

### 3. 今後の展望

#### 3) 人工神経と脂肪由来幹細胞

金沢大学附属病院整形外科

多田 薫, 赤羽 美香, 松田 匡司, 村井 惇朗, 中村 勇太, 土屋 弘行

*Kaoru TADA, Mika AKAHANE, Masashi MATSUTA, Atsuro MURAI, Yuta NAKAMURA,*

*Hiroyuki TSUCHIYA*



#### 1. 緒言

末梢神経の欠損を再建する際は、再生組織の足場となる構造に加え成長因子の放出や軸索の誘導に関わる細胞成分が必要となる。足場となる構造として研究されてきたのが人工神経であり、第一世代の人工神経は非吸収性の素材からなる中空の管腔構造、第二世代の人工神経は吸収性で透過性のある素材からなる中空の管腔構造であり、現在研究の対象とされているのが第三世代の人工神経であると報告されている<sup>1)</sup>。現在、米国食品医薬品局に認可されている人工神経は第二世代の人工神経であり、第三世代の人工神経としては、細胞外基質や成長因子、幹細胞を付加した人工神経や、導電性を持つ素材を利用した人工神経などが挙げられる。これら第三世代の人工神経の中で最も報告が多いのは、各種の幹細胞を付加した人工神経である。幹細胞には成長因子を放出する trophic 効果や、幹細胞がシュワン細胞に分化して神経の再生に寄与する repair 効果が期待されており、iPS細胞 (induced pluripotent stem cell) やES細胞 (embryonic stem cells) といった多能性幹細胞や、脂肪由来幹細胞 (adipose derived stem cells, ADSCs) や骨髄由来幹細胞などの体性幹細胞など、様々な幹細胞が実験に供されている。

我々はADSCsに着目し、末梢神経再生の研究を続けてきたので、本特集のテーマである人工神経を用いた研究結果に加え、脱細胞化同種神経や自家神経を用いた研究結果についても報告する。

#### 2. 当科の研究結果

##### 1) 間質血管細胞群を用いた研究<sup>2)</sup>

間質血管細胞群 (stromal vascular fraction, SVF) とは、脂肪組織を処理して抽出したADSCsや血管内皮細胞、周皮細胞、平滑筋細胞などを含むヘテロな細胞群を指す。SVFは皮下の脂肪組織から安全かつ簡便に、豊富に採取することが可能であり、採取後に培養や分化誘導などの操作を加えることなく十分量の幹細胞を確保できることが報告されている。また自己由来の細胞であることから、倫理的な問題が少なく免疫反応が少ないという大きな利点がある。そこで我々は、まずSVFを用いる研究を計画した。

再生組織の足場となる人工神経にはシリコンチューブを用いた。ラット坐骨神経10 mm欠損モデルを作製し、欠損部をシリコンチューブで架橋した。鼠径部から1.5 gの皮下脂肪を採取してZukらの報告<sup>3)</sup>に準じてSVFを抽出し、生理食塩水を充填した対照群、SVFとI型コラーゲンを充填したSVF群の2群を作製した。移植2週後に再生組織を摘出し、再生組織中央横断面のパラフィン切片を作製してS100蛋白染色およびPGP9.5蛋白染色を行い、シュワン細胞の有無や軸索の再生を評価した。また、SVFをPKH26で標識してS100蛋白染色の結果と照合することで、シュワン細胞への分化の有無について評価した。

その結果、S100陽性細胞は対照群では存在しなかったが、SVF群では認められ、シュワン細胞の存在が確認された。PGP9.5陽性細胞の面積を定量化し比較したところ、SVF群で有意に軸索再生が得られていた。再生組織にはPKH26陽性細胞が存在したことから、SVFは再生組織内で生存していることが確認された。また、同切片にS100蛋白染色を行ったところ、PKH26陽性細胞とS100陽性細胞の分布は異なっていた。以上の結果から、SVFはシュワン

#### ■ 著者連絡先

金沢大学附属病院整形外科

(〒920-8641 石川県金沢市宝町13-1)

E-mail. tdkr@med.kanazawa-u.ac.jp

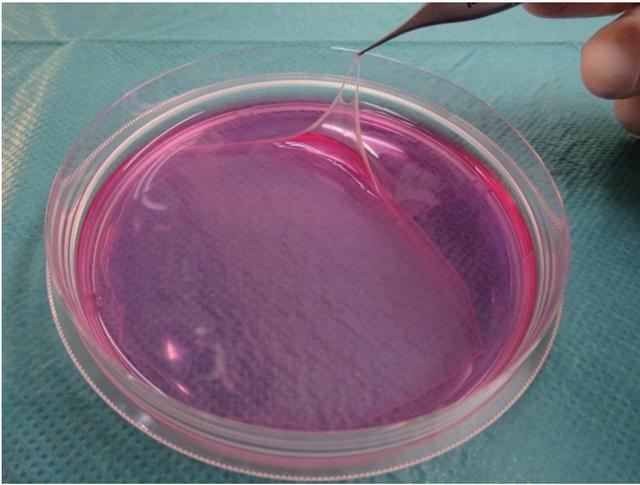


図1 ADSCシート

細胞に分化するのではなく、何らかの成長因子を分泌することによりシュワン細胞を増殖、遊走させ、神経の再生を促進している可能性が高いと考えられた。

SVFは脂肪組織から約2時間で抽出することが可能であり、必要に応じて速やかに使用できる点が最大の特徴である。臨床で遭遇する神経欠損例に対しては、筋萎縮の進行を防ぐためにも早期の再建が理想的であり、SVFは人工神経に付加する細胞として有用だと考えられる。SVFを用いた神経再生に関する報告では、ADSCsを含む細胞群が放出する各種の成長因子に加え、細胞群が有する血管新生能が神経再生に寄与すると考察されている<sup>4)</sup>。一方、SVFに含まれるADSCsは少ないため成長因子の放出が少なく、その成績は劣るとの報告も存在する<sup>5)</sup>。

## 2) 分化型脂肪由来幹細胞を用いた研究<sup>6)</sup>

SVFはシュワン細胞に分化していなかったと考えられたことから、シュワン細胞として機能する細胞を投与することで成績を向上させることができると考え、ADSCsをシュワン細胞類似細胞に分化誘導した分化型脂肪由来幹細胞(differentiated adipose derived stem cell, dADSCs)を用いる研究を計画した。

再生組織の足場となる人工神経には、吸収性材料であるポリグリコール酸(polyglycolic acid, PGA)製チューブを選択した。dADSCsへの分化誘導は、Kinghamらの報告<sup>7)</sup>に準じて行った。ラット坐骨神経15 mm欠損モデルを作製し、欠損部をPGA製チューブで架橋した。チューブ内に生理食塩水を注入した対照群、dADSCsを生理食塩水で懸濁し注入したdADSCs群、切除した坐骨神経を反転し縫合した自家神経群の3群を比較検討した。

その結果、dADSCs群は対照群に比べ、軸索伸長距離や前脛骨筋の筋湿重量に関して有意に良好な成績を示してい

た。また、移植後2週、4週の再生軸索の先端には標識したdADSCsの分布が確認され、一部の細胞はS100陽性となっていたことから、dADSCsはシュワン細胞として神経再生に寄与していたと考えられた。また、第4~6腰椎部の背側後根神経節(dorsal root ganglion, DRG)におけるATF3の発現量はdADSCs群、自家神経群においては移植後2週から4週にかけて維持されていたが、対照群では有意に減少していたことから、dADSCsは自家神経移植と同様の神経保護作用を有していたと考えられた。一方、筋湿重量や電気生理学的評価において、dADSCs群の成績は自家神経群には及ばなかった。以上の結果から、dADSCsはチューブ内で分化した状態を保ち、シュワン細胞として神経再生に寄与するrepair効果を発揮していたと考えられたが、dADSCsとPGA製チューブとの組み合わせでは自家神経に匹敵する成績を得られなかった。

ATF3(activating transcription factor 3)は、末梢神経損傷が生じた際にDRGにおいて発現量が増加するとされる。また、ATF3はHSP27(heat shock protein 27)の発現を誘導し、神経細胞を細胞死から保護して軸索伸長を促進するとされる。したがって、ATF3の発現が維持されている状態は神経再生に有利な状態であり、dADSCsは逆行性輸送を介した神経保護作用により、神経再生に寄与した可能性が示唆される。そのほか、dADSCsが神経再生を促進する機序については、成長因子の放出やシュワン細胞を誘導する作用に加え、髄鞘形成への関与なども報告されている。ただし、dADSCsが髄鞘形成に関与しているかどうかは明らかではないとの報告も存在する。また、dADSCsは移植までに時間を要する点が臨床応用する上で問題となる。Sowaらはマウス坐骨神経5 mm欠損モデルを用いてADSCsとdADSCsの成績を比較した結果、dADSCsには明らかな優位性を認めなかったことから、臨床応用を考慮した場合は、より早期に使用できるADSCsの方が有用な細胞状態であると報告している<sup>8)</sup>。

## 3) 脂肪由来幹細胞シートを用いた研究<sup>9)</sup>

SVFに含まれるADSCsより多くのADSCsを投与し、かつADSCsを移植先に担持することで成績を向上させることができると考え、ADSCsを細胞シート化した脂肪由来幹細胞シート(ADSCシート)を用いる研究を計画した。

再生組織の足場となる人工神経にはPGA製チューブを選択した。Zukらの方法<sup>3)</sup>に準じてADSCsを分離培養し、Vermetteらの方法<sup>10)</sup>に準じてADSCsを細胞シート化した(図1)。ラット坐骨神経15 mm欠損モデルを作製し、欠損部をPGA製チューブで架橋した。チューブ内に生理食塩水を注入した対照群、3~5 × 10<sup>6</sup>個のADSCsを生理食塩水

で懸濁し注入した細胞群,  $3\sim 5 \times 10^6$ 個のADSCsを含んだADSCシートを充填したシート群の3群を比較検討した。

その結果, 軸索伸長距離はシート群が対照群, 細胞群に対して有意に長くなっており, 前脛骨筋の筋湿重量や坐骨神経機能指数 (sciatic functional index, SFI), 再生組織横断面におけるS100陽性領域に関しても, シート群が対照群, 細胞群に比べ良好な成績を示していた。また, 再生組織内における血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) およびNeuregulin-1の発現量はシート群, 細胞群, 対照群の順に多くなっていた。

Vermetteらはアスコルビン酸を培地に添加し, ADSCsを細胞シート化する方法を報告した<sup>10)</sup>。この方法により, 特殊な培養器具を用いることなく細胞間結合や細胞外基質を温存した状態で, 多くのADSCsを移植先に担持することが可能となった<sup>11)</sup>。その後Yuらは, 細胞間結合や細胞外基質を温存したADSCsの細胞シート内ではADSCsが幹細胞マーカーを発現しており, 幹細胞としての性質を保持していたと報告している<sup>12)</sup>。本研究では細胞群に比べシート群の成績が有意に良好であったことから, ADSCシートは多くの細胞を移植先に担持するという, 細胞シートに期待された効果を発揮し, ADSCsの効果を増強していたと考えられた。なお, Neuregulin-1はシュワン細胞の増殖を強力に促進すると報告されており, VEGFは血管内皮細胞だけではなくシュワン細胞や神経細胞, 神経幹細胞にも作用し, 血管系や神経系に密接に関与していることが知られている。ADSCsはNeuregulin-1やVEGFを放出することで, シュワン細胞の増殖や遊走, 血管新生を促進し, 軸索の再生を促進していたと推察される。

#### 4) 脱細胞化同種神経を用いた研究<sup>13)</sup>

ADSCシートはADSCsを移植する方法として有用だと考えられたが, さらに成績を上げるためには再生組織の足場について見直す必要があると考え, 人工神経であるPGA製チューブではなく, 脱細胞化同種神経を用いる研究を計画した。

まず, Wangらの方法<sup>14)</sup>に準じて脱細胞化同種神経を作製した。次にラット坐骨神経15 mm欠損モデルを作製し, 脱細胞化同種神経を移植した同種群, 脱細胞化同種神経をADSCシートで被覆したシート群, 切除した坐骨神経を反転し縫合した自家神経群の3群を比較検討した。また, GFP (green fluorescent protein) ラット由来のADSCsからADSCシートを作製し, 移植後の細胞の追跡を行った。

SFIおよび前脛骨筋の複合筋活動電位の終末潜時 (以下, 終末潜時) は3群間に有意差を認めず, 軸索が伸長する速度は同程度であったと考えられた。軸索数の増加を示唆す

る前脛骨筋の複合筋活動電位の振幅 (以下, 振幅) と移植神経のS100蛋白染色では, シート群が同種群に比べ有意に良好な成績であったが, 自家神経群の成績には及ばなかった。前脛骨筋の筋湿重量と筋線維の横断面積では, 自家神経群が有意に改善しており, シート群は同種群より良好な結果であったが, 有意差は認めなかった。なお, 移植したADSCsは移植後4週時に生存しており, 一部は脱細胞化同種神経内に侵入していた。以上の結果から, ADSCシートは脱細胞化同種神経の成績を向上させると考えられたが, ADSCシートと脱細胞化同種神経との組み合わせでは, 自家神経に匹敵する成績を得られなかった。

神経再生を誘導するためには神経様の管腔構造と細胞外基質が重要であるとの考えから, 近年は人工神経に代わる再建材料として, 脱細胞化同種神経が注目されている。しかし, 長い神経欠損や大径神経の欠損に対する脱細胞化同種神経の成績は, いまだ自家神経移植の成績には及ばないことが報告されており, その原因としては脱細胞化同種神経がシュワン細胞などの細胞成分を含まない点, 脱細胞化処理の過程で液性因子が失われる点などが挙げられる。本研究では脱細胞化同種神経に不足する部分をADSCシートで補う方法について検討した結果, ADSCシートが人工神経だけでなく脱細胞化同種神経に対しても有効に作用することが判明した。

#### 5) 自家神経を用いた研究

ADSCsを付加した人工神経や脱細胞化同種神経の成績は, 自家神経の成績に匹敵するものではなかったが, ADSCsには神経再生を促進する効果があると考えられた。そこで我々は, ADSCsは自家神経に代わる再建材料として用いるだけではなく, 自家神経を強化するために用いることも可能ではないかと考えた。

##### (1) 自家神経+ADSCシート<sup>15)</sup>

これまでの研究結果から, ADSCsを移植する方法としてADSCシートが最も有効であると考え, まず自家神経にADSCシートを付加する研究を計画した。

ラット坐骨神経15 mm欠損モデルを作製し, 切除した坐骨神経を反転して縫合し自家神経移植を行った。自家神経の周囲に生理食塩水を投与した対照群, 自家神経の周囲に $3\sim 5 \times 10^6$ 個のADSCsを生理食塩水で懸濁し投与した細胞群, 自家神経を $3\sim 5 \times 10^6$ 個のADSCsを含むADSCシートで被覆したシート群の3群を比較検討した。

その結果, SFI, 前脛骨筋の筋湿重量, 筋線維の横断面積は, シート群が他の2群に対し有意に良好な結果であった。一方, 前脛骨筋の終末潜時は3群間に有意差を認めなかった。ADSCsの懸濁液は自家神経の成績を向上させなかつ

たが、ADSCシートは自家神経の成績を向上させると考えられた。

## (2) 自家神経+自家SVF<sup>16)</sup>

ADSCシートは、作製までに約3週間を要する点が臨床応用する上で問題になると考え、約2時間で抽出可能な自家SVFを自家神経に付加する方法についても検討した。

ラット坐骨神経15 mm欠損モデルを作製して自家神経移植を行った。鼠径部から1.5 gの皮下脂肪を採取して自家SVFを抽出し、自家神経の周囲に生理食塩水を投与した対照群、自家SVFとコラーゲンゲルを投与したSVF群の2群を作製した。

その結果、SFL、前脛骨筋の終末潜時および振幅、筋線維の横断面積、neurofilament染色陽性領域については、SVF群が対照群より良い傾向を認めたが、有意差は認めなかった。一方、前脛骨筋の筋湿重量はSVF群が有意に良好な結果であったことから、自家SVFは自家神経の成績を向上させると考えられた。

末梢神経の欠損に対する治療において最善の選択肢は自家神経移植だとされているが、自家神経移植にも限界があり、機能的な回復が得られる例は半数に満たないことが報告されている<sup>17)</sup>。自家神経移植の問題点としては、①移植片に血行が存在しないため線維化や壊死を生じる点や、②シュワン細胞の活性が低下している点、③再生軸索にmisdirectionが生じる点などが挙げられるため、これらに対処することで自家神経移植の成績は向上する余地があると考えられる。我々のこれまでの研究結果から、SVFやADSCsはシュワン細胞の遊走や新生血管の形成を促進する効果を有することが判明しており、これらの効果は特に①と②の問題点に有効に作用する可能性があると考えられたことから、本研究を計画した。その結果、ADSCシートや自家SVFの懸濁液には有意な効果があると考えられた。

自家神経の成績を向上させることを目的とした研究報告としては、ADSCsを自家神経内に注入する方法やplatelet-rich plasmaを自家神経の周囲に投与する方法について数編の報告が存在する。また、Fujiiらは自家神経移植のみ行った群、自家神経の周囲にADSCsを含む懸濁液を投与した群、自家神経をADSCシートで被覆した群の3群を比較検討し、自家神経に対する懸濁液の投与には有意な効果を認めなかったものの、ADSCシートによる被覆には有意な効果が認められたと報告している<sup>18)</sup>。この結果は我々の結果とも合致しており、ADSCシートは自家神経の成績を向上させると考えられるが、シート作製までに時間を要する点が臨床応用する際に問題となる。その一方、SVFは臨床応用する上で現実的な細胞源であると考えられるが、

本研究で有意差を認めたのは前脛骨筋の筋湿重量のみであり、効果は限定的であったともいえる。SVFに関しては適切な投与量や投与方法などについて、更なる検討を要する。

## 3. 今後の展望

前述のように、SVFやADSCs、dADSCsは成長因子を放出するtrophic効果や、シュワン細胞に分化して神経再生に寄与するrepair効果を発揮することが期待されてきた。現在のところ、trophic効果については神経成長因子(nerve growth factor, NGF)や脳由来神経栄養因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、毛様体神経栄養因子(ciliary neurotrophic factor, CNTF)、グリア細胞株由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)などの放出について報告されているが、repair効果については疑問視されている状況である<sup>19),20)</sup>。また、近年はADSCs由来の細胞外小胞が神経再生に寄与するとの報告が散見されるようになった<sup>21)</sup>。自験例において、SVFやADSCs、dADSCsは主としてtrophic効果により神経再生を促進していたと考えられるが、その詳細な機序については不明な点が多く、中でも自家神経に対する作用機序については検討できていない。今後は再生組織内における細胞の挙動や転帰について評価するとともに、細胞の適切な投与量や投与方法についても検討していきたいと考えている。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

## 文 献

- 1) Gaudin R, Knipfer C, Henningsen A, et al: Approaches to Peripheral Nerve Repair: Generations of Biomaterial Conduits Yielding to Replacing Autologous Nerve Grafts in Craniomaxillofacial Surgery. *Biomed Res Int* 3856262, 2016
- 2) Sukanuma S, Tada K, Hayashi K, et al: Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration. *J Orthop Sci* 18: 145-51, 2013
- 3) Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7: 211-28, 2001
- 4) Matsumine H, Numakura K, Klimov M, et al: Facial-nerve regeneration ability of a hybrid artificial nerve conduit containing uncultured adipose-derived stromal vascular fraction: An experimental study. *Microsurgery* 37: 808-18, 2017
- 5) Tremp M, Meyer Zu Schwabedissen M, et al: The regeneration potential after human and autologous stem cell transplantation in a rat sciatic nerve injury model can be monitored by MRI. *Cell Transplant* 24: 203-11, 2015
- 6) Yamamoto D, Tada K, Sukanuma S, et al: Differentiated adipose-derived stem cells promote peripheral nerve regeneration. *Muscle Nerve* 62: 119-27, 2020
- 7) Kingham PJ, Kalbermatten DF, Mahay D, et al: Adipose-

- derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. *Exp Nerve* **207**: 267-74, 2007
- 8) 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
  - 9) Nakajima T, Tada K, Nakada M, et al: Facilitatory effects of artificial nerve filled with adipose-derived stem cells sheets on peripheral nerve regeneration: An experimental study. *J Orthop Sci*, 2020 (online ahead of print)
  - 10) Vermette M, Trottier V, Ménard V, et al: Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells. *Biomaterials* **28**: 2850-60, 2007
  - 11) Fang X, Murakami H, Demura S, et al: A novel method to apply osteogenic potential of adipose derived stem cells in orthopaedic surgery. *PLoS One* **9**: e88874, 2014
  - 12) Yu J, Tu YK, Tang YB, et al: Stemness and transdifferentiation of adipose-derived stem cells using L-ascorbic acid 2-phosphate-induced cell sheet formation. *Biomaterials* **35**: 3516-26, 2014
  - 13) Nakada M, Itoh S, Tada K, et al: Effects of hybridization of decellularized allogenic nerves with adipose-derive stem cell sheets to facilitate nerve regeneration. *Brain Res* **1746**: 147025, 2020
  - 14) Wang W, Itoh S, Takakuda K: Comparative study of the efficacy of decellularization treatment of allogenic and xenogeneic nerves as nerve conduits. *J Biomed Mater Res A* **104**: 445-54, 2016
  - 15) 多田 薫, 中嶋宰大, 中田美香, 他: 脂肪由来幹細胞シートを用いた強化型自家神経移植の探索的研究. *日手会誌* **37**: 23-26, 2020
  - 16) Tada K, Nakada M, Matsuta M, et al: Enhanced nerve autograft using stromal vascular fraction. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2020 (online ahead of print)
  - 17) Lee SK, Wolfe SW: Peripheral nerve injury and repair. *J Am Acad Orthop Surg* **8**: 243-52, 2000
  - 18) Fujii K, Matsumine H, Osaki H, et al: Accelerated outgrowth in cross-facial nerve grafts wrapped with adipose-derived stem cell sheets. *J Tissue Eng Regen Med* **14**: 1087-99, 2020
  - 19) Giardino FR, Cuomo R, Nisi G, et al: Different Roles Played by Adipose-Derived Stem Cells in Peripheral Nerve Regeneration: State of the Art. *J Invest Surg*, 2019 (online ahead of print)
  - 20) 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
  - 21) Haertinger M, Weiss T, Mann A, et al: Adipose Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Induce Proliferation of Schwann Cells via Internalization. *Cells* **9**: 163, 2020