

3. 今後の展望

5) バイオ3Dプリンターによる人工神経

*¹京都大学医学部附属病院リハビリテーション科, *²京都大学医学部附属病院医学研究科人間健康科学科, *³京都大学医学部附属病院整形外科, *⁴京都大学iPS細胞研究所臨床応用研究部門, *⁵佐賀大学医学部附属再生医学研究センター, *⁶株式会社サイフューズ

池口良輔*¹, 青山朋樹*², 洵江宏文*³, 竹内久貴*³, 光澤定己*³,
趙成珠*³, 安藤麻紀*³, 吉元孝一*³, 宮崎雄大*⁶, 野口貴志*²,
秋枝静香*⁵, 池谷真*³, 中山功一*⁴, 松田秀一*²

Ryosuke IKEGUCHI, Tomoki AOYAMA, Hirofumi YURIE, Hisataka TAKEUCHI, Sadaki MITSUZAWA,
Chengzhu ZHAO, Maki ANDO, Koichi YOSHIMOTO, Yudai MIYAZAKI, Takashi NOGUCHI, Shizuka AKIEDA,
Makoto IKEYA, Koichi NAKAYAMA, Shuichi MATSUDA



1. はじめに

神経欠損を伴う末梢神経では、自家神経移植がゴールドスタンダードであるが、自家神経移植には健常神経を採取するため採取部遠位の知覚脱失や有痛性神経腫などの障害を伴う。そのため、神経ギャップを埋めるために人工神経などの治療法が開発されてきた。一般的な人工神経はシュワン細胞などの細胞成分を含まないため、自家神経移植ほどの神経再生は期待できない¹⁾。実験的には人工神経にシュワン細胞や間葉系幹細胞を付加する試みがなされてきたが、細胞の生存率や有効率が悪く、実用化には至っていない。そこで、著者らは、細胞のみから三次元神経導管を作製可能なバイオ3Dプリンティングの技術に着目した。

2. バイオ3Dプリンティング

細胞を培養すると、凝集しスフェロイドという集合体になる。バイオ3Dプリンター (Regenova[®], 株式会社サイフューズ) は、事前に作製した3Dデータに基づいて、剣山のような極めて細い針の山にスフェロイドを刺しながら形づくっていく方法で、「剣山方式」と呼ばれる²⁾。できあがった細胞からの立体組織が形として固まったら剣山を抜いて成熟させることにより、さらに崩れない立体組織を作ることができる技術である (図1, <https://www.cyfusebio.com/>)

product/) ³⁾。このできあがった立体組織は、人工的な足場材料を含まず、細胞のみからなる組織である。管状のデザインとすることにより、内部に酸素・栄養を供給しながら大型の組織を培養することができる。また、数種類の細胞を組み合わせると立体組織を作り出すこともできる。様々な細胞に応用することができ、様々な立体臓器に応用可能である。実際に、血管組織、軟骨組織、気管の作製などに応用されている^{4)~6)}。

3. 三次元神経導管

ヒト線維芽細胞からバイオ3Dプリンターにて8 mmの三次元神経導管を作製し、免疫不全ラットの坐骨神経欠損部に移植して、神経再生を評価した⁷⁾ (図2)。右坐骨神経の5 mm欠損部に移植し、コントロール群をシリコンチューブとして比較検討を行った。移植後8週間でのラット運動解析では、右下肢遊脚期 (swing phase) 最終での中足骨に対する足趾の角度が、コントロール群と比較して有意に改善していた。電気生理学的検査では、足部内転筋での複合筋活動電位がコントロール群と比較して有意に高値であった。組織学および形態学的には、良好な軸索再生が認められ、コントロール群と比較して有意に多くの有髄神経軸索数の再生が認められ、前脛骨筋質重量の比較では有意に高値であった。以上のことから、三次元神経導管移植による良好な神経再生を確認することができた。神経再生にはシュワン細胞だけでなくマクロファージや線維芽細胞が必要で、特に線維芽細胞はシュワン細胞の移動を促進させる^{8),9)}。また、線維芽細胞は *in vitro* での培養と増殖が

■ 著者連絡先

京都大学医学部附属病院リハビリテーション科
(〒606-8507 京都府京都市左京区聖護院川原町54)
E-mail. ikeguchir@me.com

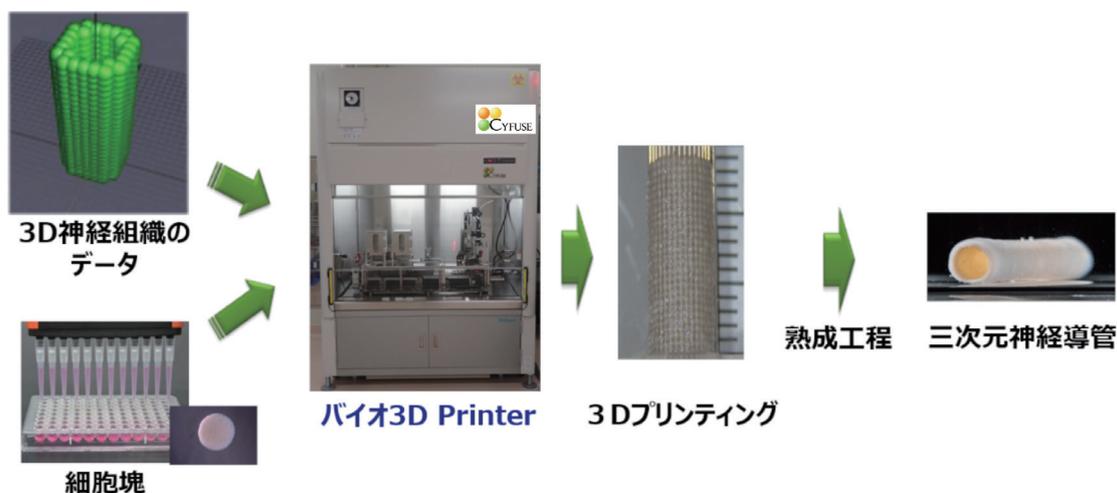


図1 バイオ3Dプリンティングの概要

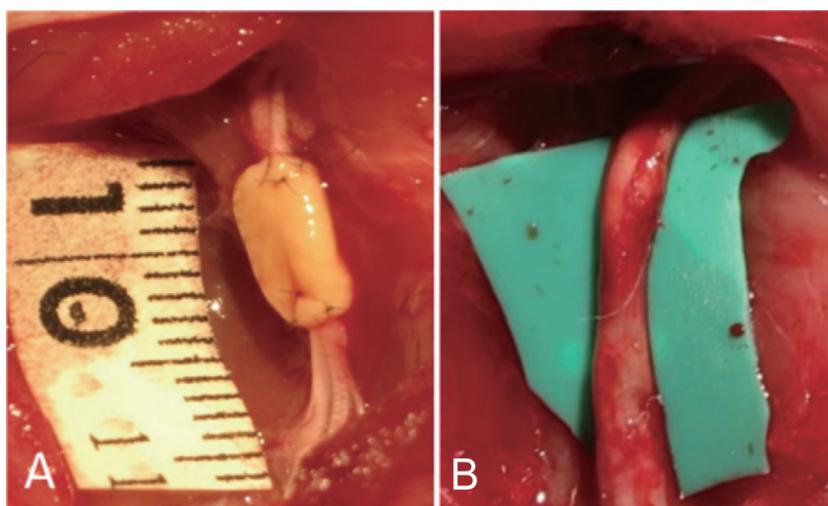


図2 三次元神経導管による神経再生
A) 線維芽細胞から作製した三次元神経導管の神経欠損部への移植(ラット), B) 8週間後の再生神経

容易で、三次元神経導管の機械的強度が比較的得やすいため、本研究で使用した。移植するヒト線維芽細胞をPKH26にて標識し、tracking analysisを行った⁹⁾。再生神経内に移植した長鎖脂肪酸末端(PKH26)標識細胞は残存しており、再生神経内に三次元神経導管構造のまま生存していることが確認できた。また、一部のPKH26標識細胞はS-100に対して陽性であることも確認され、シュワン様細胞へ分化していることが認められた⁹⁾。これは線維芽細胞が*in vitro*でシュワン細胞へ分化誘導されるという報告と一致するものであった¹⁰⁾。さらに、移植直前と移植後1週間の三次元神経導管内の細胞生存率を、LIVE/DEAD Cell Viability Assay (Thermo Fisher Scientific社)にて評価した⁹⁾。三次元神経導管内の細胞生存率は移植直前でも移植後1週間で

も高率であり、細胞投与方法しても安定していることが確認できた⁹⁾。

4. 臨床応用を目指して

前項では、8 mmの三次元神経導管を作製し、5 mmの神経欠損部へ移植して良好な神経再生を確認できていたが、臨床応用を目指すために、著者らはさらに長い神経欠損部への神経移植実験も行った¹¹⁾。ヒト線維芽細胞から13 mmの三次元神経導管を作製し、免疫不全ラットの10 mmの坐骨神経欠損部へ移植したところ、移植後8週での再生神経内の有髄神経軸索数、有髄神経軸索直径ともコントロール群と比較して有意に高値であり、神経再生の促進を確認できた。また、大径神経の再建も必要なことから、ビー

グル犬を用いて鼠径部の皮膚から線維芽細胞を分離培養し、5 mm径の三次元神経導管を作製して尺骨神経欠損部へ移植し、前臨床Proof of Concept研究として検討を行った¹²⁾。移植後10週で小指球筋の複合筋活動電位が認められるようになり、前足部尺側の知覚再支配と多数の有髄神経軸索が認められ、神経再生が確認できた。有害事象の発生も認められなかった。バイオ3Dプリンティングの技術はあらゆる細胞種でも立体組織を作り出すことが可能であるため、自家骨髄間葉系幹細胞を用いて三次元神経導管を作製し、ラット坐骨神経欠損部へ移植し検討を行った¹³⁾。移植後12週間で、ラット運動解析では、右下肢swing phase最終での中足骨に対する足趾の角度が、コントロール群と比較して有意に改善しており、電気生理学的検査では、足部内転筋での複合筋活動電位がコントロール群と比較して有意に高値であった。組織形態学的には、再生神経内の有髄神経軸索数がコントロール群と比較して有意に高値であり、前脛骨筋質重量も有意に高値であった。前述のように、骨髄間葉系幹細胞を用いても三次元神経導管は作製することができ、末梢神経欠損部の神経再生促進を確認することができた。間葉系幹細胞が神経再生を促進することから、iPS細胞(induced pluripotent stem cells)から間葉系幹細胞を分化誘導させたiPS細胞由来間葉系幹細胞からも三次元神経導管を作製し、ラット坐骨神経欠損部へ移植して検討を行った¹⁴⁾。その結果、ラット運動解析、電気生理学的検査、前脛骨筋質重量、組織形態学的にもコントロール群と比較し有意に良好な神経再生を確認できた。このことから、HLA(human leukocyte antigen)タイプ別の再生医療用iPS細胞ストックが確立されれば、将来的にはHLAタイプ別の三次元神経導管をあらかじめ作製しストックしておくことで、救急医療の現場で急性期の末梢神経損傷へ移植できる可能性がある。また、現在開発されているHLAをノックアウトしたiPS株を使用することで、1つの株をユニバーサルに使用できる可能性がある。

5. 医師主導治験

前述のような結果を得て、手の外傷性末梢神経損傷に対して、臨床用バイオ3Dプリンターを用いて製造した三次元神経導管移植の医師主導治験を開始している。京都大学医学部附属病院整形外科が中心となり、京都大学医学部附属病院先端医療研究開発機構(iACT)の支援を得て、細胞療法センター(C-RACT)とともに実施している。株式会社サイフューズの開発した臨床用バイオ3Dプリンターは、C-RACT内の細胞調製施設(CCMT)に設置し、三次元神経導管の製造を行っている。20歳以上60歳以下の手関節以

遠の外傷性末梢神経損傷で、神経断裂・欠損部位が予想されるもので、受傷から6ヵ月以内の患者を対象としている。方法としては、患者の腹部または鼠径部から皮膚を採取し、C-RACT内のCCMTにて線維芽細胞を拡大培養し、臨床用バイオ3Dプリンターにて三次元神経導管を製造して、神経欠損部に移植する。

謝辞

本論文の内容の一部は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)「橋渡し研究戦略的推進プログラム」として実施された。

中山功一：【役員・顧問職】株式会社サイフューズ創業者
【株】株式会社サイフューズ創業者株

その他の著者には規定されたCOIはない。

文献

- 1) Griffin JW, Hogan MV, Chhabra AB, et al: Peripheral nerve repair and reconstruction. *J Bone Joint Surg Am* **95**: 2144-51, 2013
- 2) Nakayama K: Development of a Scaffold-Free 3D Biofabrication System "Kenzan Method". *Kenzan Method for Scaffold-Free Biofabrication 1-15*, ed by Nakayama K. Springer Nature Switzerland AG, 2021
- 3) Itoh M, Nakayama K, Noguchi R, et al: Scaffold-free tubular tissues created by a Bio-3D printer undergo remodeling and endothelialization when implanted in Rat Aortae. *PLoS One* **11**: e0136681, 2015
- 4) Ishihara K, Nakayama K, Akieda S, et al: Simultaneous regeneration of full-thickness cartilage and subchondral bone defects in vivo using a three-dimensional scaffold-free autologous construct derived from high-density bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Surg Res* **9**: 98, 2014
- 5) Dikina AD, Strobel HA, Lai BP, et al: Engineered cartilaginous tubes for tracheal tissue replacement via self-assembly and fusion of human mesenchymal stem cell constructs. *Biomaterials* **52**: 452-62, 2015
- 6) Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, et al: The efficacy of a scaffold-free Bio 3D conduit developed from human fibroblasts on peripheral nerve regeneration in a rat sciatic nerve model. *PLoS One* **12**: e0171448, 2017
- 7) Pan D, Mackinnon SE, Wood MD: Advances in the repair of segmental nerve injuries and trends in reconstruction. *Muscle Nerve* **61**: 726-39, 2019
- 8) 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
- 9) Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, et al: Mechanism of Peripheral Nerve Regeneration Using a Bio 3D Conduit Derived from Normal Human Dermal Fibroblasts. *J Reconstr Microsurg*, 2020, doi: 10.1055/s-0040-1716855. Online ahead of print
- 10) Thoma EC, Merkl C, Heckel T, et al: Chemical conversion

- of human fibroblasts into functional Schwann cells. *Stem Cell Reports* **3**: 539-47, 2014
- 11) Takeuchi H, Ikeguchi R, Aoyama T, et al: A scaffold-free Bio 3D nerve conduit for repair of a 10-mm peripheral nerve defect in the rats. *Microsurgery* **40**: 207-16, 2020
 - 12) Mitsuzawa S, Ikeguchi R, Aoyama T, et al: The efficacy of a Scaffold-free Bio 3D conduit developed from autologous dermal fibroblasts on peripheral nerve regeneration in a canine ulnar nerve injury model: A Preclinical Proof-of-Concept Study. *Cell Transplant* **28**: 1231-41, 2019
 - 13) Yurie H, Ikeguchi R, Aoyama T, et al: Bio 3D conduits derived from bone marrow stromal cells promote peripheral nerve regeneration. *Cell Transplant* **29**: 963689720951551, 2020
 - 14) Mitsuzawa S, Zhao C, Ikeguchi R, et al: Pro-angiogenic scaffold-free Bio three-dimensional conduit developed from human induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells promotes peripheral nerve regeneration. *Sci Rep* **10**: 12034, 2020