

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18074

研究課題名(和文) 広範囲末梢神経損傷に対する細胞移植を組み合わせた新規人工神経の作成

研究課題名(英文) A novel hybrid nerve conduit for peripheral nerve regeneration

研究代表者

木村 洋朗 (Kimura, Hiroo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40627048

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)：外層キトサンハイドロゲル、内層コラーゲンハイドロゲルで構成された人工神経(CCN)を作成した。シュワン細胞をコラーゲン層に封入しラット左坐骨神経欠損部に移植し(CCN+群)、CCN細胞なし群(CCN-群)、同細胞をシリコンチューブに封入した群(Silicone+群)、自家神経移植群(Auto群)と比較検討した。CCN+群はCCN-群およびSilicone+群と比較して有意な運動機能回復、髄鞘形成を示した。CCN-群とSilicone+群は歩行解析、組織学的解析いずれにおいても有意差を認めず、Auto群は最も優れた回復を示したが、再生軸索断面積に関してはCCN+群と有意差を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞移植を前提にした生体吸収性の人工神経を作成してラット末梢神経欠損部に移植し、神経再生が促進されたことを示した。現在、細胞移植を前提にした人工神経は存在しないため、本人工神経が臨床応用可能になれば、既存の人工神経よりも良好な神経再生とそれによる機能回復が得られる可能性が期待される。また、現時点での標準治療である自家神経移植術を回避することができれば、神経採取に伴う様々な問題の解決に繋がる。

研究成果の概要(英文)：We prepared a chitosan-collagen hydrogel nerve conduit (CCN) consisting of an outer layer of chitosan hydrogel and an inner layer of collagen hydrogel to encapsulate the intended cells. Rats with a 10-mm sciatic nerve defect were treated with Schwann cells encapsulated in CCN (CCN+), CCN without SCs (CCN-), SC-encapsulated silicone tube (silicone+), and autologous nerve transplanting (auto). Behavioral and histological analyses indicated that motor function recovery and myelination of the CCN+ group were superior to those of the CCN- and silicone+ groups, whereas the CCN- and silicone+ groups showed no significant differences in the recovery of motor function and nerve restoration. In conclusion, SC-encapsulated CCN possessed synergistic effect on peripheral nerve regeneration, especially remyelination of host SCs. The comparable recovery in the CCN- and silicone+ groups suggests that the structure of CCN and/or the effect of chitosan metabolites positively impact nerve regeneration.

研究分野：末梢神経障害

キーワード：末梢神経再生 人工神経 神経損傷 再生医療 神経麻痺

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷は、交通事故や労働災害、スポーツなどの外傷や悪性腫瘍摘出後などの外科的手術でしばしば発生し、運動障害や感覚障害、疼痛により日常生活に大きな障害を与える。末梢神経損傷は、欠損が少ない例に対しては神経断端を直接縫合して修復することが可能であるが、大きな欠損を有する場合、神経は牽引に弱いため無理な端々縫合は困難であり行われるべきではない。このような症例に対して古くから一般的に行われてきた手法は、受傷した神経と比べて重要度のより低い自己の他神経を採取して架橋する自家神経移植術や、近接する神経の一部を利用して遠位断端に縫合する神経移行術などである。しかし、これらはドナーとなる神経の支配領域の脱落症状は避けられず、同症状が術後の大きな愁訴になってしまうことがある。また、採取可能な神経長の限界や手術時間の延長、ドナー神経採取部の正常皮膚に侵襲を加え醜状痕を残してしまうことなど、様々な問題を有する。このような背景から、自家神経の代替となる素材の研究が行われるようになり、近年では国内外で種々の生体吸収材を用いた人工神経が開発され、その一部は既に臨床で使用することが可能となった。神経欠損の短い症例に対する使用に関しては、感覚機能の回復は比較的良好な成績が報告されているが、一方で、運動機能回復や広範囲神経欠損例に対する治療成績は依然として自家神経移植術に大きく劣るのが現状である。近年、神経再生における基礎研究では、人工神経に細胞移植を組み合わせることにより、人工神経単独に比較して再生がより促進されることが明らかになっている。これまでにシュワン細胞をはじめとした様々な細胞を用いられた研究結果が報告されているが、末梢神経再生に最適と考えられる細胞の特定は未だされておらず、また、細胞移植を前提とした構造を有する人工神経については、未だに臨床応用には至っていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、既存の人工神経の成績を大きく上回り、かつ細胞移植を組み合わせることで自家神経移植術と同等、あるいはそれ以上の組織学的および機能的回復を示すハイブリッド型人工神経(人工神経+細胞移植)を開発し、最終的に臨床応用を実現することである。申請者らは、これまでに慶應義塾大学医学部整形外科学教室および生理学教室が行ってきた脊髄・末梢神経再生の基礎研究から得られた最新の知見に加えて、同大学理工学部のバイオエンジニアリング技術により開発された新規の生体吸収性人工神経を用いて本研究を行う。この人工神経は、外層にキトサン、内層のコラーゲンと2種類の生体吸収性素材から構成されている管状構造を有する(図1)。そして、これまで過去に報告されてきた人工神経と異なり、内層のコラーゲン内あるいはその内腔表面に目的とする細胞を播種されることが可能であるという特徴を有しており、細胞移植を前提とした構造を有する人工神経である。同理工学部における *in vitro* 実験において、管腔内に播種した細胞による軸索伸長が確認されている。

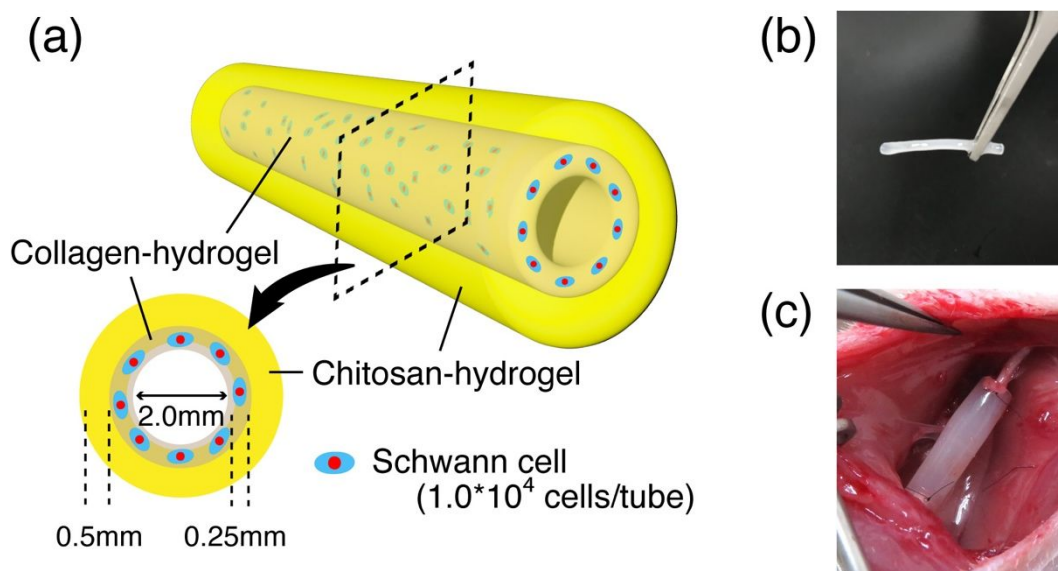


図1

- (a) 人工神経のシェーマ
- (b) 人工神経の肉眼画像
- (c) 人工神経をラット坐骨神経欠損部に移植した画像

3. 研究の方法

(1) 新規人工神経の生体内での動態の評価

外径 3mm、内径 2mm で外層がキトサンハイドロゲル、内層が細胞封入可能なコラーゲンハイドロゲルで構成された人工神経 (chitosan-collagen hydrogel nerve conduit: CCN) を SD ラット坐骨神経欠損部に移植し、1 か月毎に CCN の評価 (生体吸収性) および人工神経内の内腔の維持、内部の軸索再生の評価を行う。

(2) 人工神経とシュワン細胞移植を組み合わせたハイブリッド型人工神経の作成とその神経再生効果の検証

ffLuc で標識化した SD ラット由来シュワン細胞 (図 2) を CCN コラーゲン層に播種させ、ハイブリッド型人工神経を作成、SD ラット坐骨神経 10mm 欠損部に移植する (CCN+)。バイオイメージングを用いて移植細胞の生存、増殖を追跡すると共に、移植細胞なし群 (CCN-)、シリコンチューブに同シュワン細胞移植を行った群 (Silicone+)、自家神経移植群 (Auto) との比較検討を行う。比較内容としては、2 週毎の継時的な歩行解析 (sciatic functional index: SFI)、術後 12 週での組織学的評価 (トルイジンブルー染色、免疫蛍光組織染色、電子顕微鏡) を行った。

4. 研究成果

移植細胞が生存していた場合に認められるバイオイメージングでのルシフェリン発光は、移植後 4 週の段階で消失していた (図 2)。CCN+ 群は CCN- 群および Silicone+ 群と比較して、術後 12 週の段階で SFI が有意に高値であり (図 3)、免疫蛍光組織染色の P0 陽性領域および電子顕微鏡による G-ratio においても有意な髄鞘形成が確認された。一方、CCN- 群と Silicone+ 群は歩行解析、組織学的解析いずれにおいても有意差を認めなかった。Auto 群はいずれにおいても他群と比較して最も優れた回復を示したが、トルイジンブルー染色における再生軸索の断面積に関しては CCN+ 群と有意差を認めなかった (図 4)。以上の結果から、CCN および移植 Schwann 細胞それぞれが末梢神経再生に寄与し、それらを組み合わせたことにより神経再生がより促進したと考えられた。

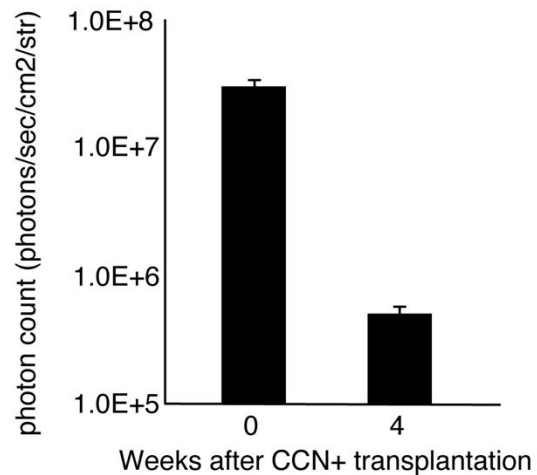
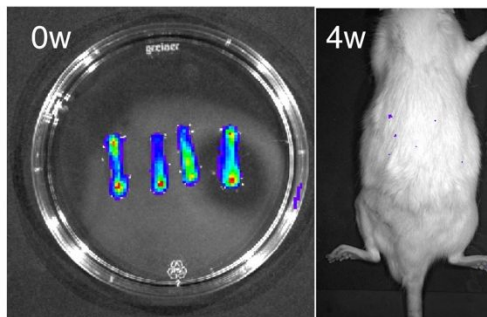


図 2 バイオイメージングによるルシフェリン発光

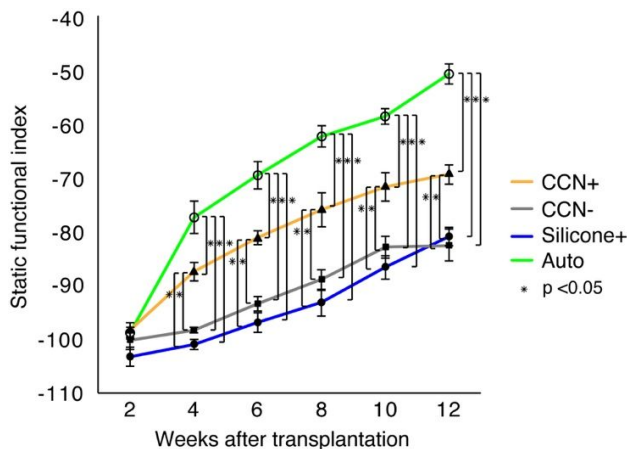


図 3 継時的歩行解析

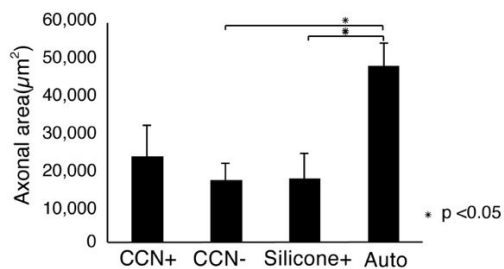
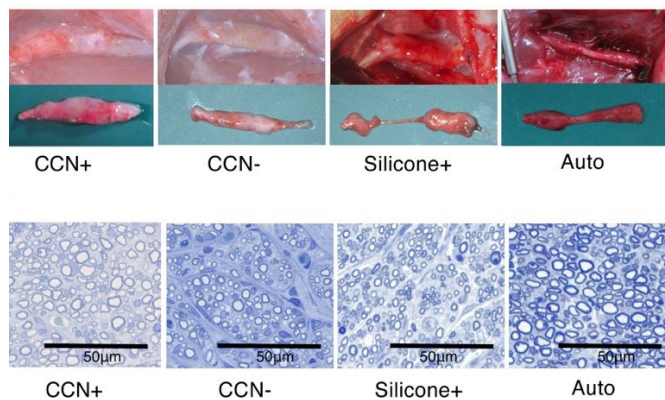


図4 術後12週の再生神経肉眼所見とトルイジンブルー染色における axon area

本結果ではわれわれが作成した人工神経の有用性を示すことができたが、自家神経移植には成績は及ばなかった。国内外の基礎研究結果をわれわれが渉猟した限り、現時点では自家神経を上回る人工神経は、細胞移植を組み合わせても未だ存在していない。そこで、今後は本人工神経にシュワン細胞とは異なる細胞移植を行って神経再生効果を検証し、最適な移植細胞の決定を行うことが望ましいと考えられる。また、より大型動物での *in vivo* 実験で既存の人工神経と比較検討して優位性を示すことができれば、臨床応用を実現させることができる可能性がある。最終的に自家神経移植に匹敵あるいは上回る神経再生効果を示すことができれば、広範囲末梢神経損傷に対する外科治療のパラダイムシフトになる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 武谷博明、木村洋朗、鈴木拓、松村昇、佐藤和毅、岩本卓士、中村雅也
2. 発表標題 キトサン・コラーゲンハイドロゲル人工神経を用いた末梢神経再生
3. 学会等名 第66回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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