

令和元年6月19日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10872

研究課題名(和文) 臨床応用へ向けたヒトiPS細胞移植と人工神経による末梢神経再生治療法の確立

研究課題名(英文) Peripheral nerve regeneration using nerve conduit in combination with human iPS cells

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・客員研究員

研究者番号：10597321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトiPS細胞と人工神経を用いてラットの末梢神経再生を行った。まず、ヒトiPS細胞(201B7)から分化誘導した第4世代神経前駆細胞を人工神経上で14日間培養し、iPS細胞付加ハイブリッド型人工神経を作製した。

次に、免疫不全ラットの坐骨神経欠損(5mm)に、iPS細胞付加ハイブリッド型人工神経を移植した。移植後12週において人工神経単独移植群に比べて、下肢機能回復が促進し、再生軸索数が増大した。組織学的に腫瘍化は認めなかった。自家神経移植群が最も下肢機能が回復し、再生軸索数も最大であった。人工神経にヒトiPS細胞由来神経前駆細胞を付加することでラットの末梢神経再生が促進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、1)ヒトiPS細胞と人工神経を併用した末梢神経再生の基礎研究である、2)ヒトiPS細胞移植の安全性と有効性を実証することで、ヒトiPS細胞移植の臨床応用に直結する研究である、3)自家神経を犠牲にして移植する従来法の神経移植に代わる新しい再生治療法となりうる、があげられる。本研究によって、ラット末梢神経損傷に対するヒトiPS細胞移植の安全性と有効性が確認されれば、末梢神経再生に対するヒトiPS細胞移植の臨床応用に向けて重要な基盤研究結果となり、今後は大型動物を用いてヒトiPS細胞移植の安全性と有効性の確認の実験系へとつなげることができる。

研究成果の概要(英文)：Peripheral nerve gaps in rats were repaired using nerve conduits in combination with human induced pluripotent stem cell (iPSc). First, the fourth neurospheres derived from human iPScs (201B7) were suspended in each conduit (4000,000 cells per conduit) and cultured for 14 days. Second, sciatic nerve 5mm gaps in athymic nude rats were reconstructed in the following groups: nerve conduit alone, nerve conduit coated with human iPSc-derived neurospheres (iPSc group), and autograft. After 12 weeks, motor and sensory functional recovery in rats were improved better in the iPSc group than the control group. Histological analysis indicated axonal regeneration in the iPSc group was more vigorous than the control group. The fastest functional recovery and the greatest axon regeneration occurred in the autograft group. Peripheral nerve regeneration using nerve conduits and functional recovery in rats was accelerated by a combination of human iPSc-derived neurospheres and nerve conduits.

研究分野：整形外科 末梢神経再生

キーワード：iPS細胞 人工神経 末梢神経 再生医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、四肢の末梢神経欠損に対する標準治療は自家神経移植であるが、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。これまでの研究成果 (科研費基盤研究 C 平成 21 年度「21591904」、平成 25 年度「25462300」) から、マウス iPS 細胞由来の神経前駆細胞を人工神経と移植することによって、マウス坐骨神経損傷モデルにおいて長期的に安全でかつ効率的な神経再生が得られることを実証した。

次に iPS 細胞の臨床応用へ向けて、本研究ではヒト iPS 細胞を用いて免疫不全ラットの末梢神経再生を行い、ヒト iPS 細胞移植の有効性について検証した。本研究によって、ラット末梢神経損傷に対するヒト iPS 細胞移植の有効性が確認されれば、自家神経を犠牲にしていた従来の神経移植治療に取って代わる新しい再生医療 - iPS 細胞移植による末梢神経再生 - の臨床応用へまた一歩近づくこととなる。

2. 研究の目的

本研究ではヒト iPS 細胞と人工神経を併用して免疫不全ラットの末梢神経再生を行った。

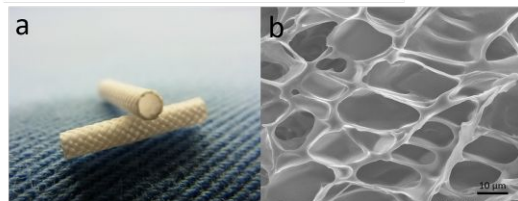
3. 研究の方法

(1) iPS 細胞付加ハイブリッド型人工神経の作製

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。サイズはラットの坐骨神経に合わせて内径 2mm、外径 3mm、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。ニューロスフェア法によって、ヒト iPS 細胞 (201B7) から第 4 世代神経前駆細胞を分化誘導した。次に神経前駆細胞を人工神経に充填し (1 本あたり細胞数 400 万個) *in vitro* で 14 日間培養することで人工神経に生着させ、iPS 細胞付加ハイブリッド型人工神経を作製した。付加した iPS 細胞神経前駆細胞の分化を評価するために、人工神経の短軸横断切片を用いて抗 Tuj-1 抗体 (未分化神経細胞マーカー) 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。

図1. 人工神経

a: 外観
b: 内層 (走査型電子顕微鏡写真)



(2) 免疫不全ラット坐骨神経欠損モデルに対する iPS 細胞付加ハイブリッド型人工神経の移植
無胸腺ヌードラット (F344/NJcl-rnu/rnu、オス 8 週齢、Japan SLC, Inc., Hamamatsu, Japan) の左坐骨神経に作成した 5mm の神経欠損部を以下の 3 群で移植再建した。

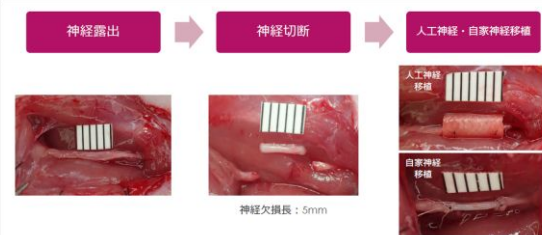
人工神経群; 人工神経単独で再建 (n=8)

ハイブリッド群; iPS 細胞ハイブリッド型人工神経で再建 (n=6)

自家神経群; 自家神経移植で再建 (n=8)

人工神経群、ハイブリッド群は、遠位・近位の各神経断端を人工神経断端に 1mm ずつ引き込み、内層面に 9-0 ナイロンで顕微鏡下にマットレス縫合した (図 2)。自家神経群は 5mm 長で切離した坐骨神経を 180° 回転させて、各々の神経断端に 9-0 ナイロンで顕微鏡下に端々縫合した。

図2. 神経移植 (ラット坐骨神経)



以上の 3 群で坐骨神経欠損を移植再建した後、ラットの知覚・運動機能回復について経時的 (4, 8, 12 週) に比較検討した。知覚機能については、Planter test によって評価し、足底から赤外線刺激を行い、足趾を逃避させるまでの時間 (秒) を自動計測した。運動機能については、George らの報告に基づき foot print を用いて、患側 (experimental print length; EPL) と健側 (normal print length; NPL) の足趾長から導いた Print Lengths Factor (PLF = (EPL-NPL)/NPL) を指標として、1 匹あたり 3 点計測しその平均値を算出した。また移植後 12 週で、腓腹筋の湿重量を計測し筋萎縮の程度を評価した。

移植後 12 週で人工神経および移植自家神経を採取し、中央部横断切片で組織学的評価を行った。再生軸索の評価のために抗 neurofilament protein (NFP) 抗体 (DAKO, Tokyo, Japan) による免疫染色を行い、画像処理ソフト (Image J) を用いて定量評価を行った。

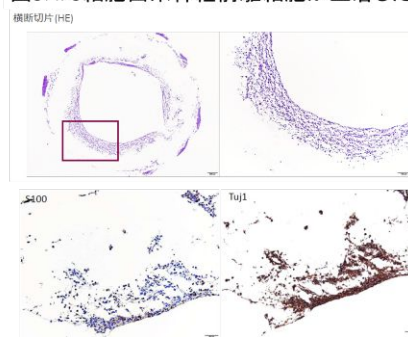
4. 研究成果

(1) iPS 細胞付加ハイブリッド型人工神経の作製

人工神経に生着したヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞は抗 Tuj-1 抗体および抗 S-100 抗体が陽

性であり、iPS 細胞由来神経前駆細胞は一部シュワン様細胞に分化して人工神経に生着していた(図3)

図3. iPS細胞由来神経前駆細胞が生着した人工神経



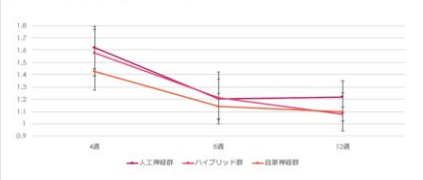
(2)免疫不全ラット坐骨神経欠損モデルに対するiPS細胞付加ハイブリッド型人工神経の移植

知覚機能回復(Planter test)の結果、4, 8, 12週のいずれにおいても自家神経群、ハイブリッド群、人工神経群の順に知覚回復していた(図4)。運動機能回復の結果も同様に8週と12週において自家神経群とハイブリッド群は、人工神経群に比較してPLF値が低くなる傾向があった。腓腹筋湿重量は、自家神経群、ハイブリッド群、人工神経群の順に大きかった。

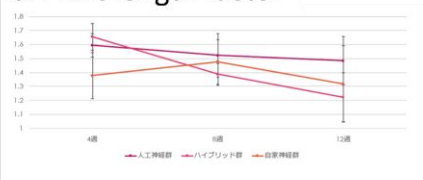
移植後12週で採取した人工神経および移植神経の中央部横断切片の組織では、抗NFP抗体陽性の再生軸索が全ての群で認められた。これら抗NFP抗体陽性軸索数の定量結果は、自家神経群、ハイブリッド群、人工神経群の順に大きい値であった(図5)。組織学的に腫瘍性病変を認められたものはなかった。

図4. 知覚・運動機能回復

a. Planter test



b. Print length factor



c. 腓腹筋湿重量(健側比)

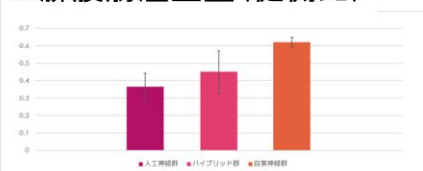
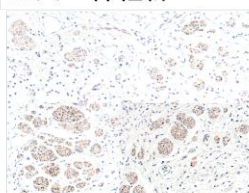
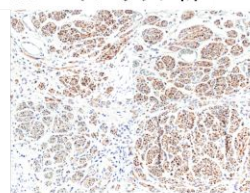


図5. 再生軸索(免疫染色; 抗NFP抗体)

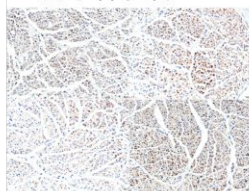
a. 人工神経群



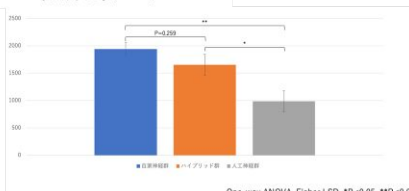
b. ハイブリッド群



c. 自家神経群



d. 軸索数カウント



移植したヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞が、どのように末梢神経再生促進に関与しているかについては未だ不明である。ヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞がシュワン様細胞として機能し、神経成長因子などの液性因子を介して軸索再生促進に寄与した、あるいはシュワン様細胞として直接再生軸索を髄鞘化した可能性がある。今後、移植した iPS 細胞由来神経前駆細胞がどのように末梢神経再生に関与しているのか、その詳細なメカニズムの解明を行う必要である。

人工神経にヒト iPS 細胞由来神経前駆細胞を付加することで免疫不全ラットの末梢神経再生が促進した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

上村 卓也、斧出 絵麻、横井 卓哉、新谷 康介、岡田 充弘、高松 聖仁、小西 定彦、中村 博亮、Nerve capping technique with nerve conduit for treating painful digital neuroma: A case report、J Orthop Sci、査読有、2019、S0949-2658(19)30061-2
DOI: 10.1016/j.jos.2019.02.012.

斧出 絵麻、上村 卓也、高松 聖仁、新谷 康介、横井 卓哉、岡田 充弘、中村 博亮、Nerve capping with a nerve conduit for the treatment of painful neuroma in the rat sciatic nerve、J Neurosurg、査読有、8、2019、1-9
DOI: 10.3171/2018.10.JNS182113.

新谷 康介、香月 憲一、米田 昌弘、上村 卓也、岡田 充弘、高松 聖仁、中村 博亮、Computer-Assisted Three-Dimensional Corrective Osteotomy for Malunited Fractures of the Distal Radius Using Prefabricated Bone Graft Substitute、J Hand Surg Asian Pac、査読有、23(4)、2018、479-486

DOI: 10.1142/S2424835518500467.

新谷 康介、上村 卓也、高松 聖仁、横井 卓哉、斧出 絵麻、岡田 充弘、中村 博亮、Protective effect of biodegradable nerve conduit against peripheral nerve adhesion after neurolysis、J Neurosurg、査読有、129(3)、2018、815-824

DOI: 10.3171/2017.4.JNS162522.

横井 卓哉、上村 卓也、高松 聖仁、新谷 康介、斧出 絵麻、岡田 充弘、日高典昭、中村 博亮、Bioabsorbable nerve conduits coated with induced pluripotent stem cell-derived neurospheres enhance axonal regeneration in sciatic nerve defects in aged mice、J Biomed Mater Res B Appl Biomater、査読有、106(5)、2018、1752-1758

DOI: 10.1002/jbm.b.33983.

横井 卓哉、上村 卓也、高松 聖仁、中村 博亮、ハイブリッド型人工神経による末梢神経再生と癒着予防材料への応用、人工臓器、査読有、47 巻 3 号、2018、Page185-188

新谷 康介、上村 卓也、高松 聖仁、横井 卓哉、岡田 充弘、中村 博亮、中空型生体吸収性人工神経による末梢神経の癒着防止効果、日本手外科学会雑誌、査読有、35 巻 2 号、2018、Page1-5

上村 卓也、高松 聖仁、中村 博亮、整形トピックス iPS 細胞由来神経前駆細胞を付加したハイブリッド型人工神経 免疫応答下での移植細胞による神経再生促進効果、整形外科、査読有、69 巻 10 号、2018、Page1044

上村 卓也、斧出 絵麻、横井 卓哉、玄 承虎、新谷 康介、中村 博亮、人工神経(リナーブ)による nerve capping で治療した有痛性断端神経腫の 1 例、中部日本整形外科災害外科学会雑誌、査読有、61 巻 4 号、2018、Page875-876

上村 卓也、高松 聖仁、岡田 充弘、横井 卓哉、新谷 康介、斧出 絵麻、中村 博亮、橈骨動脈穿通枝脂肪弁による正中神経ラッピング、日本マイクロサージャリー学会会誌、査読有、31 巻 1 号、2018、Page8-12

上村 卓也、高松 聖仁、横井 卓哉、新谷 康介、斧出 絵麻、中村 博亮、埋没した指輪による手指絞扼の 1 例 Embedded ring syndrome. 中部日本整形外科災害外科学会雑誌、査読有、61 巻 2 号、2018、Page317-318

横井 卓哉、岡田 充弘、斧出 絵麻、上村 卓也、新谷 康介、中村 博亮、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経絞扼性障害における末梢神経微小血管の描出、日本手外科学会雑誌、査読有、34 巻 4 号、2018、Page536-539

池田 幹則、岡田 充弘、遠山 雅彦、上村 卓也、高松 聖仁、中村 博亮、Comparison of Median Nerve Cross-sectional Area on 3-T MRI in Patients With Carpal Tunnel Syndrome、Orthopedics、査読有、40(1)、2017、e77-e81

上村 卓也、岡田 充弘、横井 卓哉、新谷 康介、斧出 絵麻、中村 博亮、神経鞘腫による末梢神経の電気生理学的変化、末梢神経、査読有、28 巻 1 号、2017、Page73-77

斉藤 公亮、川端 確、阿波 康成、玄 承虎、高松 聖仁、橈骨神経浅枝断端神経腫による肘関節拘縮に対する人工神経を用いた治療経験、中部日本整形外科災害外科学会雑誌、査読有、60 巻 1 号、2017、Page157-158

DOI: 10.3928/01477447-20160915-04.

斧出 絵麻、高松 聖仁、新谷 康介、横井 卓哉、上村 卓也、岡田 充弘、香月 憲一、中村 博亮、Anatomical Origins of Radial Artery Perforators Evaluated Using Color Doppler Ultrasonography、J Reconstr Microsurg、査読有、32(8)、2016、594-8

DOI: 10.1055/s-0036-1584217.新谷 康介、高松 聖仁、上村 卓也、斧出 絵麻、岡田 充弘、香月 憲一、中村 博亮、Planning digital artery perforators using color Doppler ultrasonography: A preliminary report、J Plast Reconstr Aesthet Surg、査読有、69(5)、2016、634-9

DOI: 10.1016/j.bjps.2016.01.003.

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、末梢神経、査読有、27 巻 1 号、2016、Page98-102

〔学会発表〕(計 20 件)

上村 卓也 他、iPS 細胞由来神経前駆細胞と人工神経によるマウス末梢神経再生、第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、2018.10.11、奈良春日野国際フォーラム(奈良県)

上村 卓也 他、人工神経と iPS 細胞移植を併用した末梢神経再生における免疫応答と加齢の影響、第 91 回日本整形外科学会学術総会、2018.5.24、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

岡田 充弘 他、蛍光血管造影法による末梢神経内血流に着目した神経上膜剥離術の有効性の検討、第 91 回日本整形外科学会学術総会、2018.5.24、神戸コンベンションセンター(兵庫県)

上村 卓也 他、人工神経と iPS 細胞移植を併用した末梢神経再生 神経再生における免疫応答と加齢の影響、第 61 回日本手外科学会学術集会、2018.4.26、京王プラザホテル(東京都)

上村 卓也 他、FGF と SDF-1 の Dual release DDS を併用した人工神経 - マウス坐骨神経欠損モデルによる実験的研究 -、第 61 回日本手外科学会学術集会、2018.4.26、京王プラザホテル（東京都）

上村 卓也 他、中空型人工神経による神経保護・癒着防止効果 - ラット坐骨神経癒着モデルによる実験的研究 -、第 61 回日本手外科学会学術集会、2018.4.26、京王プラザホテル（東京都）

岡田 充弘 他、蛍光血管造影法を併用した末梢神経絞扼性障害重症例における神経上膜剥離術の有効性の検討、第 61 回日本手外科学会学術集会、2018.4.26、京王プラザホテル（東京都）

上村 卓也 他、人工神経（リナーブ）による Nerve capping で治療した有痛性断端神経腫の 1 例、第 130 回中部日本整形災害外科学会、2018.4.20、ひめぎんホール（愛媛県）

上村 卓也 他、iPS 細胞由来神経前駆細胞を付加したハイブリッド型人工神経-免疫応答下での移植細胞による神経再生促進効果-、第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会、2017.10.26、沖縄コンベンションセンター（沖縄県）

上村 卓也 他、Entrapment of Digital Nerves due to an Embedded Ring: A Case Report、2017.6.21、ブダペスト（ハンガリー）

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経の血流評価法、第 60 回日本手外科学会学術集会、2017.4.27、名古屋国際会議場（愛知県）

上村 卓也 他、橈骨動脈穿通枝脂肪弁による正中神経ラッピング、第 43 回日本マイクロサージャリ学会学術集会、2016.11.17、リーガロイヤルホテル広島（広島県）

上村 卓也 他、iPS 細胞を用いた運動器疾患治療への挑戦 iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経再生、第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会、2016.10.13、福岡国際会議場（福岡県）

上村 卓也 他、神経鞘腫による末梢神経の電気生理学的変化、第 27 回日本末梢神経学会学術集会、2016.8.26、大阪国際会議場（大阪府）

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた蛍光輝度補正による神経内血行評価、第 27 回日本末梢神経学会学術集会、2016.8.26、大阪国際会議場（大阪府）

上村 卓也 他、iPS 細胞と FGF を融合したハイブリッド型人工神経 自家神経移植に匹敵する人工神経をめざして、第 37 回日本炎症再生医学会学術集会、2016.6.16、京都勧業館みやこめっせ（京都府）

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経内の微小血行動態の評価法、第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会、2016.6.9、国立京都国際会館（京都府）

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経絞扼性障害における神経内血行動態の評価、第 89 回日本整形外科学会学術総会、2016.5.12、パシフィコ横浜（神奈川県）

上村 卓也 他、手外科 Front line iPS 細胞と人工神経を用いた末梢神経再生医療、第 59 回日本手外科学会学術集会、2016.4.21、広島国際会議場（広島県）

岡田 充弘 他、インドシアニングリーン蛍光法を用いた末梢神経絞扼性障害における神経内血行動態の評価、第 59 回日本手外科学会学術集会、2016.4.21、広島国際会議場（広島県）

〔図書〕(計 6 件)

上村 卓也 他、南光堂、整形外科、2018、1 (1044)

上村 卓也 他、西野一三中外医学社、Annual Review 神経、2017、6 (222~227)

上村 卓也、技術情報協会、生体吸収性材料の開発と安全性評価、2017、6 (162~167)

上村 卓也 他、化学工業社、化学工業、2017、4 (15~18)

上村 卓也 他、ニュー・サイエンス社、細胞、2017、2 (36~37)

上村 卓也 他、中外医学社、Clinical Neuroscience、2016、4 (1166~1169)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：高松 聖仁
ローマ字氏名：(TAKAMATSU, Kiyohito)
所属研究機関名：大阪市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：客員准教授
研究者番号(8桁)：30295688

研究分担者氏名：岡田 充弘
ローマ字氏名：(OKADA, Mitsuhiro)
所属研究機関名：大阪市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：講師
研究者番号(8桁)：40309571

研究分担者氏名：中村 博亮
ローマ字氏名：(NAKAMURA, Hiroaki)
所属研究機関名：大阪市立大学
部局名：大学院医学研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：60227931

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：横井 卓哉
ローマ字氏名：(YOKOI, Takuya)

研究協力者氏名：新谷 康介
ローマ字氏名：(SHINTANI, Kosuke)

研究協力者氏名：斧出 絵麻
ローマ字氏名：(ONODE, Ema)

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、研究者個人に帰属されます。