

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10857

研究課題名(和文) 腕神経叢引き抜き損傷に対する前処理自家神経を用いた神経根再移植術

研究課題名(英文) Replantation surgery using pretreated nerve autografts for the treatment of spinal nerve root avulsion injury

研究代表者

太田 壮一 (Ohta, Souichi)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：70592484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：頸髄から引き抜かれた神経根を脊髄に再移植する研究をラットモデルを用いて行った。脊髄と引き抜かれた神経根の間に、橋渡しするように自家神経を移植した。その自家神経を移植前の1週間、器官培養した。培養液にレスベラトロールを添加すると、移植神経内に神経再生を促す栄養因子が増加し、再生軸索数が増加した。レスベラトロール添加群は、術後8週では再生軸索数が著しく増加し、術後6か月目や1年目では、再生軸索数に明らかな差は認めなかったが、再生神経の径は有意に大きく、電気生理検査ではより大きい振幅が得られた。レスベラトロールによる神経再生促進効果が、長期にわたり維持されていることを本研究で示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上肢を支配する末梢神経の全てが、脊髄からの起始部で損傷する全型腕神経叢損傷では、肩甲骨を含む上肢機能が全廃となる。その治療は困難を極め、様々な手術方法を駆使しても限られた機能しか回復させることはできない。今回、我々が報告した移植神経にレスベラトロール処理を加える方法は、引き抜き損傷後に生じる脊髄前角細胞死を抑制する方法などの他の方法と組み合わせ、将来的に、全型腕神経叢損傷の治療における神経根再移植術で活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated replantation surgery for the treatment of cervical nerve root avulsion injury using rats. Nerves grafted between spinal cord segments and avulsed nerve roots were explant-cultured for 1 week. At 8 weeks after the procedure, addition of resveratrol to the explant culture medium resulted in a significant increase in glial cell line-derived neurotrophic factor expression and the number and myelin thickness of regenerated axons. At 6 months and 1 year after the procedure, addition of resveratrol to the explant culture medium resulted in a significant increase in the diameter of regenerated axons and greater amplitude in electrophysiological studies. Resveratrol promoted axonal regeneration following replantation surgery for the treatment of nerve root avulsion injury and its promotive effect lasted for a long time.

研究分野：整形外科学

キーワード：autograft nerve root avulsion nerve regeneration resveratorl

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

腕神経叢引き抜き損傷は、交通事故や労働災害時あるいは出生時に患肢を牽引されることにより生じる(図1)。脊髓腔内で脊髓の付着部から神経根が引き抜けているため、末梢神経損傷と異なり治療が非常に困難である。特に、全型損傷(第5,6,7,8頸髄および第1胸髄神経根全ての損傷)では患肢はほぼ廃用状態となる(図2)。この状態に対して、神経移植、神経移行、筋肉移植、腱移行、関節固定などの手術手技を駆使し、一部の損傷型では肘や肩を多少自力で動かせる状態を期待できるようになった。しかし、依然として全型損傷における手、手指の機能については惨憺たる現状である。

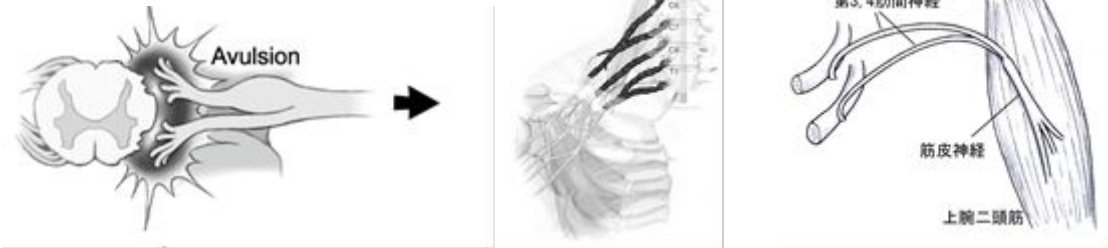


図1: 腕神経叢引き抜き損傷

図2: 全型腕神経叢損傷

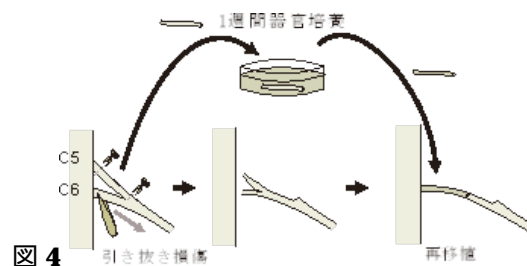
図3: 肋間神経移行術。

1995年、Carlstedtらにより臨床例で引き抜かれた神経根を脊髓に再移植し、上腕二頭筋への神経の再支配が得られたことが初めて報告された(T. Carlstedt et al. Lancet. 1995)。その後、数例 Carlstedt や Fournier により再移植法が施行された。しかし、再移植された神経により上肢の一部の筋肉の再支配が行われるものの実用的と言えるものではなかった(Carlstedt T et al. J Neurosurg. 2000, Fournier HD et al. Hand Clin. 2005)。

しかし、特に全型腕神経叢損傷では、患肢機能再建に使用できる残存する脳、脊髓神経は限られており、副神経、肋間神経(図3)、横隔神経や健側第7頸髄神経根を使用しても満足な結果は得られず、現在手詰まり感がある。この引き抜かれた神経根を脊髓へ再移植する方法は、ドナー神経不足に対する解決の糸口となる方法ではないかと我々は考えている。ただ、未だ実用的とはいえ、我々は現在、この再移植法の成績を向上させる研究を続けている。

引き抜き損傷後、損傷脊髓節の運動神経細胞は徐々に死滅し、ラットでは損傷後1ヶ月で生存細胞数が50%以下となる(太田 日手会誌 2008)。この運動細胞死が神経根再移植法の成績不良の原因の一つと考えられている。我々は、まず再現性の高いラット頸髄神経根引き抜き損傷モデルを考案、作成した(Noguchi T, Ohta S et al. J Brachial Plex Peripher Nerve Inj., 2013)。さらに、このモデルを用いて、貧血の治療に広く使用されているエリスロポイエチンの引き抜き損傷後の脊髓運動神経細胞死抑制効果を確認した。(Noguchi T, Ohta S et al. Restor Neurol Neurosci., 2015)。

現在、我々は、次の段階として脊髓に再移植した神経内を再生する神経軸索数を増加させる研究を行っている。引き抜き損傷では、引き抜かれた神経断端が末梢へいくらか退縮するため、直接脊髓へ神経根を再移植することは実際には困難である。また、図2で示す黒色部分のように神経根が脊髓から引き抜かれる時に、すでに神経自体にも一部牽引力による損傷が生じており、軸索再生を阻害するその部分は切除する必要がある。そのため、引き抜かれた神経の断端と脊髓間に橋渡しする形で神経移植が必ず必要となる。この移植神経には自家神経を用いるが、移植前に前処理を加えて、再生軸索数を増加させる試みを行っている。前処理は、採取した移植神経を薬剤を添加したシュワン細胞用培地に浸し、1週間器官培養して行う(図4)。すでに、ポリフェノール的一种であるレスベラトロールを用いた前処理により再生軸索数が有意に増加することを確認しているが、その作用機序は未だ不明である。



### 2. 研究の目的

レスベラトロールで前処理した移植神経内に生じた変化を分子生物学的、組織学的に検証し、どのような作用機序が再生軸索数の増加に影響を与えたのかを明らかにすること、また、長期的に再生軸索数の有意な増加や機能の改善が維持されるのか検証すること。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験の対象

## (2) ラット頸髄神経の採取、及び器官培養

安楽死させたラットの頸部後方より脊椎後側方を露出し、両側の第 5 頸髄神経根を採取する。Naive 群 (N 群: n=20)、control 群 (以下 C 群: n=20)、resveratorol 群 (以下 R 群: n=20) とし、N 群は採取後すぐ固定した。C 群と R 群は、採取後 7 日間、Schwann 細胞用の培地 (ScienCell Research Laboratories) にて器官培養し、R 群には 100 $\mu$ M レスベラトロールを添加した。

## (3) 前処理自家神経の分子生物学的、組織学的検討

培養後の神経を 4% パラホルムアルデヒドに 24 時間、その後 20% スクロースで後固定後、40 $\mu$ m 厚の凍結縦切あるいは横切連続切片を作成した。抗 CD68 抗体 (1:50; Bio-Rad, Hercules, CA)、抗 S-100 抗体 (1:500; Dako, Carpinteria, CA, USA)、抗 GFAP 抗体 (1:1000; Abcam plc, Cambridge, UK) を使用し、免疫組織学的に検討した。

さらに、12 本の頸髄神経と 12 本の坐骨神経を採取し、N 群 (n=8)、C 群 (n=8)、R 群 (n=8) の 3 群にランダムに分けた。N 群は採取後すぐに凍結した。C 群は Schwann 細胞用培地で 1 週間培養後凍結し、R 群は 100 $\mu$ M レスベラトロールを添加したシュワン細胞用培地で 1 週間培養し、凍結した。その後、PCR 法を用いて、グリア由来神経成長因子 (GDNF) の mRNA 発現量を計測した。また、14 本の頸髄神経と 14 本の下肢の坐骨神経を採取、N 群 (n=8)、C 群 (n=10)、R 群 (n=10) の 3 群にランダムに分けた。PCR 法と同様に、各群を凍結した後、ELISA kit (Raybiotech, Norcross, GA, USA) を用いて GDNF 量を測定した。

## (4) ラット第 6 頸髄神経根引き抜き損傷再移植モデルの作成

ソムノペンチル腹腔内麻酔下に、腹臥位としたラットの頸部後方より脊椎椎間孔外で第 6 頸髄神経根を露出、それを鑷子で引き抜く。同時に同側第 5 頸髄神経根神経を約 5 ミリ採取する。採取神経は、レスベラトロール添加あるいは非添加培地で 1 週間培養した後、再度同じラットに移植する。再移植手術は、まずソムノペンチル腹腔内麻酔下に、腹臥位としたラットの頸部後方より左頸椎片側椎弓切除、外側塊部分切除を行う。第 6 頸髄神経レベルで左側の硬膜小切開部より前処理した移植自家神経を脊髄側方に数ミリ埋め込みフィブリン糊で固定する。移植神経末梢側は、手術用顕微鏡下で断端を一部切除した神経根に縫合した。

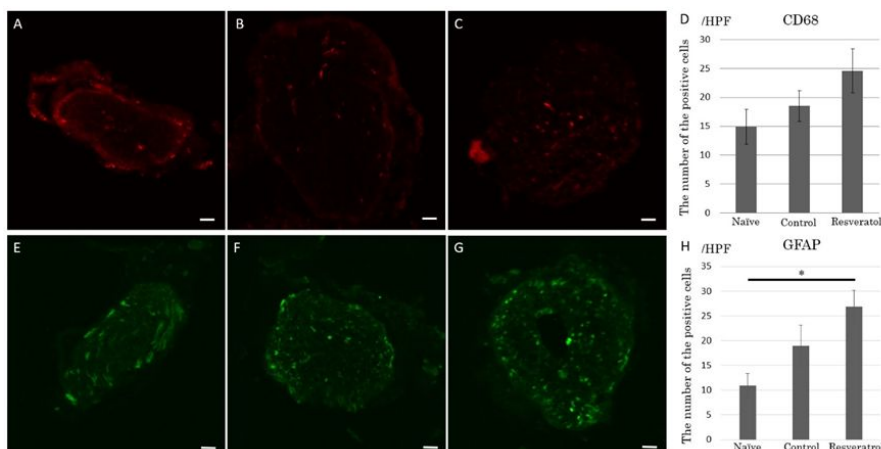
## (5) 前処理自家神経再移植モデルの長期成績の評価

再移植術より 6 ヶ月後に、橋渡し移植した神経の遠位縫合部の 2mm 末梢部位を採取した。採取神経をグルタルアルデヒドとオスミウム酸で固定後、エポン包埋し、準超薄横断切片を作成、トリイジンブルー染色し、光学顕微鏡下に再生軸索数などを比較検討した (R 群: n=7、C 群: n=7)。さらに、超薄切片を作成し、髓鞘厚、軸索直径を計測した。また、再移植術の 1 年経過後、筋皮神経の複合筋活動電位 (CMAP) 振幅を計測した (R 群: n=3、C 群: n=3)。ソムノペンチル腹腔内麻酔下にラットを仰臥位とし、大胸筋を筋繊維に沿って割き、腕神経叢末梢を露出、筋皮神経を同定して行った。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫組織学的検討

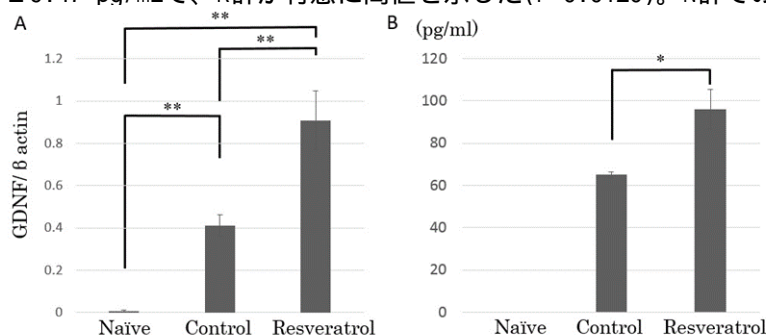
CD68 陽性細胞数は、N 群:  $14.9 \pm 3.03$ 、C 群:  $18.5 \pm 2.71$ 、R 群:  $24.6 \pm 3.82$  で、3 群間で有意差は見られなかった。GFAP 陽性細胞数は、R 群 ( $26.9 \pm 3.34$ ) は N 群 ( $10.9 \pm 2.43$ ) と比較し有意に増加していた ( $P=0.015$ )。N 群と C 群 ( $19.0 \pm 4.16$ ) 間、C 群と R 群間で有意差は見られなかった。S-100 陽性細胞数は、3 群間で優位差は見られなかった (N 群:  $19.0 \pm 4.03$ 、C 群:  $13.5 \pm 5.28$ 、R 群:  $13.8 \pm 2.81$ )。



### (2) Real-time PCR と ELISA

Real-time PCR では、GDNF mRNA の発現量は、R 群は C 群と比較し有意に多かった (R 群:  $0.910 \pm 0.14$ 、

C群:  $0.412 \pm 0.051$ ;  $P=0.0013$ )。また、R群とC群は、N群と比較し、有意に多かった(N群:  $0.00658 \pm 0.0038$ ;  $P<0.0001$ )。ELISAでは、GDNF発現量は、C群で  $65.09 \pm 1.45$  pg/mL、R群で  $96.02 \pm 9.47$  pg/mLで、R群が有意に高値を示した( $P=0.0120$ )。N群での発現は見られなかった。



### (3) 24 週時の組織学的評価

再生軸索数は R 群と C 群で差を認めなかったが、神経線維径 (C 群;  $2.66 \pm 0.046$ 、R 群;  $2.96 \pm 0.098$ ) と軸索径 (C 群;  $1.46 \pm 0.047$ 、R 群  $1.76 \pm 0.053$ ) は、R 群が有意に大きかった。髄鞘厚に差はなかった。

### (4) 1 年時の組織学的評価および電気生理学的評価

再生軸索数 (R 群  $1483.0 \pm 142.6$ 、C 群  $1576.4 \pm 189.5$ )、髄鞘厚 (R 群  $0.72 \pm 0.038$ 、C 群  $0.67 \pm 0.13$ )、神経線維径 (R 群  $3.45 \pm 0.26$ 、C 群  $3.04 \pm 0.44$ )、軸索径 (R 群  $2.00 \pm 0.22$ 、C 群  $1.69 \pm 0.18$ ) では有意差を認めなかったが、筋皮神経の CMAP 振幅は R 群が C 群より大きい傾向が見られた (R 群  $96.5 \pm 0.49$ 、C 群  $88.7 \pm 0.28$ )。CMAP 振幅は、1 匹が計測前に麻酔により死亡し、 $n=2$  となったため、有意差を出すことはできなかった。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Oda H, Ohta S, Ikeguchi R, Noguchi T, Kaizawa Y, Yurie H, Takeuchi H, Mitsuzawa S, Matsuda S. Pretreatment of nerve grafts with resveratrol improves axonal regeneration following replantation surgery for nerve root avulsion injury in rats. *Restor Neurol Neurosci*. 査読あり、2018;36(5):647-658. doi: 10.3233/RNN-180844. PMID: 30056441

### 〔学会発表〕(計 1 件)

Oda H, Ohta S, Ikeguchi R, et al. Pretreatment with Resveratrol improved axonal regeneration in replantation surgery for nerve root avulsion injury in rats. 73rd American Society for Surgery of the Hand Annual Meeting, 2018.9.11-15, Boston

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 池口 良輔  
 ローマ字氏名: IKEGUCHI, Ryosuke  
 所属研究機関名: 京都大学  
 部局名: 医学研究科  
 職名: 准教授  
 研究者番号 (8 桁): 80437201

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 織田 宏基  
 ローマ字氏名: ODA, Hiroki  
 研究協力者氏名: 野口 貴志  
 ローマ字氏名: NOGUCHI, Takashi  
 研究協力者氏名: 貝澤 幸俊  
 ローマ字氏名: KAIZAWA, Yukitoshi  
 研究協力者氏名: 滝江 宏文  
 ローマ字氏名: YURIE, Hirofumi  
 研究協力者氏名: 竹内 久貴  
 ローマ字氏名: TAKEUCHI, Hisataka  
 研究協力者氏名: 光澤 定己  
 ローマ字氏名: MITSUZAWA, Sadaki  
 研究協力者氏名: 松田 秀一  
 ローマ字氏名: MATSUDA, Shuichi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。