

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591643

研究課題名（和文） 骨格筋由来多能性幹細胞移植と生体吸収チューブを用いた末梢神経再生

研究課題名（英文） Regeneration of Damaged Peripheral Nerve using Skeletal Muscle-Derived Multipotent Stem Cell co-using with Absorbable Tube

研究代表者

内山 善康（UCHIYAMA YOSHIYASU）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80317784

研究成果の概要（和文）：研究成果の概要（和文）：骨格筋間質幹細胞群（Sk-34、Sk-DN 細胞）を含んだ総合増幅型幹細胞群を使用し、再生不能な広範囲マウス坐骨神経欠損を再生する実験を行った。エタノール処理した生体チューブ内に幹細胞群を移植した結果、移植後 4 週間で欠損部分に移植細胞由来 GFP 陽性のシュワン細胞、神経内膜・周膜細胞が軸索再伸展を補助する形で出現し、神経そのものを架橋していた。術後 8 週には、移植細胞はチューブ領域を超えて両断端のレシピエント神経内へ拡散していた。したがって骨格筋間質由来幹細胞は末梢神経再生治療に対して、最適な細胞群であると考えられ、臨床応用を目指してさらに研究を続けていきたい。

研究成果の概要（英文）：To develop the new therapy for the irreversible long nerve deficit, we applied skeletal muscle-derived multipotent stem cell sheet pellets (Sk-MSGSPs), as a novel alternative source of nerve autograft. We used the tube to the decellularized conduit (dehydrated esophageal submucous membrane by 70% ethanol). After 4 weeks, conduit was filed by GFP+ cells/tissues, and engrafted GFP+ donor cells/tissues obviously stretch back to proximal portion of recipient nerve. After 8 weeks, the above properties were more enhanced. These results strongly suggested that Sk-MSGSPs may be the best suitable stem cells for the long nerve gap therapy. Therefore, we want to continue further study with the aim of clinical application.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨格筋幹細胞・末梢神経・再生・生体吸収性チューブ

1. 研究開始当初の背景

大幅な末梢神経欠損・損傷の治療では、健常部からの神経採取による自家神経移植法がある。この場合、健常部の部分的機能消失

（感覚神経による麻痺）は避けられない。これに代わる代替え方法として、シリコンチューブや生体吸収性チューブ（I型 collagen tube、ポリグリコール酸 PGA tube etc.）で

神経欠損部を架橋する方法が実験的、臨床的に行われている。しかし、この方法はあくまでも残存神経の再生能力に頼ったものであり、再生範囲に限界がある。そこでこれらのチューブ治療と細胞移植治療を組み合わせることで、より活発な組織再生と長い末梢神経修復が期待できるのではないかと考えた。一方、申請者らのグループは骨格筋間質から多能性の幹細胞群 (Sk-34 細胞: CD34+/CD45-, Sk-DN 細胞: CD34-/CD45-) を見出し、マウス重度筋損傷モデルに移植することで、骨格筋細胞はもとより血管系細胞 (血管内皮、血管平滑筋、pericytes)、さらに筋内末梢神経系細胞 (シュワン細胞、神経周膜) に分化し、損傷した神経・筋・血管をユニットとして再構築し、質量・機能ともに非移植群の 3 倍を超える回復を助長した (Tamaki, Uchiyama et al. *Circulation* 2005; *Histochem Cell Biol* 2007)。特に、末梢神経においては、ドナー由来のシュワン細胞 (GFAP 陽性) がレシピエントの再生神経軸索 (無髄、有髄の両方) をしっかり取り囲み、有髄神経ではミエリンを形成、さらにその周囲をドナー由来の神経周膜が覆っていた。即ち、ドナー由来の細胞が形成した外筒の中を、レシピエントの再生神経軸索が伸張していき、最終的に欠損部分の架橋が成立するものと考えられた。この能力をもつ幹細胞を神経損傷部へ直接移植あるいは神経欠損部に架橋したチューブ内に移植することによって、末梢神経再生に利用することを考えた。

2. 研究の目的

現在行われている大幅な末梢神経欠損・損傷の治療 (自家神経移植、チューブ再建法) では、再生範囲に限界がある。本研究はこの限界を埋めるべく、生体吸収性チューブによる架橋にプラスして、活発なシュワン細胞への分化能を持つ骨格筋由来幹細胞を同時に移植し、末梢神経をより機能的に、広範囲に、さらに早期の再生を促そうとするものである。

3. 研究の方法

GFP マウス骨格筋間質から抽出した Sk-34 細胞と Sk-DN 細胞を同系マウス坐骨神経挫滅モデルに直接移植する実験と広範囲切除モデル (7mm 以上) に生体吸収性チューブで架橋し、その中に幹細胞群を同時移植する。

また臨床应用到近づける目的で、骨格筋間質由来幹細胞をより効率的に増幅し、神経損傷治療に応用することを試みた (骨格筋由来総合増幅型幹細胞群)。骨格筋間質由来幹細胞群を抽出した後、分離・精製せずに分化を抑えた形で増幅培養し、マウス坐骨神経損傷モデルを用いて分化能力を検討した。

移植後の再生神経内での細胞動向及び分化状況を組織学的に解析し、非移植群と比較、神経再生能を *in vivo* で検討した。

実験動物: 正常 6-10 週令マウスをレシピエントに、GFP-TG マウスをドナーに用いた。

骨格筋間質幹細胞分離・純化: 酵素処理により骨格筋より細胞を分離、細胞表面抗原 (CD34, CD45)、セルソーター (FACSaria) を用いて純化する。

これまでの実験結果から申請者らが見出した「骨格筋間質由来幹細胞群」には幹細胞としてある程度分化したもの (CD34 陽性で CD45 陰性: Sk-34) と、極めて未分化なもの (CD34, CD45 とともに陰性: Sk-DN) が存在する。Sk-34 細胞は、比較的豊富に存在し、抽出・分離・精製後直ちに利用可能 (むしろ、直ちに利用した場合の方が myogenic な能力は高い) である。一方、未分化な Sk-DN 細胞は、数は少ないが、分裂・増殖能力に富み (コラーゲンをベースとしたコロニー培養系で、細胞塊 [スフェア] を形成するなど)、多分化能を維持した状態での細胞増幅が可能である。従って、移植実験は分離・精製直後の Sk-34 細胞と培養増幅 (5 日間) した Sk-DN 細胞で行う。

したがって、まず Sk-34 細胞、Sk-DN 細胞及び総合増幅型幹細胞群の挫滅神経内への移植実験を行い、その能力を検証した。その結果、骨格筋由来総合増幅型幹細胞群は末梢神経系細胞への分化能力には全く変化なく、むしろ少量の筋肉から大量の移植細胞が得られることが確認できた。また、この増幅幹細胞系では骨格筋細胞への分化能が大幅に低下しており、非骨格筋系の組織への応用に際してはさらに有利であることが判明した。

実験①

1) GFP トランスジェニックマウスから骨格筋間質由来細胞群 (Sk-34、Sk-DN 細胞) と総合増幅型幹細胞群を抽出し、ドナー細胞とした。

2) マウス坐骨神経内に神経損傷 (広範囲挫滅モデル: 神経鞘膜を残し神経内の組織のみ破壊する) を作成する。

3) 欠損部分にドナー細胞を移植し、その分化を観察する。即ち、軸策断端から放出されることが期待される神経誘導因子を利用し、生体内での分化能力を検討する。

4) 回復期である損傷後 4~8 週でサンプリングを行い、移植細胞の生着状態を確認する。

分析項目

1) 蛍光実体顕微鏡で移植細胞の生体内での貢献度を GFP 陽性細胞としてマクロスコピ

ックに評価した。

2) また、凍結組織切片を作成し蛍光顕微鏡を用いて免疫組織化学的検索を行った。

使用抗体：MBP (myelin basic protein), N200 (neuro-filament 200), CD31

3) GFP 抗体を用いた免疫電子顕微鏡的検索。着床細胞の局在を把握した。

実験②

1) 上記同様に GFP トランスジェニックマウスから骨格筋間質由来幹細胞群と総合増幅型幹細胞群を抽出し、ドナー細胞とする。

2) マウス坐骨神経を 8mm 切除 (マウス坐骨神経は 8mm 以上の欠損では再生しないと報告されている) し、生体吸収性 PGA (ポリグリコール酸) チューブにて切除部を架橋する。このとき架橋した PGA チューブ内に移植細胞を満たした。コントロール群には、架橋チューブ内に神経断端のみを移植した。

3) 損傷後 4~8 週後に機能測定及び神経・下肢骨格筋のサンプリングを行い、コントロールと比較する。

分析項目

1) 蛍光実体顕微鏡で移植細胞の生体内での貢献度を GFP 陽性細胞としてマクロスコピックに評価する。

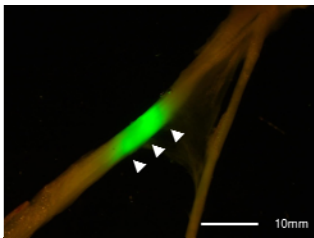
2) また、凍結組織切片を作成し蛍光顕微鏡を用いて免疫組織化学的検索を行う。

使用抗体：MBP (myelin basic protein), N200 (neuro-filament 200), CD31

4. 研究成果

1) マウス坐骨神経広範囲挫滅モデルへの骨格筋間質由来細胞群 (Sk-34、Sk-DN 細胞) 移植結果

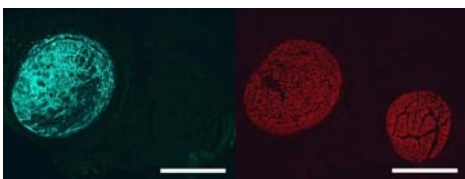
① 移植 4 週後の坐骨神経



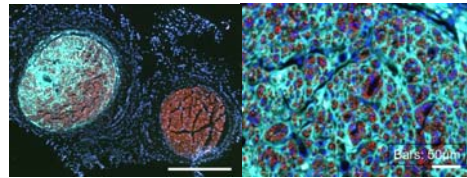
移植部を中心に GFP 陽性の組織が観察された

② 移植 4 週後の坐骨神経横断面像

GFP N-200

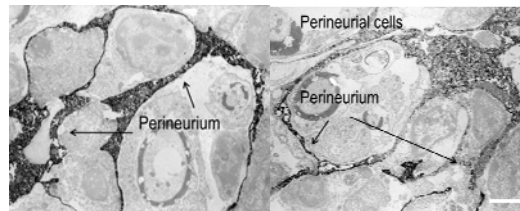


GFP+N-200+DAPI 拡大

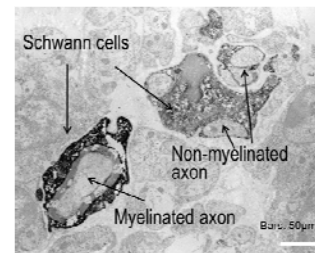


損傷中央部において GFP 陽性細胞は活発に生着し損傷中央部において約 70%の再建に貢献し、GFP 陽性細胞は N200 陽性の神経軸索の周囲を取り囲むように存在していた。

③ 抗 GFP 抗体を使用した免疫電気顕微鏡撮影



移植した GFP 陽性細胞は神経周膜と神経周膜細胞に分化していた。



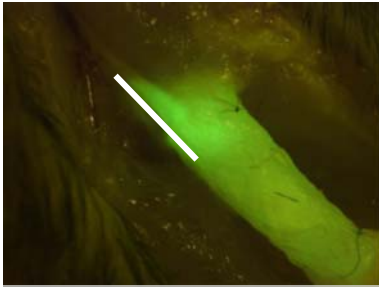
軸索の周囲に存在するシュワン細胞にも分化し、このシュワン細胞への分化は有髄、無髄線維ともに再生に貢献していた。

総合増幅型幹細胞群も末梢神経系細胞への分化能力には全く変化なく、むしろ少量の筋肉から大量の移植細胞が得られることが確認できた。また、この増幅幹細胞系では骨格筋細胞への分化能が大幅に低下しており、非骨格筋系の組織への応用に際してはさらに有利であることが判明した。

2) マウス坐骨神経を完全断裂し、その部分を PGA チューブで架橋し、その中に増幅型幹細胞群を注入する実験を行った。

当初、計画していた生体吸収性人工神経 (PGA tube) を用いて、完全断裂した神経を架橋する実験を行ったが、小動物では硬度が強すぎる点、及び細かい加工が困難な点、さらに移植 8 週後も tube 内の中心部までしか、神経伸展が認められず、ほとんど架橋が成立していない状況であったため、計画の変更を余儀なくされた。

① 移植 8 週後の人工神経

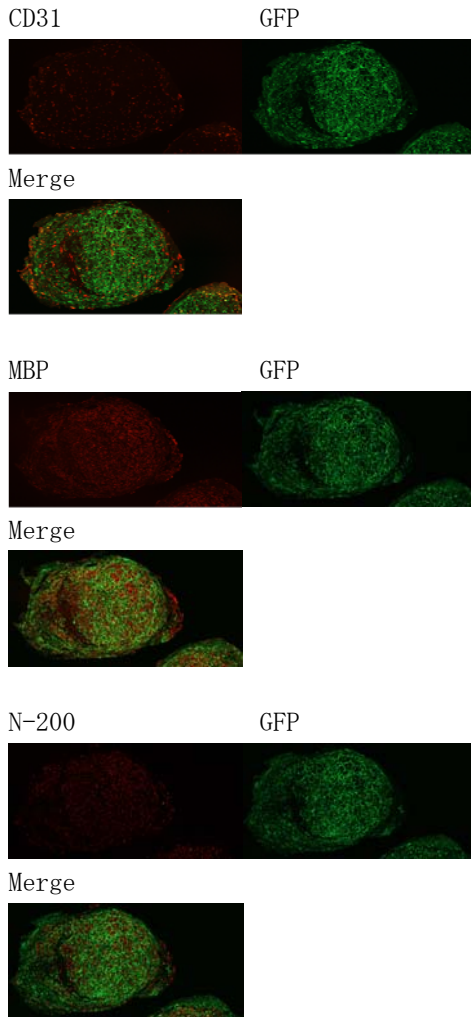


GFP 陽性組織はチューブ中央までしかみられない。また人工神経は吸収されていない。(白線：GFP 陽性神経組織)

そこで、その代替法として同系マウスの生体管腔組織であるマウス食道粘膜下層を 70%エタノール処理し、架橋チューブとして利用し、神経再生研究を繰り返し行った。

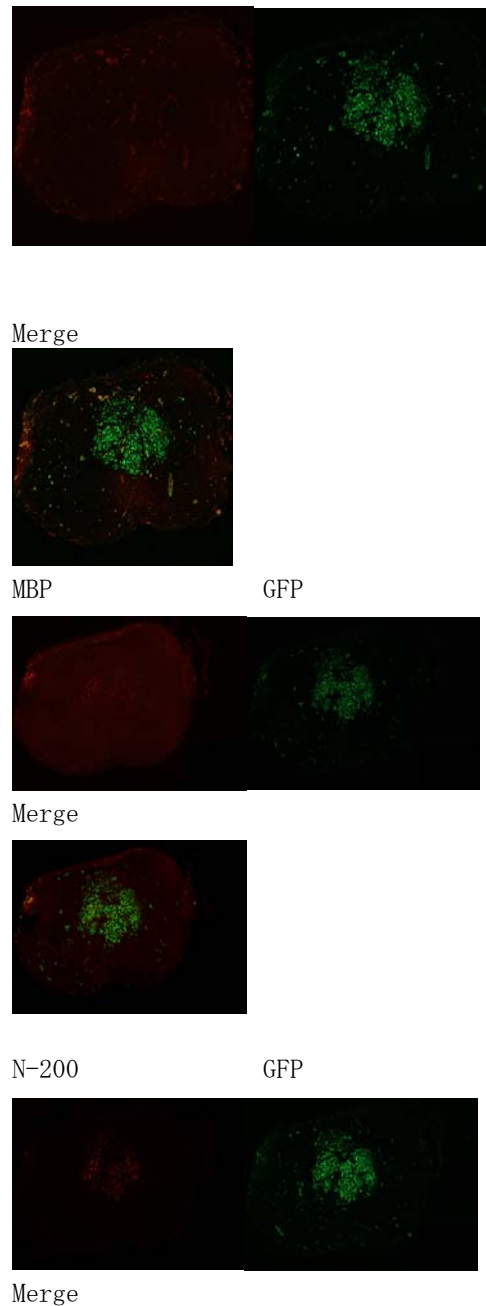
マウス坐骨神経において 7 mmを超える欠損(生体チューブのみでは再生不能)を生体チューブと骨格筋由来総合増幅型幹細胞群を使用し架橋した。

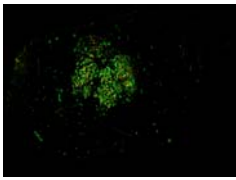
②総合増幅型幹細胞群移植 4 週後の坐骨神経横断面像



術後僅か 4 週間で欠損部分に移植細胞由来 GFP 陽性のシュワン細胞、神経内膜・周膜細胞が軸索再伸展を補助する形で出現し、神経そのものを架橋していた。また、術後 8 週には、ほぼ 95%の軸索が再架橋を果たし、移植細胞はチューブ領域を超えて両断端のレシピエント神経内へ拡散しながら、神経系細胞に分化し、軸索を保護していた。

④ 神経片移植 4 週後の坐骨神経横断面像





神経片移植では移植神経片は局所に留まっているだけであり、活発な血管の再生はみられず、軽度なミエリンの修復しかみられなかった。

これらの結果は、①神経欠損が 10mm 以上であること、②非移植群ではほとんど回復が見られないこと、③神経グラフト移植（現時点での臨床におけるゴールドスタンダード）法でも 30%前後の回復に止まることを考慮すると、正に画期的な結果と考えられる。さらに、骨格筋細胞への分化（神経内では必要ない）を押さえた培養増幅法も併せて開発することが出来た。

したがって骨格筋間質由来幹細胞（Sk-34、Sk-DN 細胞）を含んだ総合増幅型幹細胞群は、骨格筋間質由来幹細胞は末梢神経再生治療に対する現状、最適な細胞群であると考えられ、臨床的を目指してさらに研究を続けて行きたい。次のステップとして、実際にヒト骨格筋由来多能性幹細胞を抽出し、免疫不全動物へ移植する実験を計画中である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔学会発表〕（計 1 件）

シンポジウム臨床への橋渡し研究の現状
（腱・靭帯・筋肉） 骨格筋間質由来多能性
幹細胞を用いた運動器再生治療、 玉木哲朗
2010. 10. 14-15 日本整形外科基礎学術集会
京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 善康 (UCHIYAMA YOSHIYASU)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：80317784

(2) 連携研究者

玉木 哲朗 (TAMAKI TETSURO)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：10217177