

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670767

研究課題名(和文) 筋肉内静脈網を利用したNeurotization～培養シュワン細胞の血管内遊走

研究課題名(英文) Neurotization through the venous network in muscle : intravenous migration of Schwann cells.

研究代表者

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00399924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：静脈ネットワークを利用した効率的軸索再生について検証した。動物モデルは、手術手技の困難さのため当初予定していた胸背神経断端を胸背静脈に挿入するモデルから伏在神経断端を大腿静脈に挿入するモデルに変更した。血管をscaffoldとして軸索の伸長を期待し、モデル作成から2か月後に神経・静脈挿入部前後の組織を採取、静脈管腔内への軸索伸長の有無をNF-H, CD34を標識し病理学的に観察した。結果、静脈管腔内への軸索伸長は確認できなかった。今回の実験では管腔内へ軸索は伸びていなかった。このことより軸索伸長はscaffoldも重要だが、それ以上に軸索を導く遠位部の要素が重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This work aimed to validate whether axonal regeneration would be possible through the venous network in the muscle. At first, we planned to use the latissimus dorsi muscle dominated by thoracodorsal nerve and vein, but we changed experimental animal model because of surgical difficulty. Eventually, we used saphenous nerve and femoral vein at inside of the thigh. The saphenous nerve was cut and inserted into the femoral vein, and two months later, we removed specimen compounded of nerve and vein. The specimen was stained with NF-H and CD34 by immunostaining procedure and observed to ascertain that axonal regeneration occurred in the vein. Unfortunately, we couldn't identify the regeneration of axons. This study indicated that the distal condition which was the target of axonal elongation was of the same importance as scaffold of axonal regeneration.

研究分野：形成外科学

キーワード：末梢神経 軸索再生

1. 研究開始当初の背景

神経再生には再生の足場の存在や、伸長の物理的障壁がないこと、周囲組織の血行状態などが重要である。静脈移植は足場の提供・障壁の除去を目指した方法であり、管腔内に良好な神経の再生を得られることが示されている(Chiu D.T. et al.Surgery.1982)。

また、より効果的な軸索再生をめざし、管腔内へ Schwann 細胞(Zhang F. et al. J Reconstr Microsurg.2002.)や筋肉・骨髄幹細胞(Nijhuis,T.H. et al.JPRAS.2013.)を充填する方法なども報告されている。

一方、脱神経した筋肉に神経の末梢が接することにより、筋肉への新たな神経支配が起こることを neurotization と呼ぶが、脱神経している筋肉に対し、筋肉内に存在する静脈のネットワークを神経軸索再生の通路として利用し neurotization を起こすことが可能であれば、筋の機能的再建において作用部の筋側に神経の断端がない場合でも新たな神経ネットワークの構築ができるのではないかと考え本研究を立案した。

2. 研究の目的

筋肉内血管網を介した neurotization を証明する。

3. 研究の方法

体重 300 ~ 350g、雄の wister rat を使用した。全ての実験は北海道大学動物実験に関する規定に則り行った。遠位側に神経断端がない状態で血管内腔を神経軸索が伸長していくかどうかを確認した。

(1) 実験モデルの確立

神経を静脈内へ挿入するモデル作成のために、解剖学的に利用できる神経・血管・筋肉が存在する部位の候補として 胸背神経・胸背静脈・広背筋、脛骨神経・膝窩静脈・腓腹筋、の2部位をピックアップし、各々の上記神経を静脈内へ挿入するモデルの作成を試みた。

について

問題点:胸背神経の枝分かれが多く(図1)、神経・静脈ともに非常に細く手術操作が困難であった。

上記理由によりモデル作成は不可能であった。



図1 ラット胸背神経と広背筋

について

問題点:神経・静脈ともに同定することはできたが神経の径の方が膝窩部において太く(図2)、静脈管腔内に挿入することが困難であった。

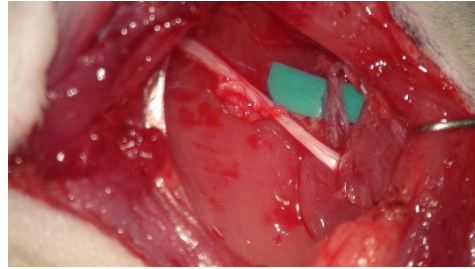


図2 脛骨神経と膝窩静脈

、共にそれぞれの理由により当初考えていたモデルの作成ができなかったため、静脈内神経挿入モデルを改変し神経、静脈の断端を縫合するモデルの作成を検討した。

3 つ目のモデルとして 伏在神経を大腿静脈内に挿入するモデル(図3)を考案した。このモデルについては筋肉内静脈ネットワークが存在しないこと、知覚神経であることなど、当初想定したモデルとは異なったものとなったが、まずは静脈の管腔内への軸索伸長の観察のためのモデルとして位置づけた。

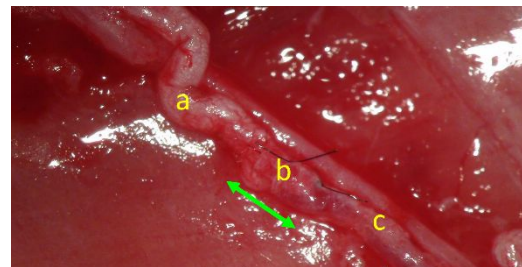


図3 伏在神経 大腿静脈挿入モデル

(2) 評価法

病理組織学的評価

前述の手術操作から8週目にa 神経単独部、b 神経静脈内挿入部、c 静脈単独部(初回手術時において)(図3)、を十分含むように組織を採取し、上記a、b、cの部位の切片を NF-H 染色、CD34 染色にて観察した。

電気生理学的検査

当初考案のモデルでは運動神経～筋肉といった運動単位を総合したユニットとしていたため、筋肉への神経再支配は複合筋活動電位(CMAP)を用いて計測する予定であったが前述の理由により CMAP 計測は断念した。

4. 研究成果

(1) 結果

a, c 部の断面の CD34, NF-H 免疫染色結果を示す(図4)。

神経部である a 部は CD34, NF-H が染色されていることが確認できた。血管部である c 部では CD34 で染色された血管内皮細胞は確認できたが、管腔内に NF-H で染色される組織は確認できなかった。

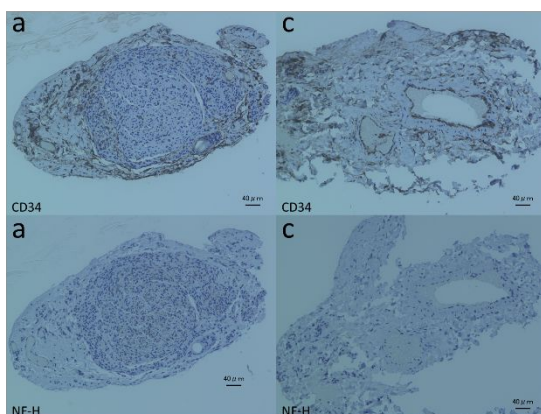


図4 a, c 部断面 (CD34, NF-H 染色)

(2) 考察

本研究では血管内腔を利用した神経軸索の伸長については証明することができなかった。問題点の一つとしては、モデル作成時における手技上の困難さがあげられる。また、標本採取・作成時においても、初回手術操作による瘢痕組織内に採取組織が存在しているため、図4でも示したように末梢の血管部(c部)の組織は切片作成時点で管腔周囲の組織の構造が破壊されているような状態であった。これらの点については、再度モデルについて検討の余地があると考えている。

血管内皮細胞と軸索伸長、つまりは Schwann 細胞の遊走については近年 Anne-Laure Cattin らによって索状に伸びた血管内皮細胞に沿うように Schwann 細胞が遊走するというメカニズムが示され (Cell 162, 1127-1139 2015), 軸索伸長は内皮細胞および多くのサイトカインが大きく影響を受けるとことがわかってきている。今回の研究ではそれらをマクロな視点で軸索伸長の現象を再現できないかということに挑戦を試みたが仮説は証明されなかった。今後は今回の実験において考えられる原因(阻害要因)を一つずつ検証し、より理想的なモデルの開発および評価を行っていくことが重要と考える。

<引用文献>

Chiu DT et al: Autogenous vein graft

as a conduit for nerve regeneration, Surgery, 1982, 91, 226-233

Zhang F et al: Autogenous venous graft with one-stage prepared schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects, J Reconstr Microsurg, 2002, 18, 295-300

Nijhuis TH et al: Natural conduits for bridging a 15-mm nerve defect: comparison of the vein supported by muscle and bone marrow stromal cells with a nerve autograft, J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2013, 66, 251-259

Cattin AL et al: Macrophage-Induced Blood Vessels Guide Schwann Cell-Mediated Regeneration of Peripheral Nerves, Cell, 2015, 162, 1127-1139

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)

大野 健太郎, 静脈を利用した neurotization の可能性, 第31回北大形成外科アカデミー, 2015年12月12日, 北京王プラザホテル札幌(北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 洋志 (FURUKAWA, Hiroshi)
北海道大学・大学院医学研究所・准教授
研究者番号: 00399924

(2) 研究分担者

山本 有平 (YAMAMOTO, Yuhei)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70271674

(3) 研究分担者

小山 明彦 (OYAMA, Akihiko)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号: 10533630

(4) 研究分担者

林 利彦 (HAYASHI, Toshihiko)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号: 00432146

(5) 研究分担者

村尾 尚規 (MURAO, Naoki)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 90706558

(6)研究分担者

七戸 龍司 (SHICHINOHE, Ryuji)
北海道大学・北海道大学病院・医員
研究者番号：30640346

(7)研究分担者

舟山 恵美 (FUNAYAMA, Emi)
北海道大学・医学研究科・講師
研究者番号：10533630

(8)研究協力者

大野 健太郎 (ONO, Kentaro)
北海道大学・北海道大学病院・医員