

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22974

研究課題名（和文）脂肪由来幹細胞シートを付加した強化型自家神経移植による末梢神経再生の研究

研究課題名（英文）Enhanced nerve autograft using adipose-derived stem cell sheets

研究代表者

村井 惇朗（Murai, Atsuro）

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：40882501

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ラットの坐骨神経15mm欠損に対して自家神経移植術を行い、自家神経移植部位に脂肪由来幹細胞にアスコルビン酸を添加することで作製した脂肪由来幹細胞シートを投与した。その結果、対照群と比較して移植後12週における神経再生効果が得られていた。また、脂肪由来幹細胞はシート化することで懸濁液と比較して神経周囲に大量に細胞を担持することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷や腫瘍の切除によって生じる末梢神経の欠損に対するgold standardは自家神経移植であるが、その成績は十分ではない。今回、神経縫合部位に脂肪由来幹細胞シートを投与することで自家神経移植術の成績が向上することが確認できた。本研究の結果を臨床応用することができれば、現在の自家神経移植術の成績を向上させる可能性があり、自家神経移植術後の四肢の機能回復を向上させる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We performed nerve autograft on a 15-mm defect of the sciatic nerve in rats, and adipose-derived stem cell sheets prepared by adding ascorbic acid to adipose-derived stem cells were administered at the nerve autograft site. As a result, compared to the control group, nerve regeneration effect at 12 weeks after transplantation was achieved. In addition, adipose-derived stem cells were able to carry a larger amount of cells in the perineuronal area by sheet formation than in suspension.

研究分野：末梢神経

キーワード：脂肪由来幹細胞 末梢神経 神経再生 自家神経移植

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。

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の欠損は外傷や腫瘍性病変の切除により生じる疾患であり、米国では末梢神経の欠損に対して年間 13～19 億ドルもの医療費が計上されている。末梢神経の欠損は運動障害や知覚障害をきたし、外傷や腫瘍性病変の治療が達成されても末梢神経再生の成績が悪ければ生活の質が著しく低下するため、末梢神経再生の成績向上が必要である。

現在、末梢神経の欠損に対する治療の gold standard は欠損部とは別の部位から健常な神経を採取して移植するという自家神経移植である。しかし、その適応は 100mm 程度までの末梢神経の欠損に限られており、自家神経移植を行っても十分な機能回復が得られるのは 50% に満たないことが報告されている。そのため、自家神経に替わる再建材料として生体吸収性材料を用いた人工神経や脱細胞化処置により抗原性を取り除いた同種処理神経を用いた研究が行われているが、これらの成績は自家神経移植の成績に遠く及ばないのが現状である。そこで申請者は末梢神経の欠損に対して十分な機能回復を得るためには、自家神経を強化して移植することこそが最善の方法であると考えた。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに脂肪由来幹細胞 (Adipose-derived stem cells: 以下 ADSCs) が人工神経、同種処理神経の神経再生を促進することを確認してきた。また、ADSCs をシート状にした ADSC シートが神経再生を強く誘導することも確認してきた。^(1,2) このことから、自家神経移植の成績を向上させるためには自家神経移植を行った部位に ADSC シートを付加することで神経再生を促進すると考えた。本研究の目的は、自家神経移植に ADSC シートを付加することで自家神経移植の治療成績を向上させることである。また、治療成績が向上することを確認した場合、脂肪由来幹細胞シートが神経再生を促進した作用機序を検討することである。

3. 研究の方法

ADSCs は、Zuk らの報告⁽³⁾ した方法でラットの鼠径部から採取した脂肪組織を酵素処理、分離培養を行うことで作製した。第 3 継代後の ADSCs にアスコルビン酸を投与してあらかじめ ADSC シートを作製した (図 1)。ラットの左坐骨神経を展開し、15mm 坐骨神経を採取して欠損を作製し、採取した 15mm の坐骨神経を反転させて縫合し自家神経移植を行った。神経移植直後に神経移植を行った周囲にリン酸緩衝生理食塩水 (以下 PBS) を 200 μ l 投与した Control 群、ADSCs を PBS200 μ l に懸濁させた ADSCs 懸濁液を投与した ADSCs 群、また ADSC シートで移植神経周囲を被覆した Sheet 群の 3 群を作製した。

評価内容に関して、移植後 12 週における成績の評価として、運動機能評価に Sciatic function index (以下 SFI)、神経機能の評価に前脛骨筋の複合筋活動電位の終末潜時と振幅 (患健側比) および前脛骨筋の筋湿重量 (患健側比) を測定した。また、移植後 1 週における DiI 標識した移植細胞の局在の評価、移植後 1、4、7、14、28 日における realtime RT-PCR による神経移植片の遺伝子評価 (VEGF、NGF、TGF- β 、P21、iNOS、Arginase1) を行った。

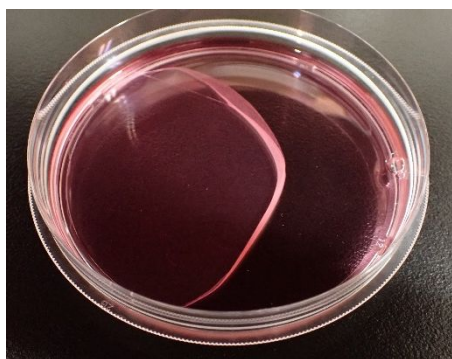


図 1. 作製した ADSC シート

4. 研究成果

移植後 12 週における成績の評価

前脛骨筋の筋湿重量、複合筋活動電位の終末潜時に関して Sheet 群が Control 群よりも有意な改善を認めた。また、複合筋活動電位の振幅や SFI に関して有意差は認めなかったものの Sheet 群が良好な結果を認めた。

移植後 1 週における移植した細胞の局在の評価

移植後 1 週において ADSCs 群では神経周囲 ADSCs がほとんどみられなかったものの、Sheet 群

では神経周囲に ADSCs が担持されていた。

VEGF、NGF、TGF- β 、P21 に関しては 3 群においてある一定の傾向はみられなかった。iNOS、Arginase1 のマクロファージマーカーに関して、Sheet 群が移植後早期に Control 群と比べて増加していた。

本研究の結果から、ADSC シートを移植した自家神経の周囲に投与することで自家神経移植の成績を向上させることがわかった。ADSC シートは ADSCs を懸濁液として投与するより移植神経周囲に大量に担持できることから、ADSCs の投与方法として有効な方法であると考えた。また、ADSCs が神経再生を促進している要因としては、移植神経内のマクロファージに影響を与えることが要因の一つであることが示唆された。

< 引用文献 >

1. Nakajima T, Tada K, Nakada M, et al. Facilitatory effects of artificial nerve filled with adipose-derived stem cell sheets on peripheral nerve regeneration: An experimental study. J Orthop Sci. 2020.
2. Nakada M, Itoh S, Tada K, et al. Effects of hybridization of decellularized allogenic nerves with adipose-derive stem cell sheets to facilitate nerve regeneration. Brain Res. 2020;1746:147025.
3. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng. 2001;7(2): 211-28.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 村井惇朗 多田 薫 赤羽美香 松田匡司 中村勇太 土屋弘行
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞シートを付加した強化型自家神経移植による神経再生効果の研究
3. 学会等名 第64回日本手外科学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuro Murai, Kaoru Tada, Mika Nakada, Masashi Matsuta, Yuta Nakamura, Hiroyuki Tsuchiya
2. 発表標題 Peripheral Nerve Regeneration with Enhanced Nerve Autograft using Adipose-derived Stem Cell Sheets
3. 学会等名 FESSH 2021 CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井惇朗 多田薫 中村勇太 赤羽美香 松田匡司 土屋弘行
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞シートを付加した自家神経移植の神経再生と遺伝子発現
3. 学会等名 第32回日本末梢神経学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井惇朗 多田 薫 赤羽美香 松田匡司 中村勇太 土屋弘行
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞シートで被覆した自家神経移植術の移植成績
3. 学会等名 第36回日本整形外科基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuro Murai, Kaoru Tada, Yuta Nakamura, Mika Akahane, Masashi Matsuta, Hiroyuki Tsuchiya
2. 発表標題 Nerve Autograft using Adipose-derived Stem Cell Sheets promotes nerve regeneration.
3. 学会等名 第5回アジア太平洋マイクロサージャリー学会（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsuro Murai, Kaoru Tada, Mika Akahane, Masashi Matsuta, Yuta Nakamura, Hiroyuki Tsuchiya
2. 発表標題 Nerve Regeneration and Gene Expression in Nerve Autograft Wrapped with an Adipose-derived Stem Cell Sheets
3. 学会等名 2022年アメリカ整形外科学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村井惇朗 多田 薫 中村勇太 赤羽美香 松田匡司 土屋弘行
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞シートは局所に細胞を担持して自家神経移植の成績を向上させる
3. 学会等名 第65回日本手外科学術集会
4. 発表年 2022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
研究協力者	多田 薫 (Tada Kaoru)	金沢大学・整形外科学・助教 (13301)	

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
---------	---------