

3. 今後の展望

4) iPS細胞を併用した人工神経の開発研究

*¹JR大阪鉄道病院整形外科, *²淀川キリスト教病院整形外科,

*³大阪市立大学大学院医学研究科整形外科学

上村 卓也*^{1,3}, 高松 聖仁*^{2,3}, 中村 博亮*³

Takuya UEMURA, Kiyohito TAKAMATSU, Hiroaki NAKAMURA



1. はじめに

末梢神経欠損に対する現在の標準治療は自家神経移植であるが、体の他部位の正常な神経を犠牲にしなければならないという問題がある。近年、神経再生誘導材（以下、人工神経）が臨床応用されるようになり、正常神経を犠牲にせず末梢神経再生を行うことが可能となった。しかし、既存の人工神経は素材（吸収が速い）、強度（硬い）などの点で課題があり、また長い神経欠損、とくに運動神経欠損では、自家神経移植に比べて神経再生が十分ではないといった最大のハードルが残っている。そこで我々は独自に人工神経の開発を行い、神経再生を促進させるために、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell, iPS細胞）を併用したハイブリッド型人工神経の研究を行ってきた。

2. 新規人工神経の開発

我々は、十分に神経が再生し成熟するまで、一定期間にわたって管腔構造が維持されるような強度を持ち、なおかつ高い柔軟性を維持できる生体吸収性素材の人工神経を開発した（研究段階、図1）^{1), 2)}。この人工神経は管腔壁が2層構造となっている。内層はポリ乳酸とポリカプロラク톤を50%ずつで配合したスポンジ共重合体で構成され、吸収は比較的速く柔軟性に富む。内層構造だけでは強度が不十分であるため、外層を吸収の遅いポリ乳酸のマルチファイバーメッシュで補強した構造である。この2層構造のため、再生軸索が伸長する間も人工神経は閉塞することなく管腔が維持されると同時に、十分な柔軟性のため折れ曲が

らない。この人工神経は動きのある関節付近でも移植可能であり、既存の人工神経よりも適応範囲の拡大が見込まれる。さらに、この人工神経は蜂巢構造のスポンジ多孔体となっている内層が最大の特徴であり、この多孔体内を足場として神経再生に有利な細胞や物質を付加することができる^{3), 4)}。

3. iPS細胞を併用した人工神経

1) マウスiPS細胞を併用した人工神経

前述のとおり、長い神経欠損であっても自家神経移植と同等に神経再生が得られる、神経再生能が促進した人工神経の作製が求められている。そこで我々はiPS細胞に着目した。iPS細胞は、京都大学iPS細胞研究所の山中伸弥教授が2012年にノーベル生理学・医学賞を受賞するなど、再生医療において現在最も脚光を浴びている幹細胞の1つである⁵⁾。iPS細胞は皮膚線維芽細胞から樹立可能で、神経系細胞への分化誘導方法が確立されており、パーキンソン病や脊髄損傷に対する臨床治験が開始されている。

我々はまず、マウスiPS細胞（iPS-MEF-Ng-178B-5）から分化誘導した第2世代神経前駆細胞（neural stem/progenitor cells）⁶⁾を付加したハイブリッド型人工神経を作製し、マウスの末梢神経再生実験を行った。第1世代神経前駆細胞からは主に神経細胞が、第2世代神経前駆細胞からはグリア細胞が優位に分化誘導されることがわかっている。第2世代神経前駆細胞を人工神経1本当たり 4×10^6 個の濃度で人工神経に充填し、そのままインキュベーター内に14日間静置することで、細胞が人工神経を足場として3次元培養され、その一部がシュワン様細胞として人工神経の内層スポンジ内に生着した⁷⁾。

次いで、6週齢の若齢マウス（C57BL6）の坐骨神経欠損（long gap model）に対して人工神経移植を行った。移植後、

■ 著者連絡先

JR大阪鉄道病院整形外科

（〒545-0053 大阪府大阪市阿倍野区松崎町1-2-22）

E-mail: t-uemura@med.osaka-cu.ac.jp

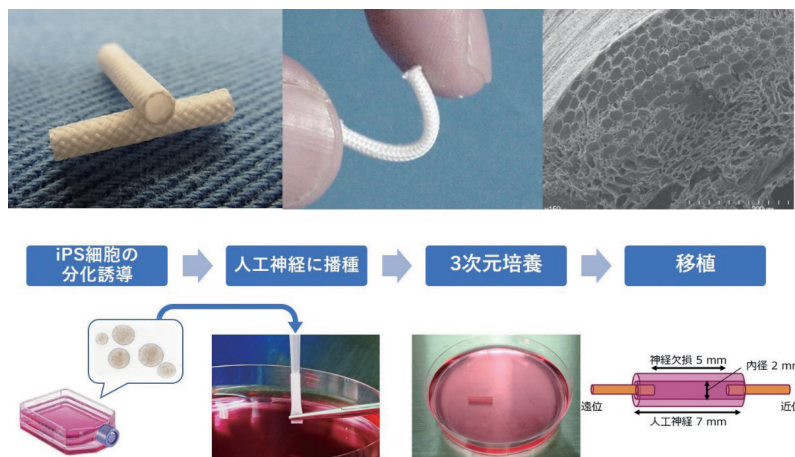
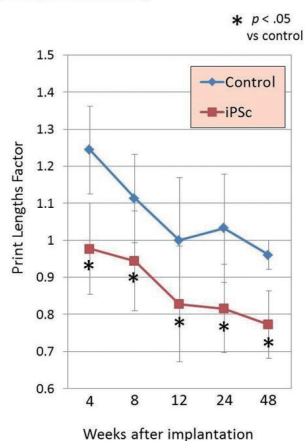


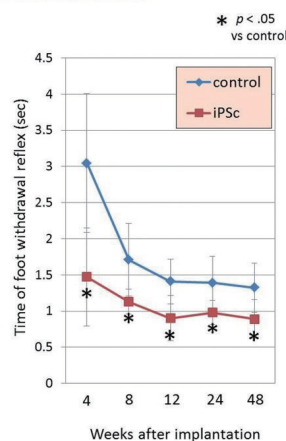
図1 新規人工神経（研究段階）とiPS細胞3次元培養ハイブリッド型人工神経^{1)~3),7)}

A. マウスの下肢機能回復結果

運動機能回復



知覚機能回復



B. 再生軸索（移植後12週）

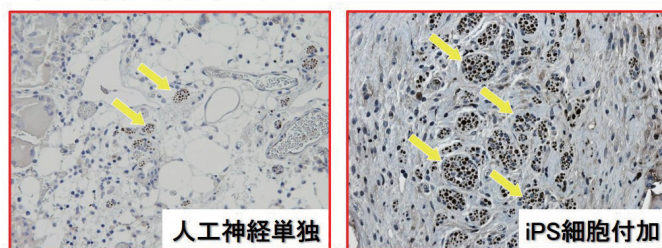


図2 マウスiPS細胞3次元培養ハイブリッド型人工神経の移植（若齢マウス）結果^{8),9)}

12週、24週、48週と時間が経過するにつれて人工神経は徐々に吸収が進んでいったが、この人工神経は柔軟性を維持しつつも管腔壁は圧潰せずチューブ形態を維持し、人工神経内に伸長した再生軸索を認めた（図2）^{8),9)}。移植後12、24、48週のいずれにおいても、人工神経単独移植群に比べてiPS細胞付加人工神経群は、統計学的に有意に下肢運動および知覚機能が回復し、再生軸索数も有意に増加し

ていた。また、人工神経の内外に奇形腫形成は認められず、マウスiPS細胞を付加した人工神経は、長期間にわたり安全かつ有効な神経再生が得られていた。

次に、実臨床の超高齢社会を想定し、92週齢の老齢マウスの坐骨神経欠損に対して、人工神経移植を行った。若齢マウスより神経再生能が低下した老齢マウスにおいても、移植後12週においてiPS細胞を付加した人工神経は人工神経

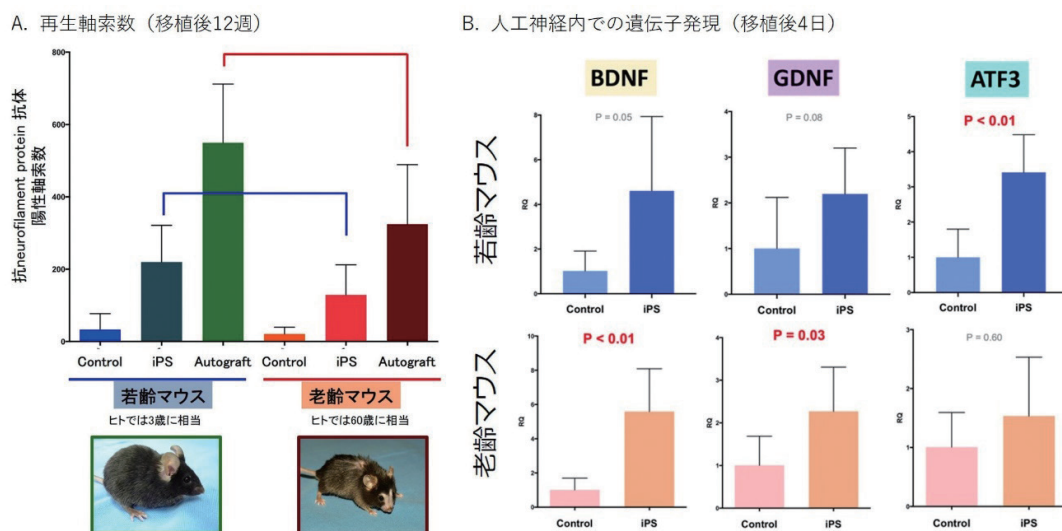


図3 マウスiPS細胞3次元培養ハイブリッド型人工神経の移植（若齢および老齢マウス）結果^{10),11)}
ATF 3, Activating transcription factor 3; BDNF, brain-derived-neurotrophic factor; GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor.

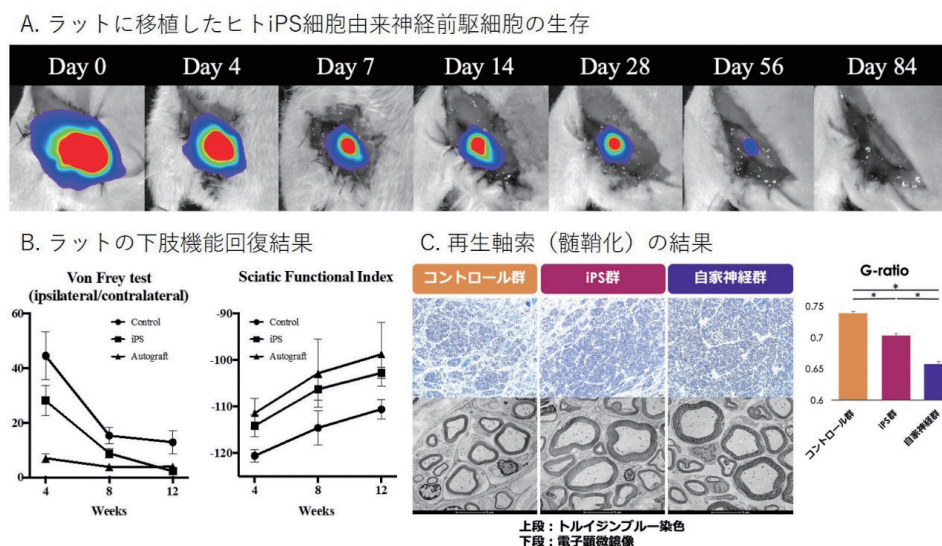


図4 ヒトiPS細胞3次元培養ハイブリッド型人工神経の移植（ヌードラット）結果¹²⁾

単独よりも神経再生が促進した(図3)¹⁰⁾。移植したiPS細胞由来神経前駆細胞は、若齢・老齢マウスともに*in vivo*イメージングで移植後2週間は人工神経内で生存しており、シュワン様細胞として遠位側の再生軸索内に遊走して神経再生促進に寄与していた¹¹⁾。さらに移植後早期(4~7日目)では、軸索再生促進・神経保護作用のある液性因子の遺伝子〔BDNF, (brain-derived-neurotrophic factor), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), ATF 3 (activating transcription factor 3)〕発現が増大しており、移植したiPS細胞由来神経前駆細胞から分泌された液性因子が神経再生促進に関与していることが示唆された。

2) ヒトiPS細胞を併用した人工神経

臨床応用に向けた次なるステップとして、ヒトiPS細胞と人工神経を用いてラットの末梢神経再生を行った。ヒトiPS細胞(201B7)から分化誘導した第4世代神経前駆細胞を人工神経1本当たり 4×10^6 個の濃度で人工神経に充填し、14日間3次元培養することでハイブリッド型人工神経を作製した。そして、無胸腺免疫不全ラットの坐骨神経欠損(short gap model)に対して人工神経移植を行った。移植後12週において、ハイブリッド型人工神経は人工神経単独に比べて下肢知覚・運動機能回復および軸索再生が有意に促進した(図4)¹²⁾。とくに、知覚機能は自家神経移植

群と同程度まで回復した。*in vivo*イメージングにおいて、人工神経に付加したヒトiPS細胞由来神経前駆細胞は、移植後8週まで人工神経内で生存し、神経再生促進に寄与していた。

これまでにiPS細胞と人工神経を用いた末梢神経再生の基礎研究はいくつか報告されているが、それらはいずれもiPS細胞由来神経堤(幹)細胞が用いられている^{13)~15)}。一方、我々はiPS細胞由来神経前駆細胞を用いてきた。どちらの細胞が末梢神経再生に有効であるかについては現状では不明である。しかし、我々が用いてきたiPS細胞由来神経前駆細胞は、神経再生における有効性と安全性について前臨床試験において厳しく評価されており、臨床応用にもっとも近い細胞という点でアドバンテージがあるものと考えている。長年にわたり慶應義塾大学において、iPS細胞由来神経前駆細胞を用いた脊髄損傷治療の基礎研究が進められてきた^{16)~18)}。げっ歯類に始まり、その後コンマーマーモセットの脊髄損傷に対するiPS細胞由来神経前駆細胞移植の有効性と安全性が実証された^{19)~21)}。2021年3月現在、本邦において亜急性期の脊髄損傷患者に対するヒトiPS細胞由来神経前駆細胞移植治療の試験が既に開始されている。我々は末梢神経損傷の分野においても同様のステップで、ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞を付加した人工神経の臨床応用を目指している。

4. おわりに

iPS細胞を用いた再生医療の研究は驚くべきスピードで進んでおり、網膜・角膜移植治療、心筋再生治療、パーキンソン病治療、脊髄損傷治療、軟骨損傷治療、血小板輸血治療など多くの分野において、臨床試験が世界に先駆けて本邦で開始されている。末梢神経再生においても、改良版の人工神経の開発のみならず、iPS細胞移植を併用したハイブリッド型人工神経が、近い将来末梢神経欠損に対する新しい標準治療となることを期待している。

謝 辞

マウスiPS細胞由来神経前駆細胞の分化誘導に関しては山中伸弥教授(京都大学iPS細胞研究所)、三浦恭子先生(熊本大学大学院生命科学研究部)に、ヒトiPS細胞由来神経前駆細胞の提供と分化誘導およびフォルティシモ・ルシフェラーゼ(ffLuc)遺伝子導入に関しては中村雅也教授、名越慈人先生(慶應義塾大学医学部整形外科)、岡野栄之教授、芝田晋介先生(慶應義塾大学医学部生理学)、佐藤和毅教授(慶應義塾大学医学部スポーツ医学総合センター)に深謝の意を表す。

本稿のすべての著者には規定されたCOIはない。

文 献

- 1) 高松聖仁, 越 宗勝, 中塚洋直, 他: 新たに開発した生体吸収性polymer tubeによるhybrid型人工神経の作成. 末梢神経 **13**: 79-82, 2002
- 2) Koshimune M, Takamatsu K, Nakatsuka H, et al: Creating bioabsorbable Schwann cell coated conduits through tissue engineering. Biomed Mater Eng **13**: 223-9, 2003
- 3) 高松聖仁: 末梢神経の再生医療—臨床応用に向けて理想の人工神経とは?—. ここまで進んだ再生医療の実践. 田端康彦(編). 羊土社, 東京, 2003, 168-77
- 4) Ikeda M, Uemura T, Takamatsu K, et al: Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system. J Biomed Mater Res A **102**: 1370-8, 2014
- 5) Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell **126**: 663-76, 2006
- 6) Miura K, Okada Y, Aoi T, et al: Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. Nat Biotechnol **27**: 743-5, 2009
- 7) Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, et al: A tissue-engineered bioabsorbable nerve conduit created by three-dimensional culture of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres. Biomed Mater Eng **21**: 333-9, 2011
- 8) Uemura T, Takamatsu K, Ikeda M, et al: Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. Biochem Biophys Res Commun **419**: 130-5, 2012
- 9) Uemura T, Ikeda M, Takamatsu K, et al: Long-term efficacy and safety outcomes of transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres with bioabsorbable nerve conduits for peripheral nerve regeneration in mice. Cells Tissues Organs **200**: 78-91, 2014
- 10) Yokoi T, Uemura T, Takamatsu K, et al: Bioabsorbable nerve conduits coated with induced pluripotent stem cell-derived neurospheres enhance axonal regeneration in sciatic nerve defects in aged mice. J Biomed Mater Res B Appl Biomater **106**: 1752-8, 2018
- 11) Yokoi T, Uemura T, Takamatsu K, et al: Fate and contribution of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres transplanted with nerve conduits to promoting peripheral nerve regeneration in mice. Biomed Mater Eng, 2021 In press
- 12) Onode E, Uemura T, Takamatsu K, et al: Bioabsorbable nerve conduits three-dimensionally coated with human induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells promote peripheral nerve regeneration in rats. Sci Rep **11**: 4204, 2021
- 13) Wang, A, Tang Z, Park IH, et al: Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering. Biomaterials **32**: 5023-32, 2011
- 14) Lv Y, Nan P, Chen G, et al: In vivo repair of rat transected sciatic nerve by low-intensity pulsed ultrasound and induced pluripotent stem cells-derived neural crest stem cells. Biotechnol Lett **37**: 2497-506, 2015

- 15) Kimura H, Ouchi T, Shibata S, et al: Stem cells purified from human induced pluripotent stem cell-derived neural crestlike cells promote peripheral nerve regeneration. *Sci Rep* **8**: 10071, 2018
- 16) Nakamura M, Okano H: Cell transplantation therapies for spinal cord injury focusing on induced pluripotent stem cells. *Cell Res* **23**: 70-80, 2013
- 17) Nagoshi N, Tsuji O, Nakamura M, et al: Cell therapy for spinal cord injury using induced pluripotent stem cells. *Regen Ther* **11**: 75-80, 2019
- 18) Tsuji O, Sugai K, Yamaguchi R, et al: Concise Review: Laying the Groundwork for a First-In-Human Study of an Induced Pluripotent Stem Cell-Based Intervention for Spinal Cord Injury. *Stem Cells* **37**: 6-13, 2019
- 19) Tsuji O, Miura K, Okada Y, et al: Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 12704-9, 2010
- 20) Nori S, Okada Y, Yasuda A, et al: Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**: 16825-30, 2011
- 21) Kobayashi Y, Okada Y, Itakura G, et al. Pre-evaluated safe human iPSC-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS One* **7**: e52787, 2012