

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462698

研究課題名(和文) 過誤支配防止を目的とした組織工学的末梢神経再生の研究

研究課題名(英文) The study for tissue engineered peripheral nerve regeneration preventing from misdirection

研究代表者

金丸 眞一 (KANEMARU, Shinichi)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・研究主幹

研究者番号：00271510

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)：末梢神経では神経線維の再生もさることながら、過誤支配をいかに抑制することができかが、機能的回復にとって重要な問題である。神経の機能的再生率をさらに向上させる必要があることから、人工神経チューブ内に封入する足場と再生促進物質としての単核球の役割を研究した。

当初期待したゼラチンスポンジは足場素材として不適であることが判明した。

また、神経再生の初期過程でのワラー変性に着目し、これを促進させることが成長円錐、軸索の伸長に有効であり、その主役を演ずるマクロファージを供給する末梢血単核球の移植を行うことが機能的再生に有効であると思われたが、単核球を移植しないモデルとの成績の差はなかった。

研究成果の概要(英文)：It is the most important for functional regeneration of the peripheral nerve to prevent from misdirection. The aim of this study was to select the best scaffold enter into the artificial nerve conduit and to elucidate the role of monocyte in the process of nerve regeneration for the purpose of promoting functional regeneration of the peripheral nerve.

This study showed that the gelatin sponge, we expected at first, was not adequate scaffold for regeneration of the peripheral nerve. We focused on Wallerian degeneration in the early process of nerve regeneration and performed the study of implantation of monocyte as the leading factor for it. However, implantation of monocyte did not promote functional regeneration of the peripheral nerve.

研究分野：再生医療

キーワード：神経再生 過誤支配 人工神経 コラーゲン ゼラチンスポンジ 単核球

## 1. 研究開始当初の背景

末梢神経のうち顔面神経や反回神経は、一つの神経の中に異なる筋や拮抗作用を示す筋を支配する神経線維が含まれている。このため神経再生が進んでも過誤支配が発症しやすく、顔面神経では病的共同運動を、反回神経では声帯麻痺が生じることになる。したがって、末梢神経では神経線維の再生もさることながら、過誤支配をいかに抑制することができるかが、機能的回復にとって重要な問題である。

これまでにわれわれは、PGA チューブ (2 頁図参照) を開発し、イヌを用いた動物実験で反回神経の再生に取り組み、約 1cm の機能的再生 (世界初) に成功している。

神経が傷害されたあと、その支配器官からは、一定の期間何らかの再生神経誘導因子が出されるものと思われる。その誘導に従って、軸索が伸長できれば過誤支配は防止できる可能性がある。したがって、過誤支配防止のためには、再生神経誘導因子が分泌されているうちに、いち早く軸索の再生を完了させる必要がある。そのためには適切な再生の条件を整え、できる限り再生を促進させることが、重要であると考えられる。

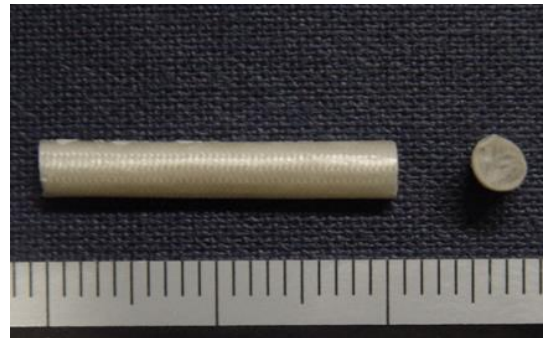
## 2. 研究の目的

末梢神経のうち顔面神経や反回神経は、神経線維の再生もさることながら、過誤支配をいかに抑制することができるかが、機能的回復にとって重要な問題である。本研究では、神経再生過程を促進させ過誤支配を抑制させるために、以下の実験を行うも

のである。

- 1) 人工神経チューブの足場素材の検討
- 2) 障害された末梢神経の初期再生過程であるワーラー変性をより効率的に推進させる目的で単核球移植効果を検討する
- 3) 人工神経に封入する調節因子の効果の検討

(1) 人工神経チューブの改良 (神経チューブ封入材料の検討)



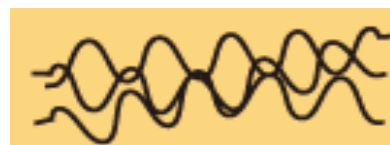
ポリグリコール酸 (PGA) を編み込んで作った人工神経管内部に入れる封入材料の検討

### コラーゲン



コラーゲンは、比較的密な構造であるため神経軸索の伸長を妨げる可能性があるが、ゼラチンはコラーゲンを分解したもので疎な構造であるため、より良い足場の可能性がある。

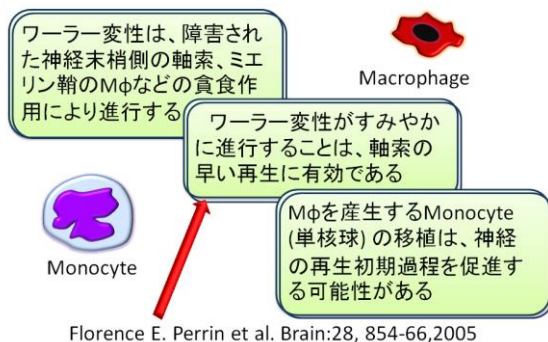
### ゼラチン



## (2) 神経変性の過程の研究と単核球移植効果の検討

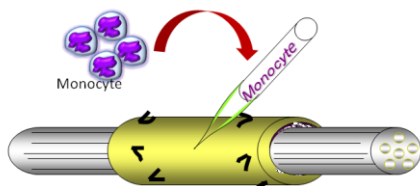
ワーラー変性など神経再生初期過程に関する研究は、末梢神経の旺盛な再生能力とそれを利用した本治療の理論的根拠を提供するものであり、これまで、自家神経移植しか手段がなかった神経再建の概念が一新されると期待できる。

### ワーラー変性とマクロファージ

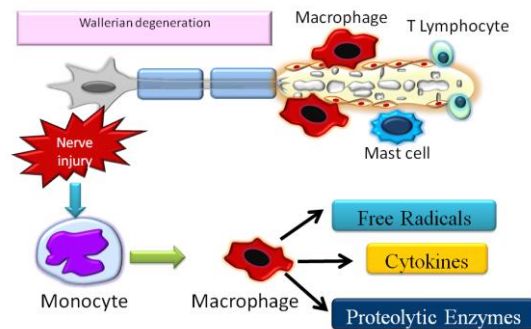


### 新しい研究

ワーラー変性を迅速に進めるために、自己末梢血より分離した単核球を移植したPGA tubeで神経再生を試みる



### 神経再生初期修復過程の主役は？



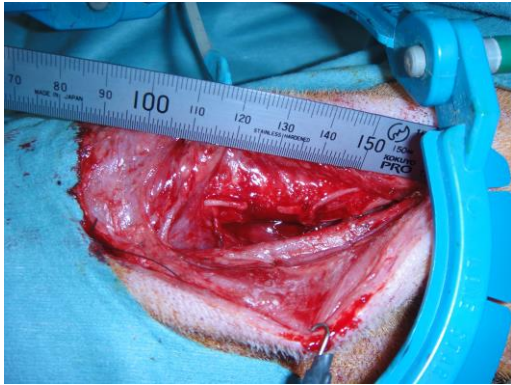
### 3. 研究の方法

1) 足場素材の検討として改良型 PGA チューブ作製

上に記したように、PGA チューブ内に封入する素材を神経伸長の方向性に制約を与えると考えられる、コラーゲンに代えて、自由な神経伸長が可能となるゼラチンに変更し以下の実験を行った。

ラット腓骨神経を切断し、ゼラチンスポンジを封入したシリコンチューブと封入していないシリコンチューブを移植し両方で神経再生の程度を調べた。

2) 単核球移植による神経再生効果の検討  
イヌ反回神経切除モデル (n=4) を作製 PGA チューブにアテロコラーゲンを封入下記の要領で作成した単核球を移植した人工神経で神経再建を行い、これまでに単核球を移植していない historical control と比較した。



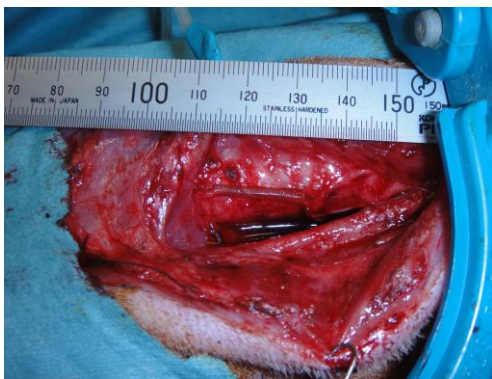
反回神経部分切除モデル作成



単核球の遠沈分離



移植用単核球



PGAチューブ+単核球による反回神経再建

評価：電子スコープで声帯の動きを経時的に観察することで機能的再生の有無を確認することができる。また、電気生理学的検査として声帯筋（甲状披裂筋）の複合筋電図および免疫組織化学的検査としてHRP(Horse radish peroxidase)による声帯筋（甲状披裂筋）神経終末の発現を確認した。

#### 4. 研究成果

1) 足場素材の検討として改良型PGAチューブ作製

ラット腓骨神経を切断し、ゼラチンスポンジを封入したシリコンチューブと封入していないシリコンチューブ（いずれも5mm）を移植し両者で神経再生の程度を調べたが、封入した群では、神経の再生がいずれも観察できなかった。一方、何も封入しなかったシリコンでは再生神経を確認できたため、ゼラチンは神経再生の足場としては不適切な素材と判断した。

このため、本研究の根本的見直しが必要となったが、われわれが、過去に報告したアテロコラーゲン封入PGAチューブによる神経再生で、良好な結果が得られていることから、このPGAチューブに単核球を移植する群としない群（historical control）でその効果を検討することにした。

2) 単核球移植による神経再生効果の検討  
イヌ反回神経を切断し20mmのPGAチューブに単核球移植し、上記の図に示した要領で神経再生を施行したが、4例中1例で声帯の動きがわずかに見られた程度で、これまで、単核球を移植しなかった群よりもむしろ悪い結果となり、単核球が再生を促進し、過誤支配を防ぐ効果があるという結論には至らなかった。

しかし、イヌ 4 頭の結果であり、ばらつきがあるため、本研究助成期間は終了したが、本件研究は今後続行する予定である。

#### <引用文献>

1. Kanemaru S, et al. Recurrent laryngeal nerve regeneration by tissue engineering. Ann Otol Rhinol Laryngol 112:492-8, 2003
2. Nakamura T, Inada Y, Fukuda S, Yoshitani M, Nakada A, Itoi S, Kanemaru S, Endo K, Shimizu Y. Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. Brain Research. 1027: 18-29 2004
3. 金丸真一 人工神経チューブによる神経再生医療、喉頭 2005;17:72-75.
4. 金丸真一 頭頸部領域の再生医療、頭頸部癌. 2005 ; 31 : 402-407.

#### 5. 主な発表論文など

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 4 件)

1. Kanemaru S and Nakamura T. “Peripheral Nerve Regeneration by tissue Engineering for Prevention of Misdirection” “Chapter 6 of Regenerative Medicine in Otolaryngology” Editor: Juichi Ito MD., PhD. Springer Japan 2015.
2. Yamashita M, Kitani Y, Kanemaru S. “Laryngeal Framework Regeneration” “Chapter 10 of Regenerative Medicine in Otolaryngology” Editor: Juichi Ito MD., PhD. Springer Japan 2015.
3. Kanemaru S, Omori K, Yamashita M,

Nakamura T. “Regeneration of the Trachea” “Chapter 15 of Regenerative Medicine in Otolaryngology” Editor: Juichi Ito MD., PhD. Springer Japan 2015.

4. Hirano S, Kanemaru S. “Future Prospective” “Chapter 16 of Regenerative Medicine in Otolaryngology” Editor: Juichi Ito MD., PhD. Springer Japan 2015.

[産業財産権] (計 0 件)

[その他] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金丸 真一 (KANEMARU, Shinichi)  
公益財団法人田附興風会・医学研究所第 5 研究部・研究主幹  
研究者番号 : 00271510

(2) 研究分担者

中村達雄 (NAKAMURA, Tatsuo)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・准教授  
研究者番号 : 70227908

山下 勝 (YAMASHITA, Masaru)  
京都大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号 : 10635519

前谷 俊樹 (MAETANI, Toshiki)  
公益財団法人田附興風会・医学研究所第 5 研究部・研究主幹  
研究者番号 : 90346669

金井 理絵 (KANAI, Rie)  
公益財団法人田附興風会・医学研究所第 5 研

究部・研究員

研究者番号：30574008