

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861524

研究課題名(和文) Muse 細胞を用いた顔面神経の神経再生

研究課題名(英文) facial nerve regeneration by Muse cell

研究代表者

古川 孝俊 (Furukawa, Takatoshi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80466630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：免疫抑制剤投与下にヒトMuse細胞を移植して実験を進めた。実際に顔面神経を露出し、main trunkを5mmの長さに渡って離断、生体に吸収される素材である75% L-lactic acid and 25% E-caprolactone ポリマーチューブを移植して実験を行った。まずWisking amplitudeの測定から開始した。その結果、Matrigellによる神経縫合により、ゆっくりとはあるが神経が再生していることを示唆する結果が得られた。今後、神経線維の再生(axonの数・再生範囲)を確認するために、また、組織学的にミエリン鞘の厚さを確認する予定である。

研究成果の概要(英文)：We use facial nerve cut models of rats. We transplanted 75% L-lactic acid and 25% E-caprolactone tube to cut sites and administered human Muse cells to these models using drugs to suppress the immune system. We can get results of slow recover of nerve regeneration. From now we are going to measure numbers of axon and thickness of myelin sheath in regenerated nerve.

研究分野：顔面神経

キーワード：顔面神経麻痺 再生 Muse細胞 ラット

1. 研究開始当初の背景

耳下腺悪性腫瘍切除・外傷・錐体骨手術に伴って peripheral facial nerve injury が引き起こされると、神経の不完全な回復によって顔面神経麻痺が残存し、患者の QOL が大きく損なわれることが多い。「笑う」「泣く」「喜ぶ」など人間の感情の表出に表情筋の果たす役割は大きく、この機能が損なわれると患者の QOL が大きく低下する。現在臨床で用いられている nerve graft の効果には限定的であり、また、採取できる神経に制限があることや神経障害が多部位に渡ると再建しきれないという問題点がある。このような患者に対して近年臨床で用いられている Nerve graft は有効な axonal guide であるが、採取できる神経に制限があり、また、神経障害が多部位に渡ると再建しきれないという欠点をもつ。

これに対し、損傷を受けた顔面神経を回復させるためのもう一つの手段として、再生医学的アプローチが考えられる。例えば、ウイルス性顔面神経麻痺の患者に顔面神経減荷術を行う際に、Basic fibroblast growth factor を gelatin hydrogel に浸して神経上に留置することで、麻痺の回復が促進されたという報告がなされた(Otolaryngol Head Neck Surg. 146, 641-646, 2012)。神経断裂に対しては、nerve conduits (NCs)が Nerve graft に代わるものとして提唱されている(J Hang Surg. 29, 100-107, 2004)。当初、nerve conduits (NCs)として silicone tube が報告されていたが、再生された組織を閉じ込めてしまうという欠点を持つ。この欠点を補うものとして、polyglycolic acid (PGA)や polyglycolic/polyglycolic acid (PLGA)が報告され(生体に吸収されるので、再生組織を閉じ込めてしまうことがない)、生体への応用が期待されている(Brain Res. 868, 315-328, 2000)。本研究では顔面神経損傷動物モデルに、骨髄間質細胞から誘導した多能性を持つ幹細胞細胞 (Muse 細胞) を用い、顔面神経麻痺に対する安全な自己細胞移植治療の可能性に挑戦する。



Rat の再生された顔面神経 upper buccal branch(Acta Oto-Laryngologica. 129, 906-914, 2009 より引用)

坐骨神経の再生モデルに比べ、顔面神経損傷に対する神経再生の報告が少なく、GDNF 発現 neural stem cells (Acta Oto-Laryngologica. 129, 906-914, 2009) や、hepatocyte growth factor 発現 HSV ベクター (Gene Therapy.18, 1063-1069, 2011) が再生を促進したという様な報告が散見されるのみである。

ところで東北大学大学院医学系研究科出

澤真理教授らの研究グループが、ヒト皮膚線維芽細胞や骨髄間質細胞などの間葉系細胞には多能性を持つ幹細胞が存在することを発見し、その性状から、Muse

(Multilineage-differentiating stress-enduring) 細胞と名付け、発表した (Proc Natl Acad Sci. 107, 8639-8643, 2010)

Muse 細胞は、多能性幹細胞、すなわち 1 細胞から神経系や皮膚などの外胚葉系、骨格筋や骨・軟骨などの中胚葉系、肝臓や膵臓などの内胚葉系のそれぞれの細胞に分化可能な幹細胞であり、この点は ES 細胞や iPS 細胞に似ているが、奇形腫を形成しないという点で大きく異なる細胞である。すなわち、再生医療への応用において問題となる腫瘍化という副作用を事実上考えなくて良いという点で、Muse 細胞は大きな可能性を秘めていると考えられている。

2. 研究の目的

今回、顔面神経損傷動物モデルにこの Muse 細胞を導入し、神経の回復がどの程度促進されるのかを検証することを目的とする。NCs に Muse 細胞を加えるだけで神経回復が促進されるのか、Muse 細胞に GDNF 等の発現を誘導した方が回復するのか、等について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

ラットは 8 weeks old Wister male rat (250g) を使用した。

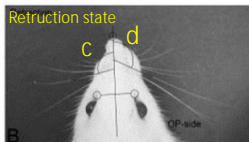
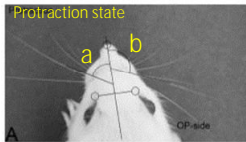
実際の Surgical procedure は以下の通りである。

- (1) イソフルレンで麻酔導入、維持
- (2) 耳前部に約 3cm の皮膚切開
- (3) Buccal branch, Marginal branch を露出し、神経をそれぞれ 6mm の長さにわたって切除
- (4) 8mm の長さのチューブで Buccal branch の断端を架橋し 10-0 ナイロン糸で片側 4 針ずつ縫合(神経断端はそれぞれ 1mm ずつチューブ内に挿入し、断端の間は 6mm の距離が維持されるようにした)
- (5) 5-0 ナイロン糸で皮膚縫合

比較対象は、Matrigel のみと、Matrigel + NHDF と Matrigel + Muse cell とで比較検討し、神経の再生に差が生じるかを検討した。

実際には、機能解析として Wisking amplitude の測定を行い、また電気生理学的検討や免疫組織学的検討を行う予定で実験を開始した。

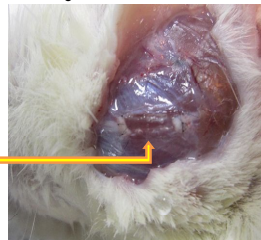
Wisking amplitude



$$(d-b)/(c-a)*100 (\%)$$

4. 研究成果

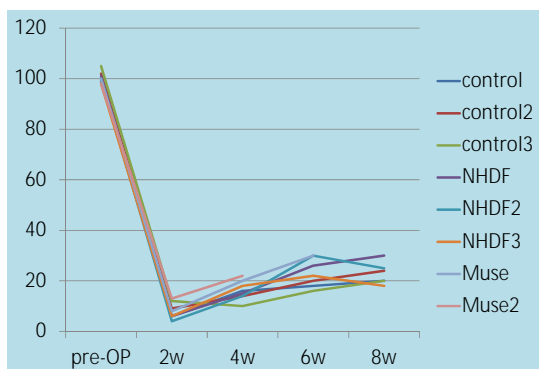
当初ラット Muse 細胞を採取してラットに移植することを予定していたが、良好なラット Muse 細胞が獲得できなかった。そのため、免疫抑制剤投与下 (FK506 1mg/kg/day 連日皮下注) にヒト Muse 細胞を移植して実験を進めた。



Muse細胞の移植

実際に顔面神経を露出し、main trunk を 5mm の長さに渡って離断、生体に吸収される素材である 75% L-lactic acid and 25% E-caprolactone ポリマーチューブを移植して実験を行った。

まず Wisking amplitude の測定から開始した。その結果、Matrigel による神経縫合により、ゆっくりとではあるが神経が再生していることを示唆する結果が得られた。NHDF や Muse cell の投与による上乘せ効果は、Wisking amplitude の実験ではまだ得られていない。今後、投与細胞数を再検討し、NHDF や Muse cell の投与による上乘せ効果を検討する予定である。



また、今後、神経線維の再生 (axon の数・再生範囲) を確認するために、また、組織学的にミエリン鞘の厚さを確認する予定である。また、nerve action potentials を測定する予定であり、測定装置の設定も完了したため、生理学的にも検討する予定である。また、神経再生部位への細胞再生を確認するために鉄染色を用いたり、再生神経断面の免染 (抗 S-100 抗体、抗 neurofilament 抗体、抗 tubulin 抗体等) を行うことで、再生線維の評価を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 4 件)

1. 古川孝俊, 稲村博雄, 阿部靖弘, 後藤崇成, 青柳 優, 欠畑誠治: 当科における外傷性顔面神経麻痺の検討. Facial N Res Jpn 2015;35:59-61 査読あり
2. 古川孝俊, 稲村博雄: Bell 麻痺、Hunt 症候群に対する抗ウイルス薬投与の実際. JOHNS 2015;31:717-720 査読なし
3. 古川孝俊, 稲村博雄, 阿部靖弘, 千田邦明, 青柳 優, 欠畑誠治: Bell 麻痺・Hunt 症候群の予後の再検討. Facial N Res Jpn 2014;34:120-122 査読あり
4. 古川孝俊, 稲村博雄, 千田邦明, 青柳 優, 欠畑誠治: 簡便な麻痺重症度の判定法 兎眼の有無での判定の試み. Facial N Res Jpn 2013;33:100-102 査読あり

(学会発表) (計 6 件)

1. 古川孝俊, 渡邊知緒, 伊藤 史, 阿部靖弘, 後藤崇成, 欠畑誠治: 当科顔面神経疾患患者の臨床統計. 日耳鼻山形県地方部会, 山形大学 (山形市); 2015 年 12 月
2. 古川孝俊, 稲村博雄, 阿部靖弘, 渡辺知緒, 伊藤 史, 窪田俊憲, 松井祐興, 青柳 優, 欠畑誠治: 当科における Bell 麻痺症例の統計学的検討. 第 25 回日本耳科学会, 長崎ブリックホール (長崎市); 2015 年 10 月
3. 古川孝俊, 稲村博雄, 阿部靖弘, 後藤崇成, 青柳 優, 欠畑誠治: 当科における外傷性顔面神経麻痺の検討. 第 38 回日本顔面神経学会, 東京大学 (東京都); 2015 年 6 月
4. Takatoshi Furukawa, Yasuhiro Abe, Tomoo Watanabe, Tsukasa Ito, Toshinori Kubota, Seiji Kakehata: Retrospective Review of Treatment for Severe Cases of Bell's Palsy and Ramsay Hunt Syndrome. 50th annual meeting American Neurotology society, Boston (America); 2015 年 5 月
5. 古川孝俊, 稲村博雄, 阿部靖弘, 千田邦明, 青柳 優, 欠畑誠治: Bell 麻痺・Hunt 症候群の予後の再検討. 第 37 回日本顔面神経学会, 東京平成大学 (東京); 2014 年 5 月

6. 古川孝俊、稲村博雄、阿部靖弘、千田邦明、青柳 優、欠畑誠治：顔面運動採点(柳原 40 点法)の検者間のばらつきと、兔眼の有無での麻痺重症度判定の試み．第 139 回日耳鼻山形県地方部会，山形大学(山形市)；2013 年 12 月

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

古川 孝俊 (FURUKAWA Takatoshi)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80466630