

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462300

研究課題名(和文) iPS細胞移植による末梢神経再生の促進メカニズムと安全性(マウス/イヌモデル)

研究課題名(英文) Acceleration of peripheral nerve regeneration with safety by tissue-engineered nerve conduits combined with induced pluripotent stem cell transplantation

研究代表者

上村 卓也 (Uemura, Takuya)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師

研究者番号：10597321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまで我々はiPS細胞と人工神経を用いた末梢神経再生に関する基礎研究を行ってきた。本研究ではGFP遺伝子がノックインされたiPS細胞を用いてハイブリッド型人工神経を作製し、マウス坐骨神経欠損モデルを用いてiPS細胞由来神経前駆細胞の付加による末梢神経再生の促進メカニズムについて検証するとともに、その安全性についても検証した。人工神経に付加したiPS細胞由来の神経前駆細胞は、マウスに移植後も少なくとも14日目まではシュワン様細胞として人工神経内、特に末梢側の再生軸索周囲に残存しており、軸索再生に寄与していた。また移植後24週および48週において組織学的に奇形腫の形成は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We have developed tissue-engineered nerve conduits in combination with iPS cells transplantation for peripheral nerve regeneration. In the present study, we reconstructed peripheral nerve gaps in mice using the nerve conduits coated with iPS cell-derived neurospheres and evaluated the teratoma formation and localization of engrafted cells histologically. The iPS cell-derived Schwann-like cells survived in the nerve conduits, especially around the distal nerve stump, until at least 14 days after transplantation. This finding suggests that transplanted Schwann-like cells derived from iPS cells may contribute to axon regeneration at the distal side. No teratomas were identified in the nerve conduits at 24 and 48 weeks after implantation.

研究分野：整形外科

キーワード：iPS細胞 人工神経 末梢神経 再生医療

1. 研究開始当初の背景

現在、四肢の末梢神経欠損に対しては自家神経移植が標準治療であるが、ドナーサイトの正常神経を犠牲にするという大きな問題を抱えている。そこでこれまで我々は、自家神経移植の代替治療方法として人工多能性幹細胞 (Induced pluripotent stem cell 以下 iPS 細胞) と神経再生誘導管 (以下人工神経) を用いた末梢神経再生の基礎研究を行ってきた。平成 21-23 年度の研究 (科研費基盤研究 C 課題番号 21591904) 結果から、マウスの坐骨神経欠損に対して人工神経を用いて末梢神経再生を行った場合、人工神経に iPS 細胞由来の神経前駆細胞を付加することで、人工神経単独よりも再生軸索が増大し、マウスの下肢機能回復も促進した。付加した iPS 細胞が軸索再生の促進に寄与したことが推察されるが、そのメカニズムについては不明であった。

2. 研究の目的

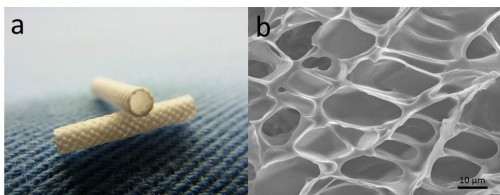
本研究では、人工神経とマウス坐骨神経欠損モデルを用いて、iPS 細胞移植による末梢神経再生の促進メカニズムについてより詳細に検討し、臨床応用へ向けて、iPS 細胞を用いた人工神経の安全性 (腫瘍化) について検討した。

3. 研究の方法

人工神経は生体吸収性ポリマーチューブを使用した (図 1)。この人工神経は壁が 2 層構造であり、内層はポリ乳酸とポリカプロラクトン (50:50) のスポンジ共重合体、外層はポリ乳酸のマルチファイバーメッシュで構成されている。サイズはマウスの坐骨神経に合わせて内径 1mm、外径 2mm、長さ 7mm とした。この人工神経は内層が蜂巢構造のため細胞の足場としても機能する。

図1. 人工神経

- a: 外観
- b: 内層 (走査型電子顕微鏡写真)

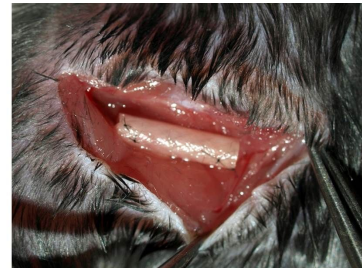


マウス iPS 細胞は、GFP 遺伝子があらかじめノックインされた iPS- Stm-FB/gfp-99-1 ならびに iPS-MEF-Ng-178B-5 を理研から購入して使用した。過去の報告のとおり、iPS 細胞から第 2 世代神経前駆細胞を分化誘導し、*in vitro* で人工神経に充填し、14 日間培養を行い人工神経に生着させた (iPS 細胞ハイブリッド型人工神経の完成)。付加した iPS 細胞の性質を評価するために、人工神経の短軸横断切片を用いて抗 Tuj-1 抗体 (未分化神経マーカー) および抗 S-100 抗体 (シュワン細胞マーカー) を用いた免疫染色を行った。

次に、オス 6 週齢のマウス (C57BL/6NCrSlc)

の左坐骨神経に長さ 5mm の欠損を作製し、iPS 細胞ハイブリッド型人工神経で架橋再建した。切断した神経の断端をそれぞれ人工神経に 1mm ずつ引き込んで人工神経に縫合した (図 2)。移植後 4、7、14 日目に人工神経を採取し、人工神経の長軸横断切片を用いて再生軸索ならびに移植 iPS 細胞について組織学的に評価した。移植 iPS 細胞は Alexa Fluor 488 で標識された抗 GFP 抗体を用いて、また再生軸索およびシュワン細胞は抗 S-100 抗体を用いた免疫染色によって同定した。いずれの免疫染色においても BZ-8000 蛍光顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて観察を行った。

図2. 人工神経移植 (マウス坐骨神経)



また移植後 24 週および 48 週で人工神経を採取し、中央部横断切片で奇形腫形成の有無について Hematoxylin-Eosin (以下 HE) 染色で組織学的に評価した。

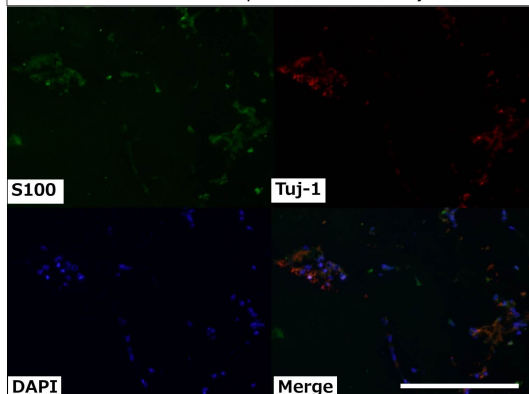
4. 研究成果

(1) 人工神経に付加した iPS 細胞由来神経前駆細胞

人工神経に付加した iPS 細胞由来の神経前駆細胞は抗 Tuj-1 抗体および抗 S-100 抗体が陽性であった (図 3)。特に抗 S-100 抗体陽性細胞が多く、iPS 細胞由来神経前駆細胞はシュワン様細胞に優位に分化して人工神経に生着していた。

図3. 組織像 (人工神経短軸横断面)。

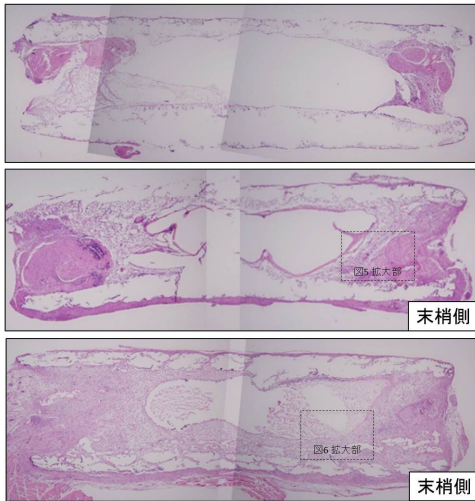
移植前 (20倍). scar bar: 200μm. 緑: S100 赤: Tuj-1 青: DAPI



(2) 移植 iPS 細胞の局在

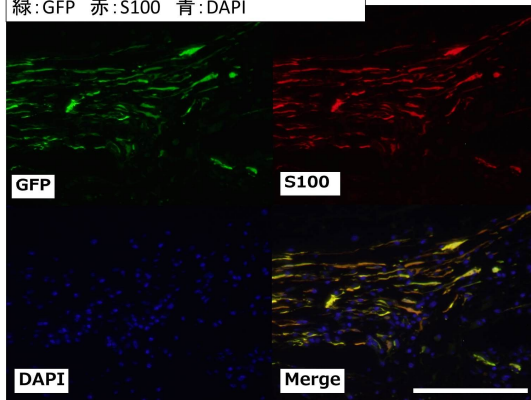
マウスに移植後の人工神経の組織像 (長軸横断切片) を図 4 に示す。移植後 4、7、14 日目では、抗 GFP 抗体が陽性となる移植 iPS 細胞は人工神経の内壁および内層内に残存していた。特に移植後 14 日目では、これら移植 iPS 細胞は抗 GFP 抗体と抗 S-100 抗体が二重陽性であり、シュワン様細胞としての性

図4. 組織像(HE染色, 人工神経長軸横断面). 上段: 移植4日目、中段: 移植7日目、下段: 移植14日目.



質を保持したまま人工神経内に残存していた。またこれらの移植 iPS 細胞は、抗 S-100 抗体が陽性となる再生軸索の遠位断端に遊走して局在しており、一部は再生軸索内にも入り込んで存在していた(図5)。

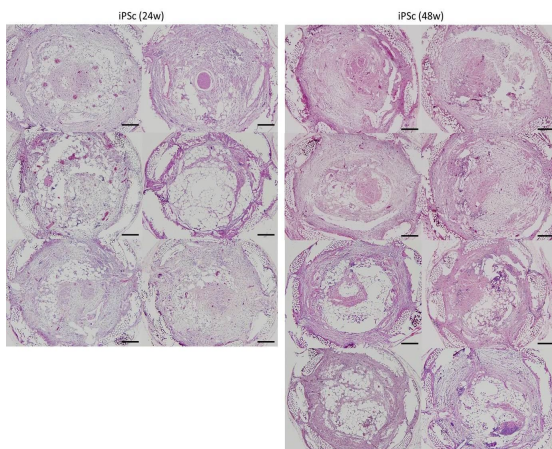
図5. 移植14日目.(20倍) scar bar:200µm
緑:GFP 赤:S100 青:DAPI



(3) 奇形腫形成の有無

マウスに移植後 24 週および 48 週において、人工神経内に線維束形成をした再生軸索を認めしたが、人工神経の内外に奇形腫形成は認められなかった(図6)。

図6. 人工神経の組織像(Hematoxylin-Eosin 染色)。Scale bar: 200 µm。左: 移植後 24 週、右: 移植後 48 週。



末梢神経再生ではシュワン細胞が非常に重要な役割を担っている。このため本研究でも iPS 細胞から分化誘導した神経前駆細胞を人工神経上でさらに 14 日間培養し、シュワン細胞へと分化させて人工神経に生着させた。本研究ではシュワン細胞の同定を抗 S-100 抗体による免疫染色で行なったが、シュワン細胞に特異的な遺伝子発現までは検索していない。そのためシュワン様細胞と表記したが、今後 iPS 細胞から分化誘導したシュワン様細胞が真のシュワン細胞かどうか検証する必要がある。また、これら iPS 細胞由来のシュワン様細胞は、マウスに移植(免疫抑制剤なし)後 14 日目まではシュワン様細胞として人工神経内に残存していた。これらの移植細胞は特に遠位の神経断端の周囲に局在しており、一部は再生軸索内にも入り込んで軸索伸長に貢献していることが示唆された。Marchesi らの報告によると、人工神経に付加した細胞(皮膚由来幹細胞)は、遠位神経断端に作用して軸索再生の促進に寄与するとされている。このため本研究では、特に人工神経の遠位部における再生軸索を評価し Marchesi らと同様の結果であったが、今後は人工神経の近位部における移植 iPS 細胞と再生軸索との相互作用についても検討する必要がある。

本研究は、マウス iPS 細胞をマウスに同種移植(免疫抑制なし)したモデルであり、免疫抑制下では移植 iPS 細胞がより長期に人工神経内で生存する可能性がある。移植 iPS 細胞が長期に生存することで、移植細胞からの液性因子による間接的な神経再生促進効果だけではなく、移植細胞がシュワン細胞として直接再生軸索の髓鞘形成を担う可能性もあり、神経再生がさらに促進するものと考えられる。今後は iPS 細胞移植を併用した人工神経の臨床応用に向けて、ヒト iPS 細胞由来の神経前駆細胞を付加した人工神経の有用性について、本研究で確立した免疫抑制下での末梢神経欠損動物モデルを用いて検証していきたい。

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 23 件)

- 1) Uemura T, Okada M, Yokoi T, Shintani K, Nakamura H. Successful Bone Healing of Nonunion After Ulnar Shortening Osteotomy for Smokers Treated With Teriparatide. *Orthopedics*. 2015; 38(8): 733-737. 査読有. doi: 10.3928/01477447-20150804-90.
- 2) Uemura T, Yagi H, Okada M, Yokoi T, Shintani K, Nakamura H. Elbow septic arthritis associated with pediatric acute leukemia: a case report and literature review. *Joint Diseases and*

- Related Surgery (Eklem Hastalik Cerrahisi). 2015; 26(3): 171-174. 査読有. doi: 10.5606/ehc.2015.35.
- 3) Okada M, Kamano M, Uemura T, Ikeda M, Nakamura H. Pedicled Adipose Tissue for Treatment of Chronic Digital Osteomyelitis. *Journal of Hand Surg (Am)*. 2015; 40(4): 677-684. 査読有. doi: 10.1016/j.jhsa.2014.12.034.
 - 4) 上村卓也, 高松聖仁, 中村博亮. iPS 細胞を付加できる高柔軟性人工神経の開発. *細胞*. 2015; 47(8): 421-422. 査読無.
 - 5) 上村卓也, 高松聖仁, 中村博亮. 整形外科領域における移植医療 新規人工材料の開発と課題 神経損傷に対する柔軟性の高い人工神経の開発 人工多能性幹細胞移植を併用したハイブリッド型人工神経による再生医療をめざして. *別冊整形外科*. 2015; 68: 47-51. 査読有.
 - 6) 上村卓也. 末梢神経再生のための人工神経の研究開発. *PHARM STAGE*. 2015; 15(2): 10-12. 査読無.
 - 7) Uemura T, Ikeda M, Takamatsu K, Yokoi T, Okada M, Nakamura H. Long-term efficacy and safety outcomes of transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres with bioabsorbable nerve conduits for peripheral nerve regeneration in mice. *Cells Tissues Organs*. 2014; 200(1): 78-91. 査読有. doi: 10.1159/000370322.
 - 8) Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Ikeda M, Nakamura H. Entrapment of digital nerves due to an embedded ring: a case report. *J Reconstr Microsurg*. 2014; 30(9): 659-661. 査読有. doi: 10.1055/s-0034-1370362.
 - 9) Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Kazuki K, Tabata Y, Ikeda Y, Nakamura H. Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. *J Biomed Mater Res A*. 2014; 102(5): 1370-8. 査読有. doi: 10.1002/jbm.a.34816.
 - 10) Okada M, Saito H, Kazuki K, Nakamura H. Combined medialis pedis and medial plantar fasciocutaneous flaps for coverage of soft tissue defects of multiple adjacent fingers. *Microsurgery*. 2014; 34(6): 454-458. 査読有. doi: 10.1002/micr.22222.
 - 11) 上村卓也, 池田幹則, 高松聖仁, 横井卓哉, 岡田充弘, 香月憲一. 末梢神経の再生医療 マウスモデルにおける iPS 細胞ハイブリッド型人工神経の長期成績と安全性. *日本手外科学会雑誌*. 2014; 31(2): 1-5. 査読有.
 - 12) 上村卓也, 高松聖仁, 池田幹則, 横井卓哉, 岡田充弘, 中村博亮. iPS 細胞ハイブリッド型人工神経による末梢神経再生. *末梢神経*. 2014; 25(2): 220-225. 査読有.
 - 13) 高松聖仁, 上村卓也, 池田幹則, 岡田充弘, 横井卓哉, 香月憲一. ハイブリッド型人工神経を用いた再生医療の実験的研究 iPS 細胞由来神経前駆細胞塊の徐放システム (Cell Delivery System). *日本手外科学会雑誌*. 2014; 30(5): 803-806. 査読有.
 - 14) 上村卓也, 日高典昭, 中村博亮. 小児肘外傷の初期治療と後遺症に対する治療 小児肘関節脱臼の治療. *関節外科*. 2014; 33(8): 849-858. 査読無.
 - 15) 高松聖仁, 新谷康介, 斧出絵麻, 岡田充弘. 指動脈穿通枝皮弁 (DAP flap) カラドップラを用いた穿通枝の検索と皮弁のデザイン. *PEPARS*. 2014; 95: 20-28. 査読無.
 - 16) 岡田充弘. 穿通枝皮弁を用いた頸部・肩甲帯の再建. *PEPARS*. 2014; 95: 42-48. 査読無.
 - 17) Uemura T, Takamatsu K, Okada M, Ikeda M, Nakamura H. Radial artery perforator adiposal flap for coverage of the scarred median nerve. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013; 66(7): 1019-1021. 査読有. doi: 10.1016/j.bjps.2013.01.024.
 - 18) Okada M, Saito H. Resection interposition arthroplasty of calcaneonavicular coalition using a lateral supramalleolar adipofascial flap: case report. *J Pediatr Orthop B*. 2013; 22(3): 252-254. 査読有. doi: 10.1097/BPB.0b013e328353a1c1.
 - 19) Okada M, Ikeda M, Uemura T, Takada J, Nakamura H. A propeller flap based on the thoracoacromial artery for reconstruction of a skin defect in the cervical region: A case report. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2013; 66(5): 720-722. 査読有. doi: 10.1016/j.bjps.2012.08.045.
 - 20) Okada M, Takamatsu K, Oebisu N, Nakamura H. Solitary neurolymphomatosis of the brachial plexus mimicking benign nerve sheath tumour: case report. *Br J Neurosurg*. 2013; 27(3): 386-387. 査読有. doi: 10.3109/02688697.2012.737959.
 - 21) 上村卓也, 高松聖仁, 池田幹則, 岡田充弘, 香月憲一, 田畑泰彦, 筏義人, 中村博亮. 末梢神経の再生医療 生体吸収性人工神経を用いた iPS cell- & bFGF drug-delivery system の有効性. *末梢神経*. 2013; 24(1): 90-8. 査読有.

- 22) 上村卓也、高松聖仁、中村博亮. 整形外科領域と再生医療 神経再生 iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経再生治療開発. Pharma Medica. 2013; 31(4). 37-42. 査読無.
- 23) 岡田充弘. 指尖切断の治療. 整形外科 Surgical Technique. 2013; 3(5): 567-71. 査読無.

〔学会発表〕(計 19 件)

- 1) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、横井卓哉、新谷康介、岡田充弘、中村博亮. ハイブリッド型人工神経による末梢神経再生. 第 35 回整形外科バイオマテリアル研究会. 2015/12/12. ソラシティカンファレンスセンター(東京都千代田区)
- 2) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、横井卓哉、新谷康介、岡田充弘、中村博亮. iPS 細胞を用いた運動器疾患研究 iPS 細胞と FGF-DDS を付加した人工神経による末梢神経再生. 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2015/10/22-10/23. 富山国際会議場(富山県富山市)
- 3) 横井卓哉、上村卓也、高松聖仁、新谷康介、岡田充弘、中村博亮. 人工神経に付加した iPS 細胞由来神経前駆細胞による末梢神経再生の促進効果. 第 26 回日本末梢神経学会. 2015/9/18-9/19. ホテルブエナビスタ(長野県松本市)
- 4) 上村卓也、高松聖仁、中村博亮. iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経再生. 第 5 回細胞再生医療研究会. 2015/7/26. 臨床研究情報センター(TIR センター)(兵庫県神戸市)
- 5) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、横井卓哉、新谷康介、岡田充弘、中村博亮. 手外科領域の再生医療、未来に向かって iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経の再生医療. 第 88 回日本整形外科学会学術総会. 2015/5/21-5/24. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- 6) 上村卓也、池田幹則、横井卓哉、岡田充弘、高松聖仁、中村博亮. マウス坐骨神経欠損モデルに対する iPS 細胞ハイブリッド型人工神経の長期成績. 第 88 回日本整形外科学会学術総会. 2015/5/21-5/24. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- 7) 横井卓哉、上村卓也、池田幹則、岡田充弘、高松聖仁、中村博亮. 末梢神経の再生医療 青壮年マウスモデルにおける iPS 細胞ハイブリッド型人工神経の有効性の検討. 第 88 回日本整形外科学会. 2015/5/21-5/24. 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- 8) 上村卓也、高松聖仁、横井卓哉、岡田充弘、中村博亮. iPS 細胞ハイブリッド型人工神経の長期成績 - マウスモデルにおける iPS 細胞由来神経前駆細胞移植の効果 -. 第 58 回日本手外科学会学術集会. 2015/4/16-4/17. 京王プラザホテル(東京都新宿区)
- 9) 横井卓哉、上村卓也、高松聖仁、岡田充弘、中村博亮. iPS 細胞ハイブリッド型人工神経による末梢神経再生-青壮年マウスモデルでの検討-. 第 58 回日本手外科学会. 2015/4/16-4/17. 京王プラザホテル(東京都新宿区)
- 10) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、横井卓哉、岡田充弘、中村博亮. iPS 細胞と人工神経によるマウス末梢神経再生. 第 14 回日本再生医療学会. 2015/3/19-3/21. パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- 11) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、横井卓哉、新谷康介、岡田充弘、中村博亮. iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経の再生医療. 第 29 回東日本手外科研究会. 2015/3/7. 仙台 サンプラザホテル(宮城県仙台市)
- 12) 上村卓也、高松聖仁、中村博亮. 末梢神経の再生医療 -iPS 細胞技術を応用したハイブリッド型人工神経-. メディカルジャパン 2015 大阪アカデミックフォーラム. 2015/2/4-2/6. インデックス大阪(大阪府大阪市)
- 13) 上村卓也、池田幹則、高松聖仁、岡田充弘、横井卓哉、新谷康介、田畑泰彦、中村博亮. 自家神経移植に匹敵する人工神経の開発 iPS 細胞と FGF を融合したハイブリッド型人工神経. 第 32 回中部日本手外科研究会. 2015/1/31. 今池ガスホール(愛知県名古屋市)
- 14) 上村卓也、高松聖仁、中村博亮. PLA-PCL 共重合体人工神経の開発. 第 19 回 ACTjapan meets 未来医療交流会. 2015/1/30. 大阪大学吹田キャンパス銀杏会館(大阪府吹田市)
- 15) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、横井卓哉、岡田充弘、筏義人、中村博亮. iPS 細胞と人工神経による末梢神経の再生医療 - マウスモデルにおける長期成績 -. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014/10/9-10/10. 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)
- 16) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、横井卓哉、岡田充弘、中村博亮. iPS 細胞と人工神経による末梢神経再生 マウス坐骨神経欠損モデルでの検討 -. 第 33 回日本運動器移植・再生医療研究会. 2014/9/27. 第一ホテル両国(東京都墨田区)
- 17) 上村卓也、高松聖仁、岡田充弘、中村博亮. iPS 細胞ハイブリッド型人工神経による末梢神経再生. 第 25 回日本末梢神経学会学術集会. 2014/8/29-8/30. ホテルルビノ京都堀川(京都府京都市)
- 18) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、岡田充弘、香月憲一、中村博亮. iPS 細胞による末梢神経の再生医療の実現に向けて - iPS 細胞ハイブリッド型人工神経の長

- 期成績と安全性 - . 第 122 回中部日本整形災害外科学会. 2014/4/11-4/12. 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
- 19) 上村卓也、高松聖仁、池田幹則、岡田充弘、中村博亮 . 末梢神経の再生医療マウスモデルにおける iPS 細胞ハイブリッド型人工神経の長期成績と安全性について . 第 57 回日本手外科学会. 2014/2/21-2/22. 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 岡田充弘、斎藤英彦. 尺骨神経麻痺に対する機能再建術. 整形外科手術イラストレイテッド 上腕・肘・前腕の手術. 中山書店. 2015: 320(225-34).
- 2) 上村卓也、高松 聖仁、中村 博亮. 末梢神経再生 iPS細胞播種ハイブリッド型人工神経による末梢神経再生. 先端医療シリーズ 臨床医のための最新整形外科. 寺田国際事務所/先端医療技術研究所. 2013; 44: 570(116-119).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ(大阪市立大学プレスリリース)

<https://www.osaka-cu.ac.jp/ja/news/2014/gb2u4u-1>

6. 研究組織

(1)研究代表者

上村卓也 (UEMURA, Takuya)

大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師
研究者番号：10597321

(2)研究分担者

中村博亮 (NAKAMURA, Hiroaki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60227931

岡田充弘 (OKADA, Mitsuhiro)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：40309571

高松聖仁 (TAKAMATSU, Kiyohito)

大阪市立大学・大学院医学研究科・客員准教授

(3)連携研究者

なし