

3. 今後の展望

1) 人工神経と血管束

*¹関西電力病院脊椎外科・手外科・整形外科, *²近畿大学医学部整形外科学教室

貝澤 幸俊*¹, 太田 壮一*¹, 柿木 良介*²

Yukitoshi KAIZAWA, Souichi OHTA, Ryosuke KAKINOKI



1. はじめに

末梢神経欠損部位を架橋するグラフトの選択肢は、自家神経、同種神経、そして人工神経だが、我が国においては、同種神経移植は一般的には行われておらず、自家神経移植か、人工神経移植かの選択となる。自家神経移植は、神経再生に促進的に働く細胞外マトリックス (extra cellular matrix, ECM) と、末梢神経再生の際に極めて重要な役割を果たすシュワン細胞を豊富に含む3次元の足場で欠損部を架橋することであり、末梢神経欠損に対する現在の標準的治療であるが、採取部の神経障害の問題や採取可能な長さに限界があるといった課題を有する。これらの問題がない人工神経は自家神経の代替として期待されているが、その成績は自家神経に及ばない。本邦よりも早くから人工神経が臨床応用されてきた欧米では、中空構造の人工神経の使用は3 cm以下の重要でない知覚神経の欠損に限定すべき¹⁾とされ、運動神経や長距離欠損に対しては、通常自家神経移植が行われる。したがって、本邦における人工神経開発の究極の目的は、運動神経や長距離欠損に対して使用しても自家神経移植と同等の成績が得られる人工神経の開発、ということになる。

人工神経の基本概念はtubulizationであり、基本的構造は中空構造である。神経導管で架橋された神経断端間の空間に、遠位神経断端から分泌される神経栄養因子や神経断端から遊走してくる細胞が蓄積され、神経再生に適した微小空間が維持されることが、良好な神経再生につながると考えられている。しかし、中空構造の人工神経導管単独で

は限界があり、導管内に何らかの要素を追加することで神経再生を促進させようとする試みが数多く行われてきている。細胞、足場、成長因子は組織工学における基本3要素であり、これらを導管内に移植することで一定の成果が得られてきているが、近年、末梢神経再生における血管新生の重要性が明らかとなり、導管内の血行が注目されてきている^{2)~4)}。

本稿では、血管束を含む神経導管 (vessel-containing tube, VCT) における末梢神経再生、および血管束を含めることの効果について述べる。また、VCTに改良を加え、高等動物を用いた実験や自家神経移植との比較も行ってきたので、これらについても順次述べていくこととする。

2. 末梢神経再生と新生血管

血行賦与が、末梢神経再生にとってどの程度重要なのかに関してはコンセンサスが得られていない。例えば、血管柄付き神経移植と通常の神経移植を比較した研究の結果は、基礎実験レベルにおいてでさえ、血管柄付き神経移植の優位性を示したもの^{5),6)}と、優位性は示されなかったと結論付けるもの^{7),8)}に分かれる。しかし、組織学的には古くから神経再生の旺盛な部位に、より多くの血管新生が生じていることが確認されており^{9),10)}、bands of büngnerを形成するシュワン細胞の配列に先立って新生血管網の形成が生じていることも、免疫染色でとらえられている^{11),12)}。近年、Cattinらは、新生血管壁がシュワン細胞遊走の直接的なガイドとなっていることを分子生物学的に証明し²⁾、末梢神経再生初期において血管新生が極めて重要であることが再認識されてきている。

3. 如何にして人工神経導管に血行を賦与するか

神経導管内の血行は、移植母床および導管内に引き込ま

■ 著者連絡先

関西電力病院脊椎外科・手外科・整形外科
(〒553-0003 大阪府大阪市福島区福島2-1-7)
E-mail. kaizawayukitoshi@gmail.com

れた神経両断端からの新生血管に依存するため、特に長距離欠損に対する架橋の際には、導管内中央部で虚血が生じやすい。多孔性構造を有し血管透過性を有する導管壁は、血行の問題は解決する可能性があるが、導管壁の孔が大きすぎて、導管内外の物質・細胞の出入りを許容しすぎると、末梢神経再生に適切な微小空間の維持が困難となり、かえって神経再生を阻害し得る。孔の径は、 10^5 Daで 10^6 Daの時よりも神経再生が有意に良好であったとの動物実験レベルの報告¹³⁾があるので、 10^5 Daあたりが理想的である可能性はあるが、ヒトにおける理想的な径についてのコンセンサスはない。

また、そもそも導管内血行が移植母床の血流に依存するようでは、複数回手術後で移植母床が高度に瘢痕化されてしまっている場合などで成績が期待しにくい(あるいは母床血行のための皮弁術が必要となる)。したがって、人工神経導管に独立した形で血行を賦与することが望ましい。導管内に血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)を移植する報告¹²⁾や、prefabricationにより人工神経導管を、いわゆる血管柄付き人工神経のような形で使用する報告¹⁴⁾もあるが、臨床応用を考えた場合、VEGFに関してはヒトの末梢神経再生に対しての有効量がはっきりしていないことや、効果を持続させるための投与方法などに課題を残していると考えられ、また、prefabricationでは数週間の待機時間と複数回の手術が必要なことが難点と思われる。神経導管内に血管束を挿入する人工神経(VCT)¹⁵⁾は、挿入する血管束を準備する際に、ある程度のマイクロの技術を要することはあるが、複数回の手術を要さず、実臨床に応用しやすいと考えられる。

4. 血管束を含んだ人工神経導管(VCT)

Lundborgらはsilicone chamberモデルを用いて、末梢神経欠損に対する中空構造導管による架橋の有効性を示したが、シリコンチューブによるラット坐骨神経の架橋可能な欠損距離は10 mmまでで、限界があった¹⁶⁾。

Kakinokiはラットの腓腹動静脈束をモニター皮弁付きで挙上し、この血管束を、スリットを加えたシリコンチューブ内に、坐骨神経欠損部に沿わせる形で挿入するモデルを考案¹⁵⁾し、シリコンチューブ内に血管束を含めた人工神経導管(VCT)の有効性、応用性についての研究を進めてきた。

1) VCTでは神経再生が速くなる

ラット坐骨神経10 mm欠損を、①シリコンチューブ単独(empty tube群, ET群)、②腓腹動静脈を含めたシリコンチューブ(VCT群)、③結紮処理を加えた腓腹動静脈を含め

たシリコンチューブ(ligated VCT群, LVCT群)で架橋し、3群間での比較実験を行った¹⁵⁾。

まず、3群の導管内の血行を経時的に血管造影で評価した。ET群、VCT群では切離神経断端両端から新生血管が伸びてきているのみであったが、VCT群では、これに加えて、挿入した血管束から多くの新生血管が形成されていることが確認された。術後12週以降で有意差はみられなくなったが、術後3週、6週でVCT群では他2群と比較し、チューブ内で有意に多くの新生血管が確認され、VCTにおいては、挿入した血管束が術後早期の導管内の新生血管網形成に貢献していることが示唆された。

続いて、再生神経を比較した。術後6週、12週では、足底内転筋で計測した複合筋活動電位(compound muscle action potential, CMAP)の振幅と運動神経速度は、VCT群が他の2群と比較して有意に大きかったが、術後24週では有意差がなくなっていた。この傾向は、再生神経遠位部で計測した有髄軸索数でも同様であり、VCTでは最終的な再生神経の質は変わらないが、神経再生を速める効果があると考えられた。また、VCT群では、再生軸索は移植した血管束を中心として、この周囲に形成されることが組織学的にも確認され、これまでに報告されている新生血管網形成と軸索再生の関係に矛盾しない結果となった。移植した血管束が足場として機能し、神経再生を促進する可能性も考えたが、VCT群でLVCT群よりも有意に神経再生が速かったことから、VCTの効果は挿入血管自体が足場として機能することよりも血行賦与によるところが大きいと考えられた。

2) VCTでは架橋可能な神経欠損距離が延長される

ラット坐骨神経の欠損長を20 mmとし、前述の3群で比較したところ、20 mm欠損でも神経が再生したのはVCT群だけであった¹⁷⁾。さらに欠損長を25 mmとしても、VCT群では再生神経が確認され¹⁸⁾、VCTには架橋可能な欠損距離を延長する効果があると考えられた。

5. VCTの応用

組織工学の基本3要素の観点でVCTを考察すると、VCT内には移植した血管束による足場こそあるが、細胞、成長因子は神経断端部から遊走してくるもの、分泌されるものに依存しているということになる。我々はVCTの導管内に細胞移植、足場移植を追加した人工神経導管で神経再生がどこまで改善するかを評価し、現在の臨床における標準治療である自家神経移植との比較についても長距離欠損モデルを用いて行ってきたので、これらに関して順次記述していくこととする。

1) VCT + 骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSCs) 移植

近年、細胞治療が注目されており、末梢神経再生の分野においても細胞治療を組み合わせる様々な試みがなされている。しかし、何をどのようにして移植するのかに関するコンセンサスは得られていない。シュワン細胞は末梢神経再生において極めて重要だが、シュワン細胞だけがあれば十分というわけではない。線維芽細胞¹⁹⁾やマクロファージ⁴⁾との連携が重要であり、これらを最適なバランスで移植することが理想的であるが、神経再生の時期によって必要になる細胞の種類も割合も変わるため、現実的には難しい。この意味で、環境依存性の分化能を有し、神経系の細胞への分化能も有するBM-MSCs^{20),21)}を未分化のまま移植する戦略は有用と考えられる。BM-MSCsには神経栄養因子²²⁾や血管新生促進因子²³⁾を分泌するparacrine effectがあり、また、間葉系幹細胞の中では比較的臨床使用経験のevidenceが蓄積されている点も、臨床応用を見据えた際には有利であると考えた。

移植方法として最も一般的に行われているのはシリンジによる導管内への注入だが、細胞の生着率・生存率の低さ²⁴⁾を考えると、理論的に期待される細胞移植の効果を得られない可能性がある。VCTにおいては、挿入した血管束が、新生血管の豊富な細胞接着のための足場として機能するので、通常の導管内に移植した場合よりも移植細胞が生着・生存しやすきことが期待でき、細胞移植効果の向上、さらには神経再生の向上につながる可能性があると考えた。

(1) VCT < VCT + BM-MSCs

まず、ラット坐骨神経15 mm欠損モデルを用いて実験を行った²⁰⁾。①VCT群、②通常のシリコンチューブ内にBM-MSCsを移植したET + BM-MSCs群、③VCT内にBM-MSCsを移植したVCT + BM-MSCs群を作成し、再生神経を評価した。ET + BM-MSCs群では15 mmの欠損を越えた神経再生はみられなかった。VCT + BM-MSCs群はVCT群よりも電気生理学的にも、組織学的にも有意差をもって良好な再生神経が、術後12週、24週ともに確認された。また、オスから採取したBM-MSCsを、メスの15 mm坐骨神経欠損に対して移植し、*sry*を介して移植細胞を識別できるようにしたところ、術後12週のVCT + BM-MSCs群で再生神経を構成する細胞のうち、およそ3割が移植したBM-MSCsであることが分かった。さらに、S-100, glial fibrillary acidic protein (GFAP) に対する免疫染色とY染色体に対する*in situ* hybridizationを行ったところ、移植細胞の一部がS-100, GFAP陽性であることが確認され、シュワン細胞様細胞に分化していることが示唆された。

(2) VCT + BM-MSCs < 自家神経移植

この結果を受けて、イヌ尺骨神経30 mm欠損モデルを作成し、高等動物の長距離欠損での自家神経移植 (reverse autograft) との比較を行った²¹⁾。VCT + BM-MSCs群、自家神経移植群共に、30 mmの欠損を越えて良好な再生神経がみられたが、術後12週の電気生理学的検査では、自家神経移植群で有意差をもって良好な再生神経がみられた。術後24週でも、有意差こそ消失していたが、自家神経移植群で優れた傾向を認めた。術後24週の小指球筋湿重量、組織学的評価 (有髄軸索数と有髄軸索直径) においても有意差はなかったが、自家神経移植群で優れた傾向を認め、人工神経にはさらなる改良が必要と考えた。なお、移植細胞をあらかじめCM-DiIで染色してから移植し、術後8週で再生神経を採取し、免疫染色を行ったところ、約35%のCM-DiI陽性細胞でS-100, GFAPが陽性となり、ここでもVCT内に移植したBM-MSCsはその一部がシュワン細胞様細胞へ分化することが示唆された。

2) VCT + BM-MSCs (細胞) + DANM (足場)

さらなる改良のために、導管内の足場として、脱細胞化同種神経マトリックス (decellularized allogenic nerve matrix, DANM) を追加した。脱細胞処理は、凍結解凍処理²⁵⁾か界面活性剤²⁶⁾による方法が一般的だが、特殊な機械や薬品を要せず、より汎用性が高い凍結解凍処理を行うこととした。

Inbredで抗原交差反応が最も起こりやすい組み合わせとして、Dark Agouti (DA) ラットから作成したDANMをLewisラットの坐骨神経20 mm欠損モデルに対して移植することとした。DANMは、DAラットから採取した坐骨神経に凍結解凍処理を3回行うことで作成した。

Hematoxylin and eosin (HE) 染色で脱細胞化に成功していること、また、ラミニンの免疫染色でDANM内のECMが脱細胞処理後も保たれていることを確認してから各種実験を進めた。まず、DANMのVCT内における抗原性が問題ないことをCD8陽性細胞数に基づき、自家神経移植片、未処理の同種神経移植片と比較することで確認した²⁷⁾。続いて、VCT内におけるDANMの再血管化についても評価した。20 mmの坐骨神経欠損をDANM入りのVCTで架橋し (D + V群)、最も導管内虚血が起こりやすいと考えられる導管中央部の組織を経時的に採取して、rat endothelial cell antigen-1 (RECA-1) に対する免疫染色を行った。コントロールは、血管束を含まないシリコンチューブ内にDANMを移植したもの (D群) とした。D + V群では、術後5日目のDANM内にRECA-1陽性細胞はみられなかったが、術後1週間では挿入した血管茎近傍のDANM内にRECA-1陽性細胞を認めるようになり、術後4週では

DANM内全体にRECA-1陽性細胞が観察された。一方D群では、術後4週においても、DANM内にはほとんどRECA-1陽性細胞はみられなかった²⁷⁾。以上よりVCT内に移植したDANMは、有害な抗原性を有さず、術後早期にVCT内の血管束からの新生血管により再血行化される、ラミニンをはじめとする神経再生に重要なECMを豊富に含んだ3次元の足場であることが分かった。

(1) VCT + BM-MSCs < VCT + BM-MSCs + DANM

ラット坐骨神経20 mm欠損モデルにおける再生神経を、VCT内にBM-MSCsを移植した群(V+B群)とさらにDANM移植を追加した群(V+B+D群)で比較した²⁷⁾。術後12週、24週ともに、足底筋で計測したM波のCMAPの振幅は、V+B+D群でV+B群よりも有意に大きかった。運動神経速度はV+B+D群はV+B群よりも速い傾向があったが、有意差はなかった。組織学的には有髄神経軸索数、髄鞘幅、有髄軸索直径、神経領域面積のすべての項目において、術後12週、24週ともにV+B+D群がV+B群よりも有意に良好な結果となった。前脛骨湿重量もV+B+D群の方がV+B群よりも術後12週、24週ともに有意に大きかった。

(2) VCT + BM-MSCs + DANM = 自家神経移植

ラット坐骨神経20 mm欠損モデルを用いて、V+B+D群とreverse autograftによる自家神経移植群の再生神経を術後24週で比較した²⁸⁾。電気生理学的にはV+B+D群は自家神経移植群よりも優れた傾向を有したが、有意差はなかった。組織学的評価では両者間に有意差はなかったが、有髄軸索数は自家神経移植群の方が、有髄神経直径はV+B+D群の方が、それぞれ大きい傾向にあった。CatWalk XT(Noldus Information Technology, Wageningen, The Netherlands)を用いた歩行解析では、V+B+D群は自家神経移植群に比較して有意に足底接地面積が大きく、接地圧も大きいという傾向を認めた。

6. おわりに

シリコンチューブ単独では10 mmの架橋が限界であるが、ここに血管束を挿入し、細胞としてBM-MSCsを、足場としてDANMを移植した人工神経導管は、ラット坐骨神経の20 mmという長距離欠損の架橋に成功し、その再生神経は自家神経移植に匹敵することが、電気生理学的、組織学的、そして歩行解析による機能的評価において確認されるところまで来た。今後、臨床での使用の前には、シリコンの代わりに生体分解性材料で作成した導管への変更²¹⁾や、脱細胞化自家筋肉²⁹⁾や、薬剤処理自家筋肉³⁰⁾などの、同種組織由来ではない足場への変更、さらには、術中

に効率よく間葉系幹細胞を収集し、*ex vivo*での培養を経ずに移植する方法³¹⁾の有用性の検討などを加えて、本邦における臨床の場で使いやすい形としてもなお、自家神経移植に遜色ない成績が得られかどうかを検討する必要があるが、VCTにBM-MSCsと足場の移植を追加した人工神経は、臨床における治療戦略の一つになり得る可能性があると考えている。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Meek MF, Coert JH: US Food and Drug Administration/Conformit Europe-approved absorbable nerve conduits for clinical repair of peripheral and cranial nerves. *Ann Plast Surg* **60**: 110-6, 2008
- 2) Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, et al: Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves. *Cell* **162**: 1127-39, 2015
- 3) Muangsanit P, Shipley RJ, Phillips JB: Vascularization Strategies for Peripheral Nerve Tissue Engineering. *Anat Rec (Hoboken)* **301**: 1657-67, 2018
- 4) Pan D, Acevedo-Cintrón JA, Sayanagi J, et al: The CCL2/CCR2 axis is critical to recruiting macrophages into acellular nerve allograft bridging a nerve gap to promote angiogenesis and regeneration. *Exp Neurol* **331**:113363, 2020
- 5) Koshima I, Harii K: Experimental study of vascularized nerve grafts: multifactorial analyses of axonal regeneration of nerves transplanted into an acute burn wound. *J Hand Surg* **10**: 64-72, 1985
- 6) Kanaya F, Firrell J, Tsai TM, et al: Functional results of vascularized versus nonvascularized nerve grafting. *Plast Reconstr Surg* **89**: 924-30, 1992
- 7) McCullough CJ, Gagey O, Higginson DW, et al: Axon regeneration and vascularisation of nerve grafts. An experimental study. *J Hand Surg Br* **9**: 323-7, 1984
- 8) Bertelli JA, Taleb M, Mira JC, et al: Muscle fiber type reorganization and behavioral functional recovery of rat median nerve repair with vascularized or conventional nerve grafts. *Restor Neurol Neurosci* **10**: 5-12, 1996
- 9) Weddell G: Axonal regeneration in cutaneous nerve plexuses. *J Anat* **77**: 49-62, 1942
- 10) Nukada H: Post-traumatic endoneurial neovascularization and nerve regeneration: a morphometric study. *Brain Res* **449**: 89-96, 1988
- 11) Hobson MI, Brown R, Green CJ, et al: Inter-relationships between angiogenesis and nerve regeneration: a histochemical study. *Br J Plast Surg* **50**: 125-31, 1997
- 12) Hobson MI, Green CJ, Terenghi G: VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat* **197**: 591-605, 2000
- 13) Aebischer P, Guénard V, Brace S: Peripheral nerve regeneration through blind-ended semipermeable guidance channels: effect of the molecular weight cutoff. *J Neurosci* **9**: 3590-5, 1989

- 14) Iijima Y, Ajiki T, Murayama A, et al: Effect of Artificial Nerve Conduit Vascularization on Peripheral Nerve in a Necrotic Bed. *Plast Reconstr Surg Glob Open* **4**: e665, 2016
- 15) Kakinoki R, Nishijima N, Ueba Y, et al: Relationship between axonal regeneration and vascularity in tubulation--an experimental study in rats. *Neurosci Res* **23**: 35-45, 1995
- 16) Lundborg G, Dahlin LB, Danielsen N, et al: Nerve regeneration in silicone chambers: Influence of gap and of distal stump components. *Exp Neurol* **76**: 361-75, 1982
- 17) Kakinoki R, Nishijima N, Ueba Y, et al: Nerve regeneration over a 25 mm gap in rat sciatic nerves using tubes containing blood vessels: the possibility of clinical application. *Int Orthop* **21**: 332-6, 1997
- 18) Kakinoki R, Nishijima N, Ueba Y, et al: Nerve regeneration over a 20-mm gap through a nerve conduit containing blood vessels in rats: the influence of interstump distance on nerve regeneration. *J Neurosurg Sci* **42**: 11-21, 1998
- 19) Parrinello S, Napoli I, Ribeiro S, et al: EphB signaling directs peripheral nerve regeneration through Sox2-dependent Schwann cell sorting. *Cell* **143**: 145-55, 2010
- 20) Yamakawa T, Kakinoki R, Ikeguchi R, et al: Nerve regeneration promoted in a tube with vascularity containing bone marrow-derived cells. *Cell Transplant* **16**: 811-22, 2007
- 21) Kaizawa Y, Kakinoki R, Ikeguchi R, et al: Bridging a 30 mm defect in the canine ulnar nerve using vessel-containing conduits with implantation of bone marrow stromal cells. *Microsurgery* **36**: 316-24, 2016
- 22) Wang J, Ding F, Gu Y, et al.: Bone marrow mesenchymal stem cells promote cell proliferation and neurotrophic function of Schwann cells in vitro and in vivo. *Brain Res* **1262**: 7-15, 2009
- 23) Yang Z, Cai X, Xu A, et al: Bone marrow stromal cell transplantation through tail vein injection promotes angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in cerebral infarct area in rats. *Cytherapy* **17**: 1200-12, 2015
- 24) Walsh SK, Kumar R, Grochmal JK, et al: Fate of stem cell transplants in peripheral nerves. *Stem Cell Res* **8**: 226-38, 2012
- 25) Ide C, Tohyama K, Yokota R, et al: Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain Res* **288**: 61-75, 1983
- 26) Hudson TW, Zawko S, Deister C, et al: Optimized acellular nerve graft is immunologically tolerated and supports regeneration. *Tissue Eng* **10**: 1641-51, 2004
- 27) Kaizawa Y, Kakinoki R, Ikeguchi R, et al: A Nerve Conduit Containing a Vascular Bundle and Implanted With Bone Marrow Stromal Cells and Decellularized Allogenic Nerve Matrix. *Cell Transplant* **26**: 215-28, 2017
- 28) 貝澤幸俊, 柿木良介, 真鍋克次郎, 他: 脱細胞化同種神経マトリックスと骨髄間葉系細胞を移植した血管含有神経導管: 自家神経移植術との比較. *末梢神経* **27**: 88-97, 2016
- 29) Fansa H, Keilhoff G, Wolf G, et al: Tissue engineering of peripheral nerves: A comparison of venous and acellular muscle grafts with cultured Schwann cells. *Plast Reconstr Surg* **107**: 485-94, 2001
- 30) Takeuchi H, Sakamoto A, Ikeguchi R, et al: Doxorubicin-Immersed Skeletal Muscle Grafts Promote Peripheral Nerve Regeneration Across a 10-mm Defect in the Rat Sciatic Nerve. *J Reconstr Microsurg* **36**: 41-52, 2020
- 31) Ito K, Aoyama T, Fukiage K, et al: A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by nonwoven fabric. *Tissue Eng Part C Methods* **16**: 81-91, 2010