

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09415

研究課題名(和文) バイオミメティック Vein Wrapping による末梢神経障害治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of biomimetic vein wrapping to treat chronic nerve injury

研究代表者

井上 玄 (Inoue, Gen)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：80594209

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)：外傷性末梢神経損傷、絞扼性神経障害、CRPS(複合性局所疼痛症候群)などの末梢性神経障害は神経障害性疼痛や麻痺を呈し治療に難渋する。重度絞扼性神経障害患者に対する治療法の一つとして vein wrappingがあるが、自家静脈を巻き付けるvein wrappingでは自家組織の損傷を伴うため、広範囲な傷害には対応できないという欠点があった。高密度コラーゲンシートに塩基性線維芽細胞増殖因子を吸着させた材料を末梢神経障害モデルに移植した結果、vein wrapping と同等の効果が認められた。本複合材料は広範囲な末梢神経損傷に対応し得る新たな治療材料になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重度末梢神経障害は、患者の肉体的精神的苦痛に加える。加えて、入院および通院治療の増加による医療費増加、社会復帰遅延による多大な経済損失に直結する。従って、重度末梢神経障害治療法の開発は急務である。本研究結果は新たな重度末梢神経障害治療法に繋がる社会的意義の大きい研究である。

研究成果の概要(英文)：Autologous vein wrapping is used to treat recurrent chronic constriction neuropathy and traumatic peripheral nerve injury. However, its use is restricted due to the inability to obtain sufficiently long veins for larger grafts. To mimic vein wrapping, we developed a high density collagen sheet (HCS) soaked with bFGF. In the bFGF/CS group, Hmox1 messenger RNA and HO-1 protein levels were significantly increased in the sciatic nerve compared with the control and PBS/HCS groups on PODs 1 and 5 and POD 1, respectively. The bFGF/HCS group showed decreased allodynia and HO-1 induction. Therefore, bFGF/HCS composite may be an alternative treatment strategy for compressive neuropathy and peripheral nerve trauma in clinical settings.

研究分野：整形外科

キーワード：Vein Wrapping バイオミメティクス 絞扼性末梢神経傷害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷性末梢神経損傷、絞扼性神経障害、CRPS(複合性局所疼痛症候群)などの末梢性神経障害は神経障害性疼痛や麻痺を呈し治療に難渋する。重度末梢神経障害は、患者の肉体的精神的苦痛に加える。加えて、入院および通院治療の増加による医療費増加、社会復帰遅延による多大な経済損失に直結する。従って、重度末梢神経障害治療法の開発は急務である。

申請者は重度末梢神経障害に対する治療法を確立すべく、既存治療技術の作用メカニズムの解明とそれを基盤とした新規治療シーズの創出を行ってきた。重度絞扼性神経障害患者に対して行われている治療法の一つである vein wrapping (損傷神経に自家静脈を巻きつける方法)の作用メカニズムを検討した。ラット絞扼性神経障害モデルに vein wrapping を行った結果、vein 由来の塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が抗酸化作用を有する heme oxygenase-1 (HO-1)の誘導を介して疼痛過敏抑制に働いている可能性を示した。また、vein 由来の IL-4, IL-10 が M2 マクロファージへの polarization を誘導し、神経保護に働いている可能性を示した。しかし、自家静脈を巻きつける vein wrapping では自家組織の損傷を伴うため、広範囲な傷害には対応できないという欠点があった。

2. 研究の目的

コラーゲン結合型成長因子、細胞積層技術、高密度コラーゲンシートを駆使して長期間作用し得る Biomimetic vein を作製することで新規重度末梢神経障害治療シーズの開発を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)搭載高密度コラーゲンシートを用いた末梢神経再生シーズを育成すべく、Clodtridium histoliticum 由来のコラーゲン結合ドメイン(CBD)と bFGF の融合タンパク質、bFGF-PKD-CBD を用いた検討を行った。bFGF, bFGF-PKD-CBD 溶液に高密度コラーゲンシートを 60 分浸漬後、徐放試験を行った。また、Wistar rat 8 週齢雄を用いて末梢神経障害(Chronic Constriction Injury, CCI)モデルを用いた検討を行った。結紮した坐骨神経に bFGF 溶液に浸漬した高密度コラーゲンシートを巻き付けた群(bFGF/CS)、bFGF-PKD-CBD 溶液に浸漬した高密度コラーゲンシートを巻き付けた群(bFGF-PKD-CBD/CS)、CCI のみを行ったコントロール群(CCI 群)を作成した。また坐骨神経から RNA を抽出し、RT-PCR を行い、損傷神経内での arginase-1 の発現を検討した。

高密度コラーゲンシートに骨髄間葉系細胞を積層した複合材料を用いて末梢神経障害モデル(CCI)モデルに対する影響を検討した。結紮した坐骨神経に間葉系幹細胞積層高密度コラーゲンシートを巻き付けた群(MSC/CS)、高密度コラーゲンシートのみを巻き付けた群(CS)、CCI のみを行ったコントロール群(CCI 群)を作成した。傷害後 1,3,7,14,21,28 日目に Von Frey による疼痛評価を行った。細胞の必要性を再考するために vein wrapping と vein 中の細胞を死滅させた frozen vein wrapping (FVW) を作製し、比較検討を行った。

4. 研究成果

bFGF/CS 群では 1 時間でほとんどの bFGF が徐放されたのに対し、bFGF-PKD-CBD/CS では 2 週間後においても bFGF の徐放が確認された。また、調査したすべての時間で bFGF/CS に比べ bFGF-CBD/CS 群で徐放量が多かった(図 1)。しかし、arginase-1 誘導は bFGF/CS 群でのみ認められ、bFGF-CBD/CS 群では認められなかった(図 2)。

MSC/CS 群と CS 群間で遺伝子発現、疼痛閾値ともに有意な差は認められなかった。一方、細胞を死滅させた FVW 群では VW 群と同様に Hmox1 の発現上昇を認め、疼痛閾値の改善を認めた(図 3,4)。また、ELISA の結果から vein には bFGF が多く含まれていることが明らかになった(図 5)。このことから vein wrapping の効果は vein に含まれる成長因子の作用によるものが主であり、成長因子を吸着し、作用させることが、biomimetic vein wrapping の作製に重要である可能性が示唆された。

本研究結果から、高密度コラーゲンシートに bFGF を吸着させた複合材料は広範囲な末梢神経損傷に対応し得る新たな治療材料になる可能性が示唆された。

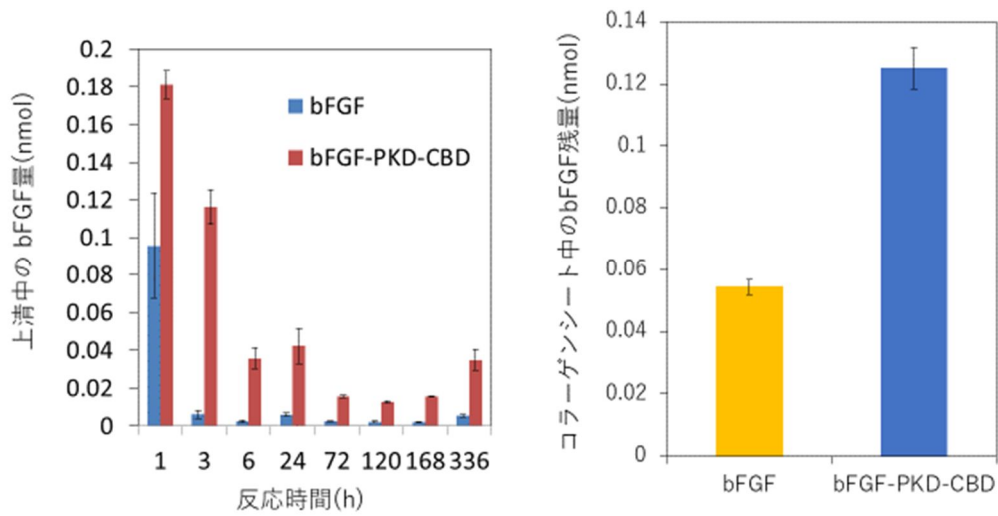


図1. コラーゲン結合型 bFGF (bFGF-PKD-CBD) の bFGF 徐放効果

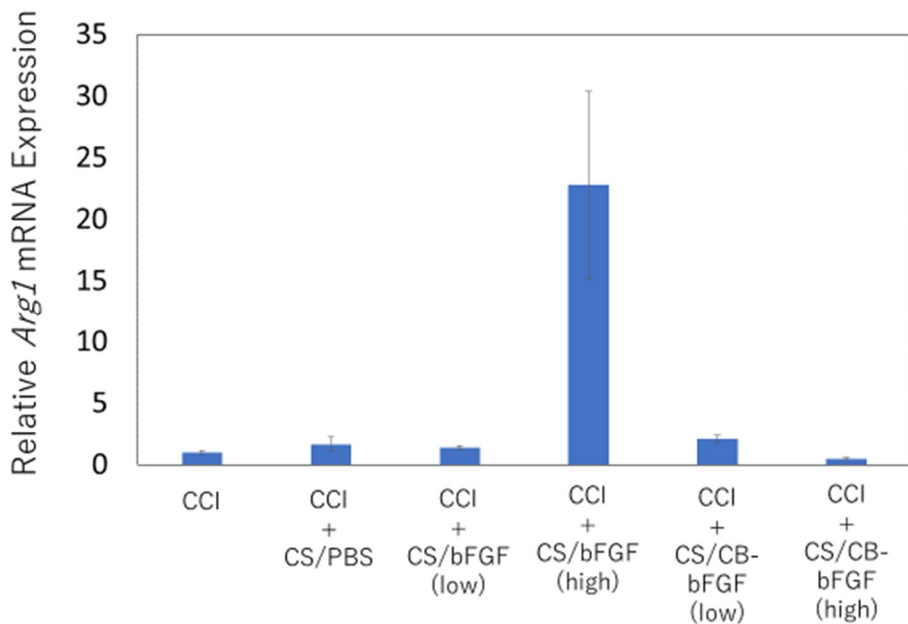


図2. bFGF およびコラーゲン結合型 bFGF (CB-bFGF) による Arg1 の誘導

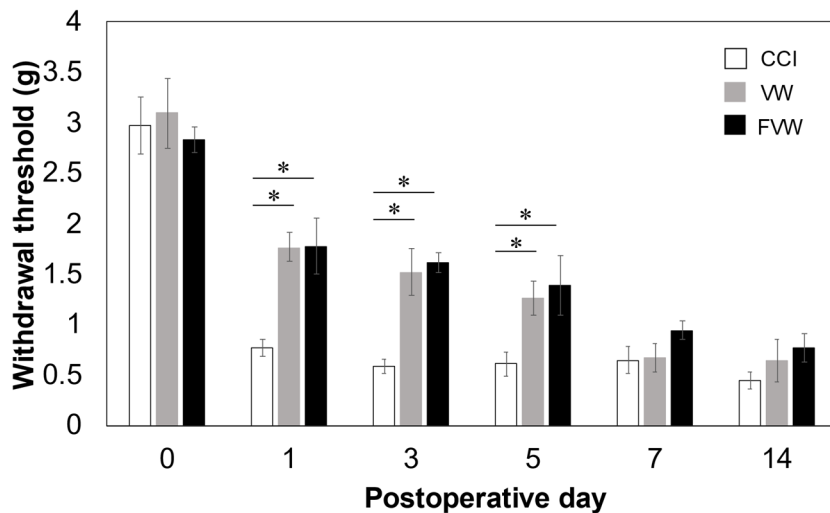


図3. FWW 後の疼痛閾値 (withdrawal threshold) 改善効果

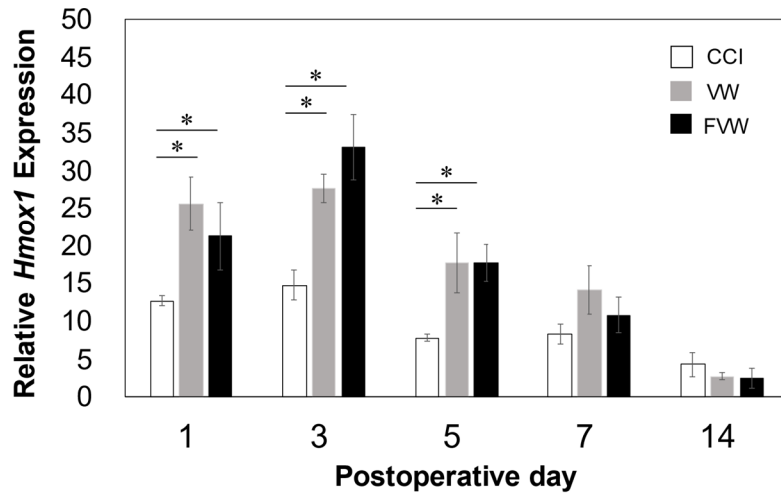


図4. 坐骨神経における Hmox1 の発現

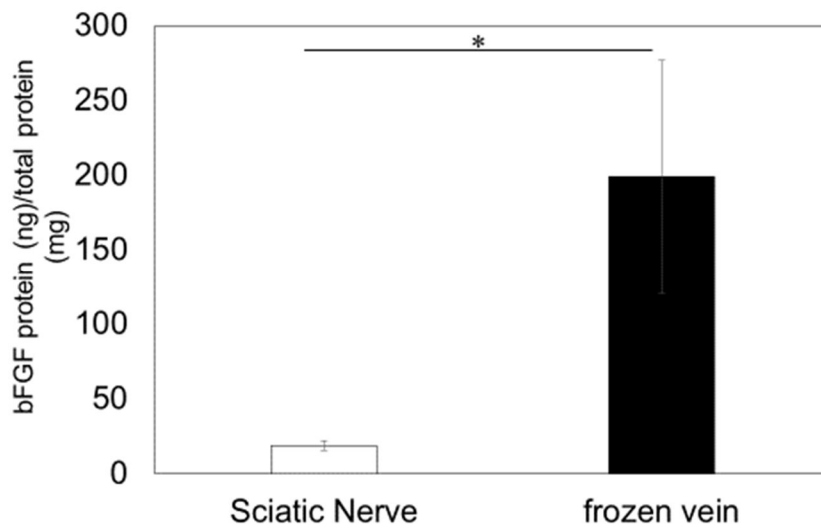


図5. 坐骨神経 (Sciatic nerve)、凍結静脈 (Frozen vein) における bFGF

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 1件）

1. 著者名 Mukai M, Uchida K, Inoue G, Satoh M, Miyagi M, Yokozeki Y, Hirose N, Matsuura Y, Ohtori S, Takaso M	4. 巻 40
2. 論文標題 Nerve decompression surgery suppresses TNF- expression and T cell infiltration in a rat sciatic nerve chronic constriction injury model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 2537-2545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.25280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mukai M, Uchida K, Hirose N, Murakami K, Inoue G, Miyagi M, Shiga Y, Sekiguchi H, Inage K, Orita S, Suzuki T, Matsuura Y, Takaso M, Ohtori S	4. 巻 23
2. 論文標題 Frozen vein wrapping for chronic nerve constriction injury reduces sciatic nerve allodynia in a rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Neurosci	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12868-022-00719-7	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横関雄司、内田健太郎、向井晃務、廣澤直也、井上 玄、宮城正行、高相晶士
2. 発表標題 絞扼性神経障害モデルラットの末梢神経におけるApelinの発現動態の検討
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

〔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	内田 健太郎 (Uchida Kentaro) (50547578)	北里大学・医学部・講師 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	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	松下 治 (Matsushita Osamu) (00209537)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	大鳥 精司 (Ohtori Seiji) (40361430)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	
研究分担者	馬淵 洋 (Mabuchi Yo) (50424172)	順天堂大学・大学院医学研究科・特任准教授 (32620)	
研究分担者	宮城 正行 (Miyagi Masayuki) (90627556)	北里大学・医学部・講師 (32607)	

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