

3. 今後の展望

2) 人工神経とシュワン細胞

*¹京都府立医科大学形成外科, *²京都府立医科大学免疫学, *³京都府立医科大学整形外科

素輪 善弘*¹, 岸田 綱郎*², 澤井 清司*³, 松田 修*²

Yoshihiro SOWA, Tsunao KISHIDA, Seiji SAWAI, Osamu MAZDA



1. はじめに

末梢神経損傷修復に対する自家神経移植に代わる架橋材料として、これまで多くの人工神経が開発され、広く使用されてきた。本邦でも2種類の人工神経が保険収載され、末梢神経障害治療の選択幅に広がりを見せている。しかし、これらの使用実績が蓄積されるとともに、運動神経あるいは感覚神経であっても欠損長が3 cmを超える大きな神経障害については、治療効果に限界点が存在することも明らかとなり、また過誤支配などの諸問題もいまだ解決されているとはいえない。そのため、これらの問題が解消された人工神経設計が次の研究テーマの焦点となっている。

神経再生を成功させるためには、再生に関与する細胞、細胞外マトリックス成分、神経成長因子などが高度なレベルで協調的に相互作用することが求められる。そして、これらの動きをオーガナイズする主役となるのがシュワン細胞 (Schwann cell, SC) である。またミエリン化という特殊機能をみても、SCの代替えとなる細胞は存在しない。このSCを中心とした相互作用を考慮に入れたコンビナトリアルアプローチ、すなわち局所へのSCの正しい誘導配置機構と、この支持細胞を最大限生かす構造設計が次世代の人工神経開発のポイントといえる。

本稿では、改めて現在知られている神経再生機構を深く考察した上で、神経再生におけるSCの利活用の工夫について主眼を置きながら、次世代のハイブリット型人工神経の可能性を考えたい。

2. 現在の人工神経を用いた神経修復効果の限界

人工神経は神経欠損部の中枢端と末梢端をつなぎ、神経再生を誘導する人工管であり、移植直後の人工神経には当然ながら興奮電位伝導作用は備わっていない。ここで人工神経に求められる働きは、欠損部を補い神経外部からの瘢痕結合組織の進入を予防し、再生誘導管として神経伸長の良好な足場となる構造を与えることである。また、組織親和性あるいは適合性がよいことに加え、神経再生後は分解吸収される素材であればなおよい。さらに物理的な特性として、移植しやすい形状や弾性力、神経が再生するまで物理的外圧に耐えられる強度が、工学・商業的な面では大量生産可能な材質が求められる。これらの要素を満たすものが理想的な人工神経といえるが、第一に要求される役割は優れた軸索再生促進能である。ところが、3~4 cmを超える分節神経損傷に対する使用効果をみると神経自家移植がなお優れており、標準的な外科治療選択肢となっている現状はいまだ変わらない。

長い神経欠損においては、たとえ細胞外マトリックス (ECM) が保存され組織構成成分が近似したアログラフト (同種神経移植) を用いても期待されるような成績が得られないことが多い。Leckenbyらが行った、アログラフト [Avance® (Axogen Inc.)] を用いた30~49 mmの神経欠損修復の治療成績では、術後75%の知覚回復がみられたが、運動機能回復率は38%に過ぎず、さらに欠損長が50 mm以上に至ると、知覚と運動機能回復率はそれぞれ50%と10%にとどまることを報告した¹⁾。自家神経移植とアログラフトとの最大の相違点は、生きたSCの同時移植効果の有無にあると推測される。そこでHuらは、アカゲザルに40 mmの尺骨神経欠損部モデルを作製し、SCを播種したアログラフトを移植したところ6か月後の評価で、細胞

■ 著者連絡先

京都府立医科大学形成外科

(〒602-8566 京都府京都市上京区河原町広小路 上る 梶井町465)

E-mail. sowawan@koto.kpu-m.ac.jp

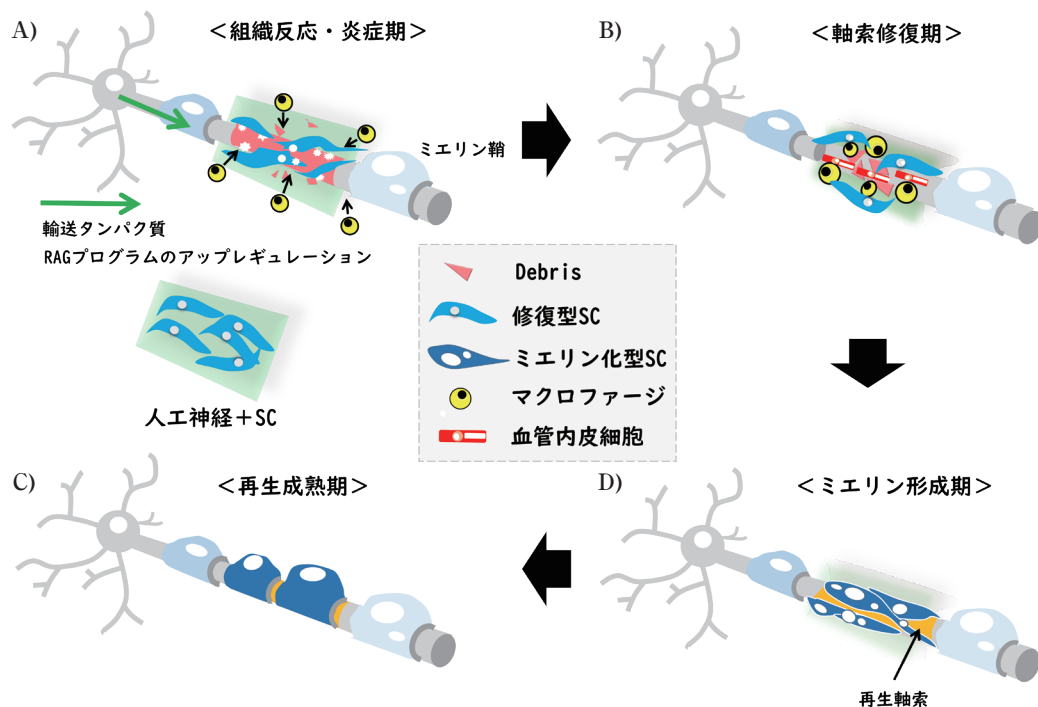


図1 末梢損傷に対するSCを付加した人工神経移植による神経再生促進治療のイメージ
 正常な神経再生システムにおいては、各種転写因子を活性化し再生への応答をトリガーする自律的な再生に加えて、血管内皮細胞による血管新生作用が重要なトリガーとなり、SCを中心としたマクロファージや線維芽細胞が一定に時間軸を持って協調的に作用する。そして最終的には、SCがミエリン形成を行うことが不可欠である。
 RAG, recombination activating gene; SC, Schwann cell.

移植群が無細胞群より優れた成績を示した²⁾。この結果は、SCの移植が直接的でいかに有効であるかを物語っている。

3. 神経再生機構における軸索再生とSCの役割

末梢神経軸索に損傷が加わると、ニューロンとその軸索、そして損傷部遠位の非ニューロン性の細胞環境は、直ちに分子学的、形態的变化を受ける。軸索内では、主にカルシウムを中心としたイオンの急速な流入によりカルシウム介在性シグナル伝達経路のカスケードを活性化し、その末端器官との恒常性の崩壊を知らせる輸送タンパク質に変化が生じる。この軸索損傷による多因子損傷反応は、ニューロン細胞体に急速に運ばれ、再生関連遺伝子(RAG)プログラムのアップレギュレーションにつながる³⁾。このRAGプログラムでは、炎症性遺伝子、神経栄養因子、細胞骨格タンパク質関連遺伝子がアップレギュレーションされ、損傷を受けた近位軸索末端からの軸索伸長が促される³⁾。しかし、神経再生には、このような自律的再生機構の反応のみでは十分とはいえず、損傷部支持細胞による組織修復や、再生の方向付けなどの正しいサポート機構が作動することも併せて必要不可欠となる。

損傷部位の遠位では、神経細胞から切り離された軸索の

断片化と非神経細胞の活性化を伴うワーラー変性が開始され、遠位の神経環境が新たな軸索の伸長を促進する。ここで軸索損傷を鋭敏に感知したSCは、段階に応じて様々なその表現型を変化させながら軸索再生、およびミエリン化をサポートする重要な役割を果たす。まず初期段階でSCはNotchシグナルやc-Junのリン酸化などを介して脱分化し、独特な「修復型」といわれる表現型に姿を変えながら、神経成長促進遺伝子がアップレギュレーションされる^{4),5)}(図1A)。これらの活性化された修復型SCは複数の機能を果たす。まず新たな軸索伸長経路の障害となる損傷軸索、およびミエリン破片を貪食する。同時に化学戦術的シグナル伝達を介して、循環マクロファージを損傷部位にリクルートし^{5),6)}、なおかつ神経修復を促進させる細胞接着分子を発現させながら様々な神経栄養因子、ECMタンパク質を分泌する(図1B)。やがて、ミエリン化を促進させる表現型に切り替わり、新しいミエリン鞘を形成する(図1C, 図1D)。これらの自然修復力は他の細胞では代替えがきかず、彼らのパフォーマンスは独特で不可欠である。以上の理由から物理的に近遠位端が大きく離れており、両者の連絡が困難な神経欠損環境にSCを組み込むことは、大変道理にかなった治療アイデアといえる。

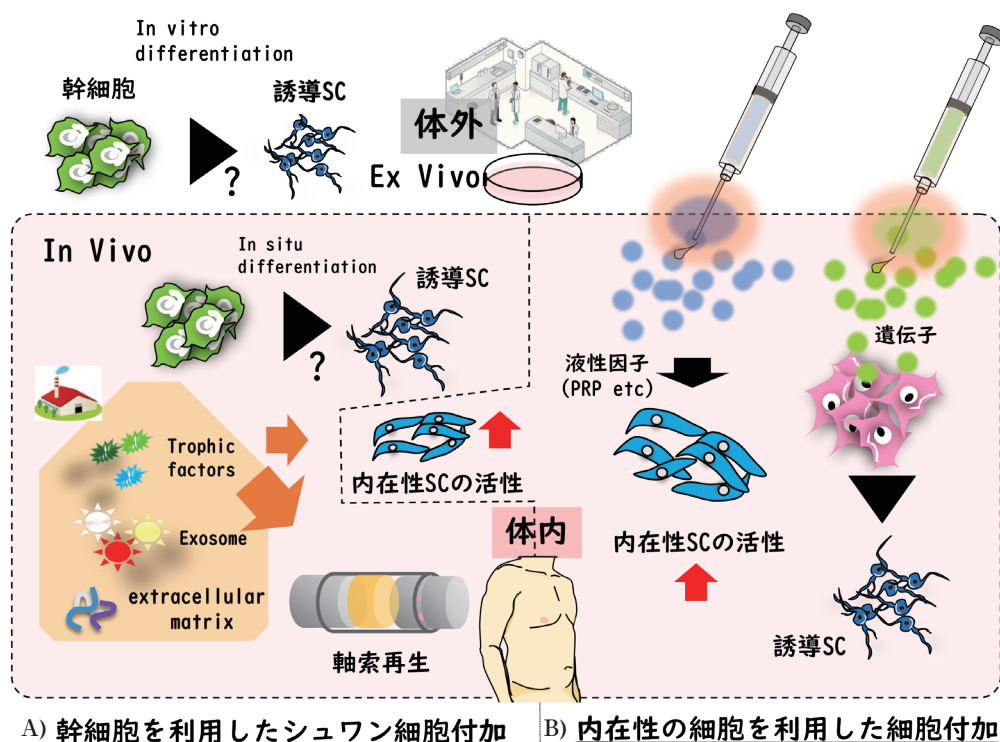


図2 SC移植の課題と損傷部位へのリクルートの工夫
 SCを損傷部位ヘリクルートさせる手段として、これまで我々は大きく分けて2つのアプローチを考えてきた。
 PRP, platelet-rich plasma; SC, Schwann cell.

4. 神経損傷へのSC移植効果検証のこれまで

これまで、末梢神経損傷部位へのSC移植の有効性については多角的にいろいろな動物を対象に、様々な条件で証明されてきた長い歴史があり、その効果を疑う余地は少ない。とりわけ、マウスやラットの齧歯類ではこれまで頻繁に検討が重ねられ、多くの証拠が蓄積されてきた。Sinisらはラット正中神経の2 cmの欠損を修復するために、SCを播種した神経管を使用したところ、移植後9か月で自家移植に匹敵する機能回復がみられたことを報告した⁷⁾。

前述のように、SCは修復期を終えるとミエリン鞘形成に寄与する。Guénardらは*in vitro*で培養したSCをラットの坐骨神経損傷部に移植したところ、軸索の周囲に正常なミエリンが形成されていることを確認した⁸⁾。また、Leviらのグループはマウス坐骨神経損傷部へのヒトSCの異種移植を行い、6週間後の移植細胞が免疫学的解析で生存しており、再生した軸索周囲にミエリン鞘を形成していることを示した⁹⁾。さらに最近の報告では、2例の培養SC移植のFirst in Human臨床研究成果が報告された。5 cmと7.5 cmの坐骨神経欠損部に人工神経移植とともに腓腹神経と損傷坐骨から分離・培養された自家培養SCが損傷周囲に注入

された。術後18か月後のフォローアップ評価では、坐骨神経の感覚と運動機能の両者に良好な回復が認められた¹⁰⁾。さらにSC移植は、中枢神経系における再生能、特に脊髄再生を促進することまで分かっている。

5. SC移植の課題と損傷部位へのリクルートの工夫

しかしながら、自己由来SCを臨床応用のために用意するには、新たな神経からこれを分離して培養せざるを得ず、採取時の侵襲とそれに伴う知覚異常や疼痛、採取量、培養時間などの諸問題があり、実際に臨床で適用させることは難しい。このため、自家SC移植に代わって分化型あるいは未分化幹細胞の使用が提案され、様々な代替細胞ソースを内腔に封入したハイブリッド人工神経誘導管開発が進められている。SCを損傷部位ヘリクルートさせる手段として、これまで我々は大きく分けて2つのアプローチを試みてきた。1つは前述のように体外でSCあるいは類似機能持つ細胞を創出し、これを移植する方法である(図2A)。もう1つは内在性のSCを活性化させることで、損傷部にSCを供与するアプローチである(図2B)。

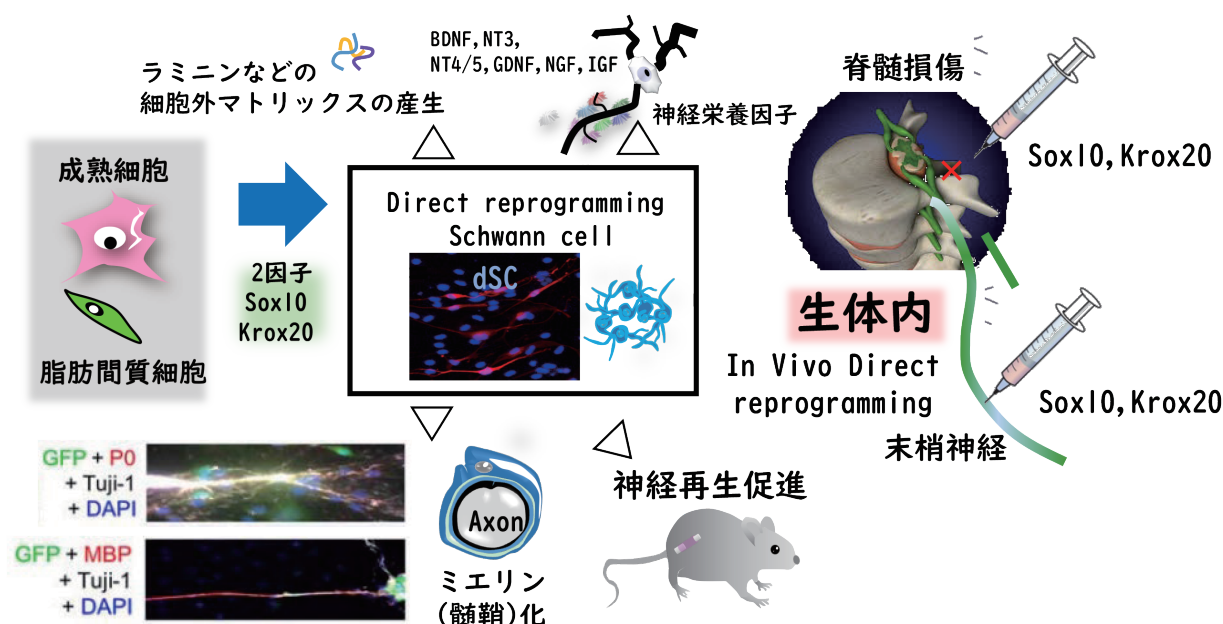


図3 体細胞を材料にしたリプログラミング技術を用いたSC創出
線維芽細胞や脂肪間質細胞に転換遺伝子 (*Sox10* と *Krox20*) を導入することで、機能的なSCを創出することができる。
BDNF, brain-derived neurotrophic factor; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; GDNF, glial cell line - derived neurotrophic factor; GFP, green fluorescent protein; IGF, insulin-like growth factor; NGF, nerve growth factor; NT, neurotrophin.

6. 脂肪幹細胞を用いた神経再生アプローチ

SCに類似する機能を持つ細胞として、本邦で生まれたiPS細胞 (induced pluripotent stem cells) をSCの方向へ分化させるアイデアも勿論あるが、多能性幹細胞からSCを誘導するまでのコストと時間、あるいは正しい分化誘導管理の必要性を考えると決して使用しやすいとは言いがたい。また、損傷後迅速に投与するためにはiPS細胞バンクを稼働させる必要があるが、2021年現在整備中のiPS細胞バンクには多くの問題点が指摘されている。そこで我々は、脂肪吸引の手技を用いて安全で容易に、そして繰り返し細胞を大量に採取することができる脂肪組織由来幹細胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) に着目してきた。ADSCs は自己複製能と脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、筋細胞などへの間葉系多分化能を有しているが、それらに加えて分化誘導培地でSC様細胞に誘導できるという報告もある¹¹⁾。我々は過去にCre/ Floxed - リポーターマウスを用いて、ADSCsの一部が神経堤細胞由来であることを証明し、これらの細胞集団がSCに類似したフェノタイプの機能を持つ可能性を示した¹²⁾。また、ADSCsがBDNF, NGF, VEGF, GGF, IGF, HGFなどの神経再生促進因子を発現し、これらのタンパクを産生・分泌し、SCの生存・増殖、遊走能を向上させる能力を維持していることも明らかにした¹³⁾。さらに、後根神経節細胞との共培養モデルでは、

星状膠細胞や線維芽細胞と比較して優れた神経突起伸長効果を示し、SCと匹敵することが分かった¹³⁾。そこでマウスの骨神経欠損モデルを作製し、徐放性ゼラチン性の神経チューブを開発し、これにADSCsを播種したところ、それらの移植再生効果が確認された¹⁴⁾。さらに移植後ADSCsの生体内動態をリポーター蛍光タンパク質で追跡モニタリングし、神経再生促進がSCへの分化に依存しないことを明らかにし、神経再生関連因子を産生・放出する molecular factory として機能することで、末梢神経再生に寄与するというメカニズムの一端を証明した¹⁴⁾。

未分化ADSCsによる一定の神経再生能力は示されたものの、これらがミエリンタンパク形成などSCすべての役割を果たしているという証拠はない。生体外で培養により化学的な装飾刺激で人工的に誘導したSC様細胞も、特にSCに特異的なkey gene どころか、代表的SCマーカーであるS100bやGFAPの発現も十分ではなく heregulin- β 1 などの誘導維持因子を取り除くと、元のフェノタイプに逆戻りすることも分かってきた。そこで、ダイレクト・プログラミングという遺伝子操作で体性成熟細胞を特定の遺伝子導入により重要な細胞に直接的に変換する技術に着目した。まず10種以上の遺伝子候補を洗い出し、さらにすべての組み合わせパターンから網羅的手法で必須遺伝子を検討した末、ミエリン形成能を持つSCを創出するのに必須の2つの遺伝子が同定された¹⁵⁾ (図3)。

7. 内在性細胞を活用したSCリクルート

現在、形成外科領域ではPRP (platelet rich plasma) 療法は様々な難治性潰瘍や瘻孔、あるいは美容目的で広く使用され、浸透している。PRPには創傷治癒を促進させる多くの有益なサイトカインが含まれており、これらは多くの細胞の生存・増殖力、あるいは遊走能などの活性を高める効果があることが明らかにされている。また神経損傷に対しても例外ではなく、PRPに含まれる成長因子のうちPDGF (platelet derived growth factor) -BB と IGF-1 は、それぞれがp38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路, ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 1/2 と PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase) /Akt 経路を活性化することで、SCの増殖と遊走を強力に刺激することが知られている¹⁶⁾。我々の研究グループは、PRPがIGF-1やPDGF-BBを介して間接的にSCの増殖能や神経再生能を生物学的に活性化させ、その効果により末梢神経の再生が促進されることを示した¹⁶⁾ (図2B)。実際に、*in vitro*におけるPRP投与実験でSCの増殖と遊走促進効果が確認されているばかりか、神経傷害動物モデルに対する局所投与でもその有効性が報告されている¹⁷⁾。最近では、人工神経にPRPを組み合わせた臨床研究も既に始まっている。今後、PRPからDDGF-BBとIGF-1の2因子をうまく抽出するなどの調整法の改善により、これまでより効果が高く、効率のよい末梢神経再生利用が可能になるかもしれない。

体外培養でSC創出する方法には、critical periodや培養過程の有害物混入のリスク、さらにコストの問題がある。損傷周囲の内在性細胞を利用する新規治療法開発に向けたもう1つのアイデアが、患部にある内在性細胞を資源に局所でダイレクト・リプログラミングを促し、SCに転換させるアプローチである (図2B)。特に、損傷部に遊走してくる一部の(筋)線維芽細胞は瘢痕形成を促し、軸索再生を阻害すると考えられており、もしこれをSCの機能を持つ細胞に転換できれば、瘢痕形成抑制を加えた二重効果が得られる。我々は安全性が高く、すでに臨床で応用されているアデノ随伴ウイルス (AAV) を遺伝子の導入に用い、損傷周囲細胞に相性のよいAAVセロタイプを同定した。これにダイレクト・リプログラミングに必須な *Sox10* と *Krox20* 遺伝子に、レポーターとして *GFP* 遺伝子を加えた3因子を、1つのベクターで同時に発現できる AAVベクターを開発している。さらに、細胞転換に必要な *Sox10*, *Krox20* を細胞内で強制発現させる AAVの代替えになる小分子化合物のスクリーニングも同時に行っている。

8. SC付加に適した人工神経のデザイン

SCを効率よくリクルートするだけでなく、これを正しい位置に配列させ、それらのパフォーマンスが十分発揮できるワーキングスペースを提供することも、同時に重大である。神経欠損を人工構造管で架橋する場合、SCをはじめとして、マクロファージや血管内皮細胞などの非神経細胞が、欠損間隙を自由に横切って遊走することができる充填材を含む神経管が理想的である¹⁸⁾。そのためには、人工神経の材料や設計デザインについても改良を重ねていく必要がある。人工神経の材料としては、単純なコラーゲンを内腔充填した場合の再生効果については意見が分かれている。そこでコーティング材料にこだわり、SCと親和性の高いラミニンやフィブロネクチンといったタンパク成分をコーティングさせることで、これらの目的を果たす試みがされてきた。ラミニンは、細胞の生存性と機能を調節するヘテロ三量体ECMタンパク質であり、末梢神経のミエリン化において重要な役割を果たす作用も報告されている¹⁹⁾。ラミニンで被覆されたコラーゲン線維を充填したPGAコラーゲンチューブは、イヌ腓骨神経において80 mmのギャップを超える行動機能が良好に回復し、正常に近い歩行パターンが達成されたなど、良好な軸索再生を橋渡しすることができた²⁰⁾。細胞の接着と遊走を促進する大型のECM糖タンパク質であるフィブロネクチンは、感覚ニューロンおよび運動ニューロンの再生量を増加させ、神経損傷部位へのSC流入を促進することが示されている²¹⁾。

また、足場形状のトポロジーに注目した足場開発も期待されており、様々な材料の長軸方向フィラメントを管腔内に充填するデザインがSCの遊走配列を促進し、結果的に良好な軸索再生を向上させることも報告されている²²⁾。例えば、内腔充填材料が単純なコラーゲンファイバーであっても、これを長軸方向のフィラメント形状にして充填することで、単純な材料充填より良好な神経再生が得られることが報告されている。しかしながら、フィラメントの径、密度や間隙径の余裕など必要検討事項は限りない。外筒の材料や構造デザインについても、その強度・伸展性、組織適合性などを検討すべきパラメータは無数にあり、足場材料の分解速度も、理想的には神経の再生速度と一致するように調整される必要がある。再生促進因子の組み込みなども含めて、SCの有効利用を軸とした神経再生戦略の探求は、今後も継続されると思われる。

9. 課題と展望

神経再生システムは、考えられていた以上に複雑かつ緻

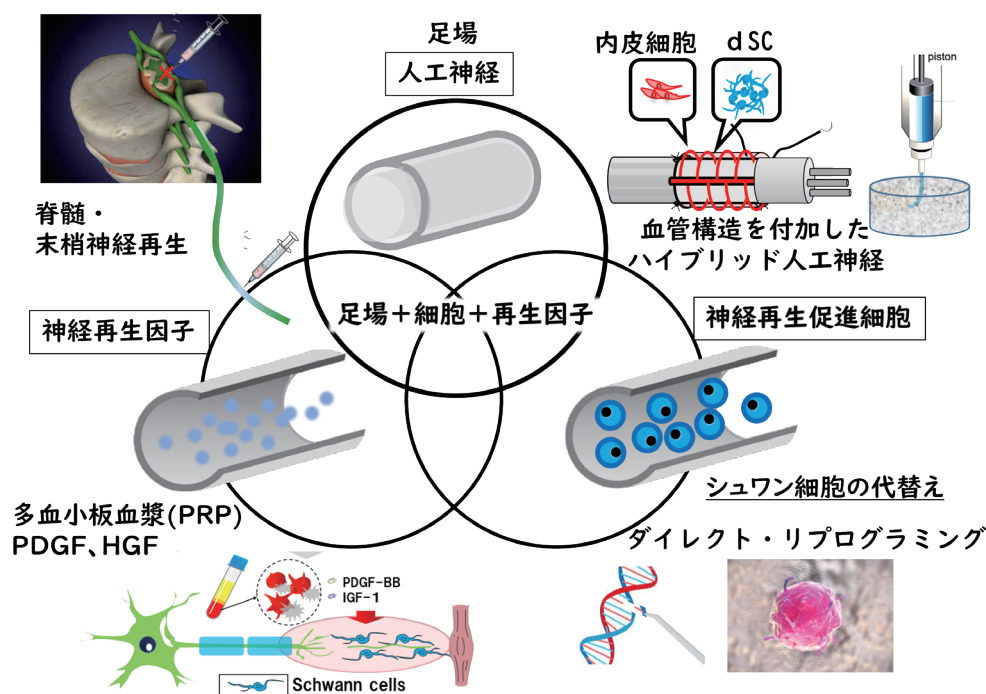


図4 次世代型人工神経開発に向けての未来図

生着に優れ、持続的作用効果を持ち、それ自身が生体神経組織の同レベルに自律的に機能する神経組織オルガノイドに近い人工的神経構築が理想的である。そのためには、血管構造の付加やSCの付加が鍵となる。
dSC, dermal sheath cup; HGF, hepatocyte growth factor; PDGF, platelet derived growth factor; PRP, platelet rich plasma.

密な機序で成立するようである。よって究極の人工神経開発のプロセスにおいて、適切な人工素材を選択し、神経栄養因子や細胞接着分子といった有効因子を加えようとする工夫は、考慮されるべき設計要因のほんの一部かもしれない。例えば、もっと持続的な再生効果やそれ自身が神経の一部を構成する役割まで期待するならば、有望な細胞を局所に配合する発想、特に幹細胞ベースの移植は特段興味深いアプローチといえる(図4)。また、最近では3Dバイオフィンターの技術も加速度的に進化し、構造設計を自由にデザインすることができる。我々も現在、例えば血管内皮細胞を配列するなどして血管構造を人工構築付加した人工神経の開発に取り組んでおり、より血流のよい再生環境を提供できるアプローチの成功を目指している。しかし、このように生理活性成分や細胞そのものを組み込むことは、製品製造における米国食品医薬品局(FDA)などのレギュレーションが新たな課題として提起される。また、神経再生促進効果の評価法についても、使用する動物や神経モデル、実験期間、形態学および機能的解析法が統一されているといえない。これらの問題点を克服しつつ、長い欠損長や運動神経に対しても高いパフォーマンスが発揮できる人工神経の開発を今後も期待したい。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) Leckenby JJ, Furrer C, Haug L, et al: A Retrospective Case Series Reporting the Outcomes of Avance Nerve Allografts in the Treatment of Peripheral Nerve Injuries. *Plast Reconstr Surg* **145**: 368e-81e, 2020
- 2) Hu J, Zhu QT, Liu XL, et al: Repair of extended peripheral nerve lesions in rhesus monkeys using acellular allogenic nerve grafts implanted with autologous mesenchymal stem cells. *Exp Neurol* **204**: 658-66, 2007
- 3) Abe N, Cavalli V: Nerve injury signaling. *Curr Opin Neurobiol* **18**: 276-83, 2008
- 4) Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, et al: c-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron* **75**: 633-47, 2012
- 5) Jessen KR, Mirsky R: The Success and Failure of the Schwann Cell Response to Nerve Injury. *Front Cell Neurosci* **13**: 33, 2019
- 6) Pan D, Mackinnon SE, Wood MD: Advances in the repair of segmental nerve injuries and trends in reconstruction. *Muscle Nerve* **61**: 726-39, 2020
- 7) Sinis N, Schaller HE, Schulte-Eversum C, et al: Nerve regeneration across a 2-cm gap in the rat median nerve using a resorbable nerve conduit filled with Schwann cells. *J Neurosurg* **103**: 1067-76, 2005
- 8) Guénard V, Kleitman N, Morrissey TK, et al: Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in

- semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci* **12**: 3310-20, 1992
- 9) Levi AD, Bunge RP: Studies of myelin formation after transplantation of human Schwann cells into the severe combined immunodeficient mouse. *Exp Neurol* **130**: 41-52, 1994
 - 10) Levi AD, Burks SS, Anderson KD, et al: The Use of Autologous Schwann Cells To Supplement Sciatic Nerve Repair With a Large Gap: First In Human Experience. *Cell Transplant* **25**: 1395-403, 2016
 - 11) Rhode SC, Beier JP, Ruhl T: Adipose tissue stem cells in peripheral nerve regeneration-In vitro and in vivo. *J Neurosci Res* **99**: 545-60, 2021
 - 12) Sowa Y, Imura T, Numajiri T, et al: Adipose stromal cells contain phenotypically distinct adipogenic progenitors derived from neural crest. *PLoS One* **8**: e84206, 2013
 - 13) Sowa Y, Imura T, Numajiri T, et al: Adipose-derived stem cells produce factors enhancing peripheral nerve regeneration: influence of age and anatomic site of origin. *Stem Cells Dev* **21**: 1852-62, 2012
 - 14) Sowa Y, Kishida T, Imura T, et al: Adipose-Derived Stem Cells Promote Peripheral Nerve Regeneration In Vivo without Differentiation into Schwann-Like Lineage. *Plast Reconstr Surg* **137**: 318e-30e, 2016
 - 15) Sowa Y, Kishida T, Tomita K, et al: Direct Conversion of Human Fibroblasts into Schwann Cells that Facilitate Regeneration of Injured Peripheral Nerve In Vivo. *Stem Cells Transl Med* **6**: 1207-16, 2017
 - 16) Sowa Y, Kishida T, Tomita K, et al: Involvement of PDGF-BB and IGF-1 in Activation of Human Schwann Cells by Platelet-Rich Plasma. *Plast Reconstr Surg* **144**: 1025e-36e, 2019
 - 17) Sánchez M, Anitua E, Delgado D, et al: Platelet-rich plasma, a source of autologous growth factors and biomimetic scaffold for peripheral nerve regeneration. *Expert Opin Biol Ther* **17**: 197-212, 2017
 - 18) Stang, F, Fansa, H, Wolf G, et al: Structural parameters of collagen nerve grafts influence peripheral nerve regeneration. *Biomaterials* **26**: 3083-91, 2005
 - 19) Podratz JL, Rodriguez E, Windebank AJ: Role of the extracellular matrix in myelination of peripheral nerve. *Glia* **35**: 35-40, 2001
 - 20) Matsumoto K, Ohnishi K, Kiyotani T, et al: Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res* **868**: 315-28, 2000
 - 21) Bailey SB, Eichler ME, Villadiego A, et al: The influence of fibronectin and laminin during Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration through silicon chambers. *J Neurocytol* **22**: 176-84, 1993
 - 22) Sahba M, Benjamin S, Christopher SL, et al: Recent advances in strategies for peripheral nerve tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering* **4**: 134-42, 2017