

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18467

研究課題名(和文)カーボンナノチューブによる末梢神経再生促進効果の解明と新たな人工神経開発への応用

研究課題名(英文)Carbon-nanotube yarns induce axonal regeneration in peripheral nerve defect.

研究代表者

兒玉 祥(Kodama, Akira)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：40806478

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)：シリコンチューブ内に占めるCNT系の占拠率を変化させた5群(0%、2%、5%、10%、35%)を作製し(N=7)、ラット坐骨神経15mm欠損に移植した。術後8週の評価では電気生理学的検査、下腿筋湿重量においてCNT移植群で有意差な神経機能再生が確認された。組織学的評価ではコントロール群では全例で神経欠損部の連続性を欠いていたが、CNT系充填群では全例で神経欠損部が再生組織で架橋されており、CNT系に沿った軸索の伸長を認めた。軸索伸長は2%、5%群で効率が良く、60%以上の軸索再生を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カーボンナノチューブが神経欠損の足場として末梢神経再生を促進することが生体内において確認された。さらに本研究で用いたCNT紡績系のナノレベルの線維構造という物理的特性も蛋白質の吸着、細胞接着を促進したことが示唆された。これらの結果はCNT繊維が神経再生を促進するOff-the-shelfは新たな生体材料として応用される一助となりうる。カーボンナノチューブを用いた人工神経管の臨床応用により、神経損傷患者の治療成績向上が期待されるとともに、神経損傷患者の機能回復で就労を促す事による経済効果、Off-the-shelfである事から国内のみならず国外での応用などの社会的意義が生まれる。

研究成果の概要(英文)：Five groups (0%, 2%, 5%, 10%, and 35%) of CNTs with different densities of CNTs in the silicone tube (N=7) were implanted into a 15 mm defect of the rat sciatic nerve. The postoperative evaluation at 8 weeks showed a significant difference in electrophysiological examination and hind limb muscle weight in the CNT transplantation group. Histological evaluation showed that all animals in the control group lost continuity of the nerve defect, whereas all animals in the CNT yarns-filled group showed cross-linking of the nerve defect with regenerated tissue and axonal growth along the CNT yarns. Axonal regeneration was most efficient in the 2% and 5% groups, with more than 60% axonal regeneration.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：末梢神経損傷 神経再生 カーボンナノチューブ 生体材料 人工神経

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷は比較的頻度の高い外傷で、欧米では年間50万件発生するとも報告される。神経組織の高度な挫滅や欠損では神経縫合ができず十分な機能回復を得ることが困難となる。これまで自家神経移植術が神経を再建する手法として広く行われてきた。しかし自家神経移植には正常神経組織の犠牲を伴うという重大な欠点があり、この問題を克服すべく、様々な人工神経の開発が行われている。現在、生体材料を用いた人工神経管が国内外で臨床使用されている。しかし、現状の人工神経は臨床成績が自家神経移植に劣る事、40mm以上の欠損に対応できないなどの課題がある。よって自家神経採取を回避し、より大きな欠損に対応可能な治療効果の高い人工神経治療の開発が必要とされている。

我々は末梢神経の再生を促進する素材としてカーボンナノチューブ(CNT)に注目した。カーボンナノチューブは細胞接着の促進、タンパク質吸着能による基底膜タンパク質の吸着や成長因子の誘導、導電性により神経再生を促進する役割を担う事が期待される。導電性生体材料による足場は電気的な活動を行う神経組織の形成を促す事(Dvir et al. 2011)や、CNTと神経のネットワークによりシナプス伝達が増強される事(Mazzatenta 2007)が示されており、CNTの導電性は末梢神経再生に有利に働くことが十分に期待できる。さらに、CNT線維の誘導により海馬神経細胞の軸索伸長が促進されること(Zhang 2005)、CNTに神経成長因子(NGF)を結合させると神経軸索伸長が促進する(Matsumoto 2010)など*in vitro*の研究においてはCNTが神経の軸索伸長を促進する事が示されている。しかし動物モデルなどを用いた*in vivo*でのカーボンナノチューブを生体材料として末梢神経再生効果を研究した報告は存在しない。その理由として、これまではCNT繊維は直径が数十から数百nmで長さ数 μm から数mmの粒子としてしか加工できず、CNTにて人工神経の形状を作ることが困難であったことが挙げられる。今回我々は共同研究先であるLintec of America社が開発した直径15 μm で長さ数十mにも加工可能なCNTの撚糸 cYarn[®]に織物技術を駆使することで、CNTの繊維束を形成し人工神経管の作成が可能とした。

2. 研究の目的

本研究の目的はカーボンナノチューブの生体内での神経再生促進作用を解明し、カーボンナノチューブを用いた神経再生効果の高い新たな人工神経を開発することである。

3. 研究の方法

ラット坐骨神経欠損モデル(欠損 15mm)に対し、CNT より作成した撚糸 cYarn[®]を充填した内腔 1.5mm 長さ 17mm のシリコンチューブを移植した。

CNT の撚糸 cYarn[®]は垂直配向多層 CNT から乾式延伸紡績法により生成した。本工程は共同研究機関である、LINTEC OF AMERICA 社(Richardson, TX, USA)の技術の下行った。シリコンチューブのみ移植したコントロール群とシリコンチューブ内に占める CNT 系の占拠率を変化させた 4 群(0%, 2%, 5%, 10%, 35%)を作製した(N=7)。術後 8 週および16週にて神経再生効果を組織学的に評価した。また、運動機能を歩行時の足跡を計測した Sciatic Functional Index (SFI)、電気生理学的検査、下腿筋湿重量で評価した。CNT に対する異物反応を術後 16 週で採取した再生組織の免疫組織化学的に評価した。

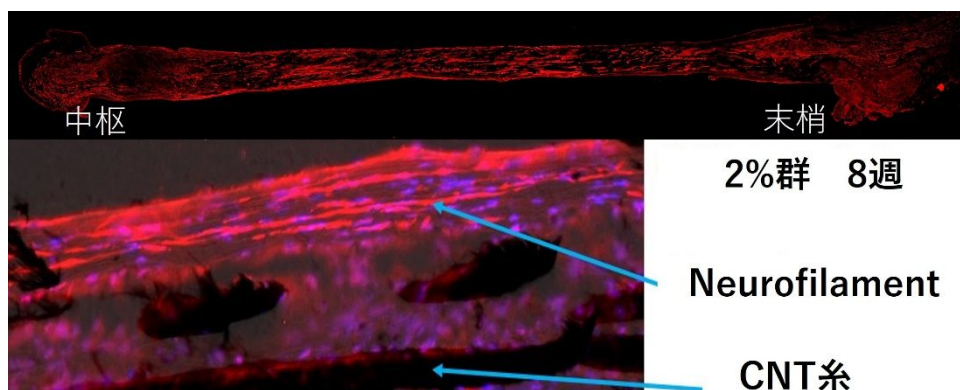


図1 2%群における再生組織の抗 Neurofilament 抗体染色
CNT 系に沿って再生した軸索が観察される

4. 研究成果

術後 8 週の評価では電気生理学的検査にて 2%群で 4/7 匹(57%), 5%群 5/7(71%), 10%群 3/7(43%) に神経電位が観察された。コントロール群と 35%群では全例で電位が観察されなかった。下腿筋湿重量においてもコントロール群と比較して 2, 5, 10%では有意差に腓腹筋湿重量が増加していた。組織学的評価ではコントロール群では全例で神経欠損部の連続性を欠いていたが, CNT 系充填群では全例で神経欠損部が再生組織で架橋されており, CNT 系に沿った軸索の伸長を認めた(図1)。軸索伸長は2%と5%群で効率が良く, 60%以上の軸索再生を認めた。そこで, 2%群にて 16 週での評価を行ったところ、組織学的には 96%の軸索再生を認め、SFI は 2%群で -72 ± 8.5 、コントロール群で -110 ± 2.2 と有意に改善していた。しかしながら、異物反応に対する評価では、2%群の CNT 周囲に再生した組織からは CD68 陽性多核巨細胞が 156.9 ± 22.5 個/mm² 確認された。

以上より、cYarn[®]が神経再生の足場として機能することが明らかとなった。治療効果、生体親和性に関してさらなる発展的研究が必要であるが、本研究の結果は Off-the-shelf な人工神経管材料としての CNT の将来的な臨床応用を支持するものとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件(うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件)

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Kunisaki A, Kodama A, Ishikawa M, Ueda T, Lima MD, Kondo T, Adachi N. | 4. 巻 11(1) |
| 2. 論文標題 Carbon-nanotube yarns induce axonal regeneration in peripheral nerve defect | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 19562 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98603-7 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計10件(うち招待講演 1件/うち国際学会 6件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 國崎 篤, 兒玉 祥, 石川 正和, 植田 貴洋, 近藤 健, 安達 伸生 |
| 2. 発表標題 親水化カーボンナノチューブ(CNT)による神経再生の促進 |
| 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 國崎 篤, 兒玉 祥, 石川 正和, 安達 伸生 |
| 2. 発表標題 カーボンナノチューブ(CNT)の酸化度の増強による神経再生の促進 |
| 3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Atsushi Kunisaki, Akira Kodama, Masakazu Ishikawa, Marcio D. Lima, Kanzan Inoue, Nobuo Adachi |
| 2. 発表標題 Hydrophilized Carbon Nanotube accelerate neurite outgrowth |
| 3. 学会等名 Annual meeting of Orthopaedic research society (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akira Kodama, Masakazu Ishikawa, Marcio D. Lima, Kanzan Inoue, Nobuo Adachi |
| 2. 発表標題 In vivo study for the effects of CNTs yarns on neurite outgrowth : peripheral nerve defect model |
| 3. 学会等名 Annual meeting of FESSH (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 國崎 篤, 兒玉 祥, 石川 正和, マルシオ D リマ, 井上 閑山, 安達 伸生 |
| 2. 発表標題 親水化カーボンナノチューブ (CNT) による神経再生の促進-官能基化CNTの人工神経応用への展望- |
| 3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 兒玉 祥 |
| 2. 発表標題 Carbon nanotube yarn for bridging peripheral nerve defect |
| 3. 学会等名 Orthopaedic Research society 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 兒玉 祥 |
| 2. 発表標題 Carbon nanotube yarn for bridging peripheral nerve defect |
| 3. 学会等名 74th Annual meeting of Americansociety for surgery of the hand (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 兒玉 祥 |
| 2. 発表標題 カーボンナノチューブはラット坐骨神経欠損での神経再生を促進する |
| 3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 兒玉 祥 |
| 2. 発表標題 カーボンナノチューブを用いた新たな人工神経管の開発 |
| 3. 学会等名 第46回日本マイクロサージャリー学会学術集会（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 兒玉 祥 |
| 2. 発表標題 Carbon nanotube yarn for bridging peripheral nerve defect |
| 3. 学会等名 Annual internatoinal meeting of Korian society for surgery of the hand（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|---|---|---------------|
| 産業財産権の名称 Yarns in Tubes especially for BioScaffold | 発明者 Akira Kodama, Masakazu Ishikawa | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 実用新案、PCT/US2019/022515 | 出願年 2019年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計0件

〔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 | | | |
|---------|------------------------|--|--|--|
| 米国 | Lintec of America INC. | | | |