

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791907

研究課題名(和文)自己集合性ペプチドゲルによる神経再生の有用性

研究課題名(英文)neuranogenesis within a self-assembling peputide gel

研究代表者

妹尾 貴矢 (Seno, Takaya)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：90509465

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：神経修復に用いる人工神経の新たな素材として、100%化学合成されたゲル状素材である自己集合性ペプチドゲルを充填し実験を行った。人工神経に用いられるその他先行品と比較したところ、神経再生においてほぼ同等の効果を確認した。自家神経に比較すれば及ばないものの、ゲルを使用しない場合に比較して良好な神経再生が得られることを確認した。同素材は今後の100%合成での人工神経作成を目指すにあたり有用と思われる。

研究成果の概要(英文)：We used a new material of self-assembling peputide "Panacea gel" for nerve guidance conduit, and compared to the other prior gel products. We filled the nerve guidance tube lumens with the gels, and transplant into sciatic nerve defect on rat. The neural regeneration in Panacea gel group was well seen, and likely to prior product "PuraMatrix" group, but doesn't catch up to auto nerve graft group. The gel was quickly replaced by original cells, and doesn't inhibit anagenesis. We suggest that self-assembling peputide is usefull material for development of 100% synthetic nerve guidance conduit.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科学

キーワード：神経再生 自己集合性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

臨床医療において、神経欠損にもっとも用いられる治療は自家神経移植であるが、その治療には採取部位の大きな犠牲を伴うためそれに代わる神経再生の手法が模索されてきた。

また近年 100%合成の再生医療用スキャフォールドとして自己集合性ペプチドゲルが注目されており、細胞の3次元培養などに応用されている。従来の自己集合性ペプチドは強酸性であり細胞障害性が指摘されていたが、今回新たに中性の自己集合性ペプチドが開発された。

上記素材は 100%合成で感染症のリスクもなく、今後臨床応用も見据えた人工神経開発に有力な材料であると期待された

2. 研究の目的

(1) 前述の自己集合性ペプチドゲルが神経再生において有用かどうかを確認し、先行品およびその他代表的な人工神経材料と比較する。

(2) 新たな人工神経の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) ラット 神経欠損モデル実験 1

ラット (20 週齢: Wistar) の片側の坐骨神経を露出し、1cm 長の神経欠損を作成。そこへポリ乳酸シートで作成した人工神経チューブを移植し、チューブ内腔へ充填する材料を変えて、それぞれ神経再生の程度を観察・評価する

チューブ内へ充填する組織としては

- ① 新規 自己集合性ペプチドゲル (Panacea gel™)
- ② 先行品 自己集合性ペプチドゲル (PuraMatrix™)
- ③ 1 型コラーゲン
- ④ PBS
- ⑤ 自家神経の切断後再縫合 (Positive control)

これに

- ⑥ 神経欠損作成のみ (Negative control)

を加えた 6 群とし、それぞれ、術後 4, 8 週時点での神経学的評価を来ない最終的に移植組織の摘出と組織学的評価を行う。

(2) ラット 神経欠損モデル実験 2

ラット (8 週齢: Wistar) を実験 1 と同様に片側の坐骨神経欠損を作成、人工神経のチューブ素材として対側の下腹壁静脈を採取して利用した。

(3) ラット 神経欠損モデル実験 3

ラット (8 週齢: Wistar) を実験 1 と同様に片側の坐骨神経欠損を作成、人工神経のチューブ素材として対側の大腿静脈を採取して

利用した。また、各群を調整し

- i. Panacea gel™ (前実験での①群に相当)
- ii. PuraMatrix™ (同②群に相当)
- iii. Positive control (同⑤群に相当)
- iv. Negative control (同④群に相当)

の 4 群に分け、同様に比較、組織学的評価を行った。特に iv 群の Negative control は (1) において結果的に⑥群が対象として有用な組織が得られなかったため、純粋に充填剤での比較対象として設定した。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的評価

各群 8 週目にラット神経移植部を展開し、神経伝達を測定した。

Positive control の⑤群では神経回復に伴う信号伝達を確認できたが、各人工神経移植群 (①~③群) においては感知できなかった。

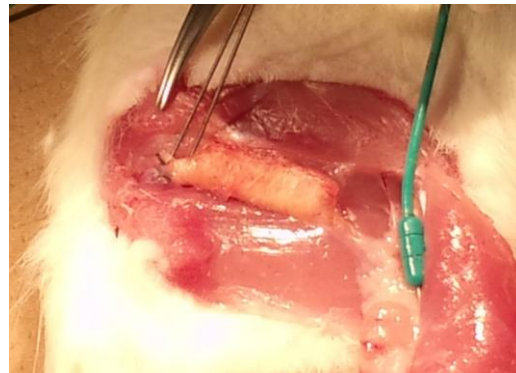


図 1 術後 8 週時点での人工神経の様子

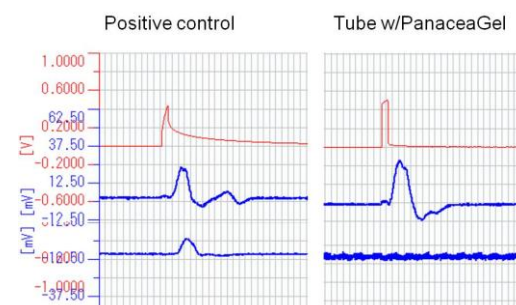


図 2 ⑤群及び①群での神経伝導
上段赤線がトリガー
中央青線が対側 (非手術肢)
下段青線が実験側

(2) 組織学的評価

①神経欠損モデル 1

ポリ乳酸チューブ型人工神経

組織学的評価は移植神経のうち中枢側と中央でそれぞれ横断面切片を作成しヘマトキシリン-エオシン (HE) 染色およびトルイジンブルー染色を行った。

神経断端により近い、人工神経中枢側の切片では各群において有髄繊維の新生を確認できた。①②③群においては再生軸索が豊富であり、④群においては再生軸索は認めるもののその本数は前者のおよそ 2/3 であった。しかし、上記 4 群においてはやはり人工神経

中央部で細胞密度が低下し、神経再生を確認できなかった。

⑤群においては、正常神経組織に比較して細胞の流入を認めていたが、有髄線維の数はほぼ保たれていた。⑥群では有効な再生組織を得ることができなかった。

同実験を等しての考察として、人工神経が太過ぎ、かつ平滑な人工膜を使用したため、側方からの栄養供給が極端に乏しかった状態と考えられ、結果的に、ある程度の距離で軸索再生が滞ったものと思われた。

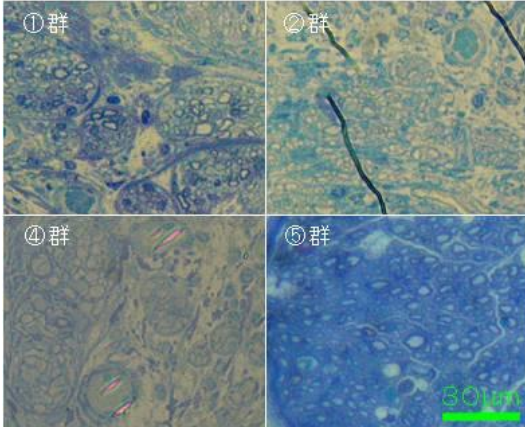


図3 術後8週神経吻合部近傍での横断面

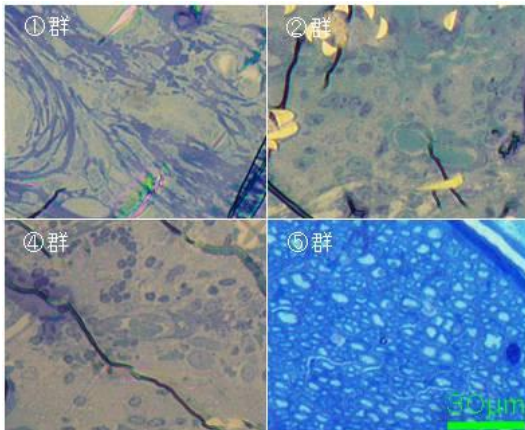


図4 術後8週人工神経中央部での横断面

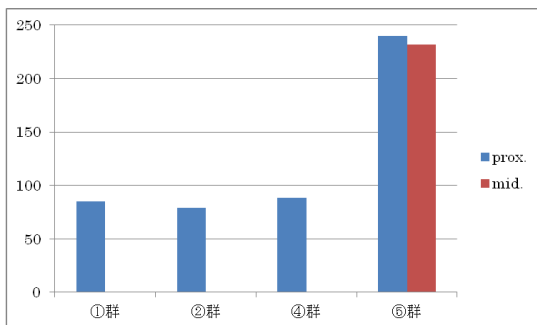


表1 面積当たり軸索数 (counts/10⁴ μm²)

⑨神経欠損モデル2

自家静脈（下腹壁静脈使用）人工神経
自家静脈を用いた人工神経モデルとして、下肢血流に影響のない対側下腹壁静脈の利用を試みた。

静脈が非常に細く、神経への吻合を行ったが、有効な組織を採取できず中断に至っ

た。

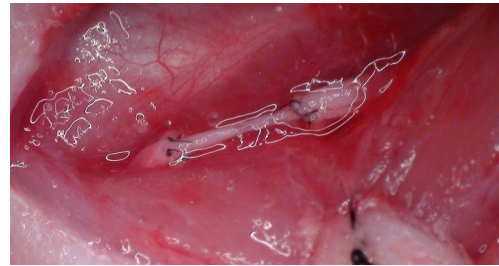


図5 下腹壁静脈は極端に細く十分な組織が得られなかった。

⑩神経欠損モデル3

自家静脈（対側大腿静脈使用）人工神経
坐骨神経と大腿静脈はほぼ口径差なく吻合可能であった。

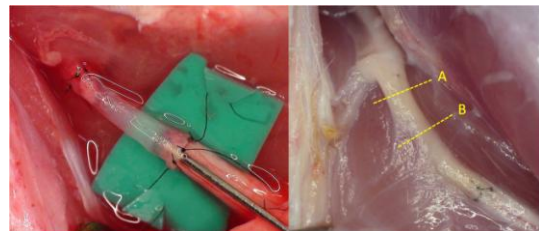


図6 大腿静脈を使用した人工神経（左）と組織採取時の状態（右：A中枢側 B中央で各々組織標本作成）

組織学的評価においては

HE染色にて、全群に再生軸索を確認できた。人工神経中枢側における軸索数は前回実験と同様に多数確認できたが、今回は人工神経中央部分においても数が少ないながら確認することができた。

各群・各期間・各部位における組織増を下に提示する

※以下の写真の並びは全て

i 群 (Panacea gel)	ii 群 (PuraMatrix)
iii 群 (自家神経)	iv 群 (PBS)

である

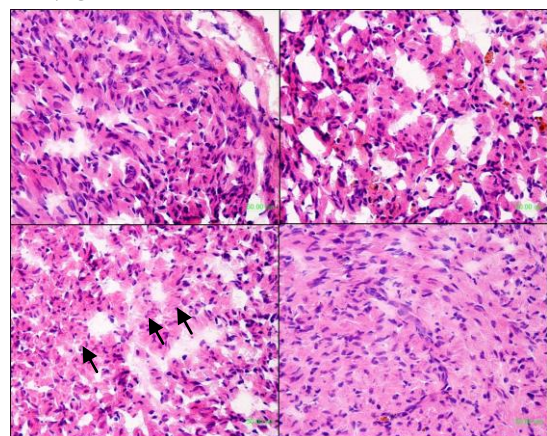


図7 術後4週 中枢側断面

自家神経移植であるiii群は各期間・各部位で大きな組織増の変化は乏しく、もともとの神経組織に繊維芽細胞の流入をきたしている以外は神経軸索も比較的維持されていた。（矢印で示すような核を持たない円形～立

方形に並んでいる胞体が軸索組織)
 4 週中枢側断面では i 群 ii 群 iv 群においても既にいくつかの再生軸索を視認できた。自己集合性ペプチドゲルを用いた i 群 ii 群においてはゲルの残存も確認できた。

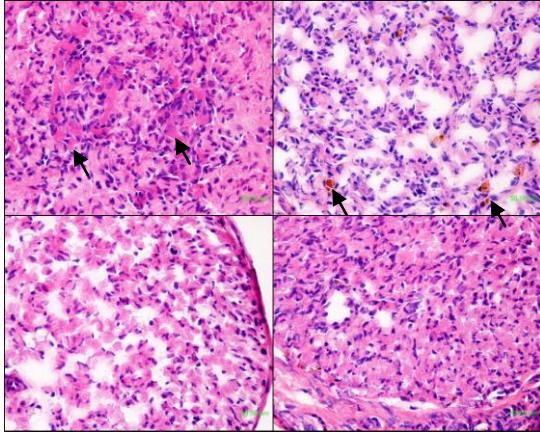


図 8 術後 4 週 中央部断面

4 週中央部断面においては iii 群以外では炎症細胞・繊維芽細胞の流入が主体であり、ゲルの残存と思われる部分も目立つ (矢印部分、各ゲルの性質の違いにより染色状態が異なるものと思われる)。

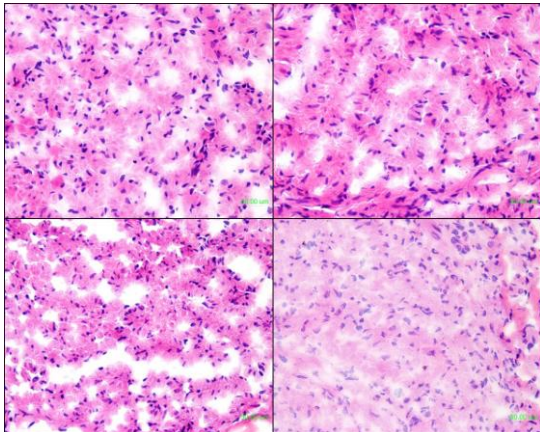


図 9 術後 8 週 中枢側断面

8 週では全体的に細胞数が減少し、明らかに再生軸索の増加を認める特に中枢側断面では盛んな神経再生を確認できた。

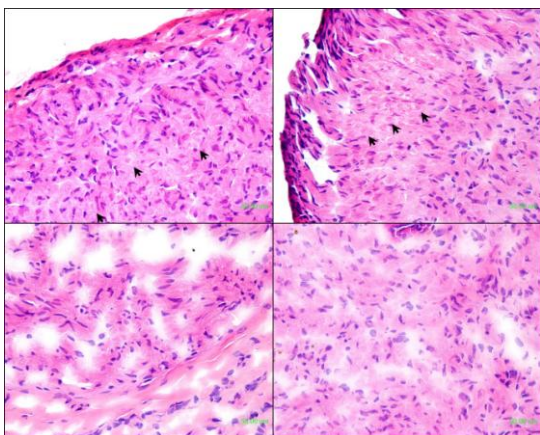


図 10 術後 8 週 中央部断面

術後 8 週となると充填した自己集合性ペプチドゲルそのものは確認できなくなった。また、4 週時点では認めなかった再生軸索も少ないながら確認できた。

各群間での比較としては i 群 ii 群に関しては細胞数、軸索数に明らかな差を認めなかった。iv 群との比較においては組織像に差を認めなかったものの、全体的に PBS を用いた iv 群は人工神経がやや細い印象を受けた。

下 (図 1 1) は左から i 群 ii 群 iv 群であるが

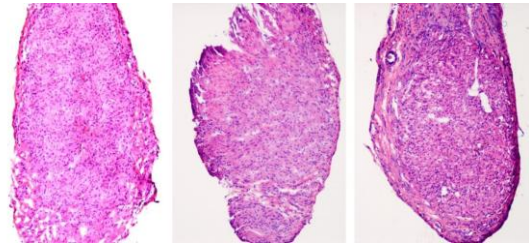


図 1 1 人工神経中央断面の全体像

同倍率で比較して iv 群のみ実際の内腔が径で $3/4$ 程度、面積としては半分近い。人工神経内腔は既に組織で置換されている為、これ以降大きく神経の外径が変化する可能性は乏しく、より長期間神経再生が進んだ局面において神経の回復の程度に差を生じ得るものと思われる。

これは粘性のある自己集合性ペプチドにより、人工神経が内部置換されるまで長期間内腔を維持できたことによると思われる。

(3) 人工神経の構造について

実験④実験⑤との比較においては、より若齢のラットを用いたこともあるが、自家静脈を用いて側面からの栄養を十分付加できたことが良好な神経再生につながったと思われる。将来的な臨床応用を睨むためには、今後はこの外壁の改良が必要となると思われる。

(4) 自己集合性ペプチドの有用性について

先に述べたように、人工神経構造を維持するためのスペーサーとしての有効性は示された。

また、術後 4 週時点でほとんど、8 週時点で全て吸収・置換されていることから生体への親和性も良好であった。

しかし今回使用した 2 製品 Panacea gel、PuraMartix はそれぞれ中性と強酸性というまったく性質の異なる素材であったにもかかわらず、その pH による差は全実験を通して全く認められなかった。神経再生の早期に組織置換されてしまうことを考えると、両者の差は臨床的にも殆ど差がない可能性がある。

両者はそのものが細胞増殖に作用するものではなく、あくまで組織が立体構造をとるための足場 (スキャフォールド) であるため、今後、この中に増殖因子等を混入するなど、

更なる人工神経改良の基礎となる物質と思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 0件)

※平成26年度中に発表を予定

[図書] (計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

妹尾 貴矢 (SENO Takaya)

大阪医科大学 形成外科学教室 助教
(准)

研究者番号：90509465

(2) 研究協力者

長谷川 健二郎 (HASEGAWA Kenjiro)

岡山大学医歯薬学総合研究科 形成外科学教室 准教授

研究者番号：90197674

成瀬 恵治 (NARUSE Keiji)

岡山大学医歯薬学総合研究科 システム生理学教室 教授

研究者番号：40252233

永井 祐介 (NAGAI Yusuke)

岡山大学医歯薬学総合研究科 システム生理学教室 大学院生