

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11411

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞をもちいた反回神経の再生治療の開発

研究課題名(英文) Development of regenerative therapy for recurrent laryngeal nerve using dedifferentiated fat cell

研究代表者

石井 崇平 (ISHII, Sohei)

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：80648056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、脂肪細胞を人工的に未分化細胞へ脱分化させた脱分化脂肪細胞(DFAT)を充填したチューブを移植することで、反回神経再生治療効果を検討することを目的とした。予備実験としてI型コラーゲンゲル充填シリコンチューブを用いて、断端間距離1、3、5mmとした3群の再生実験を行った。その結果、1時的であるが全ての群において喉頭運動の回復が認められた。予備実験の結果より、5mmシリコンチューブ内にDFAT含有させたI型コラーゲンゲルを充填し、反回神経の再生を試みたが、現時点では明らかな有意差は認められなかった。今後、至適な細胞数の検討などが必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、反回神経麻痺に対する確立した治療法はなく、新たな治療法が求められている。今回、脱分化脂肪細胞という人工的に未分化細胞へ脱分化させた細胞を用いることにより反回神経の再生効果を検討した。本研究期間では有意な結果は得られなかったが、細胞治療の検討を行うための動物モデルの作製に成功した。今後はこれを用いることで反回神経再生の研究の発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the regenerative nerve regeneration treatment effect by transplanting a tube filled with dedifferentiated adipocytes (DFAT) obtained by artificially dedifferentiating adipocytes into undifferentiated cells. As a preliminary experiment, three groups of regeneration experiments were performed using a type I collagen gel-filled silicone tube and the distance between stumps was 1, 3, and 5 mm. As a result, recovery of laryngeal movement was observed in all the groups although it was temporary. From the results of preliminary experiments, we tried to regenerate the recurrent laryngeal nerve by filling type 5 collagen gel containing DFAT in a 5 mm silicon tube, but no significant difference was observed at this time. In the future, it was considered necessary to study the optimal number of cells.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：反回神経 脱分化脂肪細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 従来の反回神経麻痺の治療、研究について

これまで手術や外傷などにより切断された反回神経の再建には、神経縫合術や神経移植術、神経移行術が行われてきた。ただし、これらの方法では、神経再支配は得られるものの、喉頭運動の回復は得られない。喉頭運動の回復が得られない原因にはいくつか説があるが、内転枝と外転枝の間に過誤再生が起きるためという説が有力である。これまでに、イヌの反回神経においてポリグリコール(PGA)酸で作られた神経再生誘導チューブによる再建を行ったところ、6頭中4頭で声帯運動の回復を得たとの報告がある。ただし、ヒトに対しても臨床応用が行われているが有効性を示す報告はされていない。また、PGAチューブに医療用コラーゲンを充填させた神経再生誘導チューブ(ナブリッジTM)が薬事承認を受け、主に感覚神経における抹消神経断裂・欠損部に対し臨床応用されているが、ラットの反回神経に移植した研究では、有髄神経線維の増加と神経繊維径の回復は見られたが、声帯運動の回復は認められていない。つまり、反回神経麻痺に対する確立された治療法はない。

(2) 脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)について

近年、生体組織より得られる間葉系幹細胞が(MSC)が高い増殖能力と多分化能を有することが明らかにされ、骨、軟骨、血管、心筋などの再生を目的とする臨床試験が開始されている。研究分担者である Matsumoto らは、終末分化した成熟脂肪組織を天井培養という方法で体外培養することで得られる脱分化脂肪細胞(DFAT)が高い増殖能と間葉系幹細胞と同等の多分化能を持つことが明らかにした。DFAT は骨髄系幹細胞と同様に種々の液性分泌を介して、組織修復作用、血管新生作用、免疫抑制作用などを示す。このような多能性を利用して細胞治療への臨床応用を目指している。また、DFAT は成熟脂肪細胞から高効率かつ異種細胞の混入なく調整できるため、必要な成熟脂肪の採取量は約 1g と微量で済むことから、低侵襲であり、全身状態が不良な患者や高齢者からでも調整できるというメリットがある。

(3) DFAT による神経再生について

ラットにおける顔面神経の再生において、Matsumine らは脱分化脂肪細胞 DFAT が神経再生を促進したと報告した。この実験では、切断した顔面神経に対して DFAT を充填したシリコンチューブを移植している。その結果、再生神経の軸索径増加し、電気生理学的評価においても優位に回復を認めていた。上記を踏まえて、DFAT 細胞を用いた反回神経の再生に着想した。

2. 研究の目的

反回神経は声帯の運動支配神経であるが、頸胸部の外科手術や、悪性腫瘍、特発性疾患などにより障害されることがある。もし障害されると嚔声や嚔下障害などを生じることとなる。これまで、反回神経の再建には神経吻合や神経移植が行われてきたが、声帯運動の回復は得られない。そこで、本研究では、本学にて開発され、高い増殖能と多分化能を持つことが明らかになった DFAT を用いることで、反回神経の再生を促し、声帯運動を回復させることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 異なる断端間距離での型コラーゲン充填シリコンチューブによる架橋

本研究は、反回神経切断ラットにおいて脱分化脂肪細胞(DFAT)を充填したチューブを移植することで、その神経再生治療効果を検討するものである。ラットの反回神経は非常に細いため、それを架橋するチューブも内径 0.5mm 程度のもとなる。そのため、内部に含有できる細胞数をより多くするためには、チューブの長さは反回神経が再生可能な範囲内で最長のものが良いと考えた。そこで、予備実験として次の実験を行った。計 37 頭のラットを切除する神経の長さによって 3 群にグループ分けした。反回神経を 1mm 切除し、断端間の距離を 1mm としシリコンチューブに固定した 1mm 群(n=11)、それぞれ 3mm とした 3mm 群 (n=11) ,それぞれを 5mm とした 5mm 群(n=11)である。また、コントロールとして左反回神経の切除のみを行うコントロール群(n=4)を作成した。喉頭内視鏡検査を、全群 (n=37) に対して処置直後、処置後 5 週、10 週、15 週に行った。誘発筋電図検査は処置後 15 週に非架橋群(n=2)、架橋群 (各群 n=3) に対して行った。チューブ内組織の組織学的検討は 15 週後架橋群(各群 n=11)に、内喉頭筋の組織学的検討は非架橋群(n=2)、架橋群 (各群 n=8)に対して行った。

(2) DFAT 含有 1 型コラーゲン充填シリコンチューブによる架橋

予備実験において、5mm まで神経再生可能であることが確認されたため、DFAT を含有させた型コラーゲンを 5mm のシリコンチューブに充填し、反回神経再生実験を行った(n=5)。評価は、予備実験と同様に行った。

4. 研究成果

(1) 異なる断端間距離での 1 型コラーゲン充填シリコンチューブによる架橋

喉頭運動の評価

喉頭運動の回復について評価するため、処置直後、処置後 5 週、10 週、15 週に喉頭運動の動きを内視鏡を用いて観察した。手術直後の観察では、検討した全個体で処置側の喉頭運動が消失していた。また、コントロール群においても 15 週までの観察期間内に喉頭運動の回復が認められた個体はいなかった。一方、架橋群においては、1mm 群、3mm 群、5mm 群において、それぞれ喉頭運動の回復が得られた個体が存在した。喉頭運動が認められた個体は、5 週において、1mm 群で 9 頭、3mm 群で 4 頭、5mm 群で 3 頭であった。10 週では、低下しており 1mm 群で 3 頭、3mm 群で 3 頭、5mm 群で 1 頭であった。15 週では更に低下し、1mm 群で 1 頭、3mm 群で 1 頭、5mm 群で 1 頭であった。5 週における 1mm 群は、コントロール群、3mm 群、5mm 群に比べて有意 ($p<0.05$) に喉頭運動の回復を認めた個体が多かった。ただし、5 週または 10 週で運動が認められるようになった個体も、15 週では運動が消失しており回復は一過性であることが多かった。最終観察ポイントである 15 週において喉頭運動が確認されたものは各群 1 頭ずつのみであった。以上の結果より、切断した反回神経を 1 型コラーゲン充填シリコンチューブで架橋することにより、一過性でも喉頭運動の回復が得られることがわかった。また、断端間距離は短いほど回復しやすいことが示唆された。

チューブ内再生組織の評価

神経の再生を組織学的に評価するためチューブ内再生組織の観察を行った。処置後 15 週に、全身麻酔下にて反回神経を架橋したシリコンチューブを抜去しチューブ内の再生組織の評価を行った。その結果、検討した全ての個体で左右の組織が接合し、連続性が保たれている所見が確認された。チューブ内再生組織の中央部分の直径を測定し群間比較したところ 1mm 群、3mm 群、5mm 群それぞれの平均は $344.7 \pm 55.4 \mu\text{m}$ (平均値 \pm 標準偏差、以下同様)、 $245.0 \pm 65.0 \mu\text{m}$ 、 $193.3 \pm 40.9 \mu\text{m}$ であり、1mm 群と比較して 3mm 群($p<0.01$)、5mm 群

($p < 0.005$)は有意に細かった。電子顕微鏡による観察では、各群ともミエリン鞘に包まれた有髄神経と無髄神経が確認された。以上の結果より、1mm 群、3mm 群、5mm 群において神経が連続性をもち再生したことが確認された。また、断端間距離は短いほど再生に有利であることが示唆された。

喉頭組織の評価

喉頭運動機能評価のために、反回神経の運動神経線維により支配されている内喉頭筋の状態を組織学的に検討した。反回神経の支配を受ける内喉頭筋の中で最も観察に適した甲状披裂筋の観察を行った。甲状披裂筋は、検討した全ての個体において処置側が正常側に比べて萎縮が認められ、また高倍率による観察では筋線維の萎縮も認められた。(処置側/正常側)比を定量すると、1mm 群で $74.3 \pm 7.5\%$ (平均値 \pm 標準偏差、以下同様)、3mm 群で $67.9 \pm 7.4\%$ 、5mm 群で $61.8 \pm 7.4\%$ であった。1mm 群、3mm 群、5mm 群の順で萎縮は少ない傾向があり、1mm 群と5mm 群では有意差 ($P < 0.01$) を認めた。以上の結果より、いずれの架橋群においても喉頭内筋の萎縮は起こるものの、断端間距離が短い方が萎縮は少ないことが示唆された。

誘発筋電図の評価

再生した反回神経を電気生理学的に接合しているか評価するために誘発筋電図検査を行った。処置後 15 週に処置側と正常側の反回神経を電気刺激し、同側の甲状披裂筋から誘発筋電図を測定した。非架橋群では処置側の誘発活動電位は測定した 2 頭中 2 頭とも消失していた。架橋群のうち 1mm 群と 3mm 群ではそれぞれ 3 頭中 2 頭、3 頭中 1 頭で誘発活動電位が検出された。1mm 群と 3mm 群の誘発筋電図は、正常側と比べると CMAP の電位は低く、出現までの潜時は延長していた。電位について 1mm 群と 3mm 群で明らかな差異はなかったが、潜時は 1mm 群と比べ 3mm 群で延長している傾向があった。一方、5mm 群では測定した 3 頭中 3 頭とも誘発活動電位は検出されなかった。以上の結果より 1mm 群と 3mm 群では電気生理学的に機能を有する再生神経の存在が示唆された。また、神経断端間の距離は長くなるほど再生に不利であることも示唆された。

一過性に喉頭運動を認めた個体の検討

喉頭運動の評価において、一度喉頭運動の回復を認めたものの、その後消失する個体について、その原因を明らかにするため個々の個体のデータを解析した。電気生理学および組織学的にも反回神経の再生が確認されても、喉頭運動が一過性の回復にとどまる可能性が示唆された。

(2) DFAT 含有 1 型コラーゲン充填シリコンチューブによる架橋

DFAT 含有 1 型コラーゲン充填シリコンチューブによる架橋実験では、非含有と比較して有意な改善は得られなかった。要因としては含有する細胞数や、チューブ素材の問題、チューブ内組織の阻血が考えられたそのため、現在、条件変更を行っているが、本研究期間ではこの結果を集約できなかった。今後も検討を重ねていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅居僚平、原田英誉、風間智彦、松崎洋海、大島猛史、松本太郎
2. 発表標題 コラーゲンゲル充填シリコンチューブ架橋によるラット反回神経再生モデルの確立
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅居僚平、松崎洋海、牧山清、大島猛史
2. 発表標題 反回神経切除ラットにおける再生可能な神経欠損距離の検討
3. 学会等名 第30回日本喉頭科学会総会・学術講演会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浅居 僚平 (ASAI Ryohei) (60851095)	日本大学・医学部・助手 (32665)	
研究分担者	松本 太郎 (MATSUMOTO Taro) (50366580)	日本大学・医学部・教授 (32665)	

