

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：13101

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2022

課題番号：19KK0416

研究課題名（和文）脱分化脂肪細胞由来cell extractの末梢神経再生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of peripheral nerve regeneration mechanism by cell extract derived from dedifferentiated fat cells

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） 11,500,000円

渡航期間： 11ヶ月

研究成果の概要（和文）：脂肪組織を採取し、脱分化脂肪細胞（DFATs）と脂肪組織由来幹細胞（ADSCs）を獲得し、それらに凍結・解凍操作を繰り返すことで、DFATs由来細胞抽出物（CE-DFATs）、ADSCs由来細胞抽出物（CE-ADSCs）を作製した。神経系細胞の培地にCE-ADSCs、またはタンパクを不活性化したCE-ADSCsを添加したところ、CE-ADSCs添加群のみで細胞の増殖、突起伸長効果が認められた。これらの結果から、神経系細胞に対するCE-ADSCsのポジティブな効果は、CE-ADSCsに含まれるタンパクによるものと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷や頭頸部腫瘍切除後に発生する顔面神経麻痺は発話や食事に影響を及ぼすことから、患者QOLを著しく低下させる。外科的治療として自家神経移植が一般的に行われているが、神経採取部位の感覚障害が問題となる。本研究では自家神経移植に代わる治療法の開発を目指し、DFATsおよびADSCsに由来する細胞抽出物の組織再生効果に着目した。CE-ADSCsに含まれるタンパクが末梢神経再生に寄与する可能性が示唆されたことから、今後ヒトへの臨床応用を目指し研究を続けることで、顔面神経麻痺に対する新しい治療法の選択肢を提供できると期待される。この点が本研究の学術的・社会的意義である。

研究成果の概要（英文）：Adipose tissue was collected to obtain dedifferentiated fat cells (DFATs) and adipose tissue-derived stem cells (ADSCs). Cell extract-derived from DFATs (CE-DFATs) and cell extract-derived from ADSCs (CE-ADSCs) were prepared by repeatedly freezing and thawing them. When CE-ADSCs or protein-inactivated CE-ADSCs were added to the media of neural cells, cell proliferation and neurite outgrowth were observed only in the CE-ADSCs-added group. These results suggest that the positive effects of CE-ADSCs on neural cells are due to proteins contained in CE-ADSCs.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：細胞抽出物 脱分化脂肪細胞 脂肪組織由来幹細胞 末梢神経再生 顔面神経麻痺

1. 研究開始当初の背景

外傷や頭頸部腫瘍切除後に発生する顔面神経麻痺は表情筋の機能不全を伴い、発話や食事に影響を及ぼすことから患者 QOL を著しく低下させる。外科的治療として自家神経移植が一般的に行われているが、神経採取部位の感覚障害や神経筋接合部の萎縮変性により運動機能が回復しにくいことが問題となる。本研究の基課題（「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」）では、高い純度と増殖能、多分化能を有する脱分化脂肪細胞 (DFATs) から細胞抽出物 (cell extract) を作製し、神経筋接合部へ投与することで顔面神経麻痺に対する新しい治療法の開発を目指す。研究ゴール達成には cell extract の組織再生メカニズムの解明が不可欠である。本研究では cell extract を用いた再生研究で著名な実績をあげているカナダ McGill University と共同研究を企図し、各種の超解像度顕微鏡による脱分化脂肪細胞由来 cell extract 移植の評価を行い、臨床応用につなげる。McGill University は cell extract のメカニズム解明のための多様な研究手法に精通し、また神経科学の研究機関が附置されている。基課題の成果から既に脱分化脂肪細胞由来 cell extract の有用性が示唆されており、本研究で網羅的な形態的分析を行うことにより、相乗的な効果が生まれ顔面神経麻痺への新たな治療法が確立される。

2. 研究の目的

基課題の研究目的はヒト DFATs 由来 cell extract (CE-DFATs) をラット顔面神経欠損モデルへ投与し、神経筋接合部をメインターゲットとした顔面神経の機能的・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。基課題の成果から、CE-DFATs はシュワン細胞にポジティブな効果を与え、顔面神経をはじめとした末梢神経再生において有用な可能性がある。しかしながら、cell extract はタンパク、炭水化物、脂質、核酸といった様々な因子を含んでおり、その中でどの因子が末梢神経再生に有効かは不明である。共同研究先である McGill University の研究から、cell extract に含まれるタンパクが組織再生効果をもたらす因子 (active component) であることが示されており (*Sci Rep.* 2015;5:16017.), CE-DFATs に含まれる active component も同様にタンパクではないかと仮説を立てた。本研究の目的はタンパクを不活性化した CE-DFATs による神経筋接合部の再生効果を評価し、基課題の結果と比較することで CE-DFATs 中の顔面神経再生における active component を同定することである。

3. 研究の方法

McGill University の関連病院である Montreal General Hospital における口腔外科手術時に、頬脂肪体を採取予定であったが COVID-19 の感染拡大による影響で、病院への立ち入りが困難となったため、マウスより脂肪組織を採取した。脂肪組織を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) と脂肪組織由来幹細胞 (ADSCs) を樹立した。凍結・解凍操作を繰り返し、両細胞の構造を破壊した後、遠心分離を行い、上清を DFATs 由来細胞抽出物 (CE-DFATs)、ADSCs 由来細胞抽出物 (CE-ADSCs) として獲得した。予備実験として CE-DFATs、CE-ADSCs をシュワン細胞培地に添加したところ、CE-ADSCs にのみ細胞増殖効果が認められたことから、以後の実験には CE-ADSCs を用いた。

シュワン細胞、PC12D 細胞、脊髄後根神経節 (DRG) ニューロンを準備し、それぞれの培地に CE-ADSCs、または熱処理によってタンパクを不活性化した CE-ADSCs を添加した。シュワン細胞増殖能、シュワン細胞マーカーである GFAP 発現量、PC12D 細胞および DRG ニューロンの突起伸長効果をそれぞれの cell extract 添加の条件下で評価した。

次に全身麻酔下でラットの下歯槽神経を切断し、同部に CE-ADSCs を足場材料(ハイドロゲル)とともに移植した。また CE-ADSCs 移植群以外に、神経露出手術のみの Sham 群、生理食塩水を移植した Vehicle 群の 2 つを設定した。切断側オトガイ部領域に対する機械的刺激に応答する頭部逃避閾値を Semmes-Weinstein monofilaments を用いて測定した。また移植後 12 日目に神経トレーサーをオトガイ神経に注入し、注入後 2 日目に灌流固定を行い、三叉神経節を取り出した。取り出した三叉神経節に透明化処理を施し、2 光子顕微鏡で撮影することで、三次元画像を構築した。三次元画像上でトレーサーに標識された細胞体の数、大きさを比較した。

4. 研究成果

CE-ADSCs 添加群ではシュワン細胞の増殖、GFAP 発現量の増加、PC12D 細胞および DRG ニューロンの突起伸長効果が認められたが、タンパクを不活性化した CE-ADSCs 添加群では、それらの効果が認められなかった。これらの結果から、In Vitro での神経系細胞に対する CE-ADSCs のポジティブな効果は、CE-ADSCs に含まれるタンパクによるものと推察された。

オトガイ部への機械的刺激に応じた頭部逃避閾値の経時変化では Vehicle 群、CE-ADSCs 移植群ともに移植後 1 日目で手術前と比較して閾値は有意に上昇し、最大値を示した。その後、Vehicle 群では閾値が低下し続け、7 日目で最低値となり、14 日目でも変化が認められなかった。

一方、CE-ADSCs 移植群では 14 日目で Vehicle 群と比較して、有意に閾値が高く、神経切断手術前のレベルになった。トレーサーで標識された三叉神経節の細胞体は、生食移植群と比較して CE-ADSCs 移植群で数が少なく、細胞の直径が大きいことが明らかとなった。このように In Vivo においても組織透明化と 3 次元イメージングの手法 (図) を用いて、末梢神経再生のメカニズム解明に向けた研究を行った。

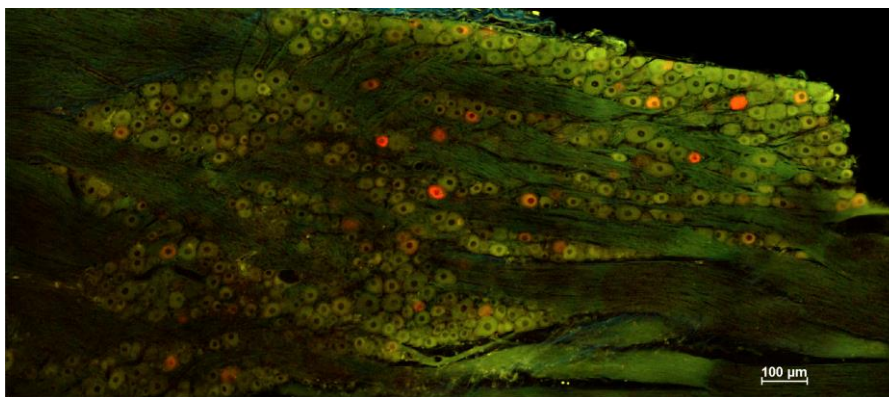


図. CE-ADSCs 移植群において神経トレーサーで標識された三叉神経節の細胞体 (赤色)

cell extract を用いた組織再生の研究に関しては、共同研究先の McGill University にて骨髄細胞 (BMCs) 由来 cell extract (CE-BMCs) が放射線照射後の唾液流出率の改善に効果的であること (*PLoS One*. 2013;8:e61632.)、CE-BMCs には複数の血管新生関連タンパクが含まれ、CE-BMCs に含まれるタンパクが唾液腺再生効果をもたらす因子であること (*Sci Rep*. 2015;5:16017.) が報告されている。さらに放射線照射後の唾液腺再生に最適な CE-BMCs の投与時期や投与頻度を調査 (*J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12:e1195-e1205.) したり、凍結乾燥 (フリーズドライ) した CE-BMCs にも唾液腺再生効果が認められることを報告 (*Oral Dis*. 2018;24:202-206.) するなど、より臨床的な視点から CE-BMCs の有用性が検討されている。しかしながら、cell extract を末梢神経再生に応用した研究はない。本研究によって CE-ADSCs に含まれるタンパクが末梢神経再生に寄与する可能性が示唆されたことから、今後ヒトへの臨床応用を目指し研究を続けることで、顔面神経麻痺に対する新しい治療法の選択肢を提供できると期待される。今後はタンパクの中のどの成分 (もしくは複数の成分の組み合わせ) が active component であるかの解析を進め、末梢神経再生効果の機序解明を目指していきたい。また本研究では当初予定していた CE-DFATs の効果が認められなかったため、同じく脂肪組織より樹立された ADSCs 由来の cell extract を主として実験に用いた。DFATs と ADSCs は細胞の純度に差があることが報告されており (*J Cell Physiol*. 2008;215:210-222.)、今回の結果もその影響があったのかもしれない。DFATs と ADSCs の細胞特性に着目し、どちらがより臨床応用に適した細胞源であるのかについても検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

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作製したCell Extractが末梢神経細胞再生に影響する因子の検討
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山祐平、岸本直隆、今井有蔵、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由来cell extract の末梢神経再生効果の神経トレーサー を用いた三次元的検討
3. 学会等名 第50回日本歯科麻酔学会学術集会
4. 発表年 2022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学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023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 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 Yuhei KOYAMA, Naotaka KISHIMOTO, Yuzo IMAI, Junichi TANUMA, Kosei TAKEUCHI, Takeyasu MAEDA, Kenji 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 50th annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuzo IMAI, Naotaka KISHIMOTO, Yuhei KOYAMA, Junichi TANUMA, Kosei TAKEUCHI, Takeyasu MAEDA, Kenji 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 50th annual meeting (国際学会)
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

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	トラン サイモン (Tran Simon)	マギル大学・歯学部・教授	

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			
カナダ	McGill University			