

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462788

研究課題名(和文) 幹細胞を融合したオーダーメイド型人工神経の開発

研究課題名(英文) Development of artificial nerve made to order combined with stem cells.

研究代表者

細川 互 (Ko, Hosokawa)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20181498

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：3cm以上の末梢神経欠損に対しては自家神経グラフト(ANG)移植が唯一の治療法であるが、ドナー神経の犠牲、採取できる神経量の限界、レシピエントとの形状のミスマッチなどの欠点を有する。本研究ではANGの代替えと成り得るオーダーメイド可能なハイブリッド型人工神経の開発を目指した。薬剤処理によって無細胞化した同種ラット末梢神経へ脂肪組織由来間葉系幹細胞から分化誘導して得られた自家シュワン細胞様細胞を付加することでハイブリッド型人工神経を作製した。神経欠損への移植後、付加した細胞の大部分はレシピエント神経由来のシュワン細胞に置き換わるものの、細胞付加により機能回復速度の促進を認めた。

研究成果の概要(英文)：For the peripheral nerve defects greater than 3cm, transplantation of autologous nerve graft (ANG) is the only therapeutic option. However, ANG has several limitations, such as need for sacrifice of donor nerve and size mismatch between ANG and recipient nerve. The purpose of this study was the development of artificial nerve made-to-order that can be a substitute for ANG. The hybrid artificial nerve was produced by adding Schwann-like cells differentiated from adipose-derived stem cells to the acellular rat peripheral nerves. Although most of the added cells were replaced with the native Schwann cells in the recipient nerve, it accelerated the functional recovery, possibly by producing neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor.

研究分野：再建外科

キーワード：末梢神経 脂肪組織由来間葉系幹細胞 人工神経

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷は成人において感覚運動障害、およびそれに伴う生産性低下の最も大きな原因の一つである。単純な神経損傷の場合、無緊張な端々縫合が可能であれば良好な機能回復が得られることも多い。一方で、大きく複雑な神経欠損が存在する場合、現時点においては自家神経グラフト移植が唯一の治療法となる。しかしながら、自家神経グラフトは採取神経の犠牲が必ず生じる、採取量に限界がある、神経径・形状のミスマッチによる癒痕・神経腫形成などの欠点を有する。したがって細胞ドナー犠牲が最小限で大量供給でき、さらにはオーダーメイドも可能な再建材料の開発が望まれる。

これまで自家神経グラフトの代替えとして吸収性人工チューブをはじめ、自己血管・筋肉組織等の材料が検討されているが、知覚神経であれば3 cm、運動神経であれば5 mm以上の欠損に用いることは困難である[参考文献1]。この限界を超えるためには軸索再生支持細胞であるシュワン細胞の付加が必須となるが、自家培養シュワン細胞はドナー神経の犠牲が必要、短期間大量培養が困難等の欠点を有するため、新たなシュワン細胞源が望まれるところである。

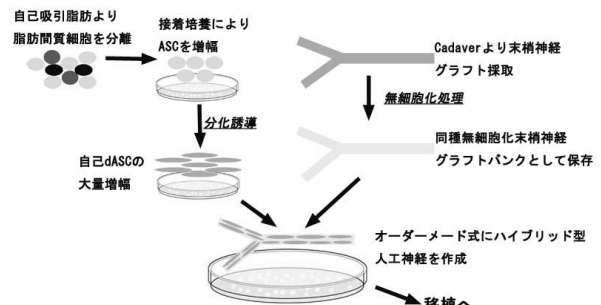
近年、様々な体性幹細胞が同定され臨床においても応用されつつあるが、2002年にはZukらにより脂肪組織の前駆細胞の中に多分化能を持つ細胞(ASC)が存在することが報告された。ASCは脂肪吸引により極めて低侵襲に大量採取が可能であることから、骨髄に代わる有力な体性幹細胞源として注目されている。さらに、申請者らの研究グループはASCが胚葉を超えてシュワン様細胞(dASC)へと分化することを世界に先駆けて報告した。またヒトdASCはNGF、BDNF、GDNFといった神経栄養因子を高いレベルで産生し、さらには、ヌードラットの末梢神経内へ移植されたヒトdASCは高い生着率を示し、その多くが再生軸索をミエリン化することも確認している。

一方で、シュワン細胞が接着・遊走するための足場としては現在、無細胞化同種神経グラフトが最も良好な治療成績を示している。

これは界面活性剤を含む溶液により繰り返し洗浄を行うことで細胞成分を除去し、抗原性を最小限化する一方で、元来の細胞外構造の保持を可能とするものである。特筆すべきは、cadaverより採取できることから大量に、且つレシピエントの形状に適合したグラフトの供給が可能である点である。

2. 研究の目的

上記の背景から本研究では図1に示すような自己細胞と同種無細胞化神経グラフトを組み合わせたオーダーメイド型神経グラフトの臨床応用へ向けて、その有効性を検証することを目的とした。



(図1) 自己細胞と同種無細胞化神経グラフトを組み合わせたオーダーメイド型神経

具体的には、

- (1) 自家 dASC と同種無細胞化神経グラフトの親和性検討および融合法の最適化
 - (2) ハイブリッド型人工神経移植における治療効果の検討
- を主な目標とした。

3. 研究の方法

- (1) ラット自家 dASC と同種無細胞化神経グラフトの親和性検討および融合法の最適化
ラット dASC およびラット坐骨神経由来シュワン細胞の初代培養

全ての細胞に蛍光タンパク GFP を発現するラット [LEW-Tg(CAG-EGFP)1Ys] の皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理、遠心分離により ASC を得た。第2継代目において、これまで我々が用いてきた手法、すなわち GGF-2 をはじめとする増殖因子添加により dASC への分化誘導を行った。

同種異型無細胞化神経グラフトの作成
SD ラットより坐骨神経を採取し、過去にワシントン大学形成外科により報告されてい

るプロトコールにより神経グラフトの無細胞化を行った (Muscle Nerve 44: 221-234, 2011)。

dASCの同種異型無細胞化神経グラフトへの移植および移植法の最適化

マイクロシリンジによる注入により dASC を神経グラフトへ移植した後、一定期間 in vitro にて培養を行った。その後グラフト内 GFP 陽性細胞において総細胞数、細胞増殖を評価し、移植法・細胞移植後培養期間の最適化を行った。

(2) 末梢神経損傷におけるハイブリッド型人工神経移植の治療効果の検討

Lewis ラット総腓骨神経に 1 cm の欠損を作成したモデルにおいて、dASC 融合人工神経グラフト移植群、無細胞人工神経グラフト移植群、自家神経グラフト移植群 (isograft 移植) の 3 群をそれぞれ作成し、以下の評価を行った。

機能的評価

神経移植後、足跡分析により Peroneal functional index (PFI) を測定し、総腓骨神経運動機能回復の程度を経時的に評価した。また細胞移植後 20 週目において、筋電図計測装置にて神経伝達速度、Peak amplitude を計測した。

再生神経の組織形態学的評価、及び支配筋の評価

神経移植後 20 週目において、神経移植部より 1 cm 遠位部の神経を採取、短軸切片をトルイジンブルー染色することにより神経軸索数、密度、軸索の直径、ミエリンの厚さを計測した。また前脛骨筋重量を測定し、健側に対する割合を評価した。

(3) 移植神経の免疫学的評価

神経移植後 20 週目において、移植神経より短軸・長軸切片をそれぞれ作成し、軸索マーカー、シュワン細胞マーカー、ミエリンタンパクマーカーを用いて免疫組織染色を行うことにより、GFP で標識された移植細胞の phenotype 変化、再生軸索への関与、およびレシピエント由来シュワン細胞のグラフト内侵入の程度を検討した。

上記のモデルに加えて、より複雑な神経欠

損への応用を想定し、脛骨神経と総腓骨神経分岐部における神経欠損を Y 字型の神経で再建したモデルを追加で作成し現在評価中である。

4. 研究成果

ラット自家 dASC と同種無細胞化神経グラフトの親和性検討および融合法の最適化

同種無細胞化神経グラフト作成をワシントン大学のプロトコールに従って試みたところ、生存しているシュワン細胞が僅かに確認されるグラフトを認めた。そこで各処理時間を約 1.5 倍程度に延長して行うことでこの問題を解決することができた。無細胞化神経の抗ラミニン抗体による免疫染色では basal lamina tube が維持されていることが確認できた。

細胞付加法に関しては、まず dASC をマイクロシリンジによりグラフト端から移植し、その後 2 週間 in vitro で培養を行ったところ、細胞の分布にばらつきが生じて細胞の生存率が低くなることが明らかとなった。その対応策として、複数箇所に分けて移植を行うことで細胞分布のばらつきが少なくなり生存率が向上することが明らかとなった。

末梢神経損傷におけるハイブリッド型人工神経移植の治療効果の検討

(1) 移植神経の免疫学的評価

神経再建後 20 週目において移植神経を採取し、凍結切片作成の後、免疫染色を行った。いずれの群においても抗ニューロフラメント抗体で染色される神経軸索を多数認めた。また抗 S100 抗体、抗 GFAP 抗体でそれぞれ染色されるミエリン化シュワン細胞および非ミエリン化シュワン細胞も全群において多数確認できた。一方、dASC 付加無細胞化神経群においては、抗 GFP 抗体で染色される細胞をグラフト内にほとんど認めなかったことから、付加した dASC の大部分は長期生存せず、レシピエント神経から遊走してきたシュワン細胞に置換されることが示唆された。

(2) 機能回復評価、再生神経の組織形態学的評価、および支配筋評価

現時点で全ての動物モデルの評価が完了

していないために統計学的評価は今後行っていく必要があるものの、足跡分析による運動機能回復において、細胞付加無細胞化神経群は無細胞化神経のみの群に比べて有意に速い機能回復速度を認めている。一方で、自家神経グラフト群は他の2群に比べて有意に速い機能回復を示している。

まとめ

本研究の結果から、現在自家神経グラフトに次いで最も良好な治療成績を収めている無細胞化神経グラフトに dASC を付加することで軸索再生、機能回復速度の促進効果が得られることが確認できた。一方で、付加細胞の長期的な生存は認めていないことから考えると、現在の方法では3cm以上の長距離神経欠損への応用は困難であることが示唆される。その理由として *in vitro* において dASC はシュワン細胞への完全な分化は達成しておらず、移植先の環境によっては再び脱分化を来たしてしまうことが考えられる (Eur J Neurosci 43:417-30, 2015)。従って、この問題を解決するためには今後、*in vitro* においてより完全なシュワン細胞へ分化する細胞の開発を行っていく必要があると考えられる。

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 3件)

Tomita K, Nishibayashi A, Yano K, Hosokawa K. Adipose-derived stem cells protect against endoneurial cell death: Cell therapy for nerve autografts. *Microsurgery*, 35(6) 474-80, 2015

doi: 10.1002/micr.22451.

Tomita K, Nishibayashi A, Yano K, Hosokawa K. Differentiated adipose-derived stem cells promote reinnervation of rat skin flaps.

Plastic and Reconstructive Surgery Global Open 1(3):e22, 2013

doi: 10.1097/GOX.0b013e318299134d.

Tomita K, Madura T, Sakai Y, Yano K, Terenghi G, Hosokawa K. Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: Implications for cell-based transplantation therapy.

Neuroscience 236(16):55-65, 2013

doi:

10.1016/j.neuroscience.2012.12.066

[学会発表](計 3件)

富田 興一 他、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた末梢神経損傷治療、第24回日本形成外科学会基礎学術集会、平成27年10月9日、岩手県盛岡市

西林 章光 他、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた皮膚知覚回復向上の試み、第24回日本形成外科学会基礎学術集会、平成27年10月9日、岩手県盛岡市

富田 興一 他、幹細胞を融合した強化型自家神経グラフトの開発：グラフト内シュワン細胞に対する細胞治療法、第23回日本形成外科学会基礎学術集会、平成26年10月10日、長野県松本市

6. 研究組織

(1)研究代表者

細川 互 (HOSOKAWA KO)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20181498

(2)研究分担者

富田 興一 (TOMITA KOICHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：90423178

西林 章光 (NISHIBAYASHI AKIMITSU)

大阪大学・医学部付属病院・医員

研究者番号：00647133

金澤 成行 (KANAZAWA SHIGEYUKI)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：50506243