

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06235

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞を用いたハイブリッド人工神経の開発

研究課題名(英文) Hybrid artificial nerve using adipose-derived stem cells

研究代表者

菅沼 省吾 (Suganuma, Seigo)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10622889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Schwann cell-like cellsへ分化誘導した脂肪由来幹細胞(dADSCs)が末梢神経再生に及ぼす影響について評価した。ラットの鼠径部から採取した脂肪組織よりADSCsを分離培養し、ADSCsからdADSCsへ分化誘導した。坐骨神経15mmの欠損をPGA-c tubeで架橋したC群、PGA-c tube内にdADSCsを注入して架橋したD群、自家神経移植群(A群)の3群を作成し、術後2, 4, 8週で評価を行った。その結果、dADSCsは神経細胞保護および髄鞘化やシュワン管の形成に関与することにより、末梢神経再生を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is currently controversial whether using mesenchymal stem cells differentiated into Schwann cell-like cells is a superior method of promoting regeneration of peripheral nerves. Here, we report the efficacy of using differentiated adipose-derived stem cells (d-ADSCs) to regenerate peripheral nerves. In this study, we used 12-14 week-old female Wistar rats. Adipose tissue was excised from their inguinal region, and the stromal vascular fraction (SVF) was separated by centrifugation. The SVF was cultured for a number of passages into ADSCs, and these cells were then differentiated into d-ADSCs. The left sciatic nerve was resected at a length of 15 mm. This defect was bridged by either a PGA-c tube (Group C), a PGA-c tube into which d-ADSCs had been injected (Group D), or by autologous nerve graft (Group A). In conclusion, regeneration was promoted by d-ADSCs by promoting peripheral nerve regeneration through neuron protection, and by participating in myelination.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：末梢神経再生 脂肪由来幹細胞 人工神経

1. 研究開始当初の背景

欠損した神経を神経以外の管腔構造で架橋し神経の再生を促す tubulization という技術が、現在の人工神経の基礎になっている (図1)。tubulization に関する研究は 19 世紀末から行われていたが、1986 年の Lundborg の報告を契機に盛んに研究が行われるようになった (Lundborg G, et al. Scand J Plast Reconstr Surg, 1986)。それ以降、人工神経は管腔構造の素材と管腔構造内の封入物という 2 つの観点から研究が進められてきた。

チューブ内の封入物として、まずは a-FGF, b-FGF, NGF などの神経成長因子を用いた実験が行われてきた。しかし、封入した神経成長因子にはその供給期間に限りがあることから、当科の池田らは生きた細胞である培養 Schwann 細胞を用いることで持続的な神経成長因子の供給が期待できると考え、培養 Schwann 細胞をシリコンチューブに封入し、実験を行った。その結果、Schwann 細胞には神経成長因子を放出する作用に加え、再生軸索を誘導する作用があることが判明した (Ikeda K, et al. Neuro-Orthopedics, 1991)。

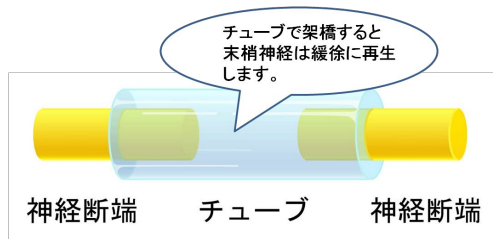


図 1

末梢神経再生の過程において重要な要素である Schwann 細胞は、現在も人工神経の封入物として最も理想的なものと考えられているが、臨床応用を考えた際には、ドナーの神経を犠牲にせざるを得ないことや Schwann 細胞の培養が技術的に困難であることが問題となる。そこで近年は、様々な幹細胞を用いて、幹細胞に Schwann 細胞としての役割を期待する研究が行われるようになった。しかし、幹細胞を用いた再生医療に関しては、様々な倫理的、技術的問題点が臨床応用への大きな障害となっている。そこで我々は、封入物として何が最適なのかを検討し、脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ADSCs) に着目するに至った。

近年、脂肪組織中に多分化能を有する細胞が存在することが指摘され、ADSCs と呼ばれるようになった (Zuk PA, et al. Mol Biol Cell, 2002)。ADSCs は脂肪組織をコラゲナーゼ処理して得られる Adipose-derived regenerative cells: ADRCs というヘテロな細胞群を培養することで抽出することが可能である。脂肪組織は小侵襲で大量に採取することが可能であり、多分化能をもつ細胞の

割合が高いこと、ADSCs が骨髄由来幹細胞と同等の潜在能力を有することから、再生医療における新たな組織幹細胞源として期待されている。そこで我々は、早期の臨床応用を目指すべく、ADSCs を含んだ非培養 ADRCs を用いた末梢神経再生の研究に取り組んできた。その結果、非培養 ADRCs は VEGFA や Neuregulin-1 などの液性因子を分泌することにより、早期 (移植後 2 週まで) の末梢神経再生を促進することを突き止めた (Suganuma S, et al. J Orthop Sci, 2012)。続いて、長期成績を検討すべく、移植後 8, 12 週モデルを作成して研究を継続したところ、非培養 ADRCs は確かに末梢神経再生を促進する作用はあるが、その速度は自家神経移植術には及ばないため、臨床応用するには ADRCs に何らかの操作を加える必要があるという結論に至った。

2. 研究の目的

ADSCs と polyglycolic acid- collagen tube (PGA-c tube) を用いたハイブリッド人工神経を作成し、末梢神経欠損の治療方法を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

実験にはラットを用いた。鼠径部から採取した脂肪組織より ADSCs を分離培養し、Kingham らの報告に準じて ADSCs から differentiated ADSCs (dADSCs) への分化誘導を行った (Kingham PJ, et al. Exp Neurol, 2007)。dADSCs に対して、Schwann 細胞 marker (S100, GFAP) に対する免疫染色および Western blotting を行い、分化の確認を行った。

坐骨神経を 15mm 切除し、16mm 長の PGA-c tube を用いて架橋した control 群 (C 群)、PGA-c tube 内に dADSCs を注入して架橋した dADSCs 群 (D 群)、切除した坐骨神経を反転して縫合した自家神経移植群 (A 群) の 3 群を作成し、術後 2, 4, 8 週で評価を行った (図 2)。軸索伸長距離は架橋部の長軸病理切片に beta 3- tubulin に対する免疫染色を行い計測した。前脛骨筋の筋湿重量は各週における健側比を算出した。L4, 5 後根神経節を採取し、2, 4 週における Activating Transcription Factor 3 (ATF3) の発現を realtime RT-PCR を用いて評価した。さらに移植細胞を Di-I で標識し、移植細胞動態の評価を行った。

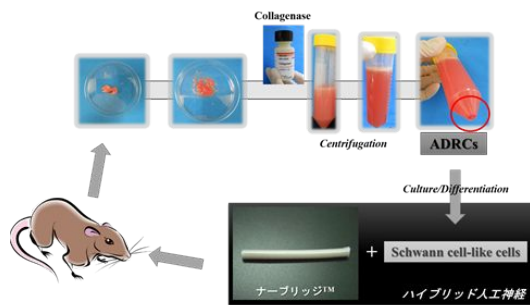


図 2

4. 研究成果

平均軸索伸長距離は 2 週、4 週、8 週いずれにおいても C 群と比較し、D 群で有意に伸長していた (図 3)。8 週では D 群で 4 例中 3 例に、C 群では 1 例のみに tube 遠位端までの軸索伸長が確認できた。筋湿重量の平均値に関しては、C 群、D 群は 8 週まで減少を続けたが、A 群のみ 4 週から 8 週にかけて増加に転じていた (図 4)。

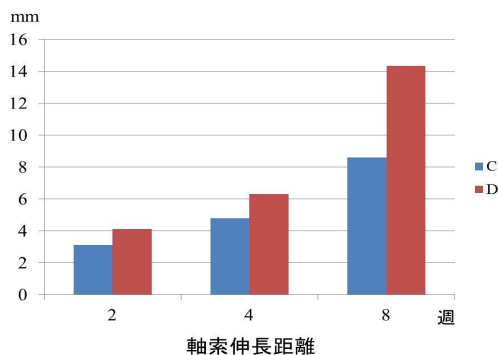


図 3

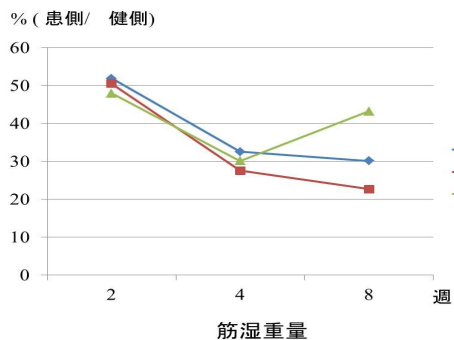
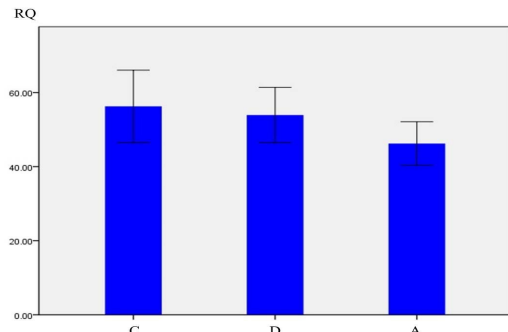


図 4

後根神経節における ATF3 の発現は C 群では 2 週から 4 週にかけて減少を認めたが、D 群、A 群では 4 週時でも発現が維持されていた (図 5, 6)。2 週および 4 週時において、Di-I 標識された移植細胞は再生軸索の先端部に特に多く分布しており、Di-I, S100 いずれも陽性となる細胞も確認できた。

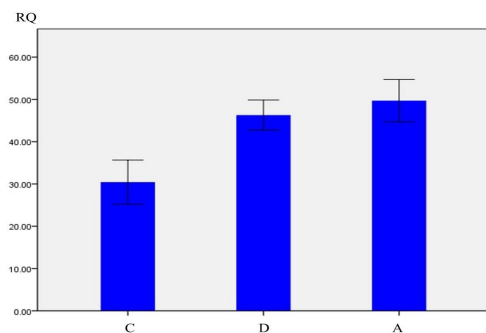
この結果、広汎な末梢神経欠損モデルにおいても dADSCs により、末梢神経再生が促進されることが証明された。また、dADSCs は神

経細胞保護 (trophic 効果) および髄鞘化やシュワン管の形成に参与すること (repair 効果) により末梢神経再生を促進する可能性が示唆された。



ATF-3 発現量(2 週)

図 5



ATF-3 発現量(4 週)

図 6

再生医療研究は、主に ES 細胞や iPS 細胞などの多能性幹細胞にスポットライトが当てられる機会が多い。しかし、これらと比較して ADSCs は臨床応用へのハードルが低く、その潜在能力を考えれば理想的な材料になる可能性があると考えている。ADSCs は自己由来の皮下脂肪組織から容易にかつ大量に分離することが可能であり、さらに骨髄由来幹細胞と比較して採取に伴う侵襲が小さく、一度に採取できる幹細胞数が圧倒的に多いことが知られている。すなわち、このことは培養期間の短縮にもつながり、ひいては臨床応用した際に懸念される感染等の合併症の危険性を軽減することができると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 2016 年 11 月 17-18 日 日本マイクロサージャリ学会学術集会 (広島)

「脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ADSCs) を用いた末梢神経再生への試

み」
金沢大学 整形外科
山本 大樹、多田 薫、菅沼 省吾、中嶋 宰大、土屋 弘行

(2) 2016年8月26-27日 日本末梢神経学会
学術集会(大阪)

「脂肪由来幹細胞を用いた末梢神経再生の
試み」

金沢大学 整形外科
山本 大樹、多田 薫、菅沼 省吾、岡本 駿
郎、中嶋 宰大、池田 和夫、土屋 弘行

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅沼 省吾 (Seigo Suganuma)
金沢大学・医学系・協力研究員
研究者番号：10622889

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

林 克洋 (Katsuhiro Hayashi)
金沢大学・附属病院・助教

多田 薫 (Kaoru Tada)
金沢大学・医学系・助教

山本 大樹 (Daiki Yamamoto)
金沢大学・附属病院・医員