

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592720

研究課題名(和文)無細胞化神経へのシュワン細胞付加法としての端側神経縫合とその応用について

研究課題名(英文)End-to-side neurorrhaphy as Schwann cells provider to acellular nerve graft and its suitable application

研究代表者

林 礼人(Hayashi, Ayato)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10365645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：人工神経では軸索再生の距離に限界があり、様々な形態でシュワン細胞を付加する研究が行われている。しかし、細胞移植を用いた手法では臨床応用に多くの課題が存在するため、移植神経内にシュワン細胞を付加する手法として端側神経縫合法を応用出来ないかを検討した。無細胞化移植神経の両側端に端側神経縫合を行うことで、最も効果的に移植神経内にシュワン細胞を遊走させることが出来ることがわかり、神経欠損モデルに移植した際も、再生軸索数が著明に増加させ、髄鞘形成の成熟化も促した。端側神経縫合法はシュワン細胞を供給する方法としても有用であり、無細胞な人工神経の新たな使用方法となりうる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Previous studies regarding acellular nerve grafts (ANGs) have suggested that axons can regenerate into ANGs within a limited distance. Axonal regeneration relies on support from proliferating host Schwann cells (SCs). Numerous studies have reported that neurotrophic factors, cultured SCs, and induced pluripotent stem cells promote nerve regeneration in ANGs. In this study, we investigated whether end-to-side (ETS) neurorrhaphy could be useful as an SC provider to support axonal elongation in ANGs. We found that ETS neurorrhaphy was most effective when an epineurium window and partial neurectomy were performed, and was even more effective when it was applied bilaterally. By grafting ANGs in which SCs were migrated via ETS to the nerve defect, we confirmed that there were abundant and matured regenerated axons in the graft. This approach could potentially represent a new use of ETS neurectomy and lead to the development of hybrid artificial nerves in which autologous SCs are combined.

研究分野：医歯薬学

キーワード：端側神経縫合 神経移植 神経再生 シュワン(Schwann)細胞 人工神経 無細胞化神経 トランスジェニックマウス g-ratio

科研費研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

顔面神経麻痺の再建手術として健側の顔面神経を力限として麻痺側の表情の再生を促す交叉神経移植や麻痺側の顔面神経以外の運動神経(舌下神経や咬筋神経など)を用いた神経移行術が行われている。しかし、交叉神経移植は、健側の顔面神経と麻痺側の顔面神経をつないで自然な表情の再建を可能にすると考えられていたものの、長い移植神経の必要性や採取可能な長い移植神経の数的限界(一側の下腿から1本)さらに再生神経の少なさや再生に要する長期の時間などの問題点から良好な結果が得られていない。一方、舌下神経や咬筋神経といった顔面神経以外の運動神経を用いた神経移行術は、有用ではあるものの元来の運動神経の機能を犠牲にする可能性や顔面神経全体を一つの運動神経で再建することに伴う病的共同運動の出現などの問題点から、端側神経縫合といった Donor 神経への最小限な侵襲での神経縫合法のより有用な活用や顔面神経のより末梢での選択的な神経再建の必要性(Ueda K et al. 2007)などが今後の課題であり、その為に豊富な移植神経の確保や神経の再生速度の促進などが取り組むべきテーマとして考えられる。

端側神経縫合については、1992年 Viterboらにより有用性が報告されて以来(Viterbo et al. 1992)様々な基礎研究や臨床応用がなされ、その再生形態の解明とそれに基づく有用な臨床的使用法について、我々も独自のモデルを開発し、DiI を神経トレーサーとして使用することで、切断されていない軸索からの側枝の発芽(Collateral sprouting)を証明することに成功した(Hayashi et al. 2004)。さらにその後、近年誕生した軸索が蛍光発色するトランスジェニックマウスを利用して、端側神経縫合における運動神経と知覚神経の再生形態の相違や軸索発芽に関わる軽微な軸索損傷刺激の必要性さらにミエリン蛋白(MAG)の関与などについて明らかにし(Hayashi et al. 2008)報告を行ってきた。また、我々は軸索再生に深く関わり神経鞘を形成するシュワン細胞の同種神経移植内での動向をシュワン細胞が蛍光発色するトランスジェニックマウスを用いて検討し、移植神経内に残存し得る移植シュワン細胞の有無が移植神経内への移植母体側からのシュワン細胞の遊走に深く関わっている事実や関連因子について明らかにし(Hayashi et al. 2008)、報告を行ってきた。

2. 研究の目的

今後の課題として挙げた豊富な移植神経の確保には現在様々な人工神経が開発され、欧米では無細胞化した同種神経を移植材料として臨床応用することも始まっているが、そこで課題となるのが長い距離の再生を可能

にするためのシュワン細胞の導入である。シュワン細胞は強力な抗原提示細胞であると同時に長距離の神経再生には欠かせない細胞で、無細胞である人工神経の中に、シュワン細胞を培養して移植神経に加える研究が盛んに行われている。しかし、体内の細胞を体外に取り出しそれをまた体内に戻すことは、臨床応用するには倫理面や安全性などの様々な制限が存在する。今回我々は、今まで行ってきた研究成果の中でも、無細胞な移植神経には母床からのシュワン細胞が速やかに遊走する結果(Hayashi et al. 2007)と端側神経縫合の donor 神経に与える影響に注目した。端側神経縫合という手技を軸索再生の目的ではなく、シュワン細胞の供給という目的で使用するために無細胞化処理した移植神経を端側神経縫合であらかじめ移植しておくことで、シュワン細胞の移植神経内への遊走を促し、Prefabricated なシュワン細胞を含有した移植神経が作成可能なのではないかという考えのもと、シュワン細胞を供給する手技としての端側神経縫合の可能性についてトランスジェニックマウスを使用して検討した。

3. 研究の方法

幼弱化した遊走能を獲得したシュワン細胞が蛍光発色する Nestin-GFP mice の坐骨神経へ、蛍光発色しない C57/BL6J マウスから摘出した坐骨神経を Wisconsin solution の中に7週間保存して無細胞化する Cold preservation という手技を使用し作成した移植神経(Fox IK et al. 2005)をコントロール群も含めて4群の端側神経縫合法(1群:コントロール群、2群:無損傷群、3群:片側群、4群:両側群)で移植し、Live imaging の手法を用いて蛍光実態顕微鏡下に経時的観察を行なった。移植4週後にシュワン細胞を遊走させた移植神経を、免疫染色や whole mount imaging の手法で形態学的に評価した。そして、シュワン細胞遊走関連因子(S100、NRG1、ErbB2)を移植2週および4週のモデルを作成し、RT-PCR法を用いて定量的に評価した。

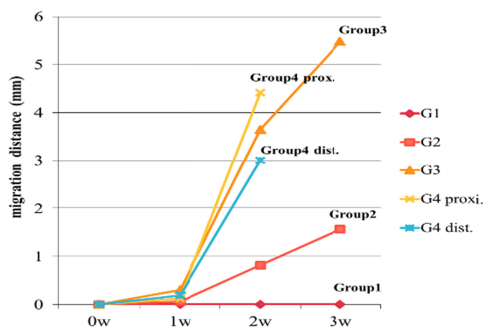
続いて、軸索がすべて蛍光発色する Thy-1YFP16 マウスの坐骨神経に神経欠損を作成し、上記から3群(1群:コントロール群、2群:片側群、3群:両側群)を作成し、シュワン細胞含有神経を移植した。神経再生の程度を軸索が蛍光発色することを利用して蛍光実態顕微鏡を使用し詳細に比較し、Live imaging の手法で経時的観察を行なった。また移植後4週の時点で、移植神経の中央部(近位側)および移植神経遠位端より2mm遠位部(遠位側)での再生軸索数や g-ratio やミエリン厚、軸索直径などの計測を行い、形態学的評価をとともにシュワン細胞を遊走させる意義やその効果を検討した。

#### 4. 研究成果

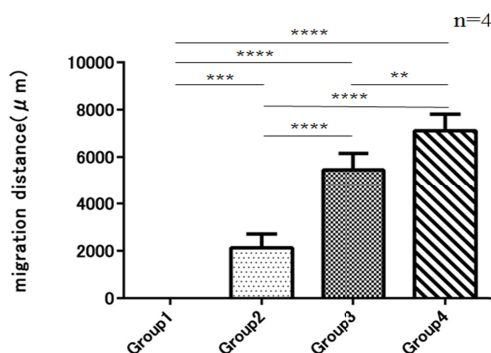
シュワン細胞は軸索再生に先行して、donor 神経から無細胞な移植神経内へ速やかに遊走する(Hayashi et al. 2007)ことが以前の我々の研究からわかっている。

##### (1) シュワン細胞の遊走に有用な端側神経縫合方法の評価

7 日毎に経時的に計測したシュワン細胞の遊走速度は移植 1 週目では各群ともに遊走距離に大きな差は見られず、1, 2 群は変化はなく、3, 4 群では端側神経縫合部の donor 神経側の GFP 発色輝度の上昇が観察された。移植 2 週目になると、1, 2 群に比べ 3, 4 群の神経線維部分切断群の方が早く遊走がみられたが、片側群と両側群の間に遊走速度の差は見られなかった。移植 3 週目になると、4 群では既に移植神経全域へ遊走したシュワン細胞が存在しているのが観察された。また、2 群の donor 神経に損傷を加えていない群でも、神経周膜を越えてシュワン細胞の遊走は短い距離ではあったが観察された。3, 4 群は片側と両側端の遊走速度違いは見られなかったが、同じ速度で両側端からシュワン細胞の遊走が起きたため、3 群の片側のみからの遊走よりも 4 群が最も早く移植神経内全域へ広がりが見られた。



次に、移植 4 週後に採取した移植神経内のシュワン細胞遊走距離を whole mount imaging で観察し、計測を行った。各群における平均遊走距離は、4 群が最も遊走距離が長く (7111±351μm)、次いで 3 群 (5451±351μm)、2 群 (2130±337μm)、1 群 (0μm)であった。



Live および whole mount imaging からは、donor 神経の神経周膜及び神経線維部分切断をして軸索損傷を加える事で、切断された軸

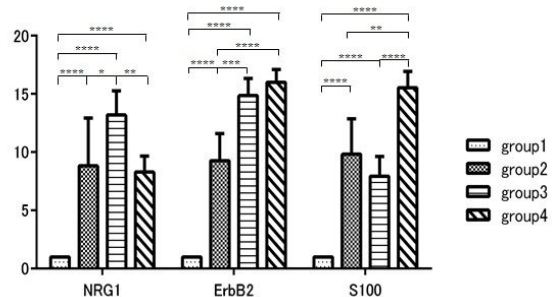
索の髄鞘を形成していたシュワン細胞が再び脱分化して遊走能を獲得し、さらに軸索断端からの神経栄養因子などの放出も何らかの影響を与えたためか、移植神経内への豊富なシュワン細胞の遊走を確認できた。

(矢印は縫合部で母床から移植神経内へ遊走しているシュワン細胞)

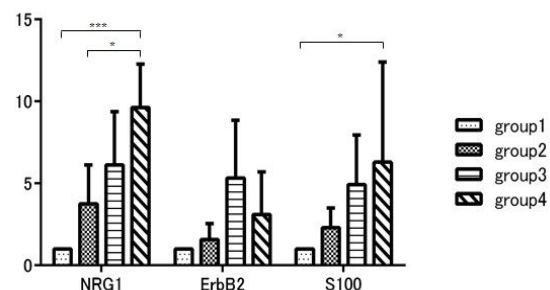
##### (2) 無細胞化神経内の形態学的評価および定量的評価

シュワン細胞遊走には多くの基礎研究から NRG-ErbB シグナリングが必要不可欠であると報告されている (D.A.Lyons et al. 2005), 移植後 2 週および 4 週モデルにおける各群におけるシュワン細胞 (S100) およびシュワン細胞遊走関連因子 (NRG1, ErbB2) の発現量を測定した。

移植 2 週後の時点で 3 群では NRG-ErbB の発現量が 1 群(コントロール群)に比べ NRG1 は 13 倍、ErbB2 は 14 倍と著明に増加が見られることから活発な遊走が続いている状態と考えられた。対して 4 群では S100 の発現量が 3 群の 8 倍に比して 15 倍と著明な増加を認められた。また未成熟なシュワン細胞で発現がみられる ErbB2 の発現量が 16 倍と依然高い状態にあることから、多くの遊走能を持った幼弱なシュワン細胞の遊走が既に移植神経内に生じている状態であることが考えられた。



また、移植 4 週後の時点で 3 群では、ErbB2 の発現量が 4.2 倍と依然高値を示し、無細胞化神経内へのシュワン細胞の遊走の受け入れがまだ可能な状態であることが推察され、4 群で見られた ErbB2 の発現量の減少 (2.4 倍) 及び NRG1 の発現量が 9.3 倍と増加していた状況は、シュワン細胞の遊走が完了し無細胞化神経内を十分に満たした状態であり、シュワン細胞の成熟化と共に再生軸索が盛んに誘導されている局面に進展した事が推察された。

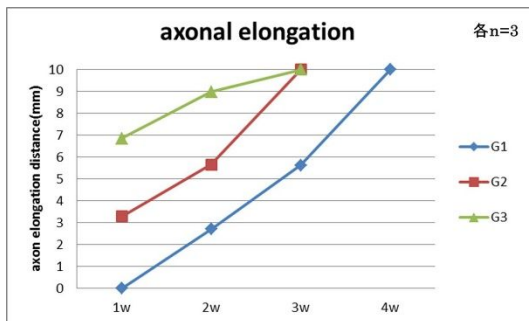


加えて移植4週後における各群において凍結切片を作成し免疫染色を行った。S100抗体染色および抗ニューロフィラメント抗体染色からもその遺伝子発現量の傾向は明らかであった。薄切凍結切片で観察すると3群でも移植神経の遠位端に少数のシュワン細胞が達していることを認め、そのシュワン細胞の分布に一致してわずかな再生軸索を認めしたが、4群になると移植神経全域でGFP発色するシュワン細胞と共に豊富な再生軸索が観察された。

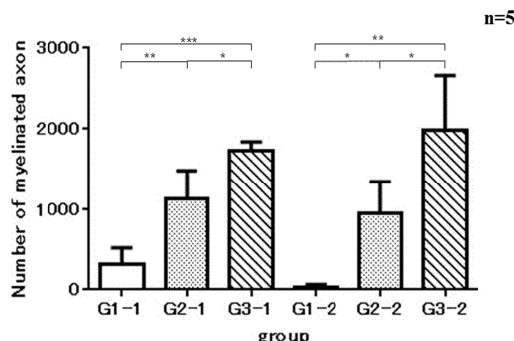
以上の事からも無細胞化神経への速やかで十分なシュワン細胞供給法には、両側端側神経縫合法が最も有用であると考えられた。

### (3) シュワン細胞充填無細胞化神経の移植モデルにおける軸索再生の形態学的評価

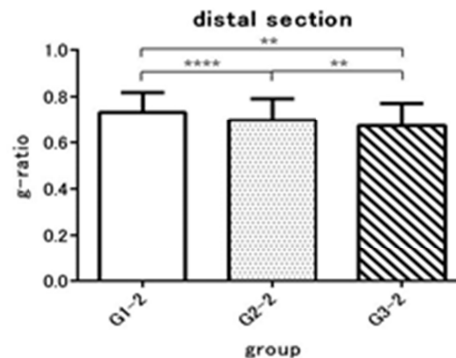
移植後7日毎に経時的に無細胞化神経内を観察した。移植後1週目でシュワン細胞を多く含有する3群では移植神経内を伸張する軸索距離が $6.86 \pm 1.45$ mmと最も遠位まで観察され、続いて2群では $3.29 \pm 0.29$ mmであり、シュワン細胞の含有程度は軸索再生の初速度に大きな差が見られた。移植後2週目においても3群で $8.98 \pm 0.89$ mm、2群で $5.66 \pm 2.09$ mm、1群で $2.72 \pm 0.12$ mmと伸張距離は各群間で有意差がみられた。



さらに、移植後4週目に検体を採取し、光学顕微鏡下に各群の近位側ならびに遠位側における再生軸索数を計測した。近位側では1群で $341.8 \pm 242.2$ 本、2群で $1174.2 \pm 468.7$ 本、3群で $1689.2 \pm 616.9$ 本であり、遠位側では1群で $158 \pm 282.3$ 本、2群で $956.2 \pm 550.6$ 本、3群で $1434 \pm 814.6$ 本観察された。明らかに3群において、他群より優位差を持って移植神経内および移植神経の遠位側の再生軸索数が多くみられた。



また、電子顕微鏡下にランダムに6視野を抽出して同じ観察部位におけるすべての再生軸索からg-ratio、ミエリン厚、軸索直径、有髄軸索直径などを計測した(De Medinaceli et al. 1995)。再生軸索の直径の分布は各群共に違いは見られず、 $1.5 \mu\text{m} \sim 2.0 \mu\text{m}$ が近位側で25%、遠位側では35%を占め、最多となる分布を示した。ミエリン厚は近位側・遠位側ともには1群に比して2、3群でミエリンの厚さの増加が観察された。軸索直径及び有髄軸索直径では、近位側でのみ1群と比べ2群、3群と直径が大きくなっていったが、遠位側ではその傾向は観察されなかった。そし



て、g-ratioでは最適な軸索の髄鞘形成の機能的、構造的な指標として広く利用されており、近位側では各群間において有意差は認められなかった。遠位側においてg-ratioは1群で $0.73 \pm 0.04$ 、2群で $0.69 \pm 0.04$ 、3群で $0.67 \pm 0.04$ であった。各群間に有意差が認められ、正常な坐骨神経の数値(0.55~0.68)に3群でシュワン細胞を充填した移植神経群が最も近似していたことから、シュワン細胞を多く含有した無細胞化神経を移植することで他群と比べ軸索再生が円滑に進むと共に良好な髄鞘形成がみられた。

以上より、シュワン細胞を付加する事で神経再生が早期に多く起きている事が明らかになり、特に両側端の端側神経縫合でシュワン細胞を付加させた神経がより軸索再生数が多く、成熟した再生軸索も多いと考えられ、末梢神経再建方法の一つとして端側神経縫合による自己シュワン細胞充填ハイブリッド型神経が新たな人工神経を用いた末梢神経再建方法の選択枝の一つとなりうる可能性が示唆された。

### 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)

〔雑誌論文〕(計8件)

Hayashi A, Labbé D, Natori Y, Yoshizawa H, Kudo H, Sakai T and Mizuno H

Experience and anatomical study of modified lengthening temporalis myoplasty for established facial paralysis J Plast Reconstr Aesthet Surg 2015

Jan;68(1):63-70

吉澤秀和、林 礼人、名取悠平、水野博司 当科における過去 15 年間の顔面神経麻痺静的再建術の変遷日形会誌 34: 252-259, 2014

林 礼人、名取悠平、吉澤秀和、水野博司 麻痺性兔眼に対する軟骨移植による Levator lengthening 法 形成外科 57: 489-496, 2014

林 礼人、山本有平、垣淵正男、松田健、古川洋志、橋川和信、渡辺頼勝、上田和毅 顔面神経再建方法における定義ならびに呼称 ~ Fukushima 提言 ~ 日形会誌 34:783-796,2014

林 礼人、西田匡伸、瀬野久和、井上雅博、岩田浩嗣、白澤友裕、新井 一、栢森良二、小室裕造、梁井 皎 我々の行ってきた急性期顔面神経麻痺に対する舌下神経縦二分劃移行について 日形会誌 35:1-11 2015

林 礼人、名取悠平、吉澤秀和、水野博司、栢森良二 顔面神経完全麻痺発症後長期経過例に対する舌下神経縦二分劃移行術 Facial N Res 34:28-31,2014

林 礼人、名取悠平、吉澤秀和、水野博司 顔面神経麻痺再建における咬筋神経と舌下神経併用例の検討 Facial N Res 34:129-132

林 礼人 麻痺性兔眼に対する静的再建術 - 上眼瞼 Levator lengthening 法を中心に - PEPARS 92: 37-45, 2014

〔学会発表〕(計 7 件)  
(国際学会)

Hayashi A

End to side neuroorrhaphy  
Instructional Course, 2014 AAHS-ASPN-ASRM  
Annual meeting, Hawaii, 2014 (Kauai, Hawaii,  
2014) January 10-12, 2014

Hayashi A

Our experience of modified lengthening temporal  
myoplasty for established facial paralysis  
12th International Microsurgical Symposium  
( Botucatu, Brazil, 2014) September, 12th and  
13th, 2014

Hayashi A, Natori Y, Yoshizawa H and

Mizuno H

Modified lengthening temporalis myoplasty for  
established facial paralysis  
The 12th Korea-Japan Congress of Plastic and  
Reconstructive Surgery, (Incheon, 2014)

2014/5/16-17

(国内学会)

林 礼人、吉澤秀和、水野博司  
顔面神経麻痺に対する戦略的動的再建術  
第 41 回日本マイクロサージャリー学会学術  
集会 (2014 年 京都) 2014 年 12 月 4 日 ~ 5  
日

林 礼人、名取悠平、吉澤秀和、水野博司、栢森良二  
当施設における完全麻痺発症後長期経過例  
に対する神経移行術 舌下神経縦二分劃  
移行術において 第 37 回日本顔面神経学  
会 (2014 年 東京) 2014 年 5 月 29 日・30  
日

林 礼人、名取悠平、吉澤秀和、古元将  
和、水野博司  
顔面神経麻痺再建における咬筋神経と舌下  
神経併用例の検討  
第 57 回日本形成外科学会総会・学術集会  
(2014 年 長崎) 2014 年 4 月 9 日 ~ 11 日

吉澤秀和、林 礼人、實川佐智恵、田中  
里佳、水野博司  
無細胞化神経へのシュワン細胞付加法とし  
ての端側神経縫合とその応用について (第 2  
報) 第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会  
(2014 年 松本) 2014 年 10 月 9 ~ 10 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 礼人 (AYATO HAYASHI)

順天堂大学・形成外科・先任准教授

研究者番号：10365645

### (2) 研究分担者

水野 博司 (HIROSHI MIZUNO)

順天堂大学・形成外科・教授

研究者番号：80343606