

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592163

研究課題名(和文) イヌでの骨髄間葉系幹細胞移植した血管柄含有チューブ内での神経再生

研究課題名(英文) Peripheral Nerve Regeneration across a Biodegradable Artificial Conduit with Vascularity Containing Autogenous Undifferentiated Bone Marrow Stromal Cells in a Canine Model

研究代表者

柿木 良介 (Ryosuke, Kakinoki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20314198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：血管含有チューブ内に骨髄間葉系幹細胞を移植して作成した神経管で、イヌの尺骨神経3cmの神経欠損を架橋した。神経管と3cmの自己神経移植内での神経再生を比較検討した。その結果神経管内での神経再生速度は、自己神経移植に劣るが、24週後には、神経管内での神経再生は、自己神経移植片内での神経再生80%以上まで回復した。またCM dye-Iで標識した骨髄間葉系幹細胞を移植したところ、再生神経内のCM dye-I陽性細胞の一部にS100、GFAPが陽性であった。以上よりチューブ内に移植された骨髄間葉系幹細胞の一部は、シュワン細胞様に分化し、末梢神経再生を促進させていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We created an ulnar vessel-containing tube (70% polylactic acid and 30% polycaprolactone), to which bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMCs) were implanted. The tube was transplanted to bridge a 3cm ulnar nerve defect in canines. Nerve regeneration through the tube was compared with that in a 3cm-long autogenous ulnar nerve segment. Although the rate of nerve regeneration in the tube was slower than that in the nerve segment, the histomorphological analysis of nerve regeneration in the tube was almost more than 80% of that in the autogenous nerve segment 24 weeks after surgery. When BMCs stained with CM dye-I were transplanted into the tube chamber, some CM-dye I-positive cells demonstrated S100 and GFAP markers in the nerve regenerated within the tube. These results indicated that some of the BMCs transplanted into the tube differentiated into Schwann cells, which might have facilitated nerve regeneration in the vessel-containing tubes with BMC transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：末梢神経再生 人工神経 骨髄間葉系幹細胞 血管含有チューブ

1. 研究開始当初の背景

交通事故等に伴うハイエネルギー損傷では、筋骨格、内蔵の損傷に加えて、神経組織欠損を伴う末梢神経損傷をたびたび合併する。高度末梢神経損傷は、ADLの低下を起し、事故後の患者のQOLに大きな影響を与える。神経欠損を伴う末梢神経の治療としては、生体内での重要性の低い知覚神経である腓腹神経、前腕皮神経、橈骨神経浅枝などで、神経欠損部を架橋する自己神経移植術が長年行なわれてきた。しかしこれらの知覚神経は、その直径が細く、太い神経や多数箇所での神経修復を行なうにはその供給神経量が少なすぎる。またいくら生体に重要でない知覚神経を採取するにしても、必ず採取後にはその神経支配部位に神経麻痺がおこる。また神経採取部にできた神経腫のため、CRPS(chronic regional pain syndrome)などの重大な後遺症を起す危険性を、自己神経移植術は含んでいる。

近年、免疫抑制剤の発達により、米国のMackinnonらは免疫抑制剤を用いた末梢神経同種移植を行なっている。しかし、免疫抑制剤の使用には日和見感染症や発ガン性などのリスクを伴い、生命予後に影響しない末梢神経損傷に、免疫抑制剤の生命に関わる副作用のリスクを伴ってまで治療するかどうか問題になってくる。

数種類の人工神経は、米国ではFDAの許可を得て、臨床の場ですでに使用されている。しかし人工神経を使って良好な神経再生を獲得するには、神経欠損距離が短いことや知覚の再建にのみ使用するなどの制約があり、まだまだ自己神経移植の成績を凌駕できるものではない。

我々も人工神経の研究を1980年頃より進めてきた。神経チューブが長くなるほど、そのチューブ内環境が疎血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モデルをラットで作成した。その結果、チューブ内への血管茎挿入は神経再生速度を増加させ(R. Kakinoki et al. Neurosci Res 1994)、神経再生距離を25mmまで延長させたが(R. Kakinoki 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がわかった。骨髄間葉系幹細胞は、その置かれた環境により、骨、軟骨、脂肪、神経系細胞に分化することが知られており、増殖も早く、培養も比較的簡単である。

血管含有チューブ内は血流に富み、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、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、神経再生を促進させるのではないかと仮説を立てて実験を続けた。骨髄間葉系幹細胞を移植した血管含有チューブ内では、線維芽細胞を移植した血管含有チューブや細胞移植していないチューブに比較して、有意に良好な神経再生を示し、20mmの神経欠損の架橋実験ではほぼ自家神経移植に匹敵する神経再生を示した。また、雄ルイスラットより採取した骨

髄間葉系幹細胞を、雌ルイスラットの坐骨神経に作成した血管含有チューブへ移植する実験では、移植細胞の約30%がオス由来のSry(sex-determining region of Y-chromosome)geneを保有していることが分かった。Sry特異的なin situ hybridizationでは、いくつかのGFAP陽性細胞はSryシグナルも陽性であることも分かった(T. Yamakawa et al. Cell transplant 2007)。以上より、血管含有チューブ内に移植した骨髄間葉系幹細胞の一部はシュワン細胞様に分化し、それらが神経再生を促進させた可能性が示唆された。

人体のなかに血管は多数あり、現在の微小血管縫合技術を使えば、チューブ内に挿入する血管茎の採取は簡単で、骨髄間葉系幹細胞移植血管含有チューブは人体内のあらゆる場所で作成可能である。今回は、より高等動物に近いとされるイヌを用いて、骨髄間葉系幹細胞移植血管含有チューブ内での神経再生と自己神経移植片内での神経再生を比較したいと考えた。

2. 研究の目的

ラットは、高等動物に比較して神経再生が活発なことが知られている。そのためラットでのデータがそのまま人体に適用できるとは考えない。今回、犬の前肢の尺骨神経で、尺骨動静脈含有させたチューブ内に骨髄間葉系幹細胞を移植し、3cmの尺骨神経欠損を架橋するモデルを作成する。対側前肢尺骨神経は3cmの神経を切断し、遠位と近位を反対にして、縫合する自家神経移植モデルを作成する。手術後3ヶ月、6ヶ月での、両前肢尺骨神経での神経再生を電気生理的、組織形態学的に測定し、骨髄間葉系幹細胞を移植した血管含有チューブ内では、自家神経移植片内に比較して、どの程度の神経再生がおこるかを明らかにする事が、この研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 実験の対象

7頭のビーグル犬(体重約10Kg)を用いた。

(2) 骨髄間葉系幹細胞(BMC)の分離、培養、準備

Aziziらの方法に従って、BMCの分離培養をする(Pro. Natl. Acad. Sci. USA 1998)。要約すると、まず手術1ヶ月前にビーグル犬をケタミン、ゼイラジンの筋肉内注射にて麻酔導入し、気管内挿管し、NGO全身麻酔下で両腸骨より骨髄液を採取する。遠心密度勾配法にて血球成分を除去し、プラスチック培養皿にて分離培養する。3日ごとに培地を交換して1週間ごとに継代し、2週間後培養皿に付着した細胞をトリプシンにて剥離し、それをBMCとして3回洗浄後1ml注射器に吸引し(3X10⁷個)神経チューブ内に移植できるように準備しておく。

第2継代されたBMCは、CD90, CD29, CD11, CD34の各表面抗原をflow cytometryで確認した。また、一部の動物より採取したBMCには、in vitroでCM-dye Iでラベルした。

(3) 神経鞘の作成

京都大学再生医科学研究所にて、PLA75%, PCPL35%よりなる神経管(内径3mm、外径4mm、長さ36mm)を作成した。各神経管には、縦方向のスリットを作成し、神経管内への血管茎の挿入に備えた。

(4) BMC含有神経管の作成(図1)

骨髄液採取後約1ヶ月後、(3)と同様に全身麻酔し、右前下肢中央部で尺骨神経及びそれに伴走する尺骨動静脈を剥離した。(3)で作成した神経管の縦スリットより、尺骨動静脈を神経管内に挿入した。25mmの尺骨神経を切除した後、神経断端距離が30mmとなる様に、尺骨動静脈を含有した神経管の両端に尺骨神経の両断端を9-0ナイロン糸で縫合した。スリットの閉鎖と神経管内の再生神経の採取を容易にするため、4-0ナイロン糸を約5mmの間隔で神経管全周に廻し、管腔直径を細くしない程度の強さで縫合した。(1)で作成したBMCの入った注射器の注射針をスリットより挿入し、BMCを神経管内の血管茎周囲に移植する。さらに、神経管のスリットは静脈血より採取した血清にてシールした。

(5) 自家神経移植の作成

左前下肢中央部で尺骨神経を剥離し、30mmの神経を切離し、神経の中樞と末梢を入れ替えて9-0ナイロン糸にて神経縫合し、これを自家神経移植とした。

(6) 再生神経の評価

電気生理学的検査

神経移植手術後、12週と24週の時点で、再度全身麻酔下に電気生理検査を行なった。右前肢では神経管の中樞3cmで、また左前肢では30mmの尺骨神経片の近位縫合部の3cm中樞にて、双極電極で直接尺骨神経を電気刺激した。各前肢の第5趾の中樞にある小指球筋上に記録電極を設置し、最大上刺激にて近位神経を刺激した場合の小指球筋でのM波の導出(M1)を試みた。このときM波の振幅を計測した。M波が導出された場合、神経管の遠位30mm、神経片の遠位30mmにて再度最大上刺激で尺骨神経を刺激し、M波を導出し(M2)、M1とM2潜時より神経伝導速度を計測した。

組織形態学的検査

電気生理検査後、動物を致死量のペントバルビタールの心腔内投与で安楽死させ、右前肢では、神経管及びその内部に形成された再生神経及びその2cm末梢までの尺骨神経を、また左前肢では、30mmの神経片とその遠位縫合部の2cm遠位

までの神経を採取した。採取した神経の遠位2cmの部分はグルタルアルデヒドとオスミウム酸で2重固定し、エポン包埋してトルイジンブルー染色を行なった。切片は光学顕微鏡で観察し、その形態計測を行なう。

電気生理学的検査、形態計測ともに神経管での値は、自家神経片での値の比率として表した。

免疫組織学的検索(再生神経内のBMC由来細胞の観察)

移植後8週間でCM-dye IでラベルしたBMCを移植したチューブ内での再生神経の中央部より神経管内に再生した神経を取り出し、2%のパラホルムアルデヒドと0.25%のグルタルアルデヒドで固定後、その中央部の凍結切片(厚さ20μm)を作成し、採取した切片をs-100, GFAPで免疫染色し、confocal顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的検索(表1)

術後12週で、1頭(dog 6)のチューブ側の小指球筋よりM波の導出ができなかったため、それ以降の評価より除外した。それ以外の動物では、術後12週、24週とも神経管側、自家神経移植側ともに小指球筋よりM波の導出が可能であった。術後12週での自家神経移植側に対するチューブ側の神経伝導速度とM波振幅比は、それぞれ0.28, 0.52であった。また24週では、それぞれ0.49, 0.81であった。Dog 3では、12週でのM波振幅比は0.77であったが、24週では0.41と低下していた。12週での電気生理学的検査時にチューブ内の再生神経が損傷されたのではないかと考えている。

(2) 組織形態学的検索(表2, 3)

術後24週での神経管遠位より1.5cm、および自家神経移植の遠位縫合部より1.5cmの横断面での平均有髄神経軸索数は、それぞれ7032, 7165で、両群間に有意差はなかった。また同部位での平均有髄神経軸索直径は、それぞれ1.73μmと2.09μmで両群間に有意差はなかった。

(3) 前脛骨筋の筋湿重量の検索(表4)

術後24週での小指球筋のwet muscle weightに関しては、自家神経移植側に対する神経管側の比率は、平均0.84で、7頭中2頭でその比率が1以上になり、小指球筋のwet muscle weightが自家神経移植側より神経管側で大きかった。

(4) 免疫組織学的検索(再生神経内のBMCの観察)

CM-dye IでラベルしたBMCを移植した神経管内での再生神経の中央部より移植後8週間で採取した切片をs-100, GFAPで免疫染色した。その結果、S-100, GFAP陽性細胞の一部にCM-dye Iも陽性であった。

(5) 結論

神経管移植では、術後 12 週で神経伝導速度は、自家神経移植の 1/4、M 波振幅は、1/2 であった。術後 24 週で、神経伝導速度は、自家神経移植の 50%、M 波振幅は、80%にまで回復していた。神経管側の小指球筋の筋湿重量も、術後 24 週で、自家神経移植の 85%まで回復していた。また移植した BMC 細胞の一部は、Schwann 細胞様に分化していることが証明された。BMC 細胞移植神経管内での神経再生は、自家神経内よりは遅いが、BMC 細胞の一部は、Schwann 細胞様に分化して、術後 24 週で神経管内の神経再生は、自家神経内の神経再生の 80%近くの回復を示した。

図 1 : BMC 移植血管含有神経管の作成



尺骨神経を 25mm 切除し、尺骨神経の断端の距離を 30mm にしてチューブの両端に縫合している。チューブの縦スリットより尺骨動静脈をチューブ内に挿入してある。

表 1 : 術後 12 週、24 週での小指球筋の M 波振幅比と神経伝導速度比

	12w		24w	
	CMAP	MNCV	CMAP	MNCV
1	0.63	0.62	0.52	0.94
2	0.12	0.93	0.37	1.12
3	0.77	0.81	0.36	0.78
4	0.19	0.75	0.68	0.84
5	0.13	0.36	0.52	0.51
6	0.00	0.00	0.57	0.90
7	0.14	0.14	0.38	0.58
Mean	0.28	0.52	0.49	0.81
SD	0.30	0.35	0.12	0.21

神経管移植側の小指球筋 M 波の振幅と神経伝導速度を、対側の自家神経移植側との比で表した。

表 2 : 術後 24 週での組織形態学

	24w			
	MAN	MAD	AD(μ)	
1	2250	3641	1.67 ± 0.91	
B	2	7517	8083	2.38 ± 1.53
M	3	6774	10752	1.55 ± 0.72
C	4	4972	5404	1.49 ± 0.56
+	5	7093	9212	1.85 ± 0.91
V	6	15617	15775	1.68 ± 0.83
C	7	5004	5560	1.5 ± 0.68
T	Mean	7032	1.73	
	SD	4188	0.31	
1	5015	7004	2.63 ± 1.46	
2	9925	11215	2.67 ± 1.74	
3	4850	7698	1.86 ± 0.72	
R	4	6800	11333	1.98 ± 0.81
A	5	8088	8514	1.86 ± 0.75
G	6	7239	8722	1.72 ± 0.67
	7	8236	11766	1.88 ± 0.77
	Mean	7165	2.09	
	SD	1814	0.39	

mean ± SD

術後 24 週での BMC 移植神経管(BMC+VCT)遠位 1.5cm および自家神経移植(RAG)遠位 1.5cm での有髄軸索数(MAN)、有髄軸索密度(MAD)と有髄軸索直径(AD)

表 3 : 術後 24 週での神経管遠位部の平均有髄軸索数(MAN)比と平均有髄軸索直径(Mean AD)比

	24w	
	MAN	Mean AD
1	0.45	0.63
2	0.76	0.89
3	1.40	0.83
4	0.73	0.75
5	0.88	0.99
6	2.16	0.98
7	0.61	0.80
Mean	1.00	0.84
SD	0.59	0.13

術後 24 週での自家神経移植に対する神経管遠位部の平均有髄軸索数比(MAN)と平均有髄軸索直径比(Mean AD)

表4：小指球筋の筋湿重量比

	24w
	WMW
1	1.14
2	0.75
3	1.13
4	0.76
5	0.67
6	0.69
7	0.71
Mean	0.84
SD	0.21

神経管移植側の自家神経移植側に対する小指球筋の筋湿重量比

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1件)

- (1) Kaizawa Y, Kakinoki R, Ikeguchi R, Ohta S, Noguchi T, Oda H and Matsuda S. Bridging a 30mm defect in the canine ulnar nerve using vessel-containing conduits with implantation of bone marrow stromal cells. Microsurgery 2014. Submitted for publication. 査読有
[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/\(ISSN\)1098-2752](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1098-2752)

〔学会発表〕(計1件)

- (1) 貝澤幸俊、柿木良介、池口良輔、太田壮一、野口貴司、織田浩樹、松田秀一. イヌでの未分化間葉系幹細胞移植された血管含有チューブでの末梢神経再生、第25回日本末梢神経学会学術集会、2014年8月29日、京都市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿木 良介 (KAKINOKI RYOSUKE)
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：20314198

(2)研究分担者

太田 壮一 (OTA SOICHI)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：70592484

(3)連携研究者

なし