

令和元年5月26日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11382

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞、成長因子を用いたハイブリッド型人工神経による顔面神経再生

研究課題名(英文) Facial nerve regeneration using hybrid artificial nerve conduit with MSCs and growth factors.

研究代表者

松峯 元 (Matsumine, Hajime)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：80598144

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経の損傷に対して生体分解性人工神経が臨床で用いられているが、そのパフォーマンスは自家神経移植に比べると劣る。今回我々は生体分解性人工神経内にADSC、SVFをそれぞれ封入したハイブリッド型人工神経を作成し、ラット動物実験モデルを用いてその顔面神経再生能力を検証した。吸入麻酔下にラットの顔面神経類筋枝を露出し7mmの神経欠損を作成した。次にSVF、ADSCsをそれぞれ人工神経誘導管内に注入したハイブリッド型人工神経を作成し、先の神経欠損部に顕微鏡下に移植した。術後13週で再生神経の生理学、組織学的比較検討を行なった。結果、ADSCsとSVFはともに同レベルでの優れた神経再生促進効果を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回我々は、ラットの皮下脂肪より作成したADSCs、SVFをそれぞれ人工神経誘導管内に封入したハイブリッド型人工神経を作成し、ラット実験モデルを用いてその顔面神経再生能力を検証する前臨床研究を行った。そして結果としてADSCsとSVFはともに同レベルでの優れた神経再生促進効果を認めた。末梢神経損傷症例へ臨床応用する観点から比較すると、SVFは脂肪を酵素処理するだけ使用可能であり、継代培養を必要とするADSCsに比べて臨床使用に際してハードルが低く、神経損傷に対するハイブリッド人工神経のマテリアルとして応用し易いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study developed biodegradable nerve conduits containing ADSCs and SVF and evaluated their facial nerve regenerating abilities in a rat model. SVF and ADSCs were individually poured into nerve conduits. The conduits were grafted to the nerve defects. As the control, the defect was bridged with nerve conduits without cells. At 13 weeks after transplantation, the regenerated nerves were evaluated physiologically and histologically. CMAP of the SVF group was significantly higher in amplitude than that of the control group. TEM showed that the axon diameter of the SVF group was the largest, followed by the ADSC group and control group with significant differences among them. The ADSC group had the highest myelin thickness, followed by the SVF group and control group with significant differences among them. Identical excellent promoting effects on nerve regeneration were observed in both the ADSC and SVF groups.

研究分野：Nerve regeneration

キーワード：神経再生 顔面神経 人工神経 間葉系幹細胞 脂肪由来幹細胞 ハイブリッド型人工神経

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頸部悪性腫瘍切除や外傷性による顔面神経欠損は、表情筋の麻痺により罹患者の豊かな社会活動、QOL を著しく損なう。この顔面神経欠損の再建手術においては、従来から腓腹神経等をドナーとした自家神経移植術が行われてきた。しかしながら神経採取部の感覚消失、術後瘢痕、神経腫形成などの不可避な合併症は依然として存在し、さらに採取できる神経の長さには限界がある。そこで自家神経移植に代わる新しい神経再建方法として、本研究では皮下脂肪組織由来の間葉系幹細胞等を既存の臨床使用可能な生体内分解性人工神経誘導管に組み込む「ハイブリッド型人工神経」を作成し、自家神経移植を用いない顔面神経欠損の再建手術法の確立を目指す。

2. 研究の目的

adipose-derived stem cells (ADSCs) は脂肪吸引の手技を用いて安全で容易に、そして繰り返し細胞を大量に採取することが可能であり、近年再生医療分野で脚光を浴びている細胞群である。その作成方法は、まず脂肪を酵素処理、濾過、遠心することで脂肪以外のヘテロジーニアスな細胞群である stromal-vascular-fraction (SVF) を分離し、このSVF を付着継代培養したものが ADSCs である。ADSCs は自己複製能と脂肪細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、筋細胞などへの間葉系多分化能を有しているが、加えて分化誘導培地でシュワン細胞様細胞に分化が可能であり、さらには神経幹細胞に変化し、ニューロン神経突起と共にミエリン構造を作ることができると報告されている。また継代培養を行う前のSVFも神経再生能力を有することが報告されている。しかし、ADSCs と uncultured-SVF とを同一条件で末梢神経の架橋に用いてその神経再生能力を比較検討した報告はいまだ存在しない。

今回我々は2013年より本邦で臨床使用されているポリグリコール酸 (PGA) -collagen nerve conduit (ナーブリッジ™; Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) にラット皮下脂肪組織から作成した ADSCs もしくはSVF を注入したハイブリッド人工神経を作成し、PGA-collagen nerve conduit 単体を含めた3群をそれぞれラット顔面神経欠損に架橋し、その神経再生について組織学的、生理学的に比較検討する前臨床研究を行った。

3. 研究の方法

イソフルレンを用いた吸入麻酔下に8週齢ルイス系ラットの左顔面に下顎下縁切開を加えて顔面神経頬筋枝を露出し、7 mm の神経欠損を作成した。次にラット鼠径部皮下脂肪を 0.075% コラゲナーゼ処理して得られる SVF を通常の付着培養にて継代した ADSCs を 1×10^5 含有した ADSCs ハイブリッド型人工神経 (ADSCs 群) また培養する前の SVF を 1×10^5 含有した SVF ハイブリッド型人工神経 (SVF 群) さらに

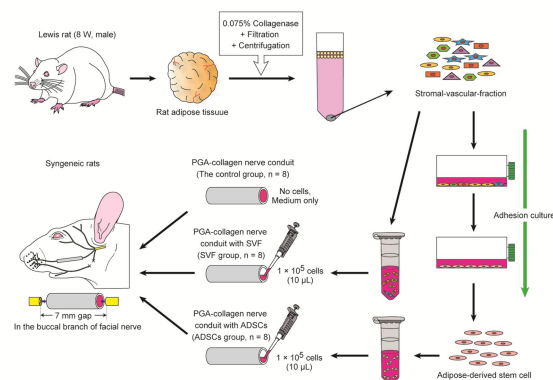


図 1 本実験のシエーマ

Nerbridge 単体の移植群 (コントロール群) を作成、これらの人工神経を顕微鏡下に前述のラット顔面神経頬筋枝欠損部に 9-0 ナイロン糸を用いて移植を行った (図 1)。術後 13 週で過去に我々が開発、報告した複合誘発筋電図 (CMAP)、さらにトルイジンブルー染色、電子顕微鏡撮影を用いた 3 群の組織学的、生理学的比較検討を行った。

4. 研究成果

CMAP では ADSCs 群と SVF 群が類似した波形を示した。Amplitude はコントロール群に比べ SVF 群は優位に高値であった (0.7 ± 0.4 mV vs. 1.6 ± 1.2 mV) が、コントロール群と ADSCs 群 (0.7 ± 0.4 mV vs. 1.1 ± 0.8 mV)、ADSCs 群と SVF 群 (1.1 ± 0.8 mV vs. 1.6 ± 1.2 mV) のそれぞれ 2 群間では有意差を認めなかった。Duration は 3 群間で有意差を認めなかった。Latency はコントロール群が ADSCs 群、SVF 群に比べて優位に高値であった (4.8 ± 1.2 ms vs.

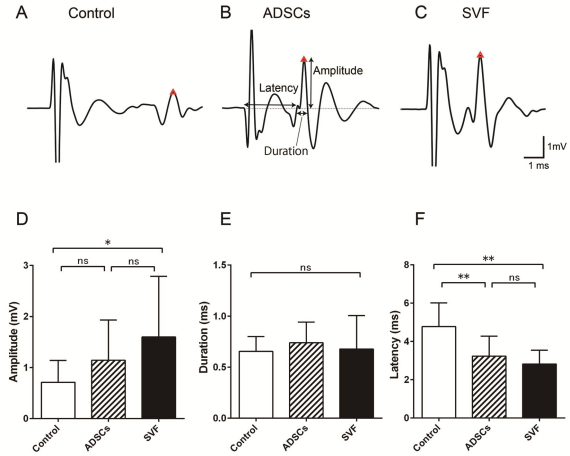


図 2 複合誘発筋電図データ

3.2 ± 1.0 ms, 4.8 ± 1.2 ms vs. 2.8 ± 0.7 ms) (図 2)。組織学的評価では、再生した神経の中央部の横断面でトルイジンブルー染色と電子顕微鏡写真の観察を行った。トルイジンブルー染色では、コントロール群は ADSCs 群、SVF 群に比べて再生神経の太さが細かった。再生軸索数は SVF 群 (1278 ± 757)、ADSCs 群 (913 ± 497)、コントロール群 (595 ± 528) の順で高値であったが、3 群間に有意差は認めなかった。電子顕微鏡写真では、コントロール群が他の二群に比べてミエリンが薄く、神経線維の太さも細かった。Axion diameter は SVF 群 (4.5 ± 1.6 μ m)、ADSCs 群 (4.0 ± 1.3 μ m)、コントロール群 (3.7 ± 1.3 μ m) の順で優位に高値であった。Fiber diameter も同様に SVF 群 (5.5 ± 1.7 μ m)、ADSCs 群 (5.1 ± 1.4 μ m)、コントロール群 (4.5 ± 1.5 μ m) の順で優位に高値であった。Myeline thickness は ADSCs 群 (0.6 ± 0.1 μ m)、SVF 群 (0.5 ± 0.1 μ m)、コントロール群 (0.4 ± 0.1 μ m) の順に優位に高値であった。g ratio は ADSCs 群が最も低値であり (0.8 ± 0.1 μ m)、コントロール群と SVF 群の 2 群間に有意差は認めなかった (0.8 ± 0.1 vs. 0.8 ± 0.1)。このように、ADSCs と SVF はともに同レベルでの神経再生促進効果を有することが解明された。

しかしながら ADSCs と SVF を末梢神経損傷症例へ臨床応用する観点から比較すると、SVF は脂肪を酵素処理するだけで使用可能であり、特別な設備を要さず培養の時間もかからず、ADSCs に比べて臨床での使用に際してそのハードルが低く、神経損傷に対するハイブリッド人工神経の材料として応用し易いと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Yosuke Niim, **Hajime Matsumine (corresponding author)**, Yuichi Takeuchi, Hironobu Osaki, Satoshi Tsunoda, Mariko Miyata, Masayuki Yamato, Hiroyuki Sakurai. A collagen-coated PGA conduit for interpositional-jump graft with end-to-side neuroorrhaphy for treating facial nerve paralysis in rat. *Microsurgery*; 39(1):70-80. 2019.
- 2) Mari Shimizu, **Hajime Matsumine (corresponding author)**, Hironobu Osaki, Yoshihumi Ueta, Satoshi Tsunoda, Wataru Kamei, Kazuki Hashimoto, Yosuke Niimi, Yorikatsu Watanabe, Mariko Miyata, Hiroyuki Sakurai. Adipose-derived stem cells and the stromal vascular fraction

in polyglycolic-acid (PGA)-collagen nerve conduits promote rat facial nerve regeneration.
Wound Repair Regen; 26(6):446-455. 2018.

〔学会発表〕(計5件)

- 1) **松峯 元**, 亀井航, 新美陽介
脂肪由来幹細胞を用いた新しい顔面神経不全麻痺手術法の確立
第27回日本形成外科学会基礎学術集会 2018年
- 2) **松峯 元**, 松峯真理, 亀井航
間葉系幹細胞を用いたハイブリッド型人工神経による顔面神経再生
第41回顔面神経学会 2018年
- 3) **松峯 元**, 佐々木亮, 清水真理, 亀井航, 風間智彦, 松本太郎, 櫻井裕之
脱分化脂肪細胞(DFAT)含有ハイブリッド型人工神経による顔面神経再建
第16回日本再生医療学会総会 2017年
- 4) **松峯 元**, 佐々木亮, 渡辺頼勝, 新美陽介, 櫻井裕之
皮下脂肪組織由来stromal-vascular-fractionを用いた顔面神経再生研究
第25回日本形成外科学会基礎学術集会 2016年
- 5) **松峯 元**, 渡辺 頼勝, 新美陽介, 佐々木亮, 櫻井裕之
皮下脂肪組織由来のstromal-vascular-fractionは顔面神経再生を促進する
第39回顔面神経学会 2016年

※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、研究者個人に帰属されます。