

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16672

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞シートと組織移植を融合させたハイブリッド型自家神経作成の試み

研究課題名(英文) Hybrid Autologous Nerve Fabrication by Combining Mesenchymal Stem Cell Sheets and Tissue Transplantation

研究代表者

清水 隆昌 (Shimizu, Takamasa)

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：70464667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：神経再生誘導管(以下人工神経)や同種神経は、近年自家神経に代わる新たなマテリアルとして開発されているが、iPS細胞や各種成長因子を添加させても自家神経移植に及ばないのが現状である。本研究は、再生医療技術を用いて自家神経の移植片に血流を付加させることである。大腿骨から採取・培養した骨髄間葉系細胞や間質細胞(Bone Marrow Stem/Stromal Cells; BMSCs)をシート状に採取し、自家神経移植後に巻くことで、自家神経移植単独と比較して神経再生が促される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経が損傷された場合に、最も再生が期待できるマテリアルは自家神経であるが、再生可能な距離は数cmと限界があり、長い欠損部やレシピエント側の神経が太い場合には移植片内部に供給される血流を確保できない。最も再生能に優れた神経移植は、自家神経に栄養血管を付加させた『血管柄付き神経移植』である。しかし、遊離血管柄付き神経移植術は極めて高度な技術が必要であり、一般的には臨床応用が進んでいないのが現状である。再生医療技術で作成した細胞シートを自家神経と組み合わせることで経再生を促進させることができ、新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Nerve regeneration inducing artificial nerves and allogeneic nerves have been developed in recent years as new materials to replace autologous nerves, but even with the addition of iPS cells and various growth factors, they are still not as good as autologous nerve grafts. The aim of this study was to add blood flow to autologous nerve grafts using tissue engineering and regenerative medicine technology. It was shown that the cell sheet, produced from bone marrow mesenchymal cells and stem/stromal cells (BMSCs), wrapped with autologous nerve grafting may promote nerve regeneration compared to autologous nerve grafting alone.

研究分野：再生医療

キーワード：間葉系幹細胞シート 末梢神経 神経再生 血管柄付き神経 自家神経移植

1. 研究開始当初の背景

腫瘍切除や外傷によって末梢神経が損傷されることは臨床でよく遭遇するが、神経の欠損が大きい場合には神経の一次修復は不可能である。欠損部の再建には、遊離自家神経移植術が標準術式として行われている。軸索再生に必要なシュワン細胞や、成長因子、長軸方向の神経周膜を保持している自家神経は、最も神経再生が期待できる移植材料であるが、正常神経を犠牲にすることが問題とされ、自家神経に代わる新しい治療法が模索されてきた。神経再生誘導管(以下人工神経)や同種神経は、近年自家神経に代わる新たなマテリアルとして開発され、整形外科をはじめとして口腔外科、耳鼻科などの多くの分野で、ひろく臨床応用されてきた。しかし、これらのマテリアルは単独では自家神経と比較して軸索再生能が劣るため、再生医療の技術を用いて軸索再生能を促進させる様々な基礎的研究が行われている。人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS細胞)から神経前駆細胞に分化誘導させ、人工神経に搭載することで再生能力を促進させる試みや、成長因子である維芽細胞増殖因子(Fibroblast growth factor; FGF)を付加させる試みなどが行われている。しかしながら、いずれの方法も自家神経の軸索再生能を超えることができていないのが現状である(上村ほか, Peripheral Nerve, 2015)。

しかし、その自家神経移植についても、欠損部の長さやレシピエントの太さが増大するにつれてその再生能は低下する。臨床的に軸索再生を期待できる欠損部の距離は数cm程度である。したがって、我々はマテリアルとして自家神経に匹敵するものを目指すのではなく、『自家神経の神経再生能促進』こそが、末梢神経再建治療の発展につながると考えるに至った。

移植した自家神経は、移植床から供給される『血流』にその生着を依存しているため、移植神経内部への血流が供給されないと、良好な軸索再生は得られない。移植床の血流が阻害された瘢痕組織では、移植神経周囲の血流はさらに乏しくなる。組織再生において近傍の血管から200µm以上離れると血流の供給は途絶し、移植細胞は生存できないと報告されている(Rouwkema J, et al. Trends Biotechnol. 2008.)。したがって、血流の乏しい移植床で良好な軸索再生を促すためには、移植する神経片内部への『血管新生』が非常に重要な要素となる。

神経移植片に対する『血流の問題』を解決するために、自家神経に栄養血管を付加させたまま移植する『遊離血管柄付き神経移植術』が開発され、同移植は遊離自家神経移植と比較して優れた軸索再生を有することが示されてきた(Zhu Y, et al. Plast Reconstr Surg. 2015)。血管柄付き神経移植後の神経再生速度は自家神経移植の約3倍(3mm/日)であり、25cm程度の移植片であれば移植後約3ヶ月で遠位部まで再生神経が到達すると報告されている。血管柄付き神経移植は、遊離自家神経移植の適応となる長さをはるかに超えており、神経再生には非常に有望なドナーといえる。しかしながら、末梢神経に付随する血管は非常に細く、その血管吻合は手技的にかなり高度な技術を要する。したがって、『遊離血管柄付き神経移植術』は一般的な手術手技となっておらず、これに匹敵する新しい治療法が望まれている。

微小血管外科の手技を用いて作製した『血管柄付き筋膜脂肪弁(Vascularized adipofascial flap)』は、それ自体が豊富な血流を有し、神経周囲を取り巻くように付加することにより血管吻合を行わずに神経の再血行化が期待できる。実際の臨床においても、採取可能な自家神経は比較的細いため、重要な機能を担う主幹神経を再建する場合には、細い自家神経を3~5本ほど束ねて移植する方法(cable graft法)が必要となる。cablegraft法は血流の豊富な組織と組み合わせることで、再生軸索の径が増大し、ミエリン髄鞘の厚さが改善したとの報告がある(O'Sullivan KL, et al. Ann Plast Surg. 1998)。しかしながら、『血管柄付き筋膜脂肪弁』を自家神経周囲に添加する方法単独では、移植片内部の血流再開に疑問が残る。すなわち主幹神経再建のための神経束移植(cable graft)においては、移植神経の中央部が壊死に陥る(Central necrosis)可能性が高い。さらに神経と血管の間を効果的に架橋することができず、『遊離血管柄付き神経移植術』に匹敵することはできないと考えられる。

2. 研究の目的

神経はその発生や再生において他の組織以上に血管と密接な関係を持ち、神経再生には血管ニッチと呼ばれる『血管内皮細胞』との相互作用が必要である(Tavazoie M, et al. Cell Stem Cell. 2008)。ヒト血液中のCD34陽性細胞分画中には血管内皮前駆細胞(endothelial progenitor cell; EPC)が存在し、血管内皮細胞への分化と、神経再生における有効性が証明されている(Asahara T, et al. Science. 1997)。これらのことから、『血管内皮細胞』を含む組織の存在は、血管新生のみならず神経再生においても有効であると推測される。

当教室では、骨髄間葉系細胞や間質細胞(Bone Marrow Stem/Stromal Cells; BMSCs)を採取培養し、シート状に採取する『BMSCシート』の再生医療分野における重要性を報告してきた。『BMSCシート』は、『血管内皮細胞増殖因子(vascular endothelial growth factor; VEGF)』など様々な成長因子を有する上に、血管新生に必要な間葉系細胞を含み、『血管新生』を促進可能なマテリアルである。

本研究の目的は、『BMSCシートの血管新生能と神経再生能』を自家神経移植に組み合わせる

ことによって作成した『ハイブリッド型自家神経』(Vascularized tissue engineering nerve graft)が、『血管柄付き神経』に匹敵するかどうかを検証することである。

間葉系幹細胞をはじめとして再生医療の技術を用いて作成した細胞は、主にシュワン細胞に分化させることで、人工神経や同種神経に搭載し軸索再生を促す試みが多い中で、我々の方法は、間葉系幹細胞の血管新生能や神経新生能に着目して末梢神経の軸索再生を促す方法であり、高い独自性を有する研究である。本研究では、『ハイブリッド型自家神経』の血管新生と軸索再生の関係性を評価する。

3. 研究の方法

1. 『BMSC シート』の作製 7 週齢 Fischer344 ラットの両側大腿骨から骨髄間葉系細胞を採取し T75 フラスコを用いて初期培養を行う。細胞培養は、MEM に 15%牛胎血清 (FBS) と抗生剤を加えたものを標準培地として使用する。2 週間後に、トリプシンを用いて細胞を培養皿から遊離させ、これを 1×10^4 cell/cm² の細胞密度で 6cm 径の培養皿に播種する。アスコルビン酸 (AscP; 82μg/ml) 添加標準培地で二次培養を行い、2 週間後にスクレパーを用いて『BMSC シート』を採取する。

2. 20mm の坐骨神経欠損モデルをラットで作成し、以下の 4 つの実験群を作製する。
同系ラットの坐骨神経を 20mm 採取し遊離自家神経移植術を行う Autologous nerve 群; AN 群
自家神経の周囲を『BMSC シート』で被覆する Hybrid nerve 群; HN 群
血管柄付き神経移植術 (20mm) を行う vascularized nerve graft 群; VN 群
坐骨神経の 20mm の欠損を、再建せずにそのまま放置した negative control 群; NC 群

3. 1 週後、坐骨神経を採取し、Tunel 染色により死細胞の評価、S-100 抗体、NF 抗体を使用して免疫染色を行う。採取した神経の中央部での断面スライス及び長軸の標本を作成し、神経再生を評価した。

4. 研究成果

Tunel 染色によって評価した死細胞数は VN 群 < AN 群 < NC 群の順であった (図 1)。S-100 抗体によりシュワン細胞を染色すると、NC 群 < AN 群 < HN 群 < VN 群の順であった (図 2)。NF 抗体は軸索に特異的に染色が困難であったが、VN 群、HN 群は中央切離部で軸索の連続性を確認できた。GAP43 抗体による軸索再生の評価では、NC 群 < AN 群 < HN 群 < VN 群の順で神経の再生が認められた (図 3)。以上のことから『BMSC シート』を自家神経と組み合わせることによって、神経再生が促進される可能性が示唆された。

図 1.

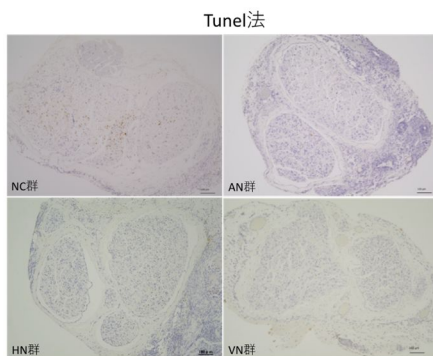


図 2.

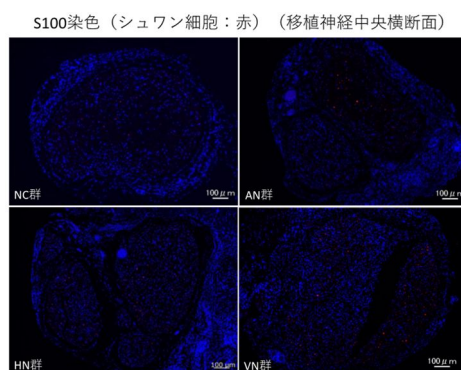
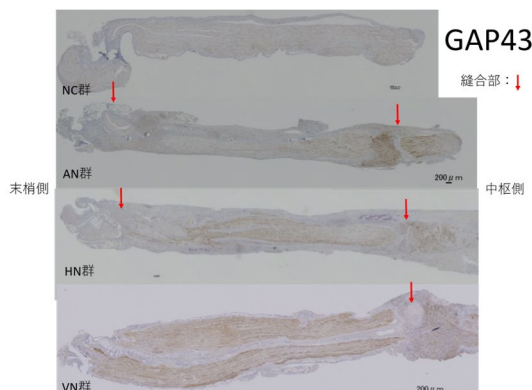
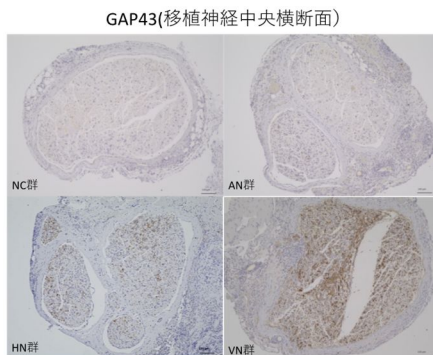


図 3.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------