

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K22496

研究課題名(和文) 異種移植による末梢神経をターゲットとした新たな麻痺治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for paralysis targeting peripheral nerves by xenotransplantation

研究代表者

佐伯 総太 (Saeki, Sota)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：30878327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はブタ胎児由来の神経幹細胞を末梢神経に異種移植することにより、新しい麻痺治療技術を開発することである。ヌードラットで脱神経モデルを作成し、神経断端にブタ胎児由来の神経幹細胞を移植した。移植3か月後に組織学的評価、電気生理学的評価を行った。ブタ胎児神経幹細胞の異種移植により、脱神経筋が機能再建されたことを示した。今後この技術を医療工学と組み合わせることで、麻痺の新しい治療法の開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷や神経変性疾患による下位運動ニューロン障害に対する有効な治療法はいまだに在しない。特にALSや脊髄損傷による呼吸筋麻痺は命にかかわる喫緊の課題である。申請者はブタ胎児由来の神経幹細胞を末梢神経へ移植することで、脱神経筋の機能再建が可能であることを示した。今後この異種移植技術と、Brain-Computer Interface等の医療工学を組み合わせることで、治療法のない難治性麻痺に対する新たな治療法の開発を目指す。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to develop a new paralysis treatment technique by xenotransplantation of neural stem cells derived from pig fetuses into peripheral nerves. A denervation model was created in nude rats, and neural stem cells derived from fetal pigs were transplanted into the nerve stump. Histological and electrophysiological evaluations were performed 3 months after transplantation. Xenotransplantation of porcine fetal neural stem cells demonstrated functional reconstruction of denervated muscles. By combining this technology with medical engineering, the company aims to develop new treatments for paralysis.

研究分野：再生医療

キーワード：末梢神経 再生医療 異種移植 神経幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

神経損傷や神経変性疾患では、脱神経による不可逆的な筋萎縮が問題になる。麻痺治療を目的として、脊髄への神経幹細胞移植が国内外で盛んに行われているが有効な治療法はいまだに確立していない。脊髄から標的筋までの距離は長く、移植された神経細胞が軸索を伸ばし標的筋へ到達するまでに筋萎縮が進行してしまう、という解決できない大きな課題が存在している。Brain-Computer Interfaces (BCI) などの医療工学の発達に伴い、機能的電気刺激を用いた麻痺患者の運動機能の回復も試みられている。しかし、この技術は骨格筋の神経支配が前提である。下位運動ニューロン疾患のために骨格筋に電極を設置して筋力を補う試みがなされているが、神経支配を失った筋肉では、神経筋接合部と筋線維が徐々に変性し、電気刺激に対する反応は低下する。一方、末梢神経をターゲットにした研究も以前から行われており、一定の成果を上げている。今後の臨床応用に向けて、ドナーとなる細胞の検討が必要となる。ドナー細胞の候補として、倫理的問題の少ない多能性幹細胞である iPS 細胞が挙げられる。しかし、複雑な相互作用を介する発生過程の再現は容易ではなく、高度な機能と構造を持った組織や臓器レベルの再生は未だ基礎的な段階であり実用化できていないのが現状である。申請者は、臓器移植のドナー不足を解決する方法として試みられてきた“異種移植”に着目した。異種移植は、近年のゲノム編集技術の発展や免疫抑制療法の改善により前臨床の移植成績が飛躍的に向上している。遺伝子操作されたブタの腎臓に続いて、ブタの心臓がヒトに移植されるなど、異種移植が世界から注目を集めている。臓器移植と異なり強烈な免疫反応がない細胞移植は、異種移植の中でも研究が進んでおり遺伝子操作されたブタの神経細胞がパーキンソン病モデルのサルに移植され、運動機能の改善が確認されている。また、ブタ由来の膵島移植ではすでに臨床試験が行われている。

## 2. 研究の目的

研究代表者はブタ胎子脊髄由来神経幹細胞を異種移植源として、脱神経筋の再支配を行う新たな運動麻痺の治療法の開発を最終目標としている。そのためにまずは、ブタ胎子由来神経幹細胞を末梢神経へ移植するための至適な採取時期を確定し、移植条件を最適化する必要がある。例えばラットにおける胎児脊髄由来ニューロンの採取の最適な時期は、ニューロンへの分化が最も進む妊娠 14 日目とされている。しかし、ブタの胎児脊髄由来ニューロンの採取の最適な時期は分かっていない。

本研究の目的は、ブタ胎児由来神経幹細胞を免疫不全ラットの末梢神経内に移植し、その効果を評価することで神経幹細胞の至適な採取時期や分離方法などの移植条件を検討することである。

## 3. 研究の方法

ヌードラットの腓骨神経を大腿レベルで切断し、脱神経モデルラットを作成した。1 週間後、妊娠時期の異なる妊娠マイクロミニブタ (妊娠 22 日目、妊娠 27 日目、妊娠 45 日目) から子宮を摘出した。子宮内のそれぞれのブタ胎児の脊髄から神経幹細胞を分離し、得られた細胞数に応じて脱神経モデルラットへ割り振り、片側の腓骨神経の遠位断端へ移植した。その結果、妊娠 22 日目モデルラット (E22 群)、妊娠 27 日目モデルラット (E27 群)、妊娠 45 日目モデルラット (E45 群) を作成した。神経細胞を含まない培地のみを移植したラットを対照群とした。

細胞移植から 12 週間後、各群で電気刺激装置 (ニューロパック S1、日本光電工業) を用いて電気生理学的評価を行った。前脛骨筋の複合筋活動電位 (CMAP) を測定後、各群の足関節の背屈角度を記録した。電気生理学的評価後、長母趾伸筋を採取し神経筋接合部の評価を行った。また、腓骨神経を採取し、神経細胞の生着の確認と再生した有髄軸索の数と面積を評価し、各群で比較した。

## 4. 研究成果

本研究では、すべての群でブタ胎児由来の神経細胞がヌードラットの末梢神経内に生着しており (図 1,2)、髄鞘化された軸索が確認された (図 3)。このことから、ブタ胎児由来神経細胞が異種であるヌードラットの末梢神経内に生着することが示された。また、E22 群と E27 群では、腓骨神経の電気刺激により足関節の背屈運動が見られた (図 4)。以上のことから、ブタ胎児神経幹細胞の末梢神経への異種移植により脱神経筋の機能回復が可能であることを示した。さらに有髄軸索の平均面積は E27 群が最も大きく (図 5)、胎児を採取する時期により移植成績に違いが見られた。本研究では、神経幹細胞の至適な採取時期は妊娠 27 日目に近いという事が示唆された。現状では、神経細胞の生着率や再生軸索数・電気生理学的な機能評価等の異種移植の成績にはばらつきがある。今後は移植条件をさらに検討し、移植成績の向上を目指す必要があると考えられる。

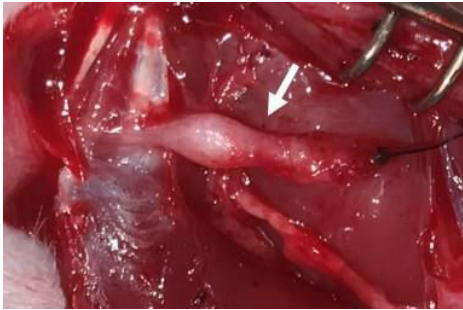


図 1 移植部位の神経断端の腫大 (白矢印)

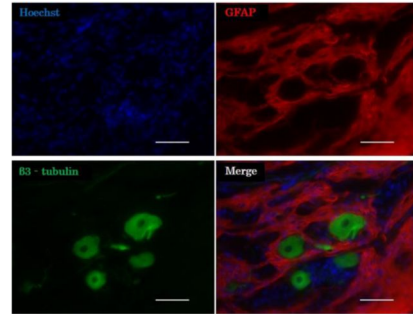


図 2 神経細胞移植部の組織学的評価  
緑;neuron, 赤;astrocyte

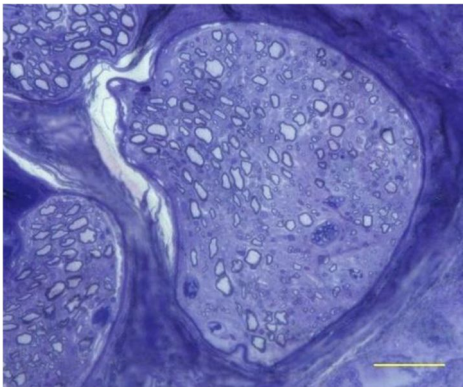


図 3 髄鞘化された軸索の再生

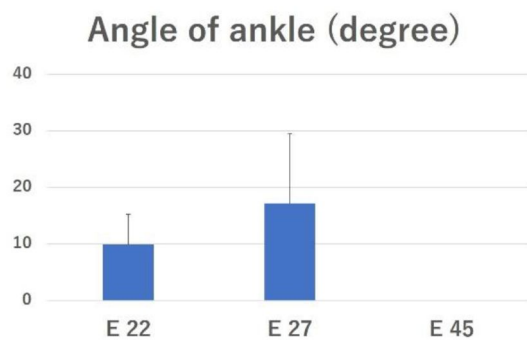


図 4 電気刺激による足関節の背屈角度

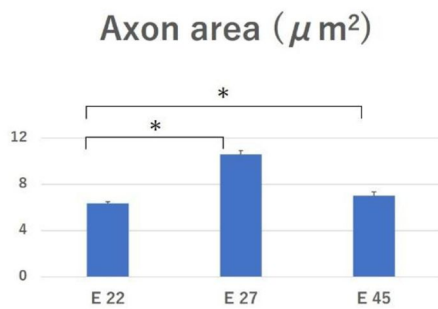


図 5 平均の軸索面積

ラットの胎児由来神経細胞を中枢神経系から切り離された末梢神経に移植する研究は、Erb らが 1993 年に最初に報告した。同様の研究はこれまで他にマウスやヒトの iPS 細胞を用いたものはあったが、ブタ胎児の神経細胞を異種の末梢神経に移植した研究は初めてである。再支配された筋肉は脳とつながっていないため、自発的に収縮することはできない。しかし、BCI の最近の発展により、脳からの信号を電気信号に変換し、電気神経回路を介して筋肉に伝達することが可能になり、電気刺激による運動の制御に寄与するようになった。本研究の移植技術を医療工学と組み合わせることで、麻痺の新しい治療法の開発に役立つと考えられる。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saeki Sota, Tokutake Katsuhiko, Takasu Masaki, Kurimoto Shigeru, Asami Yuta, Onaka Keiko, Saeki Masaomi, Hirata Hitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Functional Reconstruction of Denervated Muscle by Xenotransplantation of Neural Cells from Porcine to Rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8773 ~ 8773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23158773	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐伯総太
2. 発表標題 異種移植による新たな麻痺治療法の開発
3. 学会等名 第64回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯総太
2. 発表標題 異種移植による新たな麻痺治療法の開発
3. 学会等名 第36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 佐伯総太
2. 発表標題 異種移植による麻痺治療におけるブタの胎齢の影響
3. 学会等名 第65回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------