

令和 6 年 5 月 2 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20969

研究課題名（和文）経静脈的に全身投与したADSCsの自家神経移植治療における作用機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of action in the treatment of autologous nerve grafts with transvenous systemic administration of ADSCs.

研究代表者

本田 宗一郎（Honda, Soichiro）

金沢大学・附属病院・医員

研究者番号：10965362

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：自家神経移植モデルラットを作製し、モデルラットの尾静脈からADSCsの細胞懸濁液を投与し、対照群との比較を行った。全身投与したADSCsが自家神経移植に与える影響に関する検討では、ADSCsを投与したモデルにおいて前脛骨筋の筋湿重量の増加と複合筋活動電位の週末潜時の短縮を認め、神経再生が促進したと考えられた。全身投与したADSCsの分布を検討した研究では、自家神経移植片の周囲にわずかながらADSCsが分布していることを確認した。全身投与したADSCsの作用機序に関しては、ADSCs投与群と対照群を作製し、RNAシーケンスを実施した。現在その結果を評価中であり、今後報告の予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、脂肪由来幹細胞を経静脈的に投与した場合においても、神経再生を促進する効果があることが判明した。全身投与した脂肪由来幹細胞は、その大部分が神経再生を促進する効果を持つ液性因子などを分泌し、それらを介して神経再生の促進に寄与していると考えている。本研究の社会的意義は、自家神経移植時におけるADSCsの低侵襲かつ簡便な投与方法の確立に貢献することである。

研究成果の概要（英文）：We made Autologous nerve graft model rats and cell suspensions of ADSCs. We administered ADSCs via the tail vein of the model rats and compared with the control group. In a study on the effect of systemically administered ADSCs on autologous nerve grafts, an increase in muscle wet weight of the tibialis anterior muscle and a shortening of the weekend latency of the compound muscle action potential were observed in the model treated with ADSCs, suggesting that nerve regeneration was accelerated. A study examining the distribution of systemically administered ADSCs found a small distribution of ADSCs around autologous nerve grafts. For the mechanism of action of systemically administered ADSCs, RNA sequencing was performed in ADSCs-treated and control groups. The results are currently being evaluated and will be reported in the future.

研究分野：整形外科

キーワード：脂肪由来幹細胞 自家神経移植術 全身投与

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷や腫瘍の切除に伴う末梢神経の欠損は運動障害や知覚障害をきたし生活の質を著しく低下させる。末梢神経の欠損に対する治療の gold standard は自家神経移植だと考えられているが、十分な機能回復が得られる例は半数に満たず、その成績は十分ではない。申請者らの研究グループはこれまでに自家神経移植片に脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells: 以下 ADSCs)を付加する方法で自家神経移植の成績を向上させることに成功しているが、さらに成績を向上させるために ADSCs を経静脈的に全身投与する方法を考案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は ADSCs の全身投与による自家神経移植の治療成績を向上させ、ADSCs の作用機序を解明することである。

3. 研究の方法

ADSCs はウィスター系ラットから脂肪を採取し、Zuk らの方法で処理、培養し、3 回の継代を行い作成する。得られた ADSC を計測してリン酸緩衝食塩水以下 PBS を混合し、500 μ l 当たり $2-3 \times 10^6$ 個の ADSCs を含む細胞懸濁液を作成した。

自家神経移植モデルはウィスター系ラットの左の坐骨神経を 15mm 採取し、反転、縫合することで作成した。モデルラットの作成直後に尾静脈から ADSCs の細胞懸濁液または PBS を投与した。

以下、ADSCs の細胞懸濁液を投与したモデルラットを ADSCs 群、PBS を投与したモデルラットを対照群とする。

1) ADSCs の全身投与が自家神経移植術に与える影響に関する検討

ADSCs 群と対照群の 2 群(各 n=12)を作製した。作製後 12 週時に下肢運動機能評価 (sciatic function index:SFI)、Autotomy score、前脛骨筋の複合筋活動電位の終末潜時および最大振幅、前脛骨筋の筋湿重量の評価を行った。

2) 全身投与した ADSCs の分布に関する検討

ADSCs 群を作製し(n=6)、尾静脈から Dil で標識した ADSCs の細胞懸濁液を投与した。投与から 1 日後、4 日後(各 n=3)に自家神経移植片と腰椎の後根神経節及び脊髄前角を採取し、組織標本内における ADSCs の分布について評価した。

3) 全身投与した ADSCs による神経移植片に与える影響に関する検討

ADSCs 群と対照群を作製し(各 n=12) 投与から 1 週後、2 週後、4 週後、12 週後(各週 n=6)に神経移植片を採取した。

採取した自家神経移植片の中央断面から標本作成し、トルイジンブルー染色を用いた。

1 標本から 1 か所 104 μ m² の面積で 5 か所切り取り、切り取った 5 か所を AxonDeepSeg を用いて、有髄軸索数、軸索径、G-ratio を評価した。

4) 全身投与した ADSCs の作用機序に関する検討

ADSCs 群と対照群を作製し(各 n=3) 作製から 1 週後に自家神経移植片を採取し、RNA シークエンスによる網羅的解析を行った。

4．研究成果

1) ADSCs の全身投与が自家神経移植術に与える影響に関する検討

SFI と Autotomy スコアは 2 群間で有意差は認めなかった。筋湿重量の患健比は対照群と比較して ADSCs 群で有意に高値となっていた。複合筋活動電位の終末潜時も対照群と比較して ADSCs 群では有意に短縮していた。最大振幅は 2 群間に有意差を認めなかった。

以上の結果から、ADSCs の全身投与によっても自家神経移植術における神経再生を促進する効果があることが判明した。

2) 全身投与した ADSCs の分布に関する検討

神経移植片の周囲組織にはわずかながら ADSCs の分布を認めたものの、神経移植片の内部、後根神経節、脊髄前角には ADSCs の分布を認めなかった。これは、ADSCs が血液神経関門を通過できないことが原因と考えた。

3) 全身投与した ADSCs による神経移植片に与える影響に関する検討

標本の観察結果

1 週時点で ADSCs 群は対照群と比較して軸索径が増大していた。2 週時点では両群とも有髄軸索数が減少していた。4 週時点では両群とも有髄軸索が増加していた。12 週時点では両群ともに成熟した軸索が多数見られた。

AxonDeepSeg の結果

単位面積当たりの有髄軸索数をまとめると、12 週の時点で両群とも増加しており、2 群間に有意差は認めなかった。

軸索径は、12 週時点では両群間に有意差を認めなかった。

G-ratio は、12 週時点で ADSCs 群が有意に低値となっていた。ADSCs 群において再髄鞘化が有意に促進していたと捉えられる。

4) 全身投与した ADSCs の作用機序に関する検討

現在評価中である。

増幅もしくは減衰した遺伝子のうち 2 群間で有意差を認めたものを特定し、pathway 解析を行う予定である。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1．発表者名 本田 宗一郎
2．発表標題 脂肪由来幹細胞を経静脈的に全身投与した自家神経移植術の成績
3．学会等名 第66回日本手外科学会
4．発表年 2023年

1．発表者名 Soichiro Honda
2．発表標題 Outcome of Autologous Nerve Graft with Transvenous Systemic Administration of Adipose-Derived Stem Cells
3．学会等名 The 12th congress of the World Society For Reconstructive Microsurgery (国際学会)
4．発表年 2023年

1．発表者名 本田 宗一郎
2．発表標題 脂肪由来幹細胞を経静脈的に全身投与した自家神経移植術の検討
3．学会等名 第34回日本末梢神経学会
4．発表年 2023年

1．発表者名 本田 宗一郎
2．発表標題 脂肪由来幹細胞の経静脈的全身投与を併用した自家神経移植術の成績
3．学会等名 第67回日本手外科学会
4．発表年 2024年

1．発表者名 Soichiro Honda
2．発表標題 Outcomes of autologous nerve grafting with transvenous systemic administration of adipose-derived stem cells
3．学会等名 FESSH 2024（国際学会）
4．発表年 2024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

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------