

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03850

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞由来の細胞抽出物による末梢神経損傷の新たな治療法開発

研究課題名(英文) Trial of new therapy development for the peripheral nerve damage by the cell extract derived from a dedifferentiation fat cell

研究代表者

瀬尾 憲司 (Seo, Kenji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40242440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪細胞由来幹細胞ADSCsまたは脱分化脂肪細胞DFATからの細胞抽出物CEの末梢神経に対する再生効果を検討した。CEはシュワン細胞数やGFAP発現を増加させニューロンの突起長さを増加させた。またシュワン細胞数やGFAP発現を増加させ、ニューロンの突起を伸長させたがその効果はCE-ADSCsに比べて効果は小さい傾向にあった。またCE-ADSCsを神経切断部に移植したところマクロファージが切断部近位に集積し、軸索は伸長した。感覚は切断側の感覚移植前と同じ閾値のレベルとなった。CEに含まれる因子は軸索伸長を促進し非神経細胞も活性化させ神経再生を促進する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、末梢神経再生の一つの方法を提案し、そのメカニズムについて科学的に分析した。こうした結果は、将来の組織再生医学に新しい方向性を提案することが出来ると思われる。

研究成果の概要(英文)：Effects of Cell extract from ADSCs and DFATs on peripheral nerve regeneration was investigated in vivo and in vitro. CE-ADSCs increased Schwann cell count and GFAP expression and increased the projection length of the DRG neuron. CE-DFATs increased Schwann cell count and GFAP expression, and they extend the projection of the DRG neuron, but the effect of CE-DFATs tended to have a smaller effect than CE-ADSCs. Three days after CE-ADSCs transplant to the nerve lesion, a macrophage was observed in the proximal site. In addition, an axon extended it towards distal part, and Schwann cell was detected around distal site and the axon. Tough sensation threshold became the level of the same threshold if CE-ADSCs applied to the lesion. The growth factor included in CE-ADSCs promote axon extension and also activate the non-neuronal cells, resulting in facilitation of nerve regeneration.

研究分野：神経科学

キーワード：末梢神経損傷 シュワン細胞 感覚ニューロン 神経再生 脂肪組織由来幹細胞 脱分化脂肪細胞 細胞抽出物

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、脂肪組織由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells: ADSCs) を用いた神経再生による治療が試みられているが、幹細胞を用いた治療を臨床に応用するためには、移植された細胞による拒絶反応の可能性や、幹細胞の保管や輸送の管理といった課題が残る。一方、ADSCs 由来の細胞抽出物 (Cell Extract: CE) は細胞を含まないため理論的には腫瘍原性や免疫原性のリスクが低く、長期保存が可能である。この ADSCs 由来の CE は唾液腺や心臓など様々な臓器再生における有用性が報告されている。一方、成熟脂肪細胞を脱分化させた脱分化脂肪細胞 (DFATs) は他の間葉系幹細胞より優れた多分化能、高い増殖能をもち、その細胞抽出液 (cell extract) は腫瘍原性・免疫原性が低いので、組織再生の応用が期待されている。しかしこれらの CE を末梢神経再生へ応用した研究はない。そこで ADSCs 由来または DFATs 由来の CE (CE-ADSCs、CE-DFATs) が末梢神経の再生を促進する可能性を検討した。

2. 研究の目的

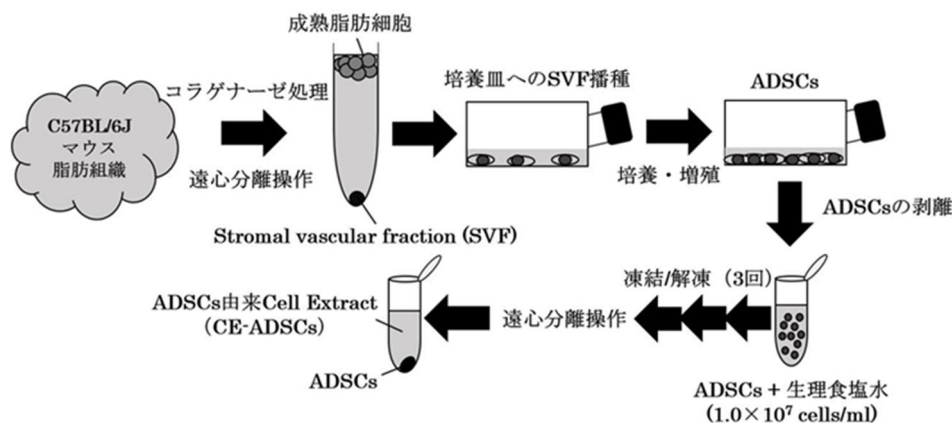
ADSC または DFAT から抽出した CE を末梢神経切断後に損傷部位へ投与することにより、神経再生に寄与することが可能であるかを免疫組織学的、または行動学的に検討する。また神経を再生させる効果が認められるならば、軸索またはシュワン細胞に対する効果を検討し、さらに CE の中のどのような因子がこうした効果に影響を及ぼしているかに関して検討を行う。

CE により再生した神経が、切断を受けていない神経と同じような性状の神経が再生されるのか、それとも異なる性状の神経が再生されるかについても検討を行う。

3. 研究の方法

脂肪組織由来幹細胞または脱分化脂肪細胞から抽出した Cell Extract の in vitro における末梢神経再生効果の検討

9 週齢の C57BL/6J マウス鼠径部の脂肪組織より ADSCs または DFATs を樹立した。これらを生理食塩水に懸濁し、凍結・解凍操作を 3 回繰り返すことで細胞構造を破壊し遠心分離操作を加え、得られた上清を回収し CE-ADSCs または CE-DFATs として実験に使用した。

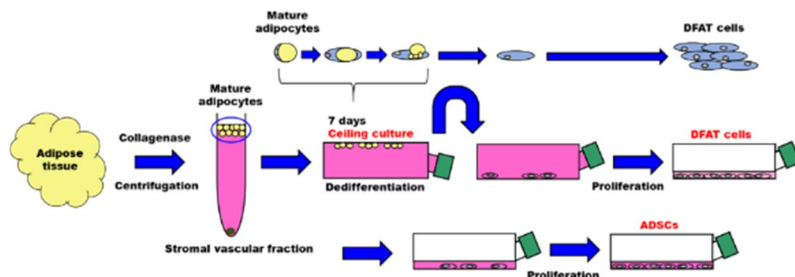


CE-ADSCs を添加した培地を用いて培養することで、CE-ADSCs のシュワン細胞 (増殖能・GFAP 発現量)、DRG ニューロンおよび PC12D 細胞 (突起長さ) に対する効果を評価した。

In vitro 研究における DFATs 由来 CE の末梢神経伸長に対する効果の検討

マウスより脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理後、遠心分離を行い、脂肪組織を成熟脂肪細胞と stromal vascular fraction (SVF) に分離した。成熟脂肪細胞を天井培養法によって、SVF

をフラスコに播種することによって、脱分化脂肪細胞（DFATs）を樹立した。



CE-DFATs を添加した培地を用いて培養することで、CE-DFATs のシュワン細胞（増殖能・GFAP 発現量）に対する効果を評価した。

脂肪組織由来幹細胞から抽出した Cell Extract の in vivo における末梢神経再生効果の検討

マウスの脂肪組織から作製した CE-ADSCs をラットの下歯槽神経を切断した部位に移植して、免疫組織学的または行動学的にその効果を検討した。

CE-ADSCs の神経トレーサーによる神経切断後の再生の評価

神経切断手術後に神経トレーサー（デキストラン結合 Alexa Fluor 594）をオトガイ神経に注入し三叉神経節を採取し、透明化処理をする。2 光子顕微鏡で撮影し、三次元画像を構築する。構築した三次元画像より、神経トレーサーによって標識された細胞体を最大面積の部分で網羅的に解析し CE-ADSCs 群と Vehicle 群で再生神経を比較した。細胞の径による CE-ADSCs 群と Vehicle 群で標識された平均細胞数に関してヒストグラムを作成した。

4. 研究成果

CE-ADSCs はシュワン細胞数や GFAP 発現を増加させ、DRG ニューロンおよび PC12D 細胞の突起長さを有意に増加させた。一方、CE-DFATs はシュワン細胞数や GFAP 発現を増加させ、DRG ニューロンの突起を伸長させたがその効果は CE-ADSCs に比べて効果は小さい傾向にあり、PC12D 細胞では突起長さを増加させなかった。したがって、CE-ADSCs 中のタンパク質がシュワン細胞や DRG ニューロンまたは PC12D 細胞に作用し、末梢神経再生を促進すると考えられた。

DFATs 由来の CE は Schwann 細胞増殖を生じさせなかった。

CE-ADSCs 移植から 3 日後に、Iba1 陽性のマクロファージが切断部近位に多数観察され、さらに 7 日後に MPZ 陽性のミエリン断片が切断部位で認めなかった。また、CE-ADSCs 移植から 7 日後には軸索が遠位に向かって伸長し、さらに S100 陽性の Schwann 細胞が切断部遠位および伸長した軸索周囲に多数認められた。また、14 日目において、切断側オトガイ部の感覚が Vehicle 群よりも有意に高く ($p < 0.05$)、移植前と同じ閾値のレベルとなった。

したがって、CE-ADSCs に含まれる成長因子は直接的に軸索の伸長を促進させ、Schwann 細胞やマクロファージといった非神経細胞も活性化させることで神経再生の微小環境を整えることが示唆された。また頭部逃避閾値が切断前のレベルに回復したことから、CE-ADSCs は機能的にも神経再生を促進すると考えられた。

CE-ADSCs 群と Vehicle 群で標識された細胞の直径と平均細胞数のヒストグラムを作成した。CE-ADSCs 群の中央値は 38 で Vehicle 群の中央値は 35 であった。このことから、CE-ADSCs 群による再生した神経細胞は Vehicle 群と比較して大きな径にシフトしていることが明らかになった。したがって、CE-ADSCs により再生した感覚細胞は、損傷前の細胞とは形態が異なっていることから再生した神経細胞の性状が異なっている可能性がある。これが感覚細胞の興奮性などに

影響することによって、神経再生後の感覚・違和感などの変化に影響している可能性がある。

結論：CE-ADSCs の移植が切断されたラット下歯槽神経の再生を促進する。CE の移植は神経再生を強化し、末梢神経再生に有効な治療法となる可能性がある。

謝辞：本研究の一部は先端バイオイメーjing支援プラットフォーム（光学顕微鏡を用いた撮像支援）の支援を得て行われた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Y. KOYAMA, N. KISHIMOTO, Y. IMAI, J. TANUMA, K. TAKEUCHI, T. MAEDA, K. SEO
2. 発表標題 Cell extract from adipose tissue-derived stem cells promotes peripheral nerve regeneration
3. 学会等名 Neuroscience 2021 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Y. IMAI, N. KISHIMOTO, Y. KOYAMA, J. TANUMA, K. TAKEUCHI, T. MAEDA, K. SEO
2. 発表標題 Effects of cell extract from adipose-derived stem cells on peripheral nerve regeneration
3. 学会等名 Neuroscience 2021 Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山 祐平, 岸本 直隆, 今井 有蔵, 氏田 倫章, 沢田 詠見, 瀬尾 憲司
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞由来cell extractの末梢神経再生効果の免疫組織学的評価
3. 学会等名 日本歯科麻酔学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井 有蔵, 岸本 直隆, 田中 裕, 弦巻 立, 倉田 行伸, 金丸 博子, 佐藤 由美子, 山本 徹, 大塚 有紀子, 小山 祐平, 沢田 詠見, 枝村 美和, 瀬尾 憲司
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞由来cell extract内の神経再生作用のある成分の分析
3. 学会等名 日本歯科麻酔学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今井有蔵、小山祐平、岸本直隆、瀬尾憲司
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞のcell extractが神経系細胞へ及ぼす効果について
3. 学会等名 第31回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小山 祐平, 今井 有蔵, 岸本 直隆, 氏田 倫章, 瀬尾 憲司
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞の抽出物が神経系細胞に及ぼす効果の検討
3. 学会等名 日本歯科麻酔学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田沼 順一 (TANUMA JYUNICHI) (20305139)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	前田 健康 (MAEDA TAKEYASU) (40183941)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	岸本 直隆 (KISHIMOTO NAOTAKA) (50610911)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武内 恒成 (TAKEUCHI KOUSEI) (90206946)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	紙谷 義孝 (KAMIYA YOSHINORI) (90381491)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	
研究分担者	山田 友里恵 (YAMADA YURIE) (20804537)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関