

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10027

研究課題名(和文) マウスを用いたin vivo 細胞融合法による神経軸索即時機能回復法の検討

研究課題名(英文) Investigation of an in vivo cell fusion method using mice to restore immediate neuroaxonal function.

研究代表者

成島 三長 (Narushima, Mitsunaga)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：80431873

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：軸索機能回復過程をマウス下肢坐骨神経を用いて、キャットウォークによる歩行機能評価、神経刺激装置による筋電図・伝導速度の機能評価、神経標本による形態学的評価の3評価を行った。切断2週間後・4週間後に神経変化の評価を行った。神経融合法は1. 縫合、PEG、センダイウイルス、リポフェクタミン、電気刺激すべてによる融合、2. 縫合のみ(control)、3. 縫合+PEG+電気刺激の三グループで行った。理論的には第二週で回復を得られると考えたが、コントロール群と融合実験群で明らかな有意差を認めず、組織学的検討においては、融合法を用いた群で回復軸索数が少なく、神経損傷が強い傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々は、軸索融合の可能性について検討した。残念ながら我々の方法では、現時点では軸索融合は、コントロール群(縫合のみ)と比較して優位性を認めなかった。しかしmtGFPマウスを用いた軸索内輸送のモデルや、PEG、センダイウイルス、リポフェクタミン、電気融合等のさまざまな細胞融合法を用いる実験手法を確立できたことで、今後さらに微細技術や知見が進み、神経再生における軸索融合法がより繊細に行える環境になった場合に再チャレンジできる環境を整えることができたと思う。

研究成果の概要(英文)：The process of axonal function recovery was evaluated using the sciatic nerve of the mouse lower limb in three ways: 1) gait function evaluation using catwalks, 2) functional evaluation of electromyography and conduction velocity using a nerve stimulator, and 3) morphological evaluation using nerve specimens. Nerve changes after amputation were evaluated at 2 and 4 weeks. The nerve fusion method was performed using three groups: 1) fusion by suture, PEG, Sendai virus, lipofectamine, and electrical stimulation all 2) suture only (control) 3) suture + PEG + electrical stimulation. Theoretically, recovery was expected to be achieved in the second week, but there was no clear significant difference between the control and experimental fusion groups, and histological examination showed that the number of recovered axons was lower and nerve damage tended to be more severe in the group using the fusion method.

研究分野：形成外科

キーワード：神経 融合 再生 再建

1. 研究開始当初の背景

腫瘍切除後や外傷による神経損傷を認めた場合、マイクロサージェリー技術を用いて神経吻合・神経移植・神経筋移植などを行っている。しかし神経再生そのものは人間の回復能力に依存している。このため、) 神経再生までに数カ月かかり、筋繊維は再生神経到達前に萎縮し本来の機能回復を得られない。) 神経軸索再生時に神経痕傷が生じ再生軸索数が制限されるなどの問題点がある。様々な神経再生誘導因子が報告されているが、臨床的に回復期間の短縮や神経の完全な回復には至っていない。そこで

“ 神経を中枢側から再生する ” という発想を転換する必要があったと考えた。軸索変性が不可逆的に

なる前に、“ 軸索の末梢側を中枢側の神経細胞と再接合し(図 1)、軸索輸送を再疎通させることにより即時神経機能回復が行えないか? ” と本研究を着想した。

この問いに答えるためには、 実際に末梢側と中枢側が再接合する事例があるか? および Waller 変性する前に切断された神経軸索同士を接合するような技術は存在するか? 検討する必要があった。 については、Neumann らによって *C.elegans* neuron で切断後、自然に再接合がされることが解明されてきた。(*Dev Dyn* (2011). 240(6)1365-1372, *Nature* (2015) 517, 219-222) また についてはその突破口は“ 軸索融合法 ” にあると考えた。1986 年 Bittner らにより crayfish の軸索を切断後、ポリエチレングリコールを用いて *in vitro* で神経融合を行った報告がある。(*Brain Research*, 1986: 5 351-55) さらに 2010 年に Wesley C. Chang らが *in vitro* にて Axon microelectrofusion 法で、2 本の軸索を交叉融合した報告があった。(*Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010;2(2):151-61)

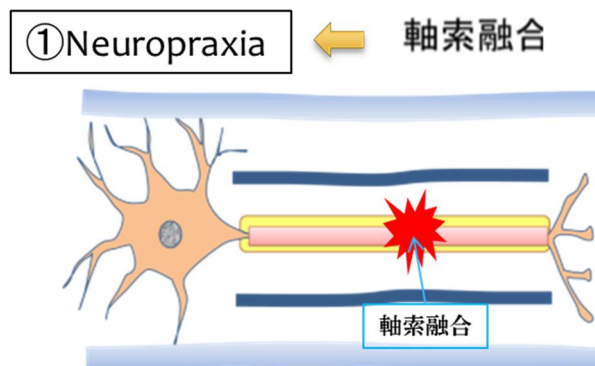


図 1 軸索融合

2. 研究の目的

この軸索融合法が確立すれば、Waller 変性後の神経再生を自然再生に依存する現状を打破できる。将来的には顔面神経麻痺や四肢麻痺の即時神経回復、具体的には神経が損傷や切断された場合、現在は回復困難な前頭筋や口角下制筋などを含めた表情筋全般の一週間程度での完全回復や四肢の巧緻運動回復も可能となる。さらには現在治療不可能な中枢神経系の神経損傷や眼球移植などの革新的な治療に応用できる可能性があり、移植や神経再生技術と組み合わせることで新たな神経の外科的治療法を生み出せると考えた。(図 1)

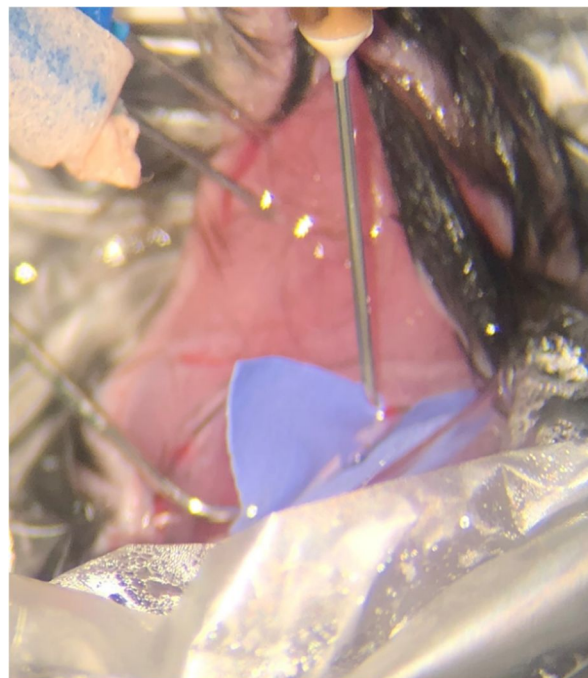


図 2 マウス坐骨神経切断

3. 研究の方法

マウス下肢の神経を用いて細胞融合技術を用いた軸索融合モデルの作成した。(図 2) 軸索輸送変化を蛍光イメージング法を用いて直視下に形態学的変化を観察するものである。具体的には mito-GFP マウス下肢神経(大腿神経および坐骨神経) を用いて、レーザーおよび剪刀による切断後の神経変化について軸索内微小管上を走行するキネシン (KIF1b) によって運ばれるミトコンドリアを二光子顕微鏡にて観察し、軸索内の細胞骨格の再構築についてミトコンドリアの軸索輸送の継時的変化を含めて観察し、軸索融合時のコントロールデータを取得。実験終了後、組織標本を作成し、光学顕微鏡・電子顕微鏡により神経近位・遠位を観察し、軸索内変化を組織学的にも検討することとした。さらに上記検討後、様々な細胞融合技術を用いた軸索融合実験を行った。利用する融合法は、PEG 法 (化学的融合法) (*J Neurocytol* 2000 29(9):633-43)、HVJ -E 法 (センダイウィルスエンベロップ法) (*Eng Med Biol Soc*. 2004) を用いた。

軸索機能回復過程を電気生理学的に観察検討した。また、実験前後の神経組織標本を作成し、光

学顕微鏡・電子顕微鏡により神経近位・遠位を観察し、軸索内変化を組織学的にも検討した。昨年度から引き続いてマウス下肢神経(坐骨神経)を用いて、キヤットウォークを用いた sciatic score による歩行機能評価 神経刺激装置を用いて筋電図および伝導速度の計測による神経機能評価 神経標本による形態学的評価の 3 評価を行った切断前に および を行い、切断後の神経変化について2週間後および4週間後に ~ の評価を行った。神経融合法は1 縫合、PEG、センダイウイルス、リポフェクタミン、電気刺激すべてによる融合2 縫合のみ(control)3 縫合 + PEG + 電気刺激(電気刺激の効果確認)の三グループを用いて行った。

4 . 研究成果

mito-GFP マウスによる軸索輸送は、二光子顕微鏡下に、安定的に観察でき、軸索を部分的に損傷することも可能であった。

この損傷やキシロカイン等の麻酔薬によってミトコンドリアの軸索輸送が停止する様子も観察することが可能であった。

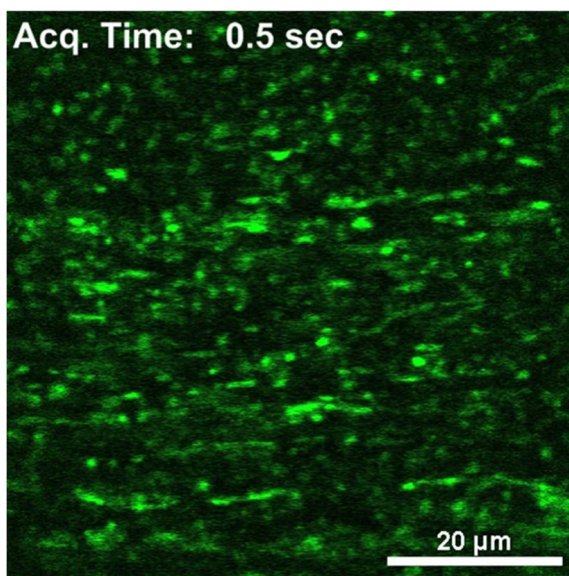


図 3mito-GFP マウスによる二光子顕微鏡下軸索輸送観察

ただ、神経融合法については、他の報告 (Roh, Joseph PRS2022) では PEG のみでも効果があったとされており、理論的には第 2 週までで回復を得られると考え実験を行ったが、今回の我々の検討では、電気生理学的に、筋電図および伝導速度の回復においてコントロール群と融合実験群で明らかな有意差を認めず、組織学的検討においては、融合法を用いた群で回復軸索数が少なく、神経損傷が強い傾向にあった。これは、我々の方法における PEG の種類・量・浸漬時間、セン

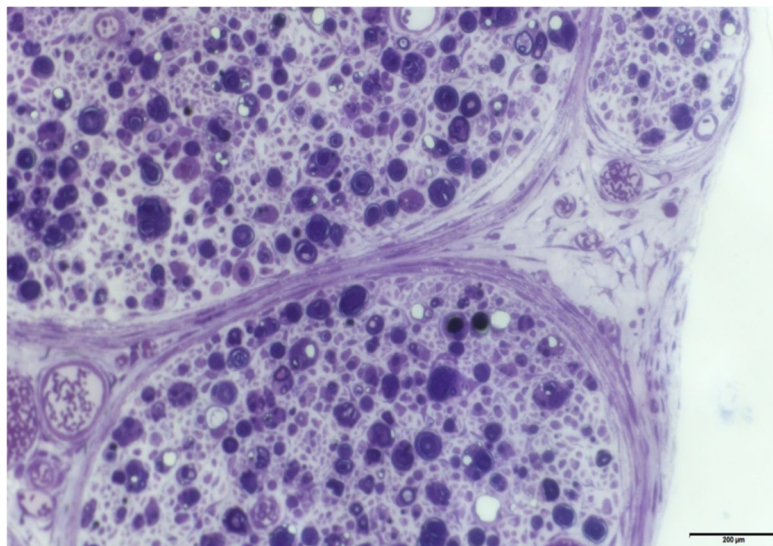


図 4 軸索融合実験後遠位側軸索断面

ダイウイルスの量・タイミング・浸漬時間、電気刺激の強度と時間等についてさらに細かく検討する必要がある可能性、または他の PEG を用いた報告でも軸索のワーラー変性が食い止められたとの報告ではなく、軸索融合ではない別の機序が神経再生に作用している可能性が示唆された。今後しばらくこの分野の動向を注視しながら、これら機序や方法の改善が得られるかについてももう少し進展があった場合に、その知見を踏まえて次のステップを検討する必要があると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 成島三長	4. 巻 78巻増刊5
2. 論文標題 肉腫-基礎・臨床の最新知見 肉腫の外科的治療 その他 神経移植・再建(解説/特集)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 408-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 成島三長	4. 巻 172
2. 論文標題 神経再生医療の最先端 遊離血管付き神経移植を用いた神経再建術の現在地	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PEPARS	6. 最初と最後の頁 50,57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 人工神経管による体幹部を含めた再建の可能性
3. 学会等名 第64回日本形成外科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 手足の創傷治療の最前線
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 眼窩周囲の形成外科治療
3. 学会等名 三重県眼科医会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 成島三長
2. 発表標題 神経損傷に対する様々な再建・再生治療
3. 学会等名 第22回日本口腔顎顔面外傷学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白石 真土 成島 三長
2. 発表標題 指外傷が寒冷不耐症に与える影響の検討(Influence of Blood Flow of Fingers after Finger Amputation on Cold Intolerance)
3. 学会等名 第47回日本マイクロサージャリー学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成島 三長
2. 発表標題 神経損傷に対する様々な再建・再生治療
3. 学会等名 第22回日本口腔学顔面外傷学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 成島 三長
2. 発表標題 イモリにおける再生と神経からScarless wound healingへの可能性を探る
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会総会・学術集会
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

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