

ヒト iPS 細胞由来間葉系幹細胞で作製した神経導管による末梢神経の再生に成功

京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA) の趙 成珠特定研究員と池谷 真准教授の研究グループと、光澤 定己大学院生と池口 良輔准教授と松田 秀一教授 (京都大学大学院医学研究科整形外科) の研究グループ、青山 朋樹教授 (京都大学大学院医学研究科人間健康科学)、中山 功一教授 (佐賀大学医学部再生医学研究センター)、秋枝 静香代表取締役 (サイフューズ) との共同研究では、ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 由来間葉系幹細胞 (iMSC) で作製されたバイオ 3D 神経導管の、末梢神経再生に対する有効性とメカニズムを検証した。

免疫不全ラットの坐骨神経を 5mm 切断し、バイオ 3D 神経導管移植の対照群として使用したシリコンチューブ移植でも切断神経は手術後 8 週間で再生したが、形態、運動性、電気生理学、および筋重量に基づいた評価により、バイオ 3D 神経導管移植群の再生神経の方が有意に優れていることが分った。また、移植されたバイオ 3D 神経導管の内側と表面の両方に血管新生が観察され、iMSC の皮下移植では血管新生を促進する機能が認められた。

以上の結果から、iMSC で作製されたバイオ 3D 神経導管は末梢神経再生に有効であり、将来的に臨床応用に役立つ可能性が示されました。

研究の背景

外傷や腫瘍切除には、しばしば末梢神経の損傷が伴います。縫合可能な場合には、切断端の縫合により修復しますが、不可能な場合、最も標準的な治療法は自家神経移植です。移植された神経は軸索伸長に最適な足場となり、神経の修復を助けます。しかし一方で、自家移植には採取部位の感染、供給量の制限、神経腫形成、口径の不一致、追加の外科的切開の必要性、手術時間の増加など、いくつかの潜在的な欠点がある。

他家由来神経移植はこれらの欠点のいくつかを解決しますが、周術期の免疫抑制や採取神経の適切な保存などが必要となります。人工神経導管は 3 番目の選択肢であり、すでに臨床の場で実際に使用されています。支持細胞、スキャフォールド、成長因子、血管形成能などが改善された人工神経導管が報告されていま

すが、人工材料を使用するため、生体適合性の低さ、異物反応、感染のリスクという課題があります。

これらの課題を克服するために、本研究では、品質が安定かつ管理しやすい、そして理論的に無限に拡大培養が可能な iPS 細胞から、免疫調節分子の分泌、エキソソームの分泌、損傷組織の修復などが期待される間葉系幹細胞 (iMSC) を誘導して、神経導管を作製した。今回使用した iMSC は、iPS 細胞から神経堤細胞 (NCC) を介して iMSC へと誘導されたが、各段階で拡大培養、凍結保存、品質評価が可能であり、かつ動物由来成分を排除した方法で誘導されている。これらの特徴は、将来の臨床応用を考えた場合に大きな利点になると考えられる。

研究結果

1. バイオ 3D 神経導管の作製

iMSC を温度応答性プレートで培養して細胞シートを生成し、次に細胞シートを低接着プレートに移して塊状の iMSC (clump-iMSC, 以下、C-iMSC) を作製しました (図 1A、B)。直径 $500 \pm 50 \mu\text{m}$ の C-iMSC を、バイオ 3D プリンターを使って 9×9 剣山に配置し、さらに培養して管状の構造体 (バイオ 3D 神経導管) を作製しました。染色により、C-iMSC およびバイオ 3D 神経導管の iMSC の周囲に細胞外マトリクス (I 型コラーゲン) の存在が確認されました (図 1C)。バイオ 3D 神経導管の各作製段階での網羅的遺伝子発現解析を行うと、iMSC、細胞シート、C-iMSC、およびバイオ 3D 神経導管の遺伝子発現パターンは、骨髄由来間葉系幹細胞に類似していることが明らかになりました。

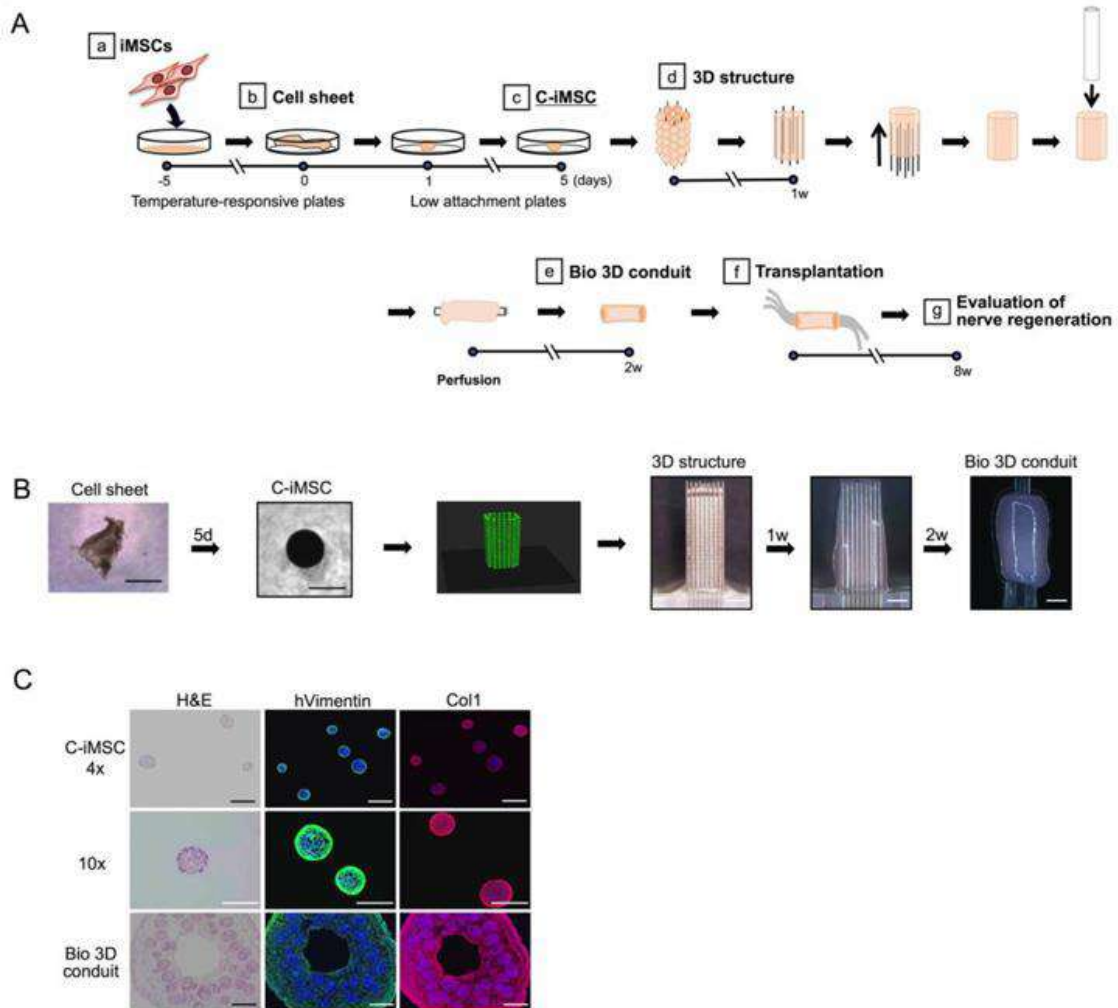


図 1. 動物由来成分を含まない iMSC からのバイオ 3D 神経導管の作製

A. バイオ 3D 神経導管の作製方法

B. バイオ 3D 神経導管作製の各段階の画像

C. C-iMSC と Bio 3D 導管の断面画像

Col1, I 型コラーゲン

2. バイオ 3D 神経導管の移植

次に、バイオ 3D 神経導管の治療効果を調べるために、ラットの坐骨神経切断モデルへの移植を行いました。移植手術の 8 週間後に肉眼的観察を行い、導管の形態と周囲組織への影響を確認しました。バイオ 3D 神経導管移植群と、対照群として使用したシリコンチューブ移植群の両方で、切断神経はすべてのラットで接続が回復していました。また、バイオ 3D 神経導管は、8 週間後も形状を維持しており、興味深いことに、表層で血管新生が顕著に観察されました。バ

バイオ 3D 神経導管の横断面と縦断面の観察から、バイオ 3D 神経導管の中心部分に再生神経があり、その周囲に血管新生が見られました。対照的に、シリコンチューブ移植群では、非常に細い再生神経のみが観察されました。

3. 再生神経の機能回復

バイオ 3D 神経導管移植群の機能回復を調べるために、下記の評価を行いました。

ピンプリックテストにより、感覚神経の回復を評価しました。痛覚刺激の度合いによるグレードを 1~3 の 3 段階で定義すると（グレード 3 が高反応）、手術の 8 週間後、バイオ 3D 神経導管移植群のすべてのラットがグレード 3 と評価されました（図 2A）。シリコンチューブ移植群では、1 匹のラットがグレード 3、5 匹のラットがグレード 2 と評価されました。どちらのグループも感覚神経の機能回復が観察されましたが、2 つのグループ間に有意差があり、バイオ 3D 神経導管移植群の方が、感覚神経がより機能的に回復しているという結果になりました。

トースプレッドテストにより、運動神経の回復を評価しました。指の広がり度合いによるグレードを 1~3 で定義すると（グレード 3 が広がりが大きい）、手術の 8 週間後、バイオ 3D 神経導管移植群では、5 匹のラットがグレード 3、1 匹のラットがグレード 2 と評価されました（図 2B）。シリコンチューブ移植群では、1 匹のラットがグレード 2、3 匹のラットがグレード 1、2 匹のラットがグレード 0 と評価されました。2 つのグループ間に有意差があり、バイオ 3D 神経導管移植群の方が、運動神経がより機能的に回復しているという結果を得られた。

行動機能回復を評価するために、トレッドミル上での歩行時の、後肢の運動特性を測定しました。平均ドラッグトゥ（DT）は、バイオ 3D 神経導管移植群とシリコンチューブ移植群の間に有意差はありませんでした（図 2C）。バイオ 3D 神経導管移植群は、シリコンチューブ移植群よりも足の仰角（AoA）が大きいことが分かりました（図 2D）。

新しく伸長した軸索が標的筋の神経筋接合部に到達することを確認するために、足の内転筋の電気生理学的研究を行いました。バイオ 3D 神経導管移植群は、シリコンチューブ移植群よりも大幅に大きな振幅を示しました（図 2E）。平均運動神経伝導速度（MNCV）は、シリコンチューブ移植群よりもバイオ 3D 神経導管移植群の方が高いという結果になりましたが、差は有意ではありませんでした。

た（図 2F）。これらのデータは、バイオ 3D 神経導管移植群で標的の筋肉がより強く再び神経支配されることを示していました。

最後に、末梢神経損傷によって引き起こされる筋萎縮をチェックするために、前脛骨筋の湿筋肉重量を測定しました。筋肉の重量は、バイオ 3D 神経導管移植群の方がシリコンチューブ移植群よりも有意に重いということが観察されました（図 2G）。これは、シリコンチューブ移植群の筋萎縮がより大きいことを示しています。バイオ 3D 神経導管移植群で筋萎縮が少なかったことから、回復の初期段階から標的筋が再び神経支配されたことが示唆されました。

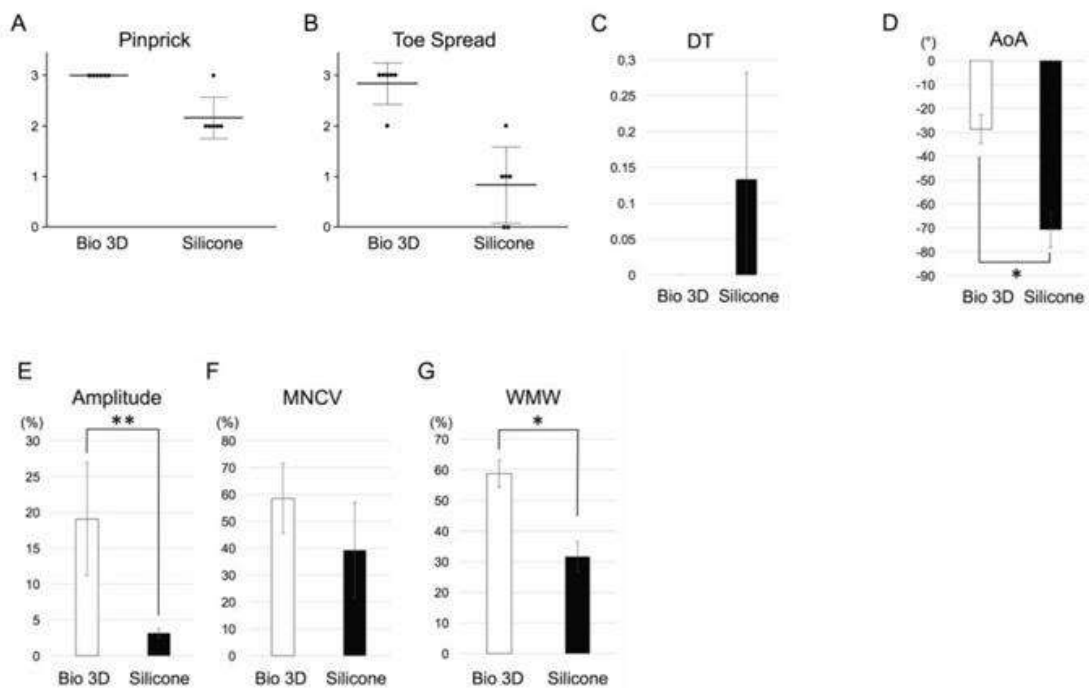


図 2. 手術後 8 週間での機能回復

- A. ピンプリックテスト（感覚神経の回復）
- B. トースプレッドテスト（運動神経の回復）
- C. ドラッグトゥ（DT）
- D. 足の仰角（AoA）
- E. F. 電気生理学的解析
振幅（Amplitude）と運動神経伝導速度（MNCV）
- G. 前脛骨筋の湿潤筋重量（WMW）

4. 再生神経の組織学的解析

再生神経を評価するために、組織学的解析を行いました。

トルイジンブルー染色により、バイオ 3D 神経導管移植群の中央部分 (図 3A-a、c、e) の有髄軸索) の数は、シリコンチューブ移植群 (図 3A-b、d、f) に比べて、多いということが観察されました。透過型電子顕微鏡 (TEM) により、バイオ 3D 神経導管移植群には形態的に正常なミエリン鞘を持つ有髄軸索が存在することが明らかになりました。また、バイオ 3D 神経導管移植群は、シリコンチューブ移植群と比較して、有髄軸索径が有為に大きく、ミエリンが厚いことが分かりました。最後に、バイオ 3D 神経導管移植群の G 比 (軸索直径 ÷ ミエリン直径) は、シリコンチューブ移植群よりも有意に小さいことが分かりました。以上より、再生された軸索の形態は、シリコンチューブ移植群の形態よりも、現在のバイオ 3D 神経導管 (ヒト iMSC) 移植群の方が、有髄軸索の量と質の両方の点で優れていることが実証されました。

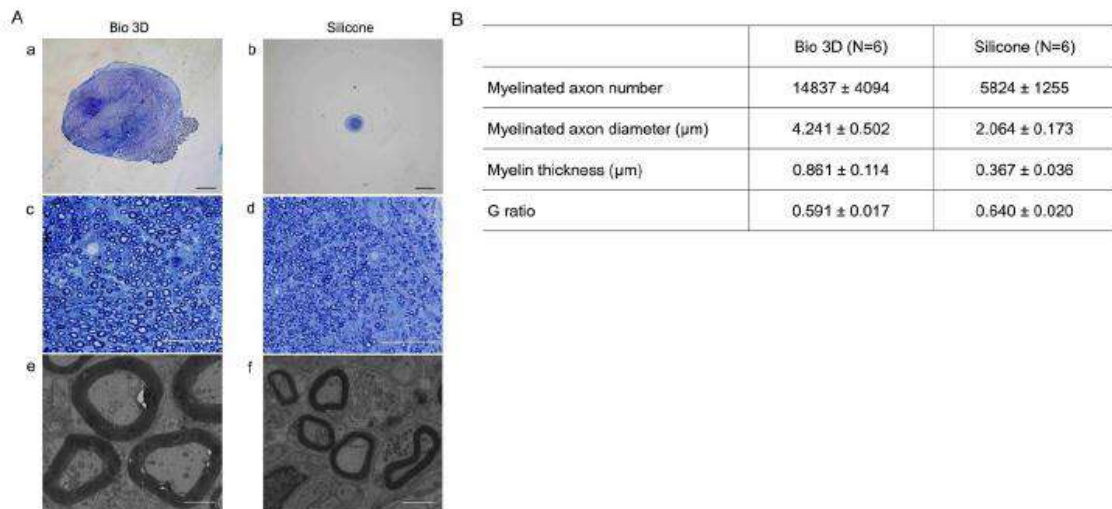


図 3. 再生神経の組織学的解析

- A. (a-d) 光学顕微鏡下の横断面 (トルイジンブルー染色) (e、f) 透過型電子顕微鏡による極薄横断面スケールバー: (a、b) 1000 μm、(c、d) 50 μm、(e、f) 2 μm
- B. バイオ 3D 神経導管移植群は、ミエリン化軸索数が多く、軸索径が大きく、ミエリンが厚い (P < 0.01)

5. Bio 3D 導管の神経成長促進および血管成長促進の可能性

MSC は多種多様な分泌性の因子を生成することが知られています。そこで、バイオ 3D 神経導管が神経成長因子と血管成長因子を発現しているかどうかを評価しました。その結果、網羅的遺伝子発現解析では、各バイオ 3D 神経導管の各ステップで、神経発生および血管形成関連遺伝子が発現していることが明らかとなりました。また、RT-qPCR では、代表的な神経成長 (NGF、NRG1、TRAF6、および HGF) と血管成長 (VEGFA、VEGFB、ANGPT1、および ANGPT2) に関連する遺伝子の発現が確認されました。これらのデータは、移植前のバイオ 3D 神経導管が、神経成長促進機能と血管成長促進機能を通じて神経再生をサポートする可能性があることを示唆しています。

6. iMSC の血管新生の可能性

血管新生促進因子がバイオ 3D 神経導管で発現し、また導管周囲に豊富な血管新生が肉眼的に観察されたため、アテロコラーゲンスポンジ (Pelnac) に iMSC を埋め込み、ラットの皮下に移植後 2 週間で観察しました (図 4A)。iMSC を埋め込んだ Pelnac 移植群 (iMSC 移植群、図 4A 左) の血管新生の総面積は、Pelnac のみの移植群 (図 4A 中央) あるいはシリコン移植群 (図 4A 右) よりも大きくなる傾向がありました (図 4B)。iMSC 移植群の血管新生の全長は、Pelnac 移植群およびシリコン移植群のそれよりも有意に長いという結果が観察されました (図 4C)。最後に、血管網の形成を評価するために iMSC 移植群の血管新生の閉じたネットワークの数は、Pelnac 移植群およびシリコン移植群のネットワークよりも大幅に多いということが観察されました (図 4D)。これらの結果により、皮下移植された iMSC が、対照群 (Pelnac 群) としての Pelnac 単独よりも強く形成された血管をより強く誘導することが明らかになりました。

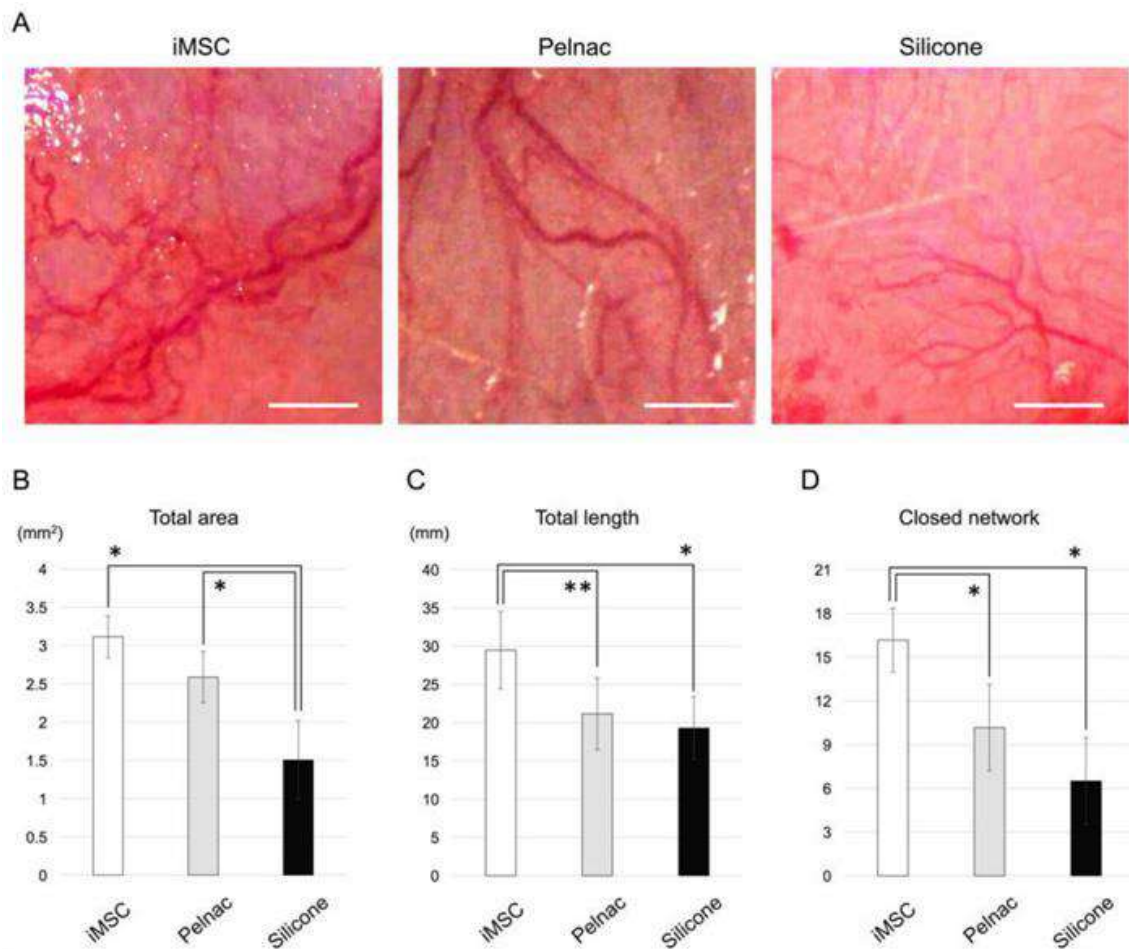


図 4. 皮下移植による血管新生アッセイ

A. 3つのグループの手術用顕微鏡下の肉眼写真 iMSC 移植群は多くの血管新生を示すスケールバーは 1 mm

B. iMSC グループの血管新生の総面積 (* P < 0.01)

C. iMSC グループの血管新生の全長 (** P < 0.05、* P < 0.01)

D. iMSC グループの血管新生の閉じたネットワークの数 (* P < 0.01)

まとめ

本研究では、動物由来成分を含まない方法で作製されたヒト iMSC で作製されたバイオ 3D 神経導管の、末梢神経再生に対する有効性とメカニズムを検証しました。末梢神経再生に対するバイオ 3D 神経導管の有効性は、線維芽細胞および歯肉由来の MSC で確認されていましたが、本研究では iPS 細胞から作製した MSC (iMSC) を使用したという点で新規性があります。

また、これまでの研究から、切断神経の周囲で新たに形成された血管は、シュワ

ン細胞が切断部位を横切る足場となり、軸索再生のより良い環境を与えることが知られていました。本研究では、バイオ 3D 神経導管の内側と外側の両方に新たな血管形成が確認されており、またラットへの皮下移植により iMSC に血管新生を誘導する能力が確認されました（図 4）。以上から、iMSC から作製されたバイオ 3D 神経導管は、血管新生を介して末梢神経再生に寄与している可能性が示されました。

今後、臨床応用のためには、安全性、有効性、コストに関するさらなる研究が必要と考えられますが、iMSC 由来のバイオ 3D 神経導管は神経欠損の治療において神経自家移植片に代わる有用なものになる可能性があります。

論文情報

タイトル: Pro-angiogenic scaffold-free Bio three-dimensional conduit developed from human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells promotes peripheral nerve regeneration

雑誌: Scientific Reports

URL: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-68745-1>

日本語原文 <https://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/pressrelease/news/200804-000000.html>

文 JST 客観日本編集部