

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20328

研究課題名(和文)骨格筋間質由来幹細胞群シート・ペレットを用いた複雑な顔面神経ネットワークの再構築

研究課題名(英文) Reconstruction of multiple facial nerve branches using skeletal muscle-derived multipotent stem cell sheet-pellet transplantation,

研究代表者

齋藤 弘亮 (SAITO, Kosuke)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：80624551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：顔面神経欠損に対する再建術や神経移植術は、満足のいく結果が得られていない。本研究では、骨格筋間質由来多能性幹細胞群のシート・ペレットを移植し、顔面神経ネットワークの再構築を試みた。動物実験による免疫組織学的評価、機能評価を行った。結果、移植群は対照群に比して有意な回復を示した。組織学的評価においては、移植細胞が、シュワン細胞、神経周膜細胞に分化し、複数の神経分岐を同時に再構築していた。加えて、血管内皮細胞、血管平滑筋、繊維芽細胞にも分化し、大小の血管再構築にも貢献していた。これらの結果は、シート・ペレットとして移植した骨格筋由来幹細胞が顔面神経の再生、機能回復に貢献したことを示していた。

研究成果の概要(英文)：We have reported the therapeutic effects of skeletal muscle-derived multipotent stem cells (Sk-Cs) which exerted reconstitution capacity for muscle-nerve-blood vessel unit. The aim of this study is the application of Sk-Cs transplantation system to the reconstitution of facial complex nerve-vascular networks after severe damaged. The mice experiments were performed as the histological analysis and the rats were used for functional examinations. The transplanted group showed significantly higher functional score as compared to the Control group. In support, engrafted transplanted cells formed nerve-vascular networks with the differentiation into Schwann and perineurial cells, vascular endothelial and smooth muscle cells. Thus, the Sk-Cs sheet pellet transplantation is potentially useful for the reconstitution of the complex facial nerve-vascular networks.

研究分野：再生医療科学

キーワード：顔面神経再生 顔面神経麻痺 再生医療 末梢神経再生 頭頸部癌 幹細胞 幹細胞移植

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は診断時点で進行しているものが多く、進行癌に対する治療（切除・放射線照射）にともない、顔面神経を障害（欠損）するケースがしばしばある。この顔面神経欠損による顔面神経麻痺は術後 QOL（生活の質）を著しく損なう結果となる。

通常、顔面神経麻痺の再生学的アプローチとしては、自家神経移植術や遊離皮弁による再建術（Iseli TA, et al. Laryngoscope, 2010; Iida T, et al. J Reconstr Microsurg, 2006）が行われているが、手術侵襲が大きいにもかかわらず、満足できる結果は得られていない。また、自家ドナー神経を得るために、他の部位の神経麻痺をとまなう欠点もある。

近年、これらをカバーする方法として、人工神経管を利用した方法が検討されている（Ichihara S, et al. Tissue Eng Part C Methods, 2009）。しかし、単一の管であるため顔面神経の複雑なネットワークまでは再生することは出来ないようである。

研究代表者の所属する本学再生医療科学の玉木研究ユニットでは、2002～2003年にマウス骨格筋間質より筋・血管内皮・脂肪細胞への分化能力を有する幹細胞群の同定・分離抽出・精製に成功し、（Tamaki T et al, J Cell Biol, 2002; Exp Cell Res, 2003）筋・血管・末梢神経組織を活発に再生することを明らかにした（Tamaki et al, Circulation 2005; Histochem Cell Biol 2007）。

また、この骨格筋間質由来多能性幹細胞は、骨格筋以外の組織、即ち、腎臓の被膜下（Tamaki et al, Histochem Cell Biol 2007）や尿道周囲（Hoshi et al, Transplantation 2008）、さらに膀胱周囲（Nitta et al, 2010）においても筋・血管・末梢神経再生能を発揮することが確認されており、機能回復にも貢献している。

私達はこの幹細胞群の「細胞間接着性を維持したシート・ペレット化」に成功し、移植の際に幹細胞の拡散を防ぐと同時に、筋肉内末梢神経再生能が増強することを明らかにした（Tamaki T et al, Regen. Med. 2013）。

本研究では、この「骨格筋間質由来多能性幹細胞群シート・ペレット」を用いて、損傷筋内末梢先端部分の細い神経ネットワークのみならず、筋外から出入力する太い根幹神経系のネットワークを同時に再生し、顔面の運動・感覚神経系を総合的に再生する。

幹細胞の持つ「損傷組織環境依存性の分化能 milieu-dependent differentiation」（Tamaki et al, Curr Pharm Des 2010）を最大限に利用する、即ち、断裂した各々の末梢神経断端部からの成長・栄養因子に、移植した幹細胞が反応し、より細かく複雑な神経ネットワークを再構築できる可能性を追求する。

2. 研究の目的

自家幹細胞移植術は、ドナーを必要とせず、

免疫的拒絶反応や倫理的問題をクリアできる手法として臨床応用への可能性が広がっている。

本研究では、この骨格筋間質由来多能性幹細胞群シートペレットを頭頸部治療へ応用し、術後機能障害の回復・予防に貢献することを期待するものである。

その第一歩として、マウス・ラット顔面神経損傷後麻痺症状の改善効果を検討する。骨格筋間質由来多能性幹細胞群のシート・ペレットを移植し、顔面神経ネットワークの再構築を試みることを目的とした。

また、早期に臨床応用する一助として、本幹細胞のもつパラクライン効果に注目し、「細胞移植を伴わない神経再生治療法」を検討すること。その第一歩として、「骨格筋多能性幹細胞由来サイトカインミックス」の投与を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

【骨格筋間質由来幹細胞の分離・増幅培養シート・ペレットの作成】

- (1) GFP-Tg マウス骨格筋を 0.1% コラゲナーゼで 1 時間処理し、個々の筋線維を分離する。
- (2) 分離した筋線維を培養フラスコで 3 日間培養、筋間質の細胞群を総合的に増幅培養する。
- (3) 培養をトリプシン EDTA で処理し、筋線維と増幅細胞群を分離、ストレーナーで筋線維を排除。得られた細胞群を、再び 4 日間増幅培養して細胞シートを形成させ、EDTA で処理し、シートを回収、遠心して幹細胞シートペレットを作成する。

【幹細胞の通常の培養・増幅】

- (1) コラゲナーゼにより骨格筋より幹細胞群を分離（ただし、筋肉は決してミンスしない）
- (2) セルストレイナーで大型のデブリスを濾し取り、コラゲナーゼを PBS で洗浄
- (3) その後、トリプシン EDTA で 37 度 C 10 分処理し、再びセルストレイナーを通す。
- (4) 得られた細胞群を、培養フラスコで 3 日間培養（IMDM / 20% FCS / ペニシリン・ストレプトマイシン・ゲンタマイシン / メルカプトエタノール）する。

【RT-PCR による細胞分化能の検索】

培養により得られた細胞群に対して、血管・末梢神経・筋肉系の分化・誘導、栄養因子等の RT-PCR を網羅的に行う。マーカーとして血管系 (VEGF, PDGF, EGF, HGF, TGFb), 末梢神経系 (GFAP, NG2, N-cadherin, NCAM, Pmp22, Nestin, p75, Sox10, NGF, BDNF, GDNF, Galectin, Ninjurin, CNTF, LIF, IGF-1, FGF2, Integrin-b1, Scn-1b, Cacnb1, Dystroglycan, Laminina2,b2, MyoD, Myf5, Pax3, Pax7, c-met, Mcad, Myogenin,

Desmin, myosin heavy chain 等のプライマーを作成し、検討、3つの細胞系譜に対して最も妥当な移植細胞を得るための培養条件を検討する。さらに、移植後に着床した細胞(GFP+)をコラゲナーゼで再抽出し、セルソーターでGFP+細胞として分離後、PCRを行い、細胞分化を検討する。

【実験動物】

GFP-Tg マウス(C57/B6)、GFP-Tg ラット(SD)をドナー、同系正常マウス・ラットをレシピエントとする。

【顔面神経損傷モデルの作成】

同系正常マウス・ラットの右側顔面神経を露出し、広範囲に損傷を作成する。損傷後、縫合し、顔面運動を観察する。基本的に、自然回復は不可能な設定を用いる。

【機能観察と機能測定】

- (1) 顔面神経麻痺スコア測定による機能観察機能観察は Most 法を発展させた応用法で行い、隔週で顔面神経麻痺スコアを採点し、継時的に8週間評価した。評価項目は、Most 法の2項目である眼瞼の動きとひげの動きに、上唇の動きを加えた3項目で行った。スコアは健側(右側)と比較して、完全麻痺:0点、わずかに動く:1点、明らかに動く:2点、よく動くが左右差あり3点、よく動いて左右差なし:4点の合計12点満点で採点した。スコア評価時の刺激は患側、移植側それぞれティッシュペーパーを丸めて細い棒状にしたもの(cotton swab)で愛護面を考慮して刺激し、評価した。
- (2) ラット洞毛筋張力想定による電気生理学的評価客観的機能評価としてラット洞毛筋張力測定実験を行った。ラットに腹腔内麻酔(sodium pentobarbital (40 mg/kg, with xylazine HCl 10 mg/kg, i.p.))を行い、体温を36度±1を維持した。手術台にラットの頭部および下肢を固定し、顔面左側に皮膚切開を加え、顔面神経頬骨枝を同定した。周囲組織はミネラルオイルで保湿し、微弱な電気ノイズの混入を防止した。双極銀電極(独自に作成:Ag/Ag、電極間距離2mm)を神経頬骨枝損傷部より上流にセットし、刺激電極とした。次にステンレススチールフックと洞毛筋4-5本を絹糸で結紮し、そのフックと張力トランスデューサ(FD-Pickup, TB-611T; Nihon Kohden, Tokyo, Japan)を接続、増幅装置(AP-621G; Nihon Kohden)へ接続した。電気刺激装置(Digital Stimulator ME-6012, MEC, Tokyo, Japan)より頬骨枝へ電気刺激(4.0mA, 1.0-ms duration, 0.5Hz, single pulses)を2秒間隔で行い、再大単収縮高が得られた刺激を至適刺激とした(1.5-4.0V)。その後、10, 20, 40, 60, 80, 100, 120Hz(0.5-s duration)の連続刺激を加えて、最大強縮張力を決定し、回復筋張力測定とした。測定は顔

面神経損傷前と直後(切断後10分)術後約8週間後の3回行った。

【組織学的評価】

蛍光実体顕微鏡及び蛍光透過型顕微鏡を用いて、移植8週間後にドナー細胞の着床状況、分化状況、組織再構築への貢献度をGFP陽性組織・細胞群として評価した。

上記マクロ観察終了後、レシピエントマウス・ラットの左心室内にカテーテルを留置した後、0.01Mリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline, PBS)を注入し、右心房に切開を加えて十分脱血還流を行った。その後、同カテーテルから4%パラフォルムアルデヒド/リン酸緩衝液(parafomaldehyde/phosphate buffer, PFA/PB)を注入し、還流固定を行った。十分に還流固定がなされたことを確認した後、皮膚、骨などを剥離し、顔面神経損傷部周囲筋組織含めて一塊に摘出した。摘出組織は4%PFA/PBにて4で一晩固定した後、同様に4の環境下で5%-25%シュウクロース/PBS溶液に順次交換後、イソペンタンにて急速凍結を行った。その後、クライオスタットにて7µmの連続横断凍結組織切片を作成した。そして蛍光顕微鏡を用いて凍結組織切片の免疫組織化学的検索を行い、細胞分化を検討した。使用抗体は、N200(neuro-filament 200, 1:1000; room temperature for 1 h; Sigma, St. Louis, MO)、MBP(myelin basic protein, rabbit polyclonal, dilution=1:200; incubation=room temperature for 2 h; MILLIPORE, Billerica, MA)、GLT-1(1:100, room temperature for 1 h; Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA)、p-75NTR(p75 neurotrophin receptor, rabbit polyclonal, 1:400, 4°C overnight; CST, Boston, MA)、CD31(1:500, 4°C overnight; BD Pharmingen, San Diego, CA)、-SMA(-Smooth muscle actin, Cy3-conjugated; 1:1500; room temperature for 1 h; Sigma)、-Bungarotoxin (Alexa Fluor 594 conjugated, 1:100, room temperature for 1 h; Molecular Probes, Eugene, OR)を用いた。

【サイトカインミックス投与に関する実験】

骨格筋由来多能性幹細胞シート・ペレットを従来の条件で約1週間培養・増幅し、通常移植時同様の条件を整えた。その時点で、培養上清を破棄し、無血清/無サイトカイン培地にて、洗浄、その後同条件で一晩培養した。次に、その培養上清を採取、10,000rpmで遠心して不純物を除去したものを、「骨格筋多能性幹細胞由来サイトカインミックス」とし、分注・凍結保存した。前回同様のマウス顔面神経麻痺モデルを作成し、損傷直後から1週間に一度の間隔で、サイトカインミックスを経皮的に患部に注入(300µl/一回、実験群)を、計4週間で4回行った。術後4週で、前回同様の顔面神経電

気刺激による、洞毛筋張力測定を行い、移植効果を評価した。培地のみを注入する群を対照群とした。

【統計解析】

2群間の差はStudents-t検定によって分析、有意水準は $p < 0.05$ とし、数値は平均値 \pm SEとして示した。

4. 研究成果

【顔面神経麻痺スコアの評価】

移植群の平均スコアは8週間後6.4であり、それに対し非移植群では2.6であった。移植群は非移植群の約3倍のスコア上昇を示し、優位に麻痺スコアの改善が認められた ($P < 0.05$)。これは正常マウス(麻痺なし)と比べると、約50%程度の回復であった。また全てのマウスにおいて顕著な体重の減少は認められなかった。

【洞毛筋張力測定による機能的評価】

洞毛を介した測定ではあるが、一般的な張力曲線と全く変わらない変化(不完全強縮から完全強縮)が認められることから、本測定方法の妥当性が示された。さらに、術後8週においても、ほぼ正常は不完全強縮から完全強縮への移行が認められ、神経-筋ユニットの回復がうかがえる。2群ともに神経切断前において得られていた最大張力は神経切断後には著しく減少し、ほぼ0に近い値となった。これは神経切断によって洞毛筋を収縮される神経ネットワークが遮断されていたことを示している。しかし、移植群では8週後に、張力はまだ低いものの、きれいな完全強縮曲線が得られているが、コントロール群ではほとんど張力は得られなかった。顔面神経切断直後の平均減少率においては2群において有意な差は認めず ($P < 0.363$)、神経損傷の程度は2群とも同程度と考えられた。しかし、8週後において、コントロール群25.4%であったのに対し、移植群では62.8%と優位に良好な回復が認められた ($P < 0.0419$)。

【組織学的評価】

蛍光顕微鏡を用いたマクロ的評価では、幹細胞シート・ペレットを移植した損傷顔面神経周囲を中心にGFP陽性(ドナー由来)組織が認められた。これらの着床したGFP陽性組織は断裂した神経枝を架橋するように網目状の構造を示していた。また、強拡大で観察すると、GFP陽性組織内には血管様の構築も多数認められた。

次に、蛍光顕微鏡による移植後凍結組織切片の免疫組織学的評価の結果について述べる。N200による神経軸索の染色では、示された神経線維群と、GFP陽性組織・細胞の位置が一致していた。つまりマクロ的なGFP陽性組織の分岐が、組織学的な神経分岐と一致していることが示された。即ち、GFP陽性細胞を含むN200陽性細胞(軸索)が筋肉表面に複数(5本)認められた。この結果は、連続切片により末梢側から中枢側に連続しており、シートペレットの移植によって神経幹か

ら複数の神経枝が再構築したことを示していた。さらに、個々の神経分枝の拡大図で確認すると、GFP陽性細胞は、単独あるいは数本の神経軸索を取り囲む構造を示しており、神経周膜、内膜形成が示唆された。

着床GFP陽性細胞は分化能をさらに検討した。太めの神経線維(N200陽性)内には、GLT-1により染色され神経周膜あるいは内膜が確認でき、軸索には有髄神経(MBP陽性)も含まれている。GFP陽性細胞が単一または複数の軸索を取り囲み、神経内膜や神経周膜へ分化していることが、再度裏付けられた。さらに、GFP陽性細胞はp-75に陽性でありシュワン細胞へ分化していることが示された。加えて、これらのGFP陽性細胞-神経軸索の関係は、骨格筋線維へと伸長し、最終的には神経筋接合部まで到達していた。

CD31およびSMAによる血管内皮、血管平滑筋の染色では、神経バンドル外の比較的太い血管、及びバンドル内の毛細血管の再生にGFP陽性細胞の関与が確認できた。

【RT-PCRによるシート・ペレットの神経・血管成長、栄養因子の分泌能評価】

移植直前のSk-MSCシート・ペレットに対して、神経成長因子(NGF, BDNF, GDNF, Galactin, Ninjurin, CTNF, LIF, FGFb)、血管栄養因子(VEGF, PDGF, EGF, HGF, TGF-)のmRNA発現を検討した。全ての因子の発現が認められ、移植後の末梢神経や脈管系に関連したパラクライン効果が期待された。

これらの結果は、シート・ペレットとして移植した骨格筋由来幹細胞が顔面神経の再生、機能回復に貢献したことを示していた。

【サイトカインミックスの効果】

洞毛筋張力測定結果から実験群は対照群に比べて、高い回復効果を示す傾向が認められたが、統計的有意差は認められなかった。しかし、傾向そのものは一貫していたことから、サイトカインのデリバリー方法(拡散を防ぐ)に問題があることが示唆された。

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1件)

- (1) Reconstruction of Multiple Facial Nerve Branches Using Skeletal Muscle-Derived Multipotent Stem Cell Sheet-Pellet Transplantation. Kosuke Saito, Tetsuro Tamaki, Maki Hirata, Hiroyuki Hashimoto, Kenei Nakazato, Nobuyuki Nakajima, Akihito Kazuno, Akihiro Sakai, Masahiro Iida, Kenji Okami. PLoS ONE, vol.10, no.9, Article ID e0138371, 2015. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1件)

- (1) 骨格筋間質由来多能性幹細胞シート・ペレットによる顔面神経ネットワークの再生. 齋藤弘亮、酒井昭博、大上研二、飯田政弘、玉木哲朗. 第116回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会.2015.

〔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

齋藤 弘亮 (SAITO, Kosuke)
東海大学・医学部・助教
研究者番号：80624551

(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

()