

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K10261

研究課題名（和文）新しい顔面神経麻痺治療への脱分化脂肪細胞由来cell extractの応用

研究課題名（英文）Application of cell extract derived from dedifferentiated fat cells to a new treatment for facial palsy

研究代表者

岸本 直隆（Kishimoto, Naotaka）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：50610911

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：マウス脂肪組織から脱分化脂肪細胞（DFATs）と脂肪組織由来幹細胞（ADSCs）を樹立し、両細胞に凍結・溶解操作を繰り返すことでDFATs由来細胞抽出物（DFATs-CE）とADSCs由来細胞抽出物（ADSCs-CE）を獲得した。ADSCs-CEを培地へ添加したところ、シュワン細胞の増殖効果、脊髄後根神経節（DRG）ニューロン/PC12D細胞の突起伸長効果が認められた。また加熱処理したADSCs-CEを培地へ添加した際には、これらの効果が消失した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢性顔面神経麻痺は外傷や頭頸部腫瘍の外科的切除後に発生し、表情筋の機能不全に伴い病的共同運動や顔面拘縮など様々な後遺症を生じるため、患者は自然な表情や発話や摂食が困難となり、身体的・精神的な問題となる。自家神経移植は顔面神経の部分欠損に対するゴールドスタンダードとされているが、神経採取部位の感覚障害やparesthesia、採取可能な神経の長さの限界など問題点は多い。これらの現状に対し、低侵襲に樹立可能で、免疫原性・腫瘍原性が低いと考えられるADSCs-CEを用いた顔面神経麻痺への治療法を開発できれば、患者QOL改善に大きく貢献できると考える。これが本研究の意義である。

研究成果の概要（英文）：Dedifferentiated fat (DFATs) and adipose tissue-derived stem cells (ADSCs) were established from mouse adipose tissue, and DFATs-derived cell extracts (DFATs-CE) and ADSCs-derived cell extracts (ADSCs-CE) were obtained by repetition of the freezing and thawing on both cells. A proliferative effect on Schwann cells and a protrusion elongation effect on dorsal root ganglion (DRG) neurons / PC12D cells were observed when ADSCs-CE was added to the culture medium. However, these effects disappeared when heated ADSCs-CE were added to the medium.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：脂肪組織由来幹細胞 脱分化脂肪細胞 細胞抽出物 末梢神経再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢性顔面神経麻痺は外傷や腫瘍切除後に発生し、顔面拘縮など様々な後遺症を生じるため、患者は発話や摂食が困難となる。自家神経移植治療ゴールドスタンダードとされているが、神経採取部位の感覚障害や採取可能な神経の長さの限界など問題点が多い。これらを克服するために骨髄間質細胞 (BMSCs) や脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) など様々な幹細胞移植による顔面神経再生の研究が行われている。BMSCs を樹立するためには骨髄穿刺が必要であり、採取に伴う侵襲が大きい。ADSCs は皮下脂肪を少量採取することで樹立可能である。しかしどちらも骨髄また脂肪組織中においてはマイナーな細胞であり、不均一な細胞集団である。脱分化脂肪細胞 (DFATs) は少ない侵襲で採取可能であり、非常に純度が高く、骨、軟骨、脂肪などの細胞へ分化する多分化能を有している。近年では BMSCs や ADSCs を凍結・溶解して得られた細胞抽出物が幹細胞と同等の臓器再生効果を有することが報告され、幹細胞の使用と比べて腫瘍原性・免疫原性のリスクが低いことから注目されている。しかし、DFATs 由来細胞抽出物を顔面神経再生に応用した報告はない。

2. 研究の目的

研究背景を考慮し「DFATs 由来細胞抽出物の投与は顔面神経を機能的・組織学的に再生させ、顔面神経麻痺に対する新たな治療法となる」との仮説を立てた。本研究の目的は DFATs 由来細胞抽出物をラット顔面神経欠損モデルへ投与し、顔面神経の機能的・組織学的回復過程の評価を行い、臨床応用の可能性を探求することである。

3. 研究の方法

(1) 脱分化脂肪細胞 (DFATs) /脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) の樹立と細胞抽出物の作製

全身麻酔下でマウス鼠径部より脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理後に遠心分離を行うことで成熟脂肪細胞とストローマ分画 (SVF) を樹立した。天井培養法により成熟脂肪細胞から DFATs, SVF をプレートに播種することで ADSCs を樹立した。両細胞に凍結 (-80 度)・溶解操作を繰り返し、遠心分離後の上清を DFATs 由来細胞抽出物 (DFATs-CE) と ADSCs 由来細胞抽出物 (ADSCs-CE) として獲得した。また BCA Protein Assay Kit を用いて総タンパク濃度、Mouse Angiogenesis Array Kit を用いて細胞抽出物に含まれる血管新生関連因子の発現を解析した。

(2) シュワン細胞増殖能に対する細胞抽出物の効果

ラット不死化シュワン細胞を購入し、専用培地中に DFATs-CE または ADSCs-CE を種々のタンパク濃度で添加し、MTT assay にて細胞数を測定した。

(3) シュワン細胞の GFAP 発現に対する ADSCs-CE の効果

ラット不死化シュワン細胞の培地へ ADSCs-CE (タンパク濃度 12.5 µg/ml に調整), または 95°C で 60 分間加熱した ADSCs-CE を添加し、GFAP ELISA Kit を用いてシュワン細胞の GFAP 発現量を測定した。

(4) 神経細胞および PC12D 細胞の神経突起伸長に対する ADSCs-CE の効果

ラット脊髄後根神経節 (DRG) ニューロン, PC12D 細胞の培地へ ADSCs-CE, または加熱した ADSCs-CE を添加し、神経突起の伸長効果を評価した。

(5) 下歯槽神経切断部位への ADSCs-CE の移植

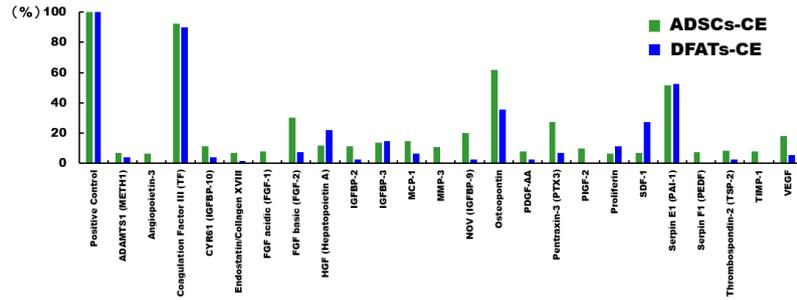
全身麻酔下でラット下歯槽神経を露出し、切断後、生体吸収性ハイドロゲル (MedGel® 粒子 II) を足場として生食または ADSCs-CE を移植した。移植から 7 日後、下歯槽神経を取り出し、Protein Gene Products (PGP9.5) 抗体を用いた免疫染色を行った。

(6) ADSCs-CE 移植後の頭部逃避閾値の測定

上記 (5) の移植から 1, 3, 7, 14 日後に Semmes-Weinstein モノフィラメントを用いて、ラットオトガイ部における頭部逃避閾値の測定を行った。

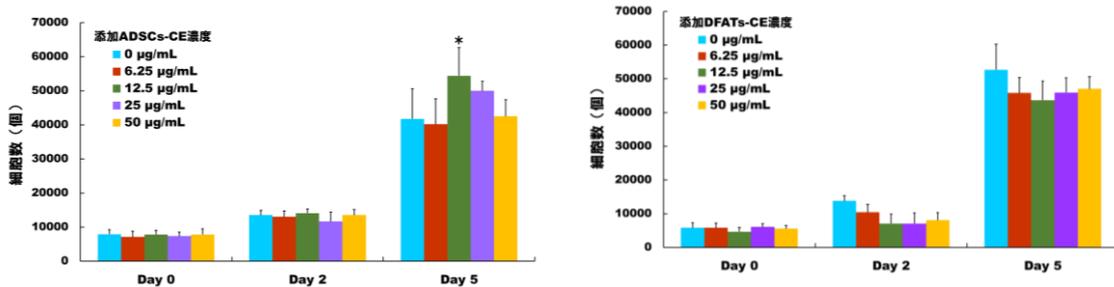
4. 研究成果

(1) DFATs-CE および ADSCs-CE に含まれる血管新生関連因子



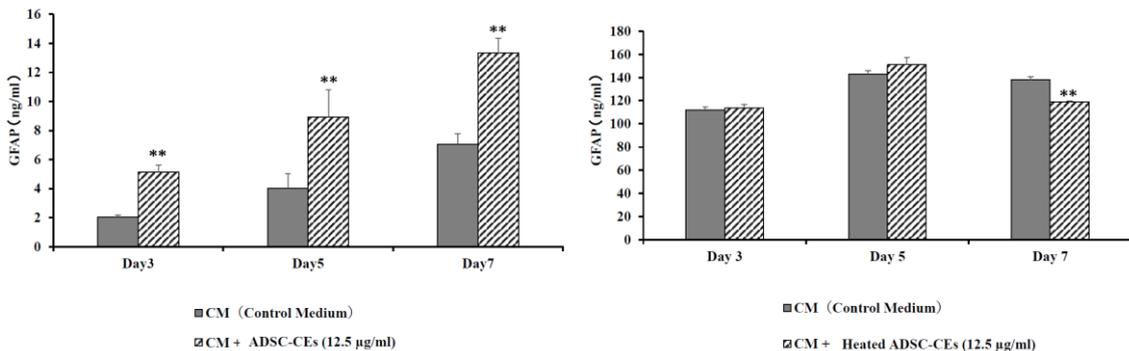
DFATs-CE, ADSCs-CE とともに VEGF, bFGF など様々な血管新生関連タンパクを発現していた。DFATs-CE のタンパク濃度は 4.85 mg/mL, ADSCs-CE のタンパク濃度は 4.01 mg/mL であった。

(2) ADSCs-CE はシュワン細胞を増殖させる



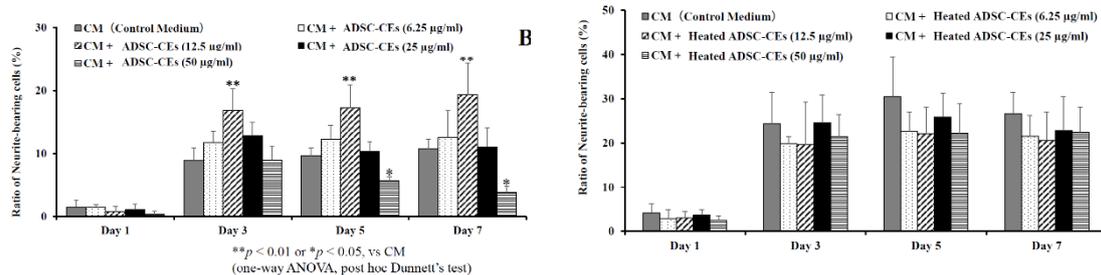
タンパク濃度を 12.5 μg/mL に調整した ADSC-CE の添加により、培養 5 日目にシュワン細胞数の有意な増加が認められた (左図)。一方、DFATs-CE の添加ではシュワン細胞数の増加は認められなかった (右図)。*P < 0.01 vs 0 and 6.25 μg/mL

(3) ADSCs-CE はシュワン細胞の GFAP 発現量を増加させる

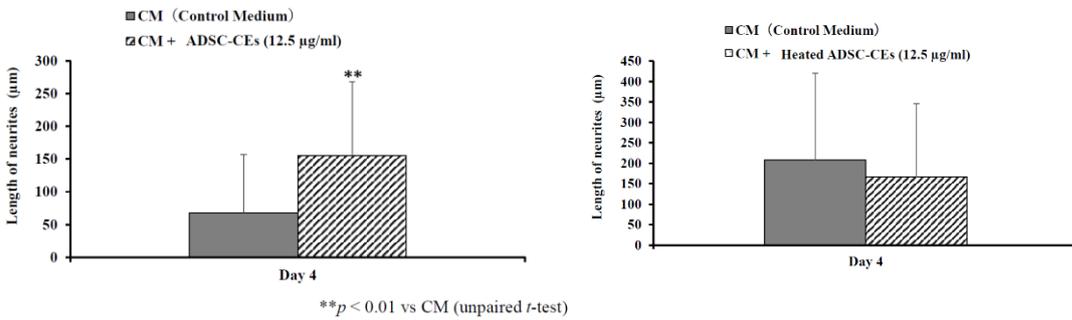


タンパク濃度を 12.5 μg/mL に調整した ADSCs-CE の培地添加により、無添加 (CM) の場合と比較して、すべての時点でシュワン細胞の GFAP 発現量が有意に増加した (左図)。一方、加熱処理した ADSCs-CE (Heated ADSCs-CE) では GFAP 発現量の増加は認められなかった (右図)。**P < 0.01 vs CM

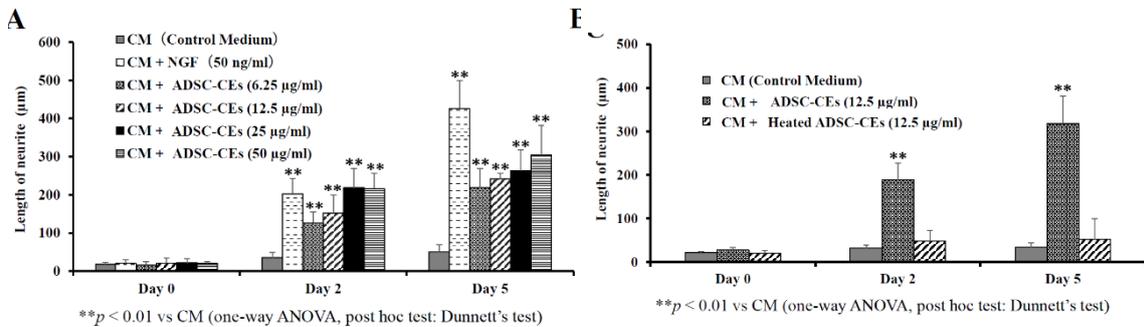
(4) ADSCs-CE は神経細胞および PC12D 細胞の神経突起伸長を促進する



タンパク濃度を 12.5 ug/mL に調整した ADSCs-CE の培地への添加によって、細胞体より長い突起を有する DRG ニューロン (neurite-bearing cells) の割合が無添加 (CM) の場合と比較し、有意に増加した (左図). 一方、加熱処理した ADSCs-CE (Heated ADSCs-CE) ではこの効果は認められなかった (右図).

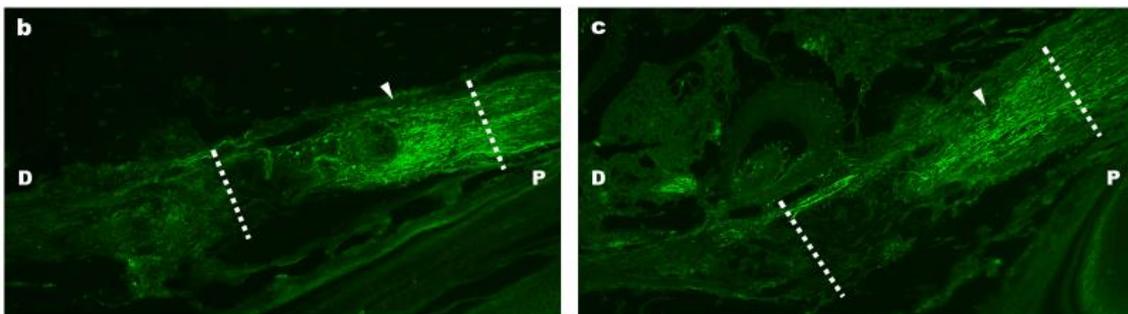


タンパク濃度を 12.5 ug/mL に調整した ADSCs-CE の培地添加によって、DRG ニューロンの神経突起長は無添加 (CM) の場合と比較し、有意に増加した (左図). 一方、加熱処理した ADSCs-CE (Heated ADSCs-CE) ではこの効果は認められなかった (右図).



タンパク濃度を 12.5 ug/mL に調整した ADSCs-CE の培地添加によって、PC12D 細胞の神経突起長は無添加 (CM) の場合と比較し、有意に増加した (左図). 一方、加熱処理した ADSCs-CE (Heated ADSCs-CE) ではこの効果は認められなかった (右図).

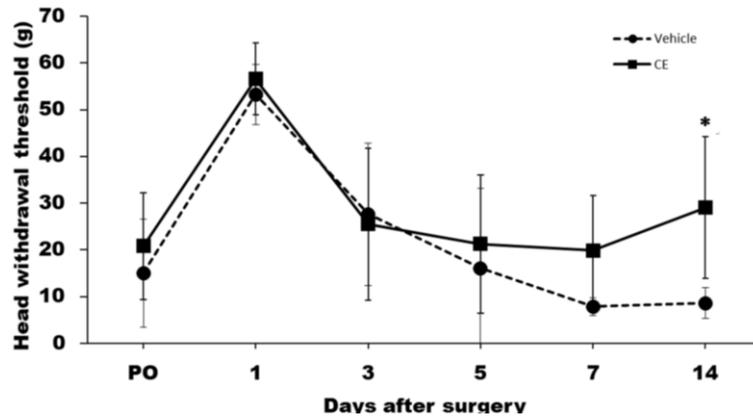
(5) 切断された下歯槽神経に対する ADSCs-CE の再生効果



Protein Gene Products (PGP9.5) による軸索伸長の評価

生食移植群 (左図) では切断側近位断端 (P) から遠位断端 (D) に向かって放射状に伸長した乱雑な神経線維 (矢頭) が認められた. ADSCs-CE 移植群 (右図) では近位断端から遠位への乱れのない神経線維 (矢頭) の伸長が認められた.

(6) 頭部逃避閾値に対する ADSCs-CE の効果



頭部逃避閾値の経時的変化

移植 14 日後、生食移植群 (Vehicle) と比較して ADSCs-CE 移植群 (CE) では有意に閾値が上昇した。生食移植群では機械的アロディニアによる閾値の上昇が認められたが、ADSCs-CE 移植群では細胞抽出物の神経再生効果により機械的アロディニアの発生が抑制された可能性が示唆された。*P < 0.05 vs Vehicle

本研究課題では当初、DFATs-CE の神経再生効果を評価する予定であったが、シュワン細胞増殖能および GFAP 発現量の評価において有用性が認められなかった。一方、ADSCs-CE はシュワン細胞に対する有用性が認められたため、本研究課題では ADSCs-CE を用いた神経再生の効果を評価することへ計画を変更した。また当初、顔面神経切断モデルによる In Vivo での評価を検討していたが、モデル作製が困難であったこと、下歯槽神経切断手術に関する指導を受ける機会を得たことから、下歯槽神経切断モデルを用いた評価へと計画を変更した。

本研究課題の成果より、ADSCs-CE はシュワン細胞の増殖/GFAP 発現、DRG ニューロンの神経突起伸長、PC12D 細胞の神経突起伸長を促進させる効果を有し、さらに下歯槽神経切断後の神経線維の再生および行動実験 (頭部逃避閾値の測定) における有用性が認められたことから、幹細胞に代わる末梢神経再生治療への新たな選択肢となる可能性が示唆された。また ADSCs-CE のこれらの有用性が、ADSCs-CE を加熱することで消失したことから、ADSCs-CE に含まれるタンパクが神経系細胞 (シュワン細胞、DRG ニューロン、PC12D 細胞) を活性化させる因子であった可能性がある。今後、顔面神経切断モデルの確立と顔面神経再生における ADSCs-CE の有用性を検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

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 第49回 日本歯科麻酔学会総会・学術集会
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 第49回 日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本直隆, 今井有蔵, 小山祐平, 氏田倫章, 沢田詠見, 山崎 学, 田沼順一, 武内恒成, 瀬尾憲司
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞に由来するcell extractの末梢神経再生におけるactive componentの解析
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山祐平, 岸本直隆, 山崎 学, 今井有蔵, 氏田倫章, 沢田詠見, 田沼順一, 瀬尾憲司
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞からのcell extractが末梢神経再生に及ぼす効果
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小山祐平, 今井有蔵, 岸本直隆, 山崎 学, 氏田倫章 田沼順一, 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 Kishimoto N, Yamazaki M, Tanuma J, Tran SD, Seo K.
2. 発表標題 Effectiveness of Cell Extract from mouse adipose-derived stem cells and dedifferentiated fat cells for peripheral nerve regeneration.
3. 学会等名 IARS 2019 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井有蔵, 岸本直隆, 山崎 学, 小山祐平, 氏田倫章, 田沼順一, 瀬尾憲司
2. 発表標題 脂肪組織由来幹細胞、脱分化脂肪細胞に由来するcell extractの末梢神経再生における有用性
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井有蔵, 岸本直隆, 小山祐平, 山本 徹, 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内における末梢神経再生に影響する因子の検討 (in vitro)
3. 学会等名 第51回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岸本直隆
2. 発表標題 脂肪組織に由来する細胞源の歯科再生医療への応用
3. 学会等名 第51回日本歯科麻酔学会総会・学術集会（学術委員会指定講演）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今井有蔵, 岸本直隆, 小山祐平, 山本 徹, 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から抽出した細胞抽出物の末梢神経再生に影響する因子の探索
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小山祐平, 岸本直隆, 山本 徹, 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cell extractによる末梢神経再生の組織透明化による三次元画像を用いた評価
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024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	佐藤 友里恵 (山田友里恵) (Sato Yurie) (20804537)	新潟大学・医歯学系・助教 (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	瀬尾 憲司 (Seo Kenji) (40242440)	新潟大学・医歯学系・教授 (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