

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591904

研究課題名（和文）iPS細胞を用いたハイブリッド型人工神経による末梢神経欠損部の架橋実験

研究課題名（英文）Experimental study of reconstruction of peripheral nerve defect using tissue-engineered bioabsorbable nerve conduit with iPS cell induced neurosphere cell

研究代表者

高松 聖仁 (TAKAMATSU KIYOHITO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30295688

研究成果の概要（和文）：これまでわれわれは、Schwann細胞と生体吸収性ポリマーチューブを組み合わせたハイブリッド型人工神経を作成し報告してきた。今回の研究において、1）iPS細胞から分化誘導させた神経系細胞が動揺に人工神経上で三次元培養可能であること、2）iPS細胞によるハイブリッド型人工神経をマウス坐骨神経欠損部に移植したところ、人工神経単独と比較し知覚機能、運動機能および組織学的に優位な神経再生が得られ、また自家神経移植と同等に末梢神経再生を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：【Background】 In spite of extensive research of induced pluripotent stem (iPS) cells, the therapeutic potential of iPS cells for peripheral nerve injury is largely unknown. This is the study to prove the feasibility of the combination of iPS cell-derived neurospheres and bioabsorbable nerve conduit.

【Purpose】

<Aim1>The first purpose of this study was to examine the adhesion of the iPS cell-induced neurospheres to the bioabsorbable nerve conduits and to examine their cellular characteristics.

<Aim2> The second purpose of this study was to test tissue-engineered bioabsorbable nerve conduits coated with a three-dimensional (3D) culture of iPS cell-derived neurospheres in peripheral nerve repair in vivo.

【Methods】

<Aim1>The nerve conduit has 2 layers. The outer layer is composed of PLLA mesh and the inner layer is composed of PLLA and PCL porous sponge. We generated primary and secondary neurospheres from iPS cells by a published protocol[Editor1]. The primary and secondary neurospheres were suspended in each conduit. After suspension, the conduits were placed in a cell incubator for 7 or 14 days. After the conduits were seeded with iPs cells, they were subjected to immunohistological analysis by using antibodies specific to the glial marker (GFAP), Schwann cell marker (S-100) and neuronal marker.

<Aim2> The secondary neurospheres derived from mouse iPS cells were suspended in each conduit (4.0×10^6 cells per conduit) and cultured in 3D-culture for 14 days. We then implanted them in the mouse sciatic nerve gap (5 mm) (iPS group; n=10). The nerve conduit

alone was implanted in the control group (n=10). Motor and sensory function recovery was assessed. At 4,8,12 weeks, nerve regeneration in the nerve conduit was evaluated by histological analysis.

【Results】

<Aim1>All the primary and secondary neurospheres that had differentiated for 7 or 14 days were found to have adhered to the inner surface of the conduits and migrated into the inner porous sponge. All neurospheres were positive for S-100 and GFAP but were negative for neurofilament protein. The cell adhesion and the immunostaining characteristics between the 7- and 14-day-differentiated neurospheres were not different.

<Aim2>

Motor and sensory function recovery was significantly faster in the iPS group at weeks 4, 8, and 12. At 12 weeks, all the nerve conduits remained structurally stable without any collapse. Histological analysis indicated axonal regeneration in the nerve conduits of both groups. However, the iPS group showed more vigorous axonal regeneration.

【Conclusion】 The bioabsorbable nerve conduits created by 3D culture of iPS cell-derived neurospheres promoted regeneration of peripheral nerves and functional recovery in vivo. The combination of iPS cell technology and bioabsorbable nerve conduits could represent a future tool for the treatment of peripheral nerve defects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 生物系 医歯薬学分野

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学 整形外科学

キーワード：

- | | | | |
|----------|---------|---------|------------|
| (1)再生医療 | (2)末梢神経 | (3)再生 | (4)生体吸収性材料 |
| (5)iPS細胞 | (6)人工神経 | (7)組織工学 | (8)マウス |

1. 研究開始当初の背景

従来、我々整形外科医は神経欠損部の補填に自家神経移植以外の手段を持ち得なかった。しかし、自家神経移植は神経欠損補填のために正常な他部位の神経を損傷するという決定的な問題を持っていた。そして、その問題の解決方法として、これまで種々の神経欠損部補填用の材料が試みられてきた。古くは動脈、静脈、筋膜などから始まり、1970年代にシリコンチューブ、ついで1980年代には生体吸収性材料を用いた人工神経の開発が試みられた。

その結果、近年になり生体吸収性材料を用いた人工神経の開発が進み、一部の人工神経は市販化されその臨床成績が報告されている。

しかし、これまで海外で市販され臨床応用された人工神経は柔軟性に乏しく、いわば硬い筒状のものが多く、移植後にリハビリ等で人工神経に屈曲・伸展の力がかかる関節近傍への移植は困難なものが多かった。また、それらは主成分であるポリグリコール酸 (PGA) やポリカプロラクトン (PCL) とポリ乳酸 (PLA) の共重合体の生体内での吸収速度の早さから、その強度の持続性には疑問があった。

その結果その人工神経の口径・長さにはおのずと制限があり、現在も小口径の末梢神経の短い欠損用のものしか市販されていない。2008年のアメリカ手の外科学会においても、市販されている人工神経を用いて動物実験を行ったところ、一部の人工神経は内腔が閉塞するという報告がされていた。

そのため、末梢神経の小欠損のみならず種々の長さや太さの神経損傷に対応可能な人工神経として、生体吸収性材料を用いた新たな人工神経を開発する必要があると考えた。そして、我々はこれまで種々の検討を加え、非常に柔軟性に富みなおかつ生体内でその強度を維持することが可能な新たな人工神経の開発に成功した。

我々は平成12年度から平成13年度にかけて、奨励研究 (A) の「tissue engineeringを用いた神経補填材料の作成に関する実験的研究」において、人工神経にシュワン細胞を組み合わせることによってシュワン細胞の三次元培養が可能であることを明らかにした。

すなわち我々の人工神経においては、内層の共重合体の孔径をシュワン細胞がその内部に入り込むことが可能なように設定しているため、シュワン細胞をこの人工神経と共に培養することによってシュワン細胞の三次元培養が可能となり、シュワン細胞が内腔表面のみならず内層のその内部にまで入り込んで培養されることが明らかとなった。これは、神経再生の場により多くのシュワン細胞を供給するには非常に有利であると考えられる。

ついで平成14年度から平成15年度にかけて若手研究 (A) の「tissue engineeringを用いた末梢神経損傷の修復に関する基礎的及び実験的研究」において、シュワン細胞を培養し付加した人工神経を末梢神経欠損部に移植する方法が、末梢神経の再生に非常に有効であることを明らかにした。

しかし、シュワン細胞の採取と培養は現実として問題をいくつか抱えていた。すなわち、損傷された神経の再生のために正常な他の神経を一部犠牲にしてシュワン細胞を採取しなければならないこと、正常神経からのシュワン細胞の分離が困難なこと、そして分離されたシュワン細胞の大量培養が困難なことである。

特にシュワン細胞が高分化した細胞であるため、これを培養して大量に増殖させることが最も難しく、我々も従来行っていた実験系では新生児ラットの後根神経節から採取した幼若なシュワン細胞を用いることによってシュワン細胞を増殖させていた。

しかし、山中伸弥 (京都大学・iPS細胞研究

センター長・研究協力者)らが開発報告した iPS細胞は、人間やマウスの皮膚から採取した細胞から作成されており、増殖能力が旺盛で大量培養できる上、神経幹細胞、シュワン細胞への分化も可能である。

そこで我々は iPS 細胞から誘導されたシュワン細胞を人工神経と組み合わせることで、正常な神経を犠牲にすることなくより良い末梢神経の再生を誘導することが可能になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

これまでの培養シュワン細胞と人工神経を組み合わせた国内外すべての報告では、それらを組み合わせることによってより良い神経の再生が認められたとしている。しかし、そのシュワン細胞はいずれも採取された神経や後根神経節から分離培養されたものであった。これまで iPS 細胞から誘導された神経系細胞が末梢神経の再生に有効であったという報告はなされていない。

そこで本研究では、iPS 細胞より誘導された神経系細胞と人工神経を組み合わせ、シュワン細胞のように人工神経上で三次元培養が可能なのかどうか、また培養された細胞が培養前と同様の細胞特性を維持できているのかをまず検討することが目的である。

ついで、そうして作成された iPS 細胞からの神経系細胞によるハイブリッド型人工神経をマウスの坐骨神経欠損部に移植し、人工神経単独移植と比較しより優位な神経再生が誘導されるのかどうか、また自家神経移植と同等の神経再生を誘導できるのか検討を加える。

3. 研究の方法

【方法】

<実験 1> iPS 細胞由来神経系細胞による三

次元培養ハイブリッド人工神経の作成

人工神経は内径 1mm・外径 2mm の二層構造(内層: PLA/PCL のスポンジ状共重合体、外層: PLA メッシュで補強)を持つポリマーチューブとした。iPS 細胞から神経系細胞への分化誘導を行い、primary neurosphere(PN)、secondary neurosphere(SN)を作成した。各 PN, SN の細胞をこの人工神経の内腔に播種し培養した。培養前および人工神経上で7日間培養後、採取した人工神経上の細胞の組織学的評価(HE染色および抗 S-100 抗体、抗 GFAP 抗体、抗 oligodendrocyte 抗体、抗 neurofilament 抗体による免疫染色)を行い、PN および SN 細胞の細胞特性に変化がないかどうか検討を加えた。

<実験 2> 三次元培養ハイブリッド人工神経によるマウス坐骨神経欠損部の架橋実験
マウスを用いた末梢神経欠損部再建モデルを用い実験を行った。具体的にはマウス(オス 12 週齢、80-100g)を用いて、坐骨神経に 5mm の神経欠損部を作成し内径 1mm 長さ 7mm の人工神経または自家神経で架橋した。(神経断端間隙は 5mm) 架橋後 4, 8, 12 週目に坐骨神経を採取し、人工神経または自家神経の中央・末梢端の横断切片について HE および LFB 染色を行った。

実験群としては、人工神経群(細胞付加なし)、ハイブリッド神経群(SN 細胞付加)、自家神経群の 3 群とした。

以上の群について、神経再生の評価を機能的及び組織学的に行う。組織学的には、神経の再生および血管の新生について、組織学的な評価項目は単位面積あたりの再生神経数、平均再生神経径、新生血管数、新生血管面積とした。

機能的評価には、ラットの坐骨神経もしくは脛骨神経損傷モデルの評価で用いられすでに確立されている方法である TFI(Tibial

Functional Index)を使用した。具体的にはマウスの坐骨神経に人工神経または自科神経を移植後、4, 8, 12週目にマウス歩行時のフットプリントを採取し、フットプリントの形状からTFIの計算式に従って指数を算出し機能の回復を評価した。

4. 研究成果

<実験1> iPS細胞由来神経系細胞による三次元培養ハイブリッド人工神経の作成

HE染色にてPN, SNともに人工神経の管腔内での細胞の生着が確認され、培養前後ともに抗S-100抗体陽性、抗GFAP抗体陽性、抗oligodendrocyte抗体陽性の細胞を管腔壁に認めた。その染色性は二つのneurosphereについて差違は認めなかった。すなわち、iPS細胞から分化誘導されたneurosphereは、人工神経上で3次元培養が可能であり、その細胞特性である多分化能は保持されたと考えられた。

<実験2> 三次元培養ハイブリッド人工神経によるマウス坐骨神経欠損部の架橋実験
人工神経群(細胞付加なし)に比べて自家神経群とハイブリッド神経群(SN細胞付加)では、移植後4, 8, 12週目のいずれにおいても機能的に統計的に優位な神経回復を認めた。また、組織学的評価においても人工神経群に比べて自家神経群とハイブリッド神経群では、移植後4, 8, 12週目において統計的に優位な神経再生・血管新生を認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① A tissue-engineered bioabsorbable nerve conduit created by three-dimensional culture of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres.

Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Ikada Y, Nakamura H.

Biomed Mater Eng. 2011 Jan 1;21(5):333-9.

② Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair.

Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, Okada M, Kazuki K, Ikada Y, Nakamura H.

Biochem Biophys Res Commun. 2012 Mar 2;419(1):130-5. Epub 2012 Feb 7.

[学会発表] (計4件)

平成22年度

① 上村卓也、高松聖仁

iPS細胞を用いたハイブリッド型人工神経の作成～人工神経上でのiPS細胞培養

第53回日本手外科学会

平成22年4月15日(新潟市)

② 高松聖仁

iPS細胞と生体吸収性材料の組み合わせに関する実験的研究 iPS誘導神経系細胞の生体吸収性人工神経による三次元培養

第25回日本整形外科学会基礎学術集会

平成22年10月15日(京都市)

平成23年度

① 上村卓也、高松聖仁

iPS分化誘導細胞と生体吸収性材料を用いた培養モデルの実験的研究 3Dmodelの作成とその細胞特性の変化について

日本再生医療学会

平成23年3月2日(東京)

第30回日本運動器移植・再生医療学会

② 上村卓也、高松聖仁

iPS細胞由来ニューロスフェアの3D培養により作成したハイブリッド型人工神経は、末梢神経再生を促進する マウスモデルでの末梢神経再生に関する実験的研究

第26回日本整形外科学会基礎学術集会

平成23年10月20日(前橋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高松聖仁(Takamatsu Kiyohito)

大阪市立大学・整形外科・講師

研究者番号: 30295688

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし