が再開する(Prpa B, et al. JHS Am. 2002.)。移植片内のシュワン細胞が血行のない状態で生存できるのは約7日間程度であるとされ(Penkert G, et al. J Reconstr Microsurg. 1988.)。血行再開の遅延はシュワン細胞の生着率低下と軸索再生の障害につながる。良好な軸索再生を促すためには、シュワン細胞の生存率の改善、すなわち移植する神経片内部への『血管新生』が非常に重要な要素となる。

神経移植片に対する『血流の問題』を解決するために、自家神経に栄養血管を付加させたまま移植する『遊離血管柄付き神経移植術』が開発され、優れた軸索再生能が示されてきた(Koshima I, et al. Ann Plast Surg. 1985., Zhu Y, et al. Plast Reconstr Surg. 2015.)。『血管柄付き神経』移植では、シュワン細胞の生存率はほぼ100%とされており、非常に有望なドナー神経である。しかし、末梢神経に付随する血管は非常に細く、その血管吻合は手技的にかなり高度な技術を要するため、『遊離血管柄付き神経移植術』は一般的な手術手技となっておらず、これに匹敵する新しい治療法が望まれている。

臨床では、採取可能な自家神経は比較的細く、重要な機能を担う主幹神経を再建する場合には、細い自家神経を3~5本ほど束ねて移植する『神経束移植(cable graft法)』が必要である。血流の豊富な組織と組み合わせることで、再生軸索の径が増大し、ミエリン髄鞘の厚さが改善したとの報告がある(O'Sullivan KL, et al. Ann Plast Surg. 1998)ものの、単独で『血管柄付き筋膜脂肪弁』を自家神経周囲に組み合わせる方法では、移植片内部の血流再開に疑問が残る。移植片内部でどのように血管新生が促され、シュワン細胞の生存率や、脱分化、増殖がどのように起きたかの詳細な報告はない。主幹神経再建のための『神経束移植(cable graft)』においては、その本数が増加するにつれて、移植神経の中央部が壊死に陥る(central necrosis)可能性が増加する。移植自家神経に良好な血管新生を促すために、さらなる工夫が必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

脂肪由来間葉系幹細胞(Adipose-derived stem cells; ASCs)を自家神経に移植し、自家神経内のシュワン細胞の生存率を改善させた強化型自家神経の試みが報告されている(Tomita K, et al. Microsurgery. 2015.)。彼らの研究によって、ASCはパラクリン作用により、シュワン細胞の保護効果を有し、術後機能回復の加速効果が認められたとされている。しかし、彼らを用いた移植神経は移植片の長さが10mmと短く、単数での移植であり、複数で長い移植片における間葉系幹細胞の効果は、さらなる検討が必要であると考えられる。

当教室では、骨髄間葉系細胞(Bone Marrow Stem/Stromal Cells; BMSCs)を採取培養し、シート状に採取する『BMSCシート』の再生医療分野における有用性を報告してきた(Akahane M, et al. JTERM. 2008.)。『BMSCシート』は、細胞単独の移植に比べて、細胞外基質、接着因子を有し生着率において優れている。また『血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)』など様々な成長因子を有し、虚血皮弁モデルにおける『血管新生』促進効果(Kira T, Plast Reconstr Surg. 2015)や、脊髄損傷モデルにおける、『軸索再生』促進効果を示した(Okuda A, J Neurosurg Spine, 2017)。

神経はその発生や再生において他の組織以上に血管と密接な関係を持ち、神経再生には血管ニッチと呼ばれる『血管内皮細胞』との相互作用が必要である(Tavazoie M, et al. Cell Stem Cell. 2008.)。ヒト血液中のCD34陽性細胞分画中には血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell; EPC)が存在し、血管内皮細胞への分化と、神経再生における有効性が証明されている(Asahara T, et al. Science. 1997.)。我々は、『BMSCシート』に『血管内皮細胞』に分化可能な間葉系細胞が含まれることを証明しており、血管新生のみならず軸索再生においても有効であると考えられる。

本研究では、自家神経の移植片に旺盛な血流を付加させるために、再生医療の技術を用いて作成した『BMSCシート』を用いる。すでに自家神経移植に『血管柄付き筋膜脂肪組織』を単独で組み合わせる試みや、間葉系幹細胞を単独で組み合わせる研究は行われている。しかし、『BMSCシート』は、細胞単独の移植と比べて生着率が高く、『血管新生能』と『神経再生能』を有する理想的なマテリアルであると考えられる。『ハイブリッド型神経束移植(tissue engineering nerve cable graft)』を作成するという、これまでに報告のない高い独自性を有する。我々の方

法が、シュワン細胞の生存率を改善し、移植後の有効な軸索再生を促すことが可能であるかの検証を研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

1. 『BMSC シート』の作製 7 週齢 Fischer344 ラットの両側大腿骨から骨髄間葉系細胞を採取し T75 フラスコを用いて初期培養を行う。細胞培養は、MEM に 15%牛胎血清 (FBS) と抗生剤を加えたものを標準培地として使用する。2 週間後に、トリプシンを用いて細胞を培養皿から遊離させ、これを  $1 \times 10^4$  cell/cm<sup>2</sup> の細胞密度で 6cm 径の培養皿に播種する。アスコルビン酸 (AscP; 82 µg/ml) 添加標準培地で二次培養を行い、2 週間後にスクレパーを用いて『BMSC シート』を採取する。

2. Fischer344 ラットの右坐骨神経に約 15mm の欠損モデルを作成し以下の方法で再建。

同系ラットの腓腹神経 (20mm) を 3 本採取し神経束移植 (Cable graft 群; CG 群)

で周囲を『BMSC シート』で被覆 (Hybrid cable graft 群; HCG 群)

坐骨神経の 20mm の欠損を、再建せずにそのまま放置 (Negative control 群; NC 群)

皮膚切開のみを施し、神経に操作を加えない (Positive control 群; PC 群)

3. 1 週後坐骨神経を採取し、TUNEL 染色により死細胞の評価、S-100 抗体、NF 抗体を使用して免疫染色を行う。採取した神経の中央部での断面スライス及び長軸の標本を作成し、神経再生を評価した。

### 4. 研究成果

採取した神経の中央部での断面スライスで標本を作成した。死細胞数は CG 群 > HCG 群の順であった。S-100 抗体によりシュワン細胞を染色すると、CG 群 < HCG 群の順であった。NF 抗体は軸索に特異的に染色が困難であったが、HCG 群は中央切離部で軸索の連続性を確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	増田 佳亮  (Masuda Keisuke)  (60790376)	奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員    (24601)	
研究分担者	清水 隆昌  (Shimizu Takamasa)  (70464667)	奈良県立医科大学・医学部・学内講師    (24601)	
研究分担者	奥田 哲教  (Okuda Akinori)  (80646167)	奈良県立医科大学・医学部・助教    (24601)	

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