

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462240

研究課題名(和文) 骨髄間葉系幹細胞移植した同種脱細胞化神経片含有血管柄入りチューブ内での神経再生

研究課題名(英文) Nerve regeneration through A vessel-containing nerve conduit implanted with bone marrow stromal cells and decellularized allogenic nerve matrix

研究代表者

柿木 良介 (KAKINOKI, Ryosuke)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20314198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：血管束と骨髄間葉系細胞、脱細胞化同種神経マトリックスを導管内へ移植した新規人工神経の成績を、ラット坐骨神経モデル(20 mm欠損)を用いて自家神経移植と比較した。術後24週の人工神経移植術群は神経移植術群と比較して後肢足底部接地面積が有意に大きく、接地圧も大きい傾向が見られた。足底内転筋での複合筋活動電位の振幅、運動神経伝導速度も、人工神経群の方が神経移植群に勝る傾向を認めた。再生神経の組織形態学的検索でも、有髄軸索線維数は人工神経群で少ないが、その直径は大きい傾向が見られた。この人工神経内の神経再生は、自家神経移植に匹敵した。

研究成果の概要(英文)：Nerve regeneration in a novel artificial nerve conduit implanted with a vascular bundle and decellularized allogenic nerve matrix seeded with bone marrow stromal cells was investigated in comparison with that in an autologous nerve graft, using a rat sciatic nerve model with a 20mm gap. Gait analysis at 24 weeks showed that in the conduit group, the area of the foot print and contact pressure of the operated hind limb were significantly greater than that in the autograft group. The conduit group was superior to the autograft group, regarding the amplitude of the compound muscle action potential in the pedal adductor muscle and the motor nerve conduction velocity. In the conduit group, the number of the myelinated axons was smaller and the diameter of the nerve fibers was larger when compared with the autograft group. Nerve regeneration through this nerve conduit was compatible with that through an autogenous nerve graft.

研究分野：peripheral nerve surgery

キーワード：vascular bundle stem cell allogenic nerve artificial nerve conduit

1. 研究開始当初の背景

通常的人工神経は中空構造の導管であり、その基本概念は tubulization である。

近年、組織工学の発展に伴い、tubulization に何らかの改良を加えて神経再生を促進させる試みが報告されてきている¹⁾。我々はこれまでに、神経導管内に血管茎を挿入したモデル (vessel-containing tube:以下 VCT) を考案し、tubulization による末梢神経再生に対して、導管内へ移植した血管が果たし得る効果や VCT に改良を加えた人工神経について報告してきた。ラット坐骨神経の silicon chamber model に、血管束を移植する(VCT) と、導管内には移植血管からの微小血管網が形成され、架橋可能な神経断端距離が延長でき、導管内の神経再生速度は加速した²⁾。さらに、VCT 内に骨髄間葉系細胞(bone marrow stromal cells:以下 BMSCs)を移植したところ、移植細胞はその一部がシュワン細胞様細胞へと分化し、VCT 単独の群や、VCT に細胞成分として線維芽細胞を移植した群よりも有意に良好な神経再生が得られた³⁾。これら結果を踏まえて、血管茎の挿入されたポリ乳酸とポリカプロラク톤の重合体から作成した神経導管内に自家 BMSCs を移植した人工神経でイヌ尺骨神経 30mm 欠損を架橋した。イヌという高等動物での混合神経 30mm 欠損での神経再生は、なお自家神経移植術には及ばなかった⁴⁾。

2. 研究の目的

Ide らは同種神経に脱細胞化処置を加えることで、神経再生に有利に働く細胞外マトリックス (extracellular matrix:以下 ECM) は温存されつつも、同種組織移植の際に問題となる抗原性が無くなることを報告した⁵⁾。我々はこの脱細胞化同種神経マトリックス (decellularized allogenic nerve matrix: 以下 DANM)に着目し、BMSCs を移植した VCT 内に、更に足場として DANM を移植した新規人工神経を考案した。今回我々は、VCT に BMSCs 移植と DANM 移植を組み合わせた新規人工神経移植術は、現在の標準的治療である自家神経移植術の代替療法となり得ると仮説を立て、ラット坐骨神経 20 mm 欠損モデルを用いて、この新規人工神経移植術の成績を自家神経移植術と比較した。また、VCT 内における DANM の再血行化と抗原性についても組織学的に評価した。

3. 研究の方法

(1) 動物

雌 Lewis ラット (RT-1^l, 9-11 週齢, 180-220 g)を 48 匹、雌 Dark Agouti (DA)ラット (RT-1^a, 9-11 週齢, 160-180 g)を 16 匹用いた。

(2) DANM の作成

Lewis ラットと major

histocompatibility mismatch のある DA ラットの坐骨神経から DANM を作成した。⁶⁾ DANM の作成は Ide らの方法^{5),7)}に準じて液体窒素内に浸漬させて行った。

(3) BMSCs 採取

BMSCs 採取には過去の論文を参照して行った。^{3),8)} 移植細胞としては第 5 継代の細胞を使用した。

(4) 手術手技と実験群

Lewis ラットの右坐骨神経の 20 mm 欠損を人工神経(D+V+B 群, n=10)あるいは自家神経(Auto 群, n=10)で架橋して再建した。D+V+B 群では、まず、15 mm の坐骨神経を切除。20 mm の DANM で欠損部を架橋し、架橋部を 23 mm のシリコンチューブ内にスリット越しに挿入した。腓腹動静脈血管束のみを踵にデザインしたモニター皮弁と共に挙上し、シリコンチューブ内に挿入して、スリットを 5-0 ナイロン糸で閉鎖。最後に BMSCs を 3×10^6 個移植した。Auto 群では 20 mm の長さの坐骨神経を切離し、180 度反転してから再び同部位に縫合した。

また、DANM の再血行化と抗原性評価のために、Auto 群を 3 匹追加して作成したのに加えて、以下の実験群も作成した。D+V+B 群の手術手技のうち、DANM による架橋と血管茎移植は行うが BMSC 移植は行わない群 (V+D 群, n=12) DANM による架橋のみを行う群(D 群, n=9)、20 mm の DA ラットの坐骨神経を採取後、脱細胞化処理を行わずにそのまま Lewis ラットの欠損部に移植を行った群(Allo 群, n=3)。

(5) 再生神経評価

D+V+B 群の 10 匹、Auto 群の 10 匹について、術後 24 週に、以下の項目で再生神経の評価を行った。

歩行解析

CatWalk XT (Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands) を用いた歩行解析を行った。手術した右後肢の足底部最大接地面積と最大接地圧を健側である左後肢の値に対する割合(%)で評価した。

電気生理学的評価

歩行解析の後、左右の坐骨神経を剖出し、梨状筋の遠位部(S1)と膝窩部(S2)を針電極で刺激し、足底内転筋の近位部、遠位部に刺入した 1 対の針電極で複合筋活動電位 (compound muscle action potential: CMAP) を計測した。^{2),3),9)}

組織学的評価

電気生理学的評価の後、再生神経を摘出し遠位縫合部から 5 mm 近位部で 1 μ m の横断準超薄切片を作成し、トルイジンブルー染色して光学顕微鏡(Nikon ECLIPSE 80i)下に観察。有髄軸索数を計測した。引き続き、超薄切片を切り出して、酢酸ウランとクエン酸

鉛で二重染色した後、透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscopy: TEM, HITACHI H-7000 型) で観察して、2 有髄軸索直径を計測した。画像解析には Image J 用いた。

(6) VCT 内における DANM の評価

再血行化の評価

D+V 群と D 群(陰性対照)を 9 匹ずつ使用した。術後 5 日、1 週、4 週で、各群 3 匹ずつを屠殺し、導管内中央部組織を採取した。4%パラホルムアルデヒドに浸漬固定した後、中央部横断面で 16 μm の凍結切片を作成。プロテインキナーゼ K(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)で抗原賦活化を行ったあと、ロバ血清を用いてブロッキングを行った。一次抗体(mouse monoclonal antibodies to rat endothelial cell cytoplasmic antigen (RECA-1) (1:40, AbD Serotec, Kidlington, UK)と 4 で 24 時間、二次抗体(donkey anti-mouse IgG (H+L) whole antibodies; CFTM543 fluorescent reagents (1:200, Biotium, Hayward, CA, US)と室温 1 時間反応させた後、共焦点蛍光顕微鏡 (Nikon D-Eclipse C1 confocal microscope; Nikon)を用いて観察した。

抗原性の評価

術後 4 週で、D+V 群、Allo 群(陽性対照)、Auto 群(陰性対照)の各群 3 匹ずつを屠殺し、導管あるいは移植片の遠位 1/3 の組織を採取。縦断面で 16 μm の凍結切片を作成し、一次抗体(mouse monoclonal antibodies to CD8a (細胞傷害性 T 細胞の表面抗原) (1:10, AbD Serotec)、二次抗体(donkey anti-mouse IgG (H+L) whole antibodies; CFTM488 fluorescent reagents (1:200, Biotium))と反応させた後、共焦点蛍光顕微鏡で観察。200 倍率像でランダムに 5 視野を抽出して CD8 陽性細胞数/視野を計測した。

(7) 統計

値は平均値 \pm SD で表示した。再生神経評価の結果の統計学的分析には t 検定を用いた。抗原性評価における CD8 陽性細胞数計測結果は one-way ANOVA を行った後に Tukey-Kramer 検定で統計学的分析を行った。P 値は 0.05 未満を有意差とした。

4 . 研究成果

(1) 再生神経評価(D+V+B 群, n=10 vs Auto 群, n=10)

歩行解析

D+V+B 群は Auto 群に比較して有意に足底部接地面積が大きかった (37.7 \pm 7.3% vs 17.8 \pm 6.9%, P<0.05)。また、接地圧も大きい傾向を有したが、両群間に有意差はなかった (79.6 \pm 12.1% vs 53.1 \pm 19.0%, P=0.06)。

電気生理学的検査

D+V+B 群と Auto 群の複合筋活動電位の振幅(64.3 \pm 19.6% vs 49.0 \pm 21.3%, P=0.11)、ならびに運動神経伝導速度(59.2 \pm 12.8% vs 57.9 \pm 14.0%, P=0.83)はいずれも、D+V+B 群の方が Auto 群に勝っていたが、有意差はなかった。

組織形態学的評価

D+V+B 群は Auto 群に比較して、有髄軸索線維数(5133 \pm 899 vs 6556 \pm 1991, P=0.07)は少ないが、その直径(3.96 \pm 0.56 μm vs 3.67 \pm 0.52 μm , P=0.28)は大きい傾向が見られた(図 1.B, 表 1)。

(2) VCT 内における DANM の評価

再血行化の評価(D+V 群, n=9 vs D 群, n=9)

D+V 群では、術後 5 日目の DANM 内に RECA-1 陽性細胞は見られなかったが、術後 1 週間では挿入した血管茎の近傍の DANM 内に RECA-1 陽性細胞を認めるようになり、術後 4 週では DANM 内全体に RECA-1 陽性細胞が観察された。一方 D 群では、術後 4 週においても、DANM 内には殆ど RECA-1 陽性細胞は見られなかった。(図 2.A)

抗原性の評価(D+V 群, n=3 vs Allo 群, n=3 vs Auto 群, n=3)

術後 4 週の導管内 DANM および移植片遠位部組織の 1 視野あたりの CD8 陽性細胞数は D+V 群、Allo 群、Auto 群で、それぞれ 21 \pm 6、102 \pm 34、51 \pm 21/視野であった。D+V 群の DANM に見られた CD8 陽性細胞数は Allo 群で見られた数に比較して有意に少なく (P<0.05)、また Auto 群とは有意差がなかった。(P = 0.15)

(3) 考察

今回用いた人工神経管腔内および DANM 内では、移植した血管束からの新生血管網により、良好な血流環境が早期に形成される。移植した BMSCs は、グリア系細胞への直接分化^{3),10)}と NGF や BDNF などの神経栄養因子の分泌¹¹⁾により、神経再生に促進的に作用するが、良好な管腔内血行動態と十分な足場の存在により、管腔内での生着・生存率は上昇し、より大きな神経再生促進効果を発揮することが期待出来た。また、管腔内には、神経両断端から放出される神経栄養因子に加えて、移植した BMSCs、神経損傷部位に遊走してくるレシピエントのシュワン細胞、マクロファージ、線維芽細胞などが産生する各種サイトカイン^{12),13)}が充満する。このように、本人工神経の管腔内に血行、細胞、足場、成長因子の要素を含んだ末梢神経再生に適した微小環境が形成されていることが、良好な神経再生につながったと考えた。

今回我々は骨髄間葉系細胞を未分化のまま移植したが、脂肪組織中の間葉系細胞等を含んだヘテロな細胞 (Adipose-derived

regenerative cells: ADRCs)を分化誘導させることなく用いる方法¹⁴⁾や骨髄間葉系幹細胞をグリア系細胞へ分化させてから移植する方法¹⁵⁾、iPS細胞から誘導したneurosphereを用いる方法¹⁶⁾などが試みられ、それぞれに神経再生促進作用が報告されてきている。我々は、整形外科医としてアプローチしやすい組織である骨髄から採取出来る細胞で、かつ、これまでに臨床応用実績も蓄積されてきている骨髄間葉系細胞¹⁷⁾を、採取から移植までの処置をなるべく少なくする形で用いることが、臨床応用を考えた際に実現性・有用性が高い方法であろうと考えている。

臨床応用を考えた場合には、骨髄間葉系細胞の腫瘍化の問題、DANMの保存方法と期間などについての更なる研究や、高等動物における本人工神経の有効性の検討も必要ではあるが、血管茎(血行)と骨髄間葉系細胞(細胞)、同種神経細胞外マトリックス(足場)を含む神経導管は、自家神経移植に取って代わりうる、人工神経開発の基本的戦略の1つとなり得ると考えた。

引用文献

- 1) Meek MF, Coert JH. US Food and Drug Administration/Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Ann Plast Surg.* 2008; 60: 110-116.
- 2) Kakinoki R, Nishijima N, Ueba Y, et al. Relationship between axonal regeneration and vascularity in tubulation-an experimental study in rats. *Neurosci Res.* 1995; 23: 35-45.
- 3) Yamakawa T, Kakinoki R, Ikeguchi R, et al. Nerve regeneration promoted in a tube with vascularity containing bone marrow-derived cells. *Cell Transplant.* 2007; 16: 811-822.
- 4) Kaizawa Y, Kakinoki R, Ikeguchi R, et al. Bridging a 30 mm defect in the canine ulnar nerve using vessel-containing conduits with implantation of bone marrow stromal cells. *Microsurgery.* 2015 Mar 14. doi: 10.1002/micr.22391. [Epub ahead of print]
- 5) Ide C, Tohyama K, Yokota R, et al. Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res.* 1983; 288: 61-75.
- 6) Lassner F, Schaller E, Steinhoff G, et al. Cellular mechanisms of rejection and regeneration in peripheral nerve allografts. *Transplantation.* 1989; 48: 386-392.
- 7) Gulati AK, Cole GP. Nerve graft immunogenicity as a factor determining axonal regeneration in the rat. *J. Neurosurg.* 1990; 72: 114-122
- 8) Nijhuis TH, Brzezicki G, Klimczak A, et al. Isogenic venous graft supported with

bone marrow stromal cells as a natural conduit for bridging a 20 mm nerve gap. *Microsurgery.* 2010; 30: 639-645.

- 9) Ikeguchi R, Kakinoki R, Matsumoto T, et al. Peripheral nerve allografts stored in green tea polyphenol solution. *Transplantation.* 2005; 79: 688-695.
- 10) Cuevas P, Carceller F, Dujovny, M et al. Peripheral nerve regeneration by bone marrow stromal cells. *Neurol Res.* 2002; 24: 634-638.
- 11) Wang J, Ding F, Gu Y, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. *Brain Res.* 2009; 1262: 7-15.
- 12) Luk HW, Noble LJ, Werb Z. Macrophages contribute to the maintenance of stable regenerating neurites following peripheral nerve injury. *Neurosci Res.* 2003; 73: 644-658.
- 13) Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, et al. EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell.* 2010; 143: 145-155.
- 14) Mimura T, Dezawa M, Kanno H, et al. Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell-derived Schwann cells in adult rats. *J Neurosurg.* 2004; 101: 806-812.
- 15) Sukanuma S, Tada K, Hayashi K, et al. Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration. *J Orthop Sci.* 2013; 18: 145-151.
- 16) Uemura T, Ikeda M, Takamatsu K, et al. 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: 78-91.
- 17) Kuroda Y, Kitada M, Wakao S, et al. Bone marrow mesenchymal cells: how do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2011; 59: 369-378.

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. 貝澤幸俊, 柿木良介, 真鍋克次郎, 岡田欣文, 池口良輔, 太田壮一, 白数健太郎, 織田宏基, 淘江宏文, 松田秀一 脱細胞化同種神経マトリックスと骨髄間葉系細胞を移植した血管含有神経導管 自家神経移植術との比較 末梢神

経;27(1):88-97(2016.06)

2. Kaizawa Y, Kakinoki R, Ikeguchi R, Ohta S, Noguchi T, Takeuchi H, Oda H, Yurie H, Matsuda S. A nerve conduit containing a vascular bundle and implanted with bone marrow stromal cells and decellularized allogenic nerve matrix. Cell Transplant. 2016 Feb 16;26(2):215-228. doi: 10.3727/096368916X692951.

〔学会発表〕(計 2件)

1. 貝澤幸俊, 柿木良介, 真鍋克次郎, 岡田欣文, 白数健太郎, 池口良輔, 太田壮一, 織田宏基, 淘江宏文, 松田秀一 脱細胞化同種神経基底膜と骨髄間葉系細胞を移植した血管茎含有神経導管 自家神経移植術との比較. 第26回日本末梢神経学. 2015.9.18,19 信州大学(松本市)

2. 貝澤幸俊, 柿木良介, 池口良輔, 太田壮一, 野口貴志, 織田宏基, 松田秀一. 脱細胞化同種神経基底膜を含む血管茎含有導管に未分化骨髄間葉系幹細胞を移植した人工神経における末梢神経再生. 第29回日本整形外科学会基礎学術集会. 2014.10.9-10 鹿児島大学(鹿児島市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

柿木 良介 (KAKINOKI, Ryosuke)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 20314198

(2)研究分担者

赤木 将男 (AKAGI, Masao)
近畿大学・医学部・教授
研究者番号: 00273441

松田 秀一 (MATSUDA, Shuichi)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号: 40294938

太田 壮一 (OHTA, Souichi)
京都大学・医学部研究科・助教
研究者番号: 70592484