

平成30年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10949

研究課題名(和文) 無細胞化神経へのシュワン細胞付加法としての端側神経縫合の実用性

研究課題名(英文) Practicability of end-to-side neurorrhaphy as Schwann cell provider to acellular nerve graft

研究代表者

林 礼人 (HAYASHI, Ayato)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10365645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：人工神経に代表される無細胞な移植神経の有用性をさらに高めるため、軸索再生手技として使用されている端側神経縫合(ETS)をシュワン細胞の供給法として応用出来ないかと考え、検討を行っている。今回、その作用について、近年注目を集めている脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived stem cells; ASCs)の投与群との比較検討を行った。ETS群とASCs投与群の双方で、機能回復の向上を認めたが、2つの手法の差異ははっきりせず、それらを組み合わせることによる相乗効果もはっきりしなかった。今後、無細胞化神経に対するETS法の有効な活用法について検討を加えていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：To improve usefulness of artificial nerve graft, we have proceeded the research to use end-to-side neurorrhaphy as Schwann cell provider to acellular nerve graft. In this research, we compared the effect of end-to-side neurorrhaphy to the acellular nerve graft to injecting Adipose-derived stem cells(ASCs). Both procedures improved functional recovery after the graft. However, the difference between two procedures were not obvious and there was no synergic effect even combining them simultaneously. We try to conduct further research to find even more effective use of end-to-side neurorrhaphy as Schwann cell provider to acellular nerve graft in the future.

研究分野：再建外科

キーワード：神経再生 端側神経縫合 人工神経 無細胞化神経 神経移植 シュワン細胞 脂肪組織由来幹細胞

科研費研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

急性期～亜急性期の顔面神経麻痺に対する再建法に舌下神経や咬筋神経といった顔面神経以外の運動神経を用いて顔面神経を再建する神経移行術が存在する。従来は顔面神経全体を一つの運動神経で再建してきたが、一つの運動神経で全ての顔面表情筋を再建することに伴う病的共同運動様の症状や再生に長い時間を要するといったことが問題点となってきた。その為、顔面神経のより末梢での複数の運動神経での選択的な神経移行といった再建手法の開発が今後の課題と考えられた。その手法を可能にするには、豊富な移植神経の確保が必要となるが、本邦でも臨床応用の始まった人工神経や欧米で実用化されている無細胞化した同種神経などの移植材料をいかに効果的に使用出来るかが大きなカギとなる。

無細胞な移植神経の有用性は、現時点では短い神経欠損に限られ、顔面神経再建に必要な長い欠損の架橋には、軸索栄養因子の供給やそれらの因子を生み出すシュワン細胞の導入が必要不可欠と考えられる。培養シュワン細胞や幹細胞移植といった細胞治療の試みが世界的に研究されてはいるものの(Dai et al. 2013)、移植細胞の viability や倫理面などの問題で臨床応用にはまだまだ多くの課題が残り、その実現には長い時間を要するものと考えられる。

我々は、シュワン細胞の同種神経移植内への遊走について、人工神経の様に移植神経内にシュワン細胞が存在しなければ、非常に速やかな遊走を移植母体から生じることをトランスジェニックマウスによる検討で明らかにした(Hayashi et al. 2008)。また、端側神経縫合における軸索再生のメカニズムについては、独自モデルの考案や軸索が蛍光発色するトランスジェニックマウスなどを用い、Collateral sprouting の存在(Hayashi et al. 2004) や軸索発芽に関わる軸索損傷刺激の必要性など、様々な報告を行ってきた(Hayashi et al. 2008)。

これらの研究成果や知見を活かし、端側神経縫合を無細胞な移植神経(又は人工神経)に対するシュワン細胞の供給法として応用出来ないかと考え検討を行っている。

2. 研究の目的

無細胞な移植神経に対するシュワン細胞供給法としての端側神経縫合の有用性については、今までの研究結果である程度確認することが出来た。どのような端側神経縫合がシュワン細胞の供給に有用かについては、軸索の場合と同様に、Donor 神経にある程度の損傷を加えた群で多くのシュワン細胞の遊走を認め、移植神経の両端を端側縫合すると、

さらに多くのシュワン細胞で移植神経内を満たすことが出来た。また、シュワン細胞を遊走させた神経を神経欠損部に移植してその有用性を検討すると、移植神経の両側端を端側縫合して prefabricate させた神経において、最も旺盛な神経再生が得られ、preliminary な結果ではあるが、本手法の有用性を確認することが出来た。

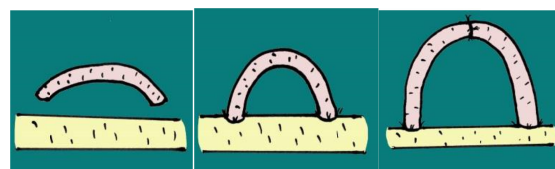
本手法は、すぐにも臨床応用が可能な手技と考えるが、prefabricate に必要な期間や遊走可能な移植神経の長さ、遊走にかかわる因子の解明や遊走距離延長の可能性など、その手法を具体化するための検討をさらに加えていく必要があると考えた。自家移植や幹細胞の中で注目される脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived stem cells; ASCs)を移植した手法など(Faroni et al. 2014)、他の手法との比較も加えて行っていくことで、その実用性や効果についてもさらに詳細に検討を行うことが出来ればと考えた。

3. 研究の方法

(1) 長い無細胞化移植神経における端側神経縫合法によるシュワン細胞供給の有用性

まず、端側神経縫合による prefabricate に必要な期間や遊走可能な移植神経の長さなどを解明するために、シュワン細胞が幼弱化すると発色する Nestin-GFP mouse と蛍光発色しない Balb/C mouse を用いた実験を行うこととした。Balb C mouse から 1cm の坐骨神経を採取し、Wisconsin solution の中に 7 週間冷蔵保存する。Cold preservation と呼ばれる手技であるが、本手技により採取した神経内のシュワン細胞はなくなり、全く抗原性を有しない移植神経となる(Fox IK et al. 2005)。Nestin-GFP mouse の坐骨神経に無細胞化した Balb/C からの移植神経をその両側端に端側神経縫合を行い移植する。端側縫合は Donor 神経の上膜開窓を行い 1/5 程部分切断を行う。移植神経の移植方法の違いによって 3 つの群を作成する。

1 本の移植神経を坐骨神経周囲に移植し縫合しない群をコントロール(第 1 群)とし、1 本の移植神経の両端を縫合する群(第 2 群)、移植神経 2 本を端々縫合で連結して 2cm の移植神経とした上で、その両端を縫合する群(第 3 群)の 3 つの群を作成した。



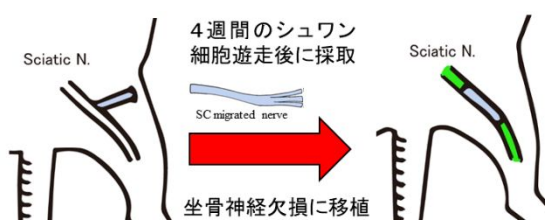
第 1 群                  第 2 群                  第 3 群

シュワン細胞の遊走距離については、Live

imaging の手法を用いて蛍光実態顕微鏡下に経時的観察を行なうこととした。移植4週間には、シュワン細胞を遊走させた移植神経を、免疫染色や whole mount imaging の手法で形態学的に評価し、シュワン細胞遊走関連因子 (S100、NRG1、ErbB2) についても RT-PCR 法を用いて定量的に評価して、各々の群に対する適正な prefabricate の期間やシュワン細胞の遊走程度について検討を行うこととした。

## (2) 無細胞化移植神経に対する ASCs 移植の効果と端側神経縫合法との比較

次に、本手法の実用性をさらに検証するため、他の臨床応用可能な手技として注目されている脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells; ASCs) との比較実験も行うこととした。

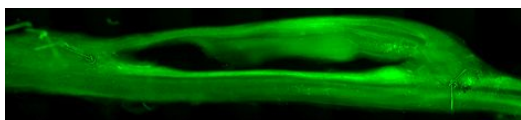


実験動物としてはラットを用い、上記に記した Cold preservation の手法で 15mm の無細胞化移植神経を作成した。無細胞移植神経に対する付加的処理の手法で 4 つの異なる群を作成した。移植神経に付加的手技を加えないものをコントロール群とし、無細胞化神経の両側に端側神経縫合を用いて、4 週間シュワン細胞を遊走させたものを第 2 群 (端側神経縫合群)、無細胞化神経に  $5 \times 10^5$  個の ASCs を局注したものを第 3 群 (ASCs 局注群)、端側神経縫合による遊走を行った上で ASCs の局注を行ったものを第 4 群 (端側神経縫合 + ASCs 群) とした。各々の手法で作成した移植神経を 10mm のラットの坐骨神経欠損に移植し、移植後の神経再生について比較検討を行うこととした。軸索再生の評価については、ラットの歩行に伴う足の拡がり度で機能的再生の評価を行う walking track analysis に加え、移植後 4 週で移植神経を採取し、移植神経内の軸索や神経関連蛋白の測定 PCR を用いて行うこととした。

## 4. 研究成果

### (1) 長い無細胞化移植神経における端側神経縫合法によるシュワン細胞供給の有用性

まず無細胞化移植神経内へのシュワン細胞遊走については、コントロール群では全く遊走を認めなかったのに対し、移植神経両側を端側神経縫合した群では、豊富なシュワン細胞の遊走を移植神経の両端から認め、移植後 3 週で移植神経全体を満たしていた。



### 第 2 群 (両側端側神経縫合群) での live imaging 像

一方、移植神経 2 本を端々縫合で連結して 2cm の移植神経とした上で端側神経縫合を行う第 3 群については、移植神経の長さから片側の坐骨神経での移植神経両端の端側神経縫合が難しく、左右両側の坐骨神経を跨ぐ形での移植が必要となった。しかし、その侵襲の為にモデル作成後の観察期間内に殆どの個体が死亡してしまい、評価を行うことが困難であった。

作成方法の変更を行うなどして実験の継続を試みるも、どうしても安定したモデル作成が出来ず、この実験系については継続が困難であった。

そのため、1 本の無細胞化移植神経による端側神経縫合を用いたシュワン細胞遊走群と ASCs 投与群との比較実験を行っていくこととした。

### (2) 無細胞化移植神経に対する ASCs 移植の効果と端側神経縫合法との比較

#### 機能回復の評価

神経移植後 2 週毎に walking track analysis による SFI を計測し比較した。



その結果、端側神経縫合でシュワン細胞遊走を行った第 2、4 群において、早期からの回復傾向を認め、ASCs 注入群でもその後良好な機能回復を認めた。

端側神経縫合によるシュワン細胞遊走や ASCs の投与を行った第 2 ~ 4 群において、コントロール群よりも良好な機能回復を生じ、その差は経時的な経過と伴にさらに顕著となった。ただし、端側神経縫合群と ASCs 投与群の間で差は認めず、それらを組み合わせることによる相乗効果も明かではなかった。

無細胞化細胞に対するシュワン細胞遊走や ASCs 投与は機能回復に促進に効果的と考えられたが、その手法による差異を認めなかった。

#### 移植神経内の神経関連蛋白

PCR を用いた移植神経内の神経再生関連蛋白の計測によって、端側神経縫合群と ASCs 群の効果の差異を検討することとした。

シュワン細胞遊走には NRG-ErbB シグナリングが必要不可欠であるが (D.A. Lyons et al.



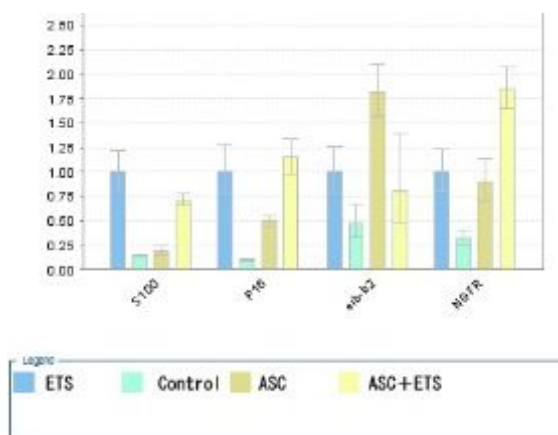
2005) 長い無細胞化神経内に遊走したシュワン細胞は老化し、軸索再生に抑制的に作用する可能性が近年注目されている (Saheb-Al-Zamani M et al. 2013)。

そこで、坐骨神経欠損移植後 4 週における各群でのシュワン細胞 (S100) および神経再生関連蛋白 (ErbB2, NGFR)、さらに細胞老化マーカー (p16) の発現量を測定した。

S100 の発現量については、端側神経縫合を行った第 2、4 群で顕著に増加しており、prefabricate の手技が効果的に作用していることを改めて確認出来た。その一方、ASCs 投与群における S100 発現量はコントロール群と変わらず、ASCs そのもののシュワン細胞への分化や ASCs 投与による host からのシュワン細胞遊走の促進効果は認めなかった。

ErB2 や NGFR といった神経再生関連蛋白については、端側神経縫合群とともに ASCs 群でも著明な発現量の増加を認めた。特に ErB2 は、ASCs 投与群で高値を示し、ASCs によるパラクライン作用が再生軸索の誘導に何らかの形で関与しているのではないかと考えられた。また、NGFR は端側神経縫合に ASCs を加えた第 4 群で著明に増加しており、栄養因子の上では相乗効果のある程度認める可能性も示唆された。

細胞老化のマーカーとなる p16 については、端側縫合群で高値を示していたが、ASCs 投与群でもある程度の増加を認めた。



以上より、無細胞化神経に対する端側神経縫合によるシュワン細胞誘導は、神経移植における軸索再生をより効果的に生じさせ、機能回復を早期から促すことが示唆された。また、ASCs の投与も、諸家からの報告の通り (Faroni et al. 2014) 無細胞化神経移植に対する効果的な作用が示唆されたが、ASCs のパラクライン効果に伴うものではないかと推察された。

端側神経縫合によるシュワン細胞遊走群との差異や相乗効果については、あまりはつきりしなかった。

今回の研究に際し、当初予定していた長い無細胞化神経における端側神経縫合のシュワン細胞遊走に関する検討を、実験モデル作成に伴う問題などから行うことが出来ず、

ASCs との比較実験においても形態的評価も含め十分な検討には至らなかった。研究体制に問題を生じたことが大きな要因となったが、今後しっかりと反省を行った上で、さらに検討を加えていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 15 件)

Natori Y, Yoshizawa H, Mizuno H, Hayashi A : Preoperative transcutaneous electrical nerve stimulation for localizing superficial nerve paths J Plast Reconstr Aesthet Surg. 68:1713-1718, 2015 (査読有)

Hayashi A, Komoto M, Tanaka R, Natori Y, Matsumura T, Horiguchi M, Matsuda N, Yoshizawa H, Mizuno H : The availability of perifascial areolar tissue graft for deep cutaneous ulcer coverage J Plast Reconstr Aesthet Surg. 68:1743-1749, 2015(査読有)

Hayashi A, Yoshizawa H, Tanaka R, Natori Y, Arakawa A, Mizuno H : Intraoperative use of indocyanine green fluorescence angiography during distally-based radial artery perforator flap for squamous cell carcinoma of the thumb Plast Reconstr Surg Glob Open. 3: e310-13, 2015(査読有)

Hayashi A, Komoto M, Matsumura T, Horiguchi M, Tanaka R, Arakawa A, Mizuno H : Conjunctival squamous cell carcinoma due to long-term placement of ocular prosthesis Plast Reconstr Surg Glob Open. 3: e325-28, 2015 (査読有)

Hayashi A, Yokoyama J, Sato R, Yoshizawa H, Tanaka R, Natori Y, Ohba S, Fukumura Y, Arakawa A, Mizuno H : Massive myoepithelial carcinoma originating from the submandibular gland that was successfully treated with surgical excision using a part of the lengthened skin as a local flap Plast Reconstr Surg Glob Open. 3: e329-34, 2015 (査読有)

Hayashi A, Komoto M, Tanaka R, Natori Y, Matsumura T, Horiguchi M, Matsuda N, Yoshizawa H, Mizuno H : The availability of perifascial areolar tissue graft for deep cutaneous ulcer coverage J Plast Reconstr Aesthet Surg. 68:1743-1749, 2015(査読有)

Hayashi A, Yoshizawa H, Natori Y, Suda S, Mochizuki M, Nishimura Y, Tanaka R, Mizuno H : Assessment of T-shape double fascia graft for lower lip deformity from facial paralysis: A questionnaire survey J Plast Reconstr Aesthet Surg. 69:427-35, 2016 (査読有)

Hayashi A, Mochizuki M, Suda S, Natori Y, Ando E, Yoshizawa H, Senda D, Tanaka R, Mizuno H : Effectiveness of platysma muscle flap in preventing Frey syndrome and depressive deformities after parotidectomy J Plast Reconstr Aesthet

Surg. 69:663-72, 2016 ( 査読有 )  
Hayashi A, Natori Y, Komoto M, Matsumura T, Horiguchi M, Yoshizawa H, Iwanuma Y, Tsurumaru M, Kajiyama Y, Mizuno H : Microvascular reconstruction of free jejunal graft in larynx-preserving esophagectomy for cervical esophageal carcinoma Plast Reconstr Surg glob open 4: e632-10, 2016 ( 査読有 )

Hayashi A, Yoshizawa H, Natori Y, Senda D, Tanaka R, Mizuno H : Levator lengthening technique using cartilage or fascia graft for paralytic lagophthalmos in facial paralysis J Plast Reconstr Aesthet Surg. 69:679-86, 2016 ( 査読有 )

Natori Y, Yoshizawa H, Senda D, Mizuno H, Hayashi A : The fluorescent intensity from the transgenic Thy1-YFP 16 mouse correlates with the amount of regenerated axons Plast Reconstr Surg glob open 4:e758, 2016 ( 査読有 )

Yoshizawa H, Natori Y, Senda D, Tanaka R, Mizuno H, Hayashi A : End-to-side neurotaphy as Schwann cell provider to acellular nerve grafts and its suitable application. Plos One 11: e0167507, 2016 ( 査読有 )

Hayashi A, Mochizuki M, Kamimori T, Horiguchi H, Tanaka R, Mizuno H Application of Kuhnt-Szymanowski procedure to lower eyelid margin defect after tumor resection Plastic and Reconstructive Surgery global open 22;5(2):e1230, 2017 ( 査読有 )

林 礼人, 吉澤秀和, 千田大貴, 水野博司 口腔内切開による Lengthening Temporalis Myoplasty での顔面神経麻痺動的再建術の経験 Facial N Res 35:p.105-108, 2015 ( 査読有 )

林 礼人 神経縫合の基礎とその実践法 PAPERS 123:p.134-146, 2017 ( 査読有 )

[ 学会発表 ] ( 計 12 件 )  
( 国際学会 )

Hayashi A  
Basic research and clinical application of peripheral nerve regeneration in plastic and reconstructive surgery End to side neurotaphy 16<sup>th</sup> Mae Fah Luang International Research Conference in Anti-Aging and Regenerative Medicine “New Episodes of Immortality” (Bangkok, Thailand, 2017)

Hayashi A, Yoshizawa H, Senda D and Mizuno H  
End-to-side neurotaphy as Schwann cells provider to acellular nerve graft and its effect 2016 AAHS-ASPN-ASRM Annual meeting, (Scottsdale, Arizona USA, 2016)

Yoshizawa H, Hayashi A, Senda D and Mizuno H

Suitable application of end-to-side neurotaphy as Schwann cells provider to acellular nerve graft 2016 AAHS-ASPN-ASRM Annual meeting, (Scottsdale, Arizona USA, 2016)

Hayashi A, Yoshizawa H, Senda D, Orgun D, and Mizuno H

Combination of hypoglossal nerve transfer using an interpositional nerve graft with end-to-side neurotaphy and masseter nerve transfer for the acute to subacute facial reanimation.

9th Congress of World Society for Reconstructive Microsurgery (Seoul, Korea , 2017)

Hayashi A, Yoshizawa H, Senda D, Orgun D, and Mizuno H

Combination of hypoglossal nerve transfer using an interpositional nerve graft with end-to-side neurotaphy and masseter nerve transfer for the acute to subacute facial reanimation.

13<sup>th</sup> International facial nerve symposium (Beverly hills, LA, 2017)

( 国内学会 )

林 礼人, 吉澤秀和, 千田大貴

顔面神経麻痺に対する静的再建の考え方と術式の実際について

第 35 回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会 ( 2017 年 福岡 ) 2017 年 11 月 16 日 ~ 17 日

林 礼人, 吉澤秀和, 千田大貴

無細胞化神経に対するシュワン細胞付加法としての端側神経縫合の可能性

第 28 回日本末梢神経学会学術集会 ( 2017 年 名古屋 ) 2017 年 8 月 25 日 ~ 26 日

林 礼人, 吉澤秀和, 千田大貴, 水野博司

顔面神経麻痺に対する神経移行術並びに筋肉移行術 ~ その歩みと今後の展望 ~

第 60 回日本形成外科学会総会・学術集会 ( 2017 年 大阪 ) 2017 年 4 月 12 日 ~ 14 日

林 礼人, 吉澤秀和, 千田大貴, 水野博司

Lengthening temporalis myoplasty における、よりきれいで正確な鼻唇溝作成、笑いの再建の手法詳細とコツについて

第 22 回日本形成外科手術手技学会 ( 2017 年 東京 ) 2017 年 2 月 18 日

林 礼人, 吉澤秀和, 千田大貴, 水野博司

顔面神経麻痺再建における様々な神経縫合法の活用とその臨床成績

第 42 回日本マイクロサージャリー学会学術集会 ( 2015 年 埼玉 ) 2015 年 11 月 26 日 ~ 27 日

林 礼人, 吉澤秀和, 千田大貴, 水野博司

急性期 ~ 亜急性期顔面神経麻痺における複数 motor source による神経移行術

第 27 回 日本頭蓋底外科学会 ( 2015 年 名古屋 ) 2015 年 9 月 9 日 ~ 10 日

林 礼人, 吉澤秀和, 水野博司

顔面神経完全麻痺に対する動的再建術 -  
我々の治療戦略 -  
第 58 回日本形成外科学会総会・学術集会  
(2015 年 京都) 2015 年 4 月 8 日 ~ 10 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

林 礼人 ( HAYASHI, Ayato )

順天堂大学 医学部 教授

研究者番号 : 10365645

(2)研究分担者

水野 博司 ( MIZUNO, Hiroshi )

順天堂大学 医学部 教授

研究者番号 : 80343606