

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18414

研究課題名(和文) 羊膜マイクログラフト混成型人工神経による末梢神経再生

研究課題名(英文) Peripheral nerve regeneration using amniotic membrane micrograft hybrid artificial nerve conduit

研究代表者

岩尾 敦彦 (Iwao, Atsuhiko)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：90816638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット坐骨神経8mm欠損モデルを用いて、新鮮ヒト羊膜(HAM)ラッピングがPGA-cの末梢神経再生能力を向上させるか検討した。ラットを(1)PGA-c単独群、(2)PGA-c/HAM群、(3)Sham群の3群、各群5匹に分けて比較した。観察期間は12週間とした。PGA-c/HAM群はPGA-c単独群と比較して、筋電図における潜時と複合筋活動電位、再生神経の電子顕微鏡による評価における有髄線維の周径とg-ratio、前脛骨筋横断面積において統計学的に優れた改善を認めた。新鮮HAMラッピングとPGA-cを組み合わせた手法は、PGA-cを単独で用いるよりも有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経再生の足場となる第2世代の人工神経に、様々な細胞や成長因子を付加した第3世代の人工神経の開発が現在進められている。我々は市販されているPGAコラーゲンチューブに、間葉系幹細胞や成長因子が豊富に含まれる新鮮ヒト羊膜を外側から巻き付けることで末梢神経再生が促進されることを、ラット坐骨神経欠損モデルで確認した。羊膜はすでに、眼科領域では再発性翼状片や癒痕性角結膜炎の治療に、形成外科領域では難治性潰瘍の治療に用いられている。我々が考案した手法はすでに臨床で使用されているものを組み合わせることに大きな特徴があり、実臨床における神経欠損の新たな治療法となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of a combined application of fresh human amniotic membrane (HAM) wrapping and a PGA-c in a rat sciatic nerve 8-mm defect model. The rats were divided into three groups: (1) the PGA-c group (n = 5); (2) the PGA-c/HAM group (n = 5); and (3) the Sham group (n = 5). Walking-Track recovery, electromyographic recovery, and histological recovery of the regenerated nerve and the tibialis anterior muscle were evaluated at 12 weeks postoperatively. Compared to the PGA-c group, the PGA-c/HAM group showed significantly better recovery in terminal latency ( $3.4 \pm 0.31$  ms vs.  $6.6 \pm 0.72$  ms,  $P < 0.001$ ), compound muscle action potential ( $0.19 \pm 0.025$  mV vs.  $0.072 \pm 0.027$  mV,  $P < 0.01$ ), myelinated axon perimeter ( $15 \pm 1.3$   $\mu$ m vs.  $8.7 \pm 0.63$   $\mu$ m,  $P < 0.01$ ), g-ratio ( $0.69 \pm 0.0089$  vs.  $0.78 \pm 0.014$ ,  $P < 0.001$ ), and tibialis anterior muscle fiber area ( $796 \pm 55$   $\mu$ m<sup>2</sup> vs.  $565 \pm 59$   $\mu$ m<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ). This combined application may be more useful than PGA-c alone.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：末梢神経 羊膜 PGAコラーゲンチューブ

## 1. 研究開始当初の背景

臨床の現場では、外傷や、悪性腫瘍の手術によって末梢神経に欠損が生じることがある。神経欠損部の再建には、自家神経移植が第一選択となる。しかし、神経採取部の知覚低下やしびれ、切断した神経腫による痛みなどの症状を引き起こす可能性がある。人工神経はドナー部位の犠牲がないという利点があるが、治療成績は自家神経移植に比べ劣ると言わざるを得ない。これは、組織再生には一般的に細胞、成長因子、足場が必要であるのに対し、既存の人工神経は神経再生の足場としてしか機能しないためであると考えられる。そこで、人工神経に様々な種類の幹細胞や成長因子を付加し、神経再生能を高める試みが行われてきた。

## 2. 研究の目的

近年、末梢神経再生を促進させるために、ヒト Amniotic Membrane (以下 HAM) を損傷された神経に巻き付ける手法が、ラット坐骨神経損傷モデルで報告されている。HAM は胎盤の最内層で、羊膜腔の中で胎児を包んでおり、羊膜と絨毛の 2 層から構成される。HAM には、羊膜上皮細胞や羊膜間葉系幹細胞が含まれている。さらに、bFGF や TGF などの成長因子が豊富に含まれている。これまでに、ラット坐骨神経癒着モデルにおいて、fresh HAM ラッピングが軸索再生を阻害する癒着形成を抑制し、末梢神経再生を促進することが報告されている。末梢神経欠損の治療においても、人工神経に、HAM に含まれる細胞や成長因子を添加することで、神経再生が促進される可能性がある。本研究では、ラット坐骨神経欠損モデルにおいて、市販の人工神経である PGA-c (Nerbridge®、東洋紡、日本) に fresh HAM ラッピングを行うことで末梢神経再生が促進されるか検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### < HAM の調整 >

長崎大学病院羊膜バンクから提供を受けた fresh HAM を生理食塩水で洗浄した。HAM を 14mm x 7mm の断片に切断し、PBS で 30 分間洗浄することを 3 回繰り返した。この HAM を、出産後 24 時間以内にラット坐骨神経欠損モデルへ移植した。

### < 手術の手順 >

SD ラットをランダムに 3 群に分けた。PGA-c 群 (n = 5): 坐骨神経を 8mm 切除し 10mm の PGA-c 移植した群。PGA-c/HAM 群 (n = 5): 坐骨神経を 8mm 切除し 10mm の PGA-c を移植し、HAM (14 mm x 7 mm) を巻き付けた群。Sham 群 (n = 5); 坐骨神経の剥離のみ行った群。遠位および近位の坐骨神経断端を PGA-c の両側に 1mm ずつ引き込み、10-0 ナイロンを用いて 2 箇所、水平マツレス縫合した。PGA-c/HAM 群では、絨毛側が PGA-c チューブに接するように HAM を巻き付け、4 箇所 HAM を縫合した。すべての処置は同じ外科医が行った。

### < 歩行解析 >

術後 12 週目にラットの後肢のフットプリントを採取し、以下の公式により SFI を算出した:  $SFI = -38.1 \times (EPL - NPL) / NPL + 109.5 \times (ETS - NTS) / NTS + 13.3 \times (EITS - NITS) / NITS - 8.8$

### < 筋電図による評価 >

術後 12 週目に複合筋活動電位 (CMAP) と終末潜時 (TL) 測定した。

### < 再生神経の組織学的評価 >

術後 12 週目に再生神経を採取した。標本は中央で 2 分割した。近位側の標本は、NF68 で免疫組織染色を行い、陽性細胞数を計測した。陽性細胞は軸索を反映する。遠位側の標本は、電子顕微鏡を用いて、有髄線維の周径と g-ratio を計測した。

### < 前脛骨筋の組織学的評価 >

術後 12 週に前脛骨筋を採取し、Masson's trichrome 染色を行ったうえで、横断面積を計測した。

### < 統計的評価 >

実験データは、平均値 ± 標準誤差で表し、一元配置分散分析 (ANOVA) を用いて分析した。グループ間の差を検出するために、データは Tukey post hoc test を用いて分析した。0.05 未満の P 値は有意と定義した。統計解析は、EZR を用いた。

#### 4. 研究成果

##### <歩行機能の回復>

SFI は、Sham 群と比較して、PGA-c 群、PGA-c/HAM 群ともに低値であった。PGA-c 群と PGA-c/HAM 群の間に有意差は認められなかった ( $-78 \pm 6.7$  vs.  $-69 \pm 7.6$ ,  $P = 0.59$ )

##### <筋電図所見の回復>

PGA-c/HAM 群の TL は、PGA-c 群より有意に短かったが ( $3.4 \pm 0.31$  ms vs  $6.6 \pm 0.72$  ms,  $P < 0.001$ ) Sham 群より長かった ( $1.4 \pm 0.058$  ms)。同じく、PGA-c/HAM 群の CMAP は PGA-c 群より有意に高かったが ( $0.19 \pm 0.025$  mV vs.  $0.072 \pm 0.027$  mV,  $P < 0.01$ ) Sham 群には及ばなかった ( $0.32 \pm 0.013$  mV)。

##### <再生神経の組織学的回復>

PGA-c 群と PGA-c/HAM 群の間で軸索数に有意差はなかった ( $10216 \pm 975$  vs.  $12846 \pm 1670$ ,  $P = 0.27$ )。電子顕微鏡による評価では、PGA-c/HAM 群の有髄軸索周囲は PGA-c 群に比べ有意に長かったが ( $15 \pm 1.3$   $\mu$ m vs.  $9.8 \pm 0.39$   $\mu$ m,  $P < 0.01$ ) Sham 群 ( $33 \pm 0.94$   $\mu$ m) に比べて短かった。PGA-c/HAM 群の g-ratio は、PGA-c 群より有意に低かったが ( $0.69 \pm 0.0089$  vs.  $0.78 \pm 0.014$ ,  $P < 0.001$ ) Sham 群 ( $0.058 \pm 0.0085$ ) より高い値であった。PGA-c/HAM 群の有髄軸索周囲の分布は、PGA-c 群に比べ長い方にシフトしていた。

##### <前脛骨筋の組織学的回復>

PGA-c/HAM 群の筋繊維面積は、PGA-c 群より有意に広がったが ( $796 \pm 55$   $\mu$ m<sup>2</sup> vs.  $565 \pm 59$   $\mu$ m<sup>2</sup>,  $P < 0.05$ ) Sham 群よりは小さかった ( $1651 \pm 58$   $\mu$ m<sup>2</sup>)。

本研究では、ラット坐骨神経欠損モデルを用いて、PGA-c への fresh HAM ラッピングの効果を検証した。結果を総括すると、PGA-c 群と比較して、PGA-c/HAM 群では、SFI 値と NF68 陽性細胞数に有意差はなかったものの、TL や CMAP、有髄線維の周径、g-ratio、前脛骨筋横断面積に関して有意な回復が認められた。

ラット坐骨神経欠損モデルに対する羊膜または羊水塗布の有効性を報告した研究がいくつかある。凍結ヒト羊膜をチューブ状に加工したものをを用いた実験では、ラット坐骨神経 10mm 欠損モデルにおいて、シリコンチューブよりも優れた軸索再生効果を示した。しかし、羊膜チューブの製造工程は複雑で手間がかかる。また、羊膜チューブは柔軟で剛性がないため、管状を維持することが困難である。そこで、形状を維持させるために、羊膜筋複合グラフト (AMCG) conduit が考案された。AMCG conduit は、乾燥羊膜チューブの内腔に骨格筋を挿入して作成され、ラット 15mm 正中神経欠損モデルで良好な末梢神経回復を示した。しかし、把持力、有髄軸索径、g 比の回復は自家移植で観察された回復には至らなかった。また、AMCG conduit は、ドナーとなる筋肉の犠牲がある。また、これらの研究は、市販の人工神経との比較は行われていない。そこで、神経欠損部に HAM を適用するために、既存の人工神経導管に外側から HAM を巻き付ける方法を新たに考案した。そして、HAM ラッピングが人工神経の能力を向上させるかどうかを検証した。本研究では、fresh HAM ラッピングが有髄軸索の周囲と g 比の有意な回復に寄与した。これらの結果から、新鮮な HAM ラッピングは、末梢神経再生時の軸索の成熟と有髄化に寄与することが示唆された。また、TL 値、CMAP 値、前脛骨筋繊維面積に代表される神経や筋肉の回復が有意に良好であったのは、この神経の組織学的回復が寄与していると考えられた。しかし、PGA-c/HAM 群のこれらの回復はいずれも Sham 群に匹敵するものではなく、SFI に関しても PGA-c 群と比較して PGA-c/HAM 群では有意に優れた回復は観察されなかった。術後 12 週ではまだ神経や筋肉は回復の途中である可能性がある。

新鮮な HAM は保存 HAM に比べ、生存率の高い幹細胞を多く含み、血管新生成長因子も豊富であることから、末梢神経欠損治療における HAM ラッピングの適用には、新鮮な HAM が最適条件と考えられる。ラット 10mm 坐骨神経欠損モデルにおいて、凍結保存した HAM を巻いて自家神経移植の効果を評価した実験では、コントロールに比べて神経癒着が有意に少なく、癒着形成も少なかったが、機能・形態的回復は改善しなかった。HAM の細胞外マトリックス (ECM) は TGF- $\beta$  シグナルを抑制し、末梢神経再生を阻害する癒着形成を抑制したが、神経欠損モデルのような難治性モデルでは ECM の効果だけでは神経再生に不十分であった可能性が考えられた。末梢神経再生のごく初期には、遊走したマクロファージから分泌される VEGF が血管新生を促し、神経の隙間を埋める。そして、シュワン細胞は再生した血管を足がかりに、軸索を再生する。乾燥 HAM にも VEGF が豊富に含まれていることが証明されている。さらに、fresh HAM には、ヒト羊膜間葉系幹細胞 (hAMSC) が豊富に含まれている。hAMSCs を脳内投与すると、少なくとも 27 日間生存し、

ラット脳内出血モデルにおいて VEGF および BDNF の発現を有意に増加させることが報告されている。結果として、神経新生と血管新生は促進された。また、BDNF は軸索の髄鞘形成に重要な役割を果たすことが報告されている。したがって fresh HAM と人工神経の併用法は、神経欠損の治療に有効であるといえる。幹細胞や成長因子を人工神経に添加する方法と比較して、この方法の利点は、簡便で低コストであることである。幹細胞の移植は培養に時間と労力を要する。一方、成長因子の応用は、それを放出するための特別な人工神経が必要となる。したがって、既存の人工神経よりも高価になることが予想される。本方法で使用する HAM と PGA-c は、いずれも既存のものである。また、手法は非常に簡便である。しかしながら、この研究には limitation がある。本法では、fresh HAM を保存する有効な方法が現時点ではないため、HAM は採取後すぐに神経欠損部に移植する必要がある。したがって、末梢神経手術のタイミングと帝王切開のタイミングと合わせなければならない。この併用方法は、外傷例などの緊急手術では困難である。新鮮な HAM の細胞生存率や成長因子の量を最大化する保存方法について、さらなる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Atsuhiko Iwao, Hiroto Saijo, Takafumi Nakayama, Akihito Higashi, Kazuya Kashiya, Norisato Mitsutake, Katsumi Tanaka	4. 巻 58
2. 論文標題 Fresh human amniotic membrane wrapping promotes peripheral nerve regeneration in PGA-collagen tubes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery	6. 最初と最後の頁 13-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2340/jphs.v58.6496	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩尾敦彦、西條広人、東晃史、森内由季、芦塚翔子、櫻山和、田中克己
2. 発表標題 Fresh Human Amniotic Membraneは神経再生誘導チューブの機能を向上させる
3. 学会等名 第65回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩尾敦彦、西條広人、東晃史、森内由季、芦塚翔子、櫻山和、田中克己
2. 発表標題 Fresh Human Amniotic Membraneラッピングによる末梢神経の再生促進
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------