

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20270

研究課題名(和文) 嗅神経鞘細胞と生体吸収性ハイドロゲルを用いた顔面神経麻痺モデルマウスへの効果

研究課題名(英文) Transplantation of olfactory stem cells with biodegradable hydrogel accelerates facial nerve regeneration after crush injury

研究代表者

勝見 さち代 (Katsumi, Sachiyo)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：60625565

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)：鼻粘膜には嗅神経幹細胞(OSCs)と呼ばれる神経幹細胞様の細胞が存在し、OSCsは軸索の伸長に寄与する。本研究ではハイドロゲルであるMedgelをOSC留置の際に使用した。OSCは新生児マウスの嗅裂から分離された。OSCは神経幹細胞マーカーを発現し、神経幹細胞様の細胞と考えられた。また、分化すると様々な神経細胞マーカーを発現した。また、OSCは培養上清中に神経の回復を促進するサイトカインを複数分泌していた。顔面神経を本幹で圧挫し、Medgelを加えたところ、顔面神経麻痺の再生が促進された。この効果は電気生理学、組織学的にも認められた。

研究成果の概要(英文)：Olfactory mucosa contain neural stem-like cells, called olfactory stem cells (OSCs), which produce broad trophic support required for promoting axonal regeneration. In this study, Medgel, a biodegradable hydrogel sponge, was applied to place OSCs around the transplanted site and to avoid the local hostile environment. The OSCs were isolated from the olfactory mucosae of newborn mice and expressed the neural stem cell markers. When differentiated, the OSCs expressed beta-III-tubulin, galactocerebroside and glial fibrillary acidic protein OSC. The OSCs secreted nerve growth factor and several cytokines that can promote nerve regeneration. When OSCs were transplanted after facial nerve injury, accelerated recovery was observed for one week. When OSCs were transplanted with Medgel, a higher level of accelerated recovery was observed throughout the study. OSCs impregnated in Medgel increased the mean evoked CMAP of the buccinator muscle, and increased newly generated nerve fibers.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科

キーワード：顔面神経麻痺 嗅神経鞘細胞 ハイドロゲル

## 1. 研究開始当初の背景

外傷性顔面神経麻痺は側頭骨骨折の重大な合併症の一つで、致死的な疾患ではないが、顔が歪み表情を失う為、患者の精神的苦痛、社会生活に与える影響は大きい疾患である。現在、高度神経損傷に対して顔面神経減荷術、神経縫合術等の手術治療が施行されているが、満足のいく麻痺の改善は得られず、新しい治療法の開発が望まれている。

嗅上皮にある嗅神経鞘細胞には、嗅神経幹細胞 (OSC: olfactory stem cell) と呼ばれる、神経幹細胞様性質をもった細胞が存在すると考えられている。OSC は自己複製能と分化能を持ち、成長因子や栄養因子などを生産し、色々な神経細胞に分化できると考えられている。これらの性質から幹細胞移植医療の候補として注目され、脊髄損傷、視神経損傷、脳梗塞、心筋梗塞への移植で、軸索伸長および再髄鞘化を促し、機能回復、神経線維の増加を促進することが確認されている。

我々の研究室では、顔面神経圧迫挫滅モデルマウスを作成し、肝細胞増殖因子 (HGF) を導入した非増殖型単純ヘルペスウイルスベクターを使用し、顔面神経麻痺の回復が促進されることや、様々な成長因子 [HGF、繊維芽細胞増殖因子 (bFGF)、グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF)、9 神経成長因子 (NGF)] をゼラチンハイドロゲル (Medgel) に添加して、損傷神経上に移植すると、ゲルの徐放化作用により髄鞘の新生が促進されることを明らかにしてきた。近年、ハイドロゲルは生体組織の再生誘導を促すことを目的とした細胞の増殖のための足場材料として注目されており、ハイドロゲルで作成したスポンジ内に幹細胞を播種すると増殖、分化することが確認されている。

## 2. 研究の目的

今回我々は、自己複製能・分化能・成長因子生産能を持つ OSC を顔面神経麻痺圧迫挫滅モデルマウスへ移植すると顔面神経の再生が促進すると仮定した。また播種した細胞は生体内でクリアランスされやすいため、ハイドロゲル (Medgel) を用いて、OSC の足場とした。本研究により、顔面神経損傷からの回復が OSC と Medgel で促進できることが証明できれば、外傷により顔面神経麻痺を生じ、顔面神経減荷術を施行している際に、従来は、損傷した顔面神経上に半減期の長いステロイド (デカドロン) をジェルフォームに浸して留置していたが、OSC を含む Medgel を顔面神経上において、顔面神経麻痺の回復をより促進できる可能性があると考えられる。

再生医療、幹細胞移植医療では他人由来の細胞のため、拒絶反応や倫理的問題が指摘されているが、鼻粘膜は患者自身の鼻腔から、

内視鏡的に容易に採取可能な自己移植片であることから、この点が解決されており、有用な移植源となり得る。また、損傷神経上に投与する方法は簡便であり、側頭骨骨折後の手術の際、顔面神経減荷術の手術時にも同様の手法で投与でき、臨床応用できる可能性が十分にあり、本研究の成果は実際の医療への還元が多いに期待できる。

## 3. 研究の方法

### 1) OSC の分離、培養とその性質

まず、生後 0-1 日の胎児マウスの脳を取り出し、嗅裂を切離して培養した。血清不添加の培地で 1-2 週間培養して、OSC を分離した。

OSC を単離し、スライド上にのせて免疫染色をおこなった。神経幹細胞様の性質を示すか検討するため、神経幹細胞マーカーである Nestin、Musashi-1、神経細胞マーカーである  $\beta$ III tubulin、GFAP、GalC、鼻粘膜マーカーである OMP の抗体を用いて、共焦点顕微鏡で観察した。OSC が神経幹細胞様の性質を示すか検討するため、血清を添加した培地で培養し、同様に神経幹細胞マーカーである Nestin、Musashi-1、 $\beta$ III-tubulin、GFAP、GalC、OMP の発現を検討した。

OSC が分泌するサイトカインを検討するため、OSC を 4 日間培養した培養上清、OSC なしで 4 日間培養した培養上清を採取し、サイトカインの発現を抗体アレイ Cytokine Antibody Array C Series 2000 を用いて検出した。3 サンプルを測定し、2 倍以上かつ統計学的に有意なサイトカインを变化ありとした。神経栄養因子については抗体アレイに含まれていなかったため、BDNF、GDNF、NGF について ELISA で検出した。

### 2) 顔面神経麻痺モデルマウスへの OSC、Medgel の移植

次に、OSC が顔面神経麻痺を改善するか、マウスモデルを用いて実験を行った。OSC が生体内で除去されにくいように細胞の足場として、ハイドロゲルである Medgel を用いることとした。マウスを麻酔し、耳下腺の下層で顔面神経本幹を剖出し、モスキート鉗子で 5 分間圧迫した。圧挫した神経上に OSC をハイドロゲルに含ませて投与した。比較対象として、OSC 単独、ハイドロゲル単独、培養液のみを神経上に塗布した。目の瞬き、髭の動きを 0-3 点で、経時的に評価した。

次に、顔面神経麻痺の改善を電気生理学的に検討した。術後 14 日目に、顔面神経本幹を露出し電極で刺激した。頬筋に電極を挿入し、電気筋電図を測定した。

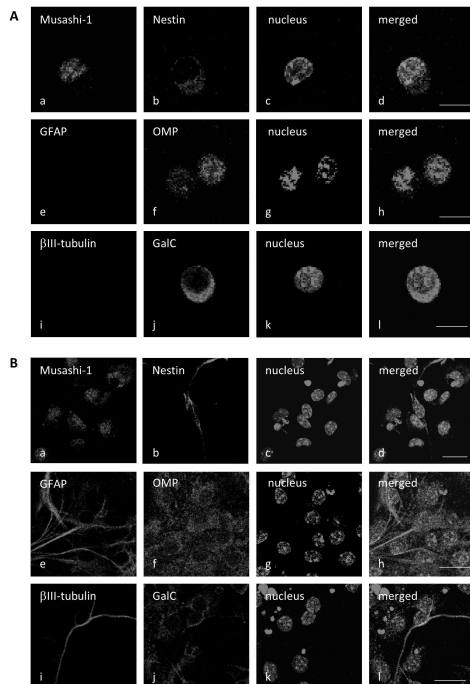
## 4. 研究成果

### 1) OSC の分離、培養とその性質

マウスの嗅裂付近を血清不添加培地で 1-2 週間培養すると、細胞塊が培養され、長期間培養可能であった。神経幹細胞と同様な形態を示すため、嗅粘膜由来幹細胞 (OSC) と名付けた。

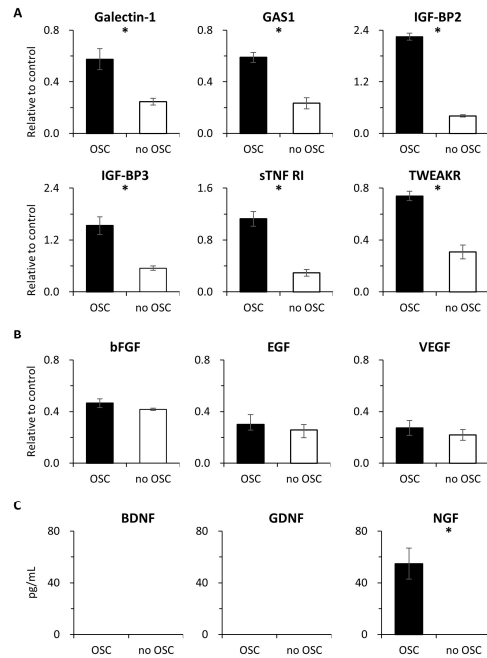
次に、神経細胞、神経幹細胞のマーカーを発現するか、細胞染色を行った。OSC の状態では Nestin、Musashi-1、OMP が陽性であり、神経細胞マーカーである  $\beta$ III-tubulin、GFAP、GalC は陰性であった。よって、この細胞は鼻粘膜由来の神経幹細胞様の細胞であると考えられた (図 1A)。次に、血清添加培地で分化誘導したところ、神経細胞マーカーである  $\beta$ III-tubulin、GFAP、GalC も陽性となり様々な種類の神経細胞に分化できることが示された (図 1B)。

図 1 (A) OSC の免疫染色 (B) 分化誘導後の OSC の免疫染色



OSC を 4 日間培養し、培養上清中に分泌されたサイトカインを測定したところ、galectin-1、GAS1 (growth arrest specific-1)、IGF-BP2 (insulin-like growth factor-binding protein 2)、IGF-BP3、sTNF-RI (soluble tumor necrosis factor receptor I)、TWEAKR (tumor necrosis factor-related weak inducer of apoptosis receptor) の上昇が認められた (図 2A)。しかし、培養液に含まれる bFGF (basic fibroblast growth factor)、EGF (epidermal growth factor) の上昇は認められなかった (図 2B)。神経栄養因子を測定したところ、NGF (nerve growth factor) の上昇が認められたが、BDNF (brain-derived neurotrophic factor)、GDNF (glial cell-derived neurotrophic factor) の上昇は認められなかった (図 2C)。

図 2 . OSC の培養上清中に分泌された (A)

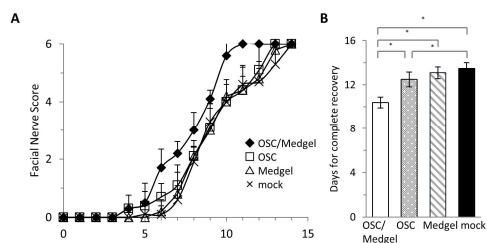


サイトカイン、(B) 成長因子、(C) 神経栄養因子

## 2) 顔面神経麻痺モデルマウスへの OSC、Medgel の移植

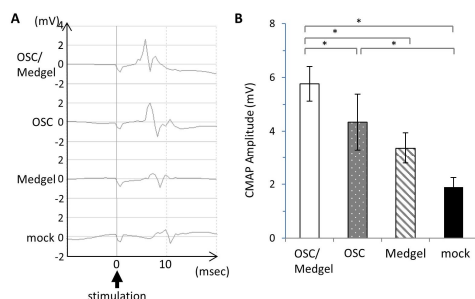
顔面神経本幹を圧挫し、顔面神経麻痺モデルマウスを作成した。OSC を含ませた Medgel、OSC、Medgel のみ、培養液のみを損傷神経上に留置し、神経の回復を検討した。OSC のみ投与した場合は、投与 1 週間までは顔面神経麻痺の回復を促進したが、その後の回復促進は認められなかった。OSC+Medgel を投与した群では、完治するまで顔面神経麻痺の回復を促進した (図 3A)。完治するまでの日数を検討したところ、OSC+Medgel を投与した群が最も短くなった (図 3A、3B)

図 3 . 顔面神経麻痺の (A) 回復曲線、(B) 完治までに必要だった日数



次に麻痺の回復促進効果を電気生理学的に検討した。麻痺がほぼ治った 14 日目に、マウスを麻酔し、顔面神経本幹を露出した。本幹を電気刺激し、頬筋の筋電図を測定したところ、OSC+Medgel を投与した群では、完治するまで顔面神経麻痺の回復を促進した (図 4A、4B)。

図4 . (A) 頬筋の筋電図、(B) 頬筋の最大振幅



以上の結果から OSC をハイドロゲルと一緒に加えることで顔面神経麻痺からの回復が促進され、外傷性顔面神経麻痺の手術の際に再生を促成する因子として投与できる可能性が示された。

#### 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0件) 1

〔学会発表〕(計1件)

Katsumi S, Esaki S: Three-dimensional evaluation of facial nerve paralysis to predict its prognosis. 13th International Facial Nerve Symposium, Hollywood, CA, USA, 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

なし

取得状況 (計0件)

なし

〔その他〕

なし

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

勝見 さち代 (KATSUMI, Sachiyō)

名古屋市立大学大学院・医学研究科・耳鼻咽喉・頭頸部外科・研究員

研究者番号：60625565

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

江崎 伸一 (ESAKI, Shinichi)

名古屋市立大学大学院・医学研究科・耳鼻咽喉・頭頸部外科・助教

研究者番号：20620983

(4)研究協力者  
なし