

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09493

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞と脱細胞性自家筋肉基底膜を移植した血管柄付き吸収性神経誘導管

研究課題名(英文) Bio-permeable nerve conduits containing isogenic acellular muscle basal lamellae and bone marrow mesenchymal stem cells

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：シリコンチューブ内に腓腹動静脈茎、同種無細胞性神経基底膜、骨髄幹細胞を移植した神経誘導管を作成し、ラット坐骨神経の20mm欠損を架橋した。結果は新鮮自家神経移植での神経再生とほぼ同等の神経再生を獲得できた。同種神経の使用には、移植免疫、感染、倫理問題など解決しなければならない多くの問題がある。我々は、無尽蔵に採取でき、移植に伴う拒絶反応がなく、また移植倫理で問題のない自家筋肉基底膜に着目した。本研究では、同種無細胞性神経基底膜の代わりに自家無細胞性筋肉基底膜をシリコンチューブ内に挿入し、神経再生を観察した。神経再生にはシュワン細胞が移動できる構造的空間が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工神経を作成するためには、神経再生に適した足場の開発が必須である。足場には、lamininなどの接着因子のみならず、シュワン細胞の移動を許容する空間が必要であることがわかった。本研究は、今後の人工神経開発の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：We have created an artificial nerve conduit model made of a silicone tube containing a sural vascular pedicle and decellularized allogenic nerve basal lamellae implanted by bone marrow derived mesenchymal stem cells. The nerve regeneration through the tube with a 20mm-interstump gap in a rat sciatic nerve was almost equal to that through a 20mm-long fresh nerve isograft. However, the use of allogenic nerves in the clinical setting is associated with several big problems that should be solved, including immunological responses, infectious disease transmission and ethical problems. The aim of this study was to investigate whether decellularized isogenic nerve basal lamellae (DIML) could be a substitute of decellularized allogenic nerve basal lamellae (DANL). Nerve regeneration occurred in the DANL and around the DIML. Scaffolds promoting nerve regeneration need the space that accommodates Schwann cell migration.

研究分野：手外科、末梢神経外科学

キーワード：末梢神経再生 人工神経 血行 細胞 足場 成長因子 同種無細胞性神経基底膜 自家無細胞性筋肉基底膜

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Lundborgらにより、神経断端をシリコンチューブで架橋するとチューブ内に神経再生がおこることが発見された。しかしながらチューブ内の再生神経は、神経断端を自家神経移植で架橋した場合に比較して、再生神経軸索数は少なく、再生軸索直径は細く、神経再生距離も限られていると報告されている。

我々は坐骨神経20mm欠損を、シリコンチューブ管腔内に血管柄、凍結解凍処理した脱細胞化同種神経基底膜(decellularized allogenic nerve basal lamellae; DANBL)、骨髄幹細胞を移植して神経欠損を架橋したところ、24週時点でほぼ自家神経移植と同等の神経再生を得た(Kaizawa Y. et al. Cell Transplant 2017)。さらに我々は臨床応用を視野に置いて、シリコンチューブを生体分解性のあるNerbridge外套管にかえたところ、24週時点で自家神経移植の70-80%の神経再生を獲得できた。(Tanaka H et al. Plos1 2021)。しかし同種神経移植には、感染、拒絶反応などの生物学的問題のみならず、同種組織を使用することに対する倫理的問題がある。

### 2. 研究の目的

今回我々は、DANBLの生物学的、倫理的欠点を補完する方法として、自家脱細胞化筋肉基底膜(decellularized isogenic muscle basal lamellae; DIMBL)に着目した。筋肉には基底膜が存在し、その基底膜には laminin などの接着因子が残存しているため、神経再生の足場として利用できるのではないかと考えた。われわれの前回研究と同様、ラット坐骨神経20mm欠損をシリコンチューブで架橋し、チューブ内に血管茎、DIMBL、骨髄間葉系幹細胞を移植し、その神経再生をDANBLと比較することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) DIMBLチューブの作成

Lewisラットを用いて腓腹動静脈茎を挙上し、大腿部に翻転し、坐骨神経に20mm欠損を作成し、それを腓腹動静脈茎含有シリコンチューブ(VCT)で架橋した。

#### (2) DIMBL, DANBLの作成

ラットの大腿四頭筋より筋肉を採取し、液体窒素にて frozen and thaw を3回繰り返して、1mmX1mmX20mmのDIMBLを作成した。同様にDAラットの坐骨神経を液体窒素処理して、20mm長のDANBLを作成した。

#### (3) 骨髄間葉系幹細胞(BMSC)の移植

Lewisラットの大腿骨、脛骨より骨髄を採取し、in vitroで培養し、5-6 passageのBMSCを作成した。VCT内に20mm長のDIMBLと $1 \times 10^7$ 個のBMSCを移植した群(VMC)、VCT内に20mm長のDANBLと $1 \times 10^7$ 個のBMSCを移植した群(VNC)を作成した。

(4)移植後 12週、24週の時点でVMC、VNC群それぞれ8匹の坐骨神経の運動神経伝導速度、足部内転筋での複合筋活動電位 CMAP を測定した。また24週での再生神経遠位端から5mm中樞部で切片を作成し、トルイジンブルー染色し、有髄神経軸索総数、平均軸索直径を測定した。

(5)さらに移植前のDANBLとDIMBLの横断切片を作り、エボン包埋して電子顕微鏡切片を作成した。切片中央部の100個の基底膜間短径の距離を測定した。

### 4. 研究の結果

#### (1)電気生理学的解析

12週で、CMAPを測定できたラットの数、VNC 7頭、VNC 1頭であった。

24週では、VNC 8頭、VNC 4頭であった。

24週での運動神経伝導速度は、対側健側坐骨神経のVNC $57.2 \pm 14.3\%$ 、VNC $24.2 \pm 13.2\%$ であった。CMAP amplitudeは、健側坐骨神経のVNC $88.2 \pm 21.3\%$ 、VNC $31.3 \pm 16.2\%$ であった。個体数が少なく統計処理できないが、VNC内での神経再生はVNCより明らかに劣っていた。

#### (2)移植後24週組織形態学的解析

再生軸索総数 VNC:  $7120 \pm 1930$  VNC:  $1830 \pm 832$

再生軸索直径 VNC:  $2.84 \pm 1.22 \mu\text{m}$  VNC:  $1.23 \pm 0.57 \mu\text{m}$

個体数が少なく統計処理できないが、VNC内での神経再生は、再生軸索総数、再生軸索直径ともにVNCより明らかに劣っていた。またVNCでは、神経再生はDANBLの中を、VNCではDIMBLの外側に認められた。

#### (3)電子顕微鏡での基底膜間距離の短径

DANBL;  $5.04 \pm 2.22 \mu\text{m}$ 、DIMBL;  $2.01 \pm 1.24 \mu\text{m}$  ( $p < 0.001$ )

DIMBL内の基底膜感距離は有為にDANBL内の基底膜感距離より狭かった。

#### (4)DANBL、DIMBLの免疫染色

DANBL、DIMBLの凍結横断雪片を作成し、抗 laminin 抗体染色を行なった。両組織とも基底膜

上に laminin の存在が確認された。

#### 5. 研究の考察

DIBML では、DANBL に比較して、基底膜間の距離が小さく、Schwann cell が DIBML に侵入できなかったものと考えられる。今後の人工神経作成に関して神経再生の scaffold の作成は、非常に大きな問題となるが、laminin などの細胞接着因子の存在のみならず、構造的に Schwann cell が侵入しやすい空間を持たせた scaffold の作成が大切と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ryosuke Kakinoki, Masao Akagi	4. 巻 19
2. 論文標題 Artificial Nerve Containing Stem Cells, Vascularity and Scaffold; Review of Our Studies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Reviews and Reports	6. 最初と最後の頁 382 ~ 391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12015-022-10467-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Tanaka, Ryosuke Kakinoki, Yukiotoshi Kaizawa, Hirofumi Yurie, Ryosuke Ikeguchi, Masao Akagi	4. 巻 16
2. 論文標題 Bone marrow-derived mesenchymal stem cells transplanted into a vascularized biodegradable tube containing decellularized allogenic nerve basal laminae promoted peripheral nerve regeneration; can it be an alternative of autologous nerve graft?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0254968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0254968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ryosuke Kakinoki, Yukiotoshi Kaizawa, Ryosuke Ikeguchi, Hiroki Tanaka, Yukiko Hara, Kazuhiro Otani, Masao Akagi
2. 発表標題 An artificial nerve made of a PGA fiber mesh cylinder containing stem cells and decellularized allogenic nerve
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿木良介 田中寛樹 貝澤幸俊 池口良輔 大谷和裕 赤木将男
2. 発表標題 自家神経移植と同等の神経再生能力を有する人工神経開発のための今後の課題(合同シンポジウム14(日本末梢神経学会)末梢神経障害とりハビリテーション医学)
3. 学会等名 第59回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿木良介 田中寛樹 貝澤幸俊 池口良輔 大谷和裕 赤木将男
2. 発表標題 再生医学をもとにした人工神経作成への基礎的アプローチ(教育講演)
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柿木良介 田中寛樹 原 佑紀子 大谷和裕 赤木将男 貝澤幸俊 淘江宏文 池口良輔
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞及び同種基底膜移植により作成した人工神経鞘に関する研究(シンポジウム1:末梢神経再生医療(人工神経含む))
3. 学会等名 第32回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中寛樹 柿木良介 貝澤幸俊 淘江宏文 池口良輔 赤木将男
2. 発表標題 骨髄間葉系細胞及び同種基底膜移植により作成した人工神経鞘に関する研究
3. 学会等名 第47回日本マイクロサージャリー学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	赤木 将男  (AKAGI Masao)  (00273441)	近畿大学・医学部・教授   (34419)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------