

日本医療研究開発機構 再生医療実現拠点ネットワークプログラム事業
幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム
事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ヒト iPS 由来神経と生体吸収性素材による損傷神経の再生を促進する安全な医療材料開発

(英語) Development of novel safe medical device to promote regeneration of injured peripheral nerve by human iPSC-derived nerve and bioabsorbable material

研究開発実施期間: 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 芝田 晋介

(英語) Shinsuke Shibata

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人新潟大学 大学院医歯学総合研究科 教授

(英語) Niigata University, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Division of Microscopic Anatomy, Professor

II 研究開発の概要

手術や外傷に伴って生じるヒトの末梢神経損傷は、決して自発的には神経再生が起こらないため必ず手術的な治療が必要となる。治療法としては、自家神経移植が最もスタンダードな治療ではあるものの、複数箇所の開創・閉創手術が必要であり手術時間が延長すること、自家神経として採取した部位の感覚脱落が生じることなどの欠点を含んでいる。また大きな欠損長を有する重症の末梢神経損傷の場合には、自家神経移植も行うことができない。市販の人工神経も複数種類販売はされているものの、大きな欠損長のある損傷には適用できず、ある程度の治療効果が期待できる短いサイズの欠損でも、治療効果は自家神経移植を超えることはない。そのため、神経欠損のサイズによらずに即時移植可能な、治療効果の高い人工神経の開発が以前より期待されていた。

私たちのグループでは、これまで長年にわたって共同研究体制を構築し、整形外科、歯科口腔外科、生理学などの専門技術と、電子顕微鏡のイメージング技術を融合した末梢神経再生プロジェクトチームにて末梢神経再生研究を行ってきた。特に、近年ではヒト iPS 細胞由来の特定の神経系に分化させた細胞移植による末梢神経再生研究を実施し、一定の治療効果が得られた報告をこれまでに行うことができた。ただし、ヒト iPS 細胞由来の神経系細胞を移植するような細胞を用いた移植療法では、どうしても一定割合の増殖細胞が移植後も観察されることを確認しており、ヒトへの臨床応用を考えると安全性に懸念が残る結果であった。そこで私たちのグループでは、さらに安全性と治療効果の高い人工神経の開発を目指すため、細胞体と軸索部分を分離培養できる優れた特殊培養デバイスにて作製する神経細胞オルガノイドの特許技術に着目した。iPS 細胞由来のヒト神経細胞オルガノイドを培養する技術を生かし、細胞核や細胞体を含まないヒト神経の軸索部分だけを取り出して束化し、生体吸収性材料にて包む新規の人工神経を作製することを目指した本研究開発課題（以下、本課題）に取り組むことを決意した。本課題は3つの研究開発項目から構成されており、研究開発項目（1）にて「移植軸索束に用いるヒト iPS 細胞由来・神経細胞の分化培養方法の検討」を行い、研究開発項目（2）では「生体吸収性材料を用いた軸索束の作製方法と有効な移植術式の検討」を実施することとした。さらに最後の研究開発項目（3）において、「より安全で、より治療効果の高い軸索束の検討」を実施するものとし、安全性と治療効果の高い神経人工神経を開発するプロジェクトを開始した。

以下に、本課題の各研究開発項目における実施研究内容の概要をまとめる。

本課題の研究開発項目（1）では、げっ歯類の神経欠損部位へ移植するための軸索束を十分に確保するために、まずヒト iPS 細胞由来の神経細胞の分化方法および培養方法を検討した。自らの手でヒト iPS 細胞から分化誘導するだけでなく、購入したヒト iPS 細胞由来の未分化神経幹細胞からヒト神経細胞を成熟させる方法も検討するなど、様々な手法によってヒト神経細胞を分化させた。また特許技術である、細胞体と軸索束を分離培養するオリジナルの特殊デバイスに対して、新規の改良を重ね、移植用に適した軸索束が培養できるデバイス開発にも成功している。新規の新規培養デバイスを用いて、十分な長さの軸索の束を、十分量一気に作製する方法を確立した。移植直前まで付属しているヒト神経オルガノイドの「細胞体」部分については、移植直前に除去して固定し、凍結切片を作製してから様々な抗体染色を行って光学顕微鏡観察を実施し、最終的にどのような成熟度とサブタイプの神経細胞に分化したのかを毎回検証した。その上で、ヒト iPS 細胞由来の複数のサブタイプの神経細胞から集めた「軸索束」を移植した際の、それぞれの治療効果の検証結果との比較検証を行った。移植前の「軸索束」部分についても軸索の直径や軸索総数などを電子顕微鏡と光学顕微鏡を用いて、定量的な組織解析を実施した。また治療効果の高かった移植軸索組織が、移植後にどのような挙動を示して治療効果を発揮したのかを検証するために、膜結合型の緑色蛍光蛋白質 GFP 発現ウイルスベクターの構築を行い、軸索束部分の細胞膜部分が緑色にラベルされていることを確認した。そして、研究開発項目（3）にて最も治療効果の高いと結論づけられた条件の軸索束を GFP により蛍光標識し、抗体染色実験を行ったところ、野生型動物への移植実験では約2週間後まで追跡可能で、それ以降は移植片が完全に消失していることが判明した。

このように、研究開発項目（１）では、特許技術の培養デバイスを改良した新規特殊培養デバイスを開発し、可能な限り十分な長さの軸索束を作製し、末梢神経損傷モデル動物への移植で治療効果の高い神経サブタイプを同定することに成功した。また膜結合型の緑色蛍光蛋白質 GFP 発現ウイルスベクターを作製し、一部の移植神経オルガノイドにウイルス感染させ、軸索束を蛍光標識してから移植し、その後の動態を詳細に検証することができた。

また本課題の研究開発項目（２）においては、生体吸収性材料を用いた軸索束人工神経の作製方法と、治療効果を検証するのに最も有効な移植術式の検討を行った。今回のプロジェクトではまずラットを実験動物として用い、広範囲の坐骨神経を欠損させた末梢神経損傷モデルを安定的に作製する方法を確立した。また神経欠損手術の直後に、複数のコントロール実験群と共に、様々な条件の新規「軸索束」人工神経移植群を並行して準備し、治療効果の検証を行うための実験手順を確立した。また、免疫機能の影響を検証するために広範囲坐骨神経欠損モデルを野生型と免疫不全動物にて作製し、術後に研究開発項目（１）にて準備した様々なサブタイプのヒト iPS 細胞由来の神経オルガノイドから得られた軸索束を封入した新規人工神経を複数のコントロール群と共に並行して移植実験を実施し、治療効果の検証を実施した。移植用神経を封入した外筒の形状に関しては、軸索束人工神経を内部に封入することが可能な生体吸収性材料によって構成された構造物をバイオ 3D プリンタにより新規作製したが、内腔の空間サイズや移植後の吸収スピードが急速であることに起因すると考えられる優れた治療効果への阻害効果が観察されたことから、過去の特許技術である別の硬度の高い外筒を用いることが望ましいという結果が得られた。本項目では、放射線照射したより安全性の高い軸索束人工神経の作製も実施し、放射線照射済み「軸索束」人工神経移植により一定の治療効果が保たれることも確認することができた。

以上の通り、研究開発項目（２）では、前項目（１）において開発を行った様々なサブタイプの神経オルガノイドの治療効果検証のために必要な末梢神経損傷モデル動物の確立と、移植に適した外筒の検証、治療効果検証のための様々な条件の移植実験を実施し、次項目（３）での治療効果・安全性検証の実験に十分な数のモデル動物個体を供給することができた。

最後に本課題の研究開発項目（３）において、行動学および組織学的な評価を実施することによって、より安全で、より治療効果の高い軸索束の比較検討を実施した。より治療効果の高いヒト iPS 細胞由来の新規「軸索束」人工神経を探るスクリーニングを実施するために、まず末梢神経損傷モデル動物への人工神経移植による治療効果を客観的に評価できる行動学的な解析手法の確立を行った。まず、経時的な解析が可能な歩様解析、歩行時の足裏の形状を連続撮影してその形態から坐骨神経の運動機能を評価する Sciatic-nerve Functional Index (SFI) 解析、感覚神経由来の触覚や温痛覚の経時的な閾値変化を計測する触覚閾値検査 (von Frey Filament test) や熱刺激鎮痛効果測定装置による温痛覚検査 (Plantar Test・Hargreaves Method) などの非侵襲的な行動学的評価方法を確立し、移植済みの各群へ適用して経時的な変化を評価した。最終的なサンプリングのタイミングでは、坐骨神経の神経再生に伴って筋肉量が回復する支配筋である腓腹筋などの筋肉量の定量的評価法も確立した。移植群と対象群の神経組織解析については、手術後 8~12 週後にサンプリングを実施した移植部位の組織は、電子顕微鏡および光学顕微鏡にて並行観察できるよう分割してそれぞれの観察方法に適した処理を行った。最終的には、電子顕微鏡によって再生軸索のミエリン鞘の評価を実施し、再生軸索の太さやミエリンの状態を経時的かつ定量的に評価した。また光学顕微鏡によって、再生神経の断面積や再生血管面積の変化、腫瘍や炎症などの有無を調べる病理組織評価などをトルイジンブルー染色やヘマトキシリンエオジン (HE) 染色サンプルにて実施し、定量的に評価した。また、各種の神経系細胞や炎症細胞、血管などのマーカーによる抗体染色を実施し、治療回復メカニズムを理解するための実験を実施した。また移植した GFP 陽性の軸索束に対しても、各種神経系細胞・血管系細胞・炎症細胞のマーカーによる抗体染色を実施して、短期間残存していた軸索束組織が誘導した炎症細胞の活躍による血管の再生が、有意な治療効果の要因であったとのデータが得られている。

このように、研究開発項目（3）において、末梢神経損傷モデル動物への新規の軸索束人工神経移植による治療効果を行動的・組織学的に経時評価し、さらに次世代シーケンサーによる発現解析を最終的には実施して治療回復メカニズムの違いにも迫ることができ、その結果を抗体染色実験により裏付けることができた。移植した末梢神経の再生過程における詳細な変化を経時的かつ定量的に評価する手法を立ち上げ、すべての移植群の実験動物個体に適用することができ、当初の計画を大幅に上回る実験をすべて完遂し、想定をはるかに上回る成果を得ることができた。将来的には、本研究で得られた成果を、末梢神経損傷後の慢性疼痛や機能回復の遅延に悩む多くの患者さんに届けるためにも、ヒトへの臨床応用を目指した研究を今後も継続して実施したいと考えている。

<英文>

The peripheral nerve injury caused by surgery or traumatic injury always requires surgical treatment because automatic nerve regeneration never occurs. As a standard treatment, autologous nerve transplantation is the most optimal treatment, but it has drawbacks such as the prolonged the operation time, and loss of sensation in donor site harvested as the autologous nerve. Autologous nerve transplantation also cannot be applied in cases of severe nerve defects with large gaps. Several artificial nerves are commercially available, they cannot be applied to large defects, and degree of therapeutic effect does not surpass that of autologous nerve transplantation. Therefore, it has long been expected to develop an artificial nerve that can be transplanted regardless of the size of the nerve defect and has a high therapeutic effect.

Our group started collaborative research project for enhancing a peripheral nerve regeneration. We carried out peripheral nerve regeneration research by transplanting cells differentiated into a specific nervous system lineage derived from human iPS cells, which demonstrated a certain therapeutic effect. However, with the transplantation of human iPS cell-derived cells, it was detected that a certain percentage of proliferating cells can be observed even after transplantation. For clinical application to humans, there are inevitably concerns about safety. Therefore, our group focused on the novel technology of nerve organoids, which is produced with special culture devices which can separately culture cell bodies and axons. To create novel artificial nerves with higher safety and higher therapeutic efficacy, we utilize the technology to culture the iPS cell-derived human nerve organoids. We extracted and bundle up only with the axons of human neurons, that do not contain cell nuclei or cell bodies.

We decided to start this research project to create new artificial nerves wrapped in bioabsorbable materials. Primary we carried out the examination of various culture method of human iPS cell-derived nerve organoid adoptable for axon bundle transplantation. Secondary, we established the procedure for preparing new artificial nerve from axon bundles using bioabsorbable materials, and also established the procedure of transplantation techniques for evaluating these candidate's artificial nerve. Thirdly, we carried out the examination of the safeties and effectiveness by transplantation of various types of artificial nerves with axon bundles.

In this project, we evaluated various novel nerve organoid culture method, with the patented technology for separately culturing cell bodies and axons with the special device. Improving the culture device itself and culture procedure enabled us to produce optimal axon bundles with sufficient length and the best subtype of human iPS cell derived neuron. Human iPS cells were

induced to differentiate into specific subtype of neurons and were cultured using this special culture device with the cell body and axons separated. The axon bundles without any cell body nor nucleus were packed for transplantation utilizing and optimizing for nerve transplantation surgery. This artificial nerve was transplanted into the sciatic nerve defect model of the wild type and immunodeficient rat. Time course dependent motor and sensory functional change was evaluated, and the condition of peripheral nerve regeneration by axonal bundle transplantation was evaluated at 8-12 weeks after transplantation. The histological evaluation was performed over time in detail using an optical microscopy and an electron microscope. We obtained a great therapeutic effect for promoting nerve regeneration in this animal experiments using axonal bundles sealed in novel nerve conduits.

By combining the sophisticated surgical skills, patented special culture device technology, and imaging special skills, this project team completely developed novel artificial nerve from iPS cell-derived nerve organoid as a new medical material. We hope to continue this research project that contributes to many patients with the large nerve defects suffering from chronic pain and delayed functional recovery, in near future.