

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670711

研究課題名(和文) 顔面神経麻痺に対する誘導シュワン細胞による再生治療 - 自己細胞移植治療への挑戦 -

研究課題名(英文) Effect of transplanting normal human dermal fibroblasts (NHDF) in the rat facial nerve palsy model

研究代表者

欠畑 誠治 (Kakehata, Seiji)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90261619

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)：ラット顔面神経損傷モデルに対するヒト皮膚線維芽細胞移植の効果を検討するために、ラット顔面神経損傷モデルを改良し、ラット顔面神経再生の評価法の再検討とヒト皮膚線維芽細胞の移植を行った。ラット顔面神経損傷モデルを作成するためにラット顔面神経を切除し、術後に左震毛の運動麻痺を確認した。顔面麻痺の評価として震毛運動の画像を撮影し、震毛運動の最大角度を用いて行った。移植用の細胞は細胞外マトリックスであるMatrigelで細胞濃度 5.6×10^6 /mlになるように懸濁した。ヒト皮膚線維芽細胞を移植したラットモデルと、コントロールモデルを作成した。術後8週までに震毛運動の有意な改善は得られていない。

研究成果の概要(英文)：Objective: To determine the effect of transplanting normal human dermal fibroblasts (NHDF) in the rat facial nerve palsy model. Methods: Eight weeks old Wister male rats (250g) were used. Facial nerves were transected at buccal branch and marginal branch in 6 mm length under general anesthesia. Polymer tubes filled with NHDF plus matrigel were grafted between the cut nerves. Winking amplitude was measured to determine the facial nerve function. Result: Winking amplitude was gradually recovered in 8 week. However, the effect of NHDF was not significant.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：顔面神経麻痺 ヒト皮膚線維芽細胞 機能再生 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。本研究では顔面神経損傷動物モデルに、骨髄間質細胞から高効率で誘導できるシュワン細胞を用い、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。耳下腺悪性腫瘍切除・外傷・錐体骨手術に伴う peripheral facial nerve injury に対して現在用いられている nerve graft は、有効な axonal guide であるものの、採取できる神経に制限があり、多部位に渡る神経障害には対応できない。

神経断裂に対して、nerve conduits (NCs) が nerve graft に代わるものとして提唱されている (J Hand Surg. 2004)。当初、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問題がある。NCs とシュワン細胞を留置すると神経再生が促進したという報告がある (J Neurosurg. 2005) が、シュワン細胞は増殖効率が悪く、培養するのが困難であるという特徴を持つため実際の臨床応用は困難である。

一方、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、骨髄間質細胞にサイトカイン処理や Notch 導入を順序立てて行うことにより、非常に高い効率でシュワン細胞を誘導できることを報告している (Eur J Neurosci 2001, J Neurosurg 2004, J Neuropath Exp Neurol 2005, BBRC 2007)。



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。

2. 研究の目的

今回、顔面神経損傷動物モデルに、誘導シュワン細胞を含む生体吸収性の chitosan gel sponges を足場として移植することにより、再生医学的アプローチによる顔面神経再生の可能性を検証する。患者自身から分化転換能をもつ細胞を採取し、目的とする細胞に分化させて個体に戻すという自己細胞移植治療のモデルとなる。神経回復が実証されれば、自己細胞移植を使った再生医学的アプローチの有効性の実証となり、顔面神経麻痺患者の福音となるばかりではなく、種々の末梢神経再生のモデルとなり、その波及効果は大きい。

今回、顔面神経損傷動物モデル(ラット)にこの誘導シュワン細胞を導入し、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して実験を行った。

3. 研究の方法

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

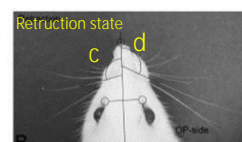
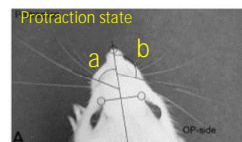
Surgical procedure は以下の通りである。

- (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 の長さにならして切除
- (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 + ヒト皮膚繊維芽細胞 (Normal Human Dermal Fibroblasts : NHDF) で比較検討し、神経の再生に差が生じるかを検討した。免疫抑制剤投与化 (FK506 1mg/kg/day 連日皮下注) を併用して実験を行った。

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。

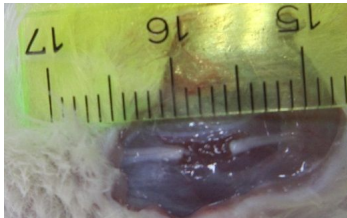
Wisking amplitude



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

4. 研究成果

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することで、Wisking amplitude の著明な減少を惹起させることができ顔面神経麻痺を確認できた。

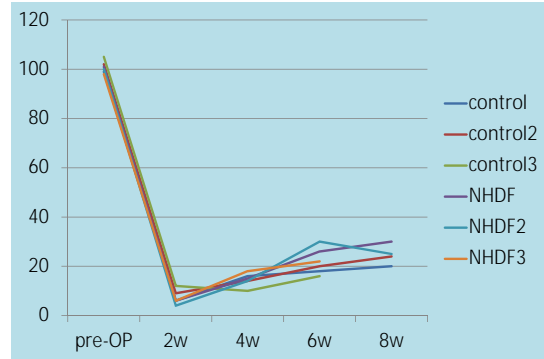


移植用の細胞は細胞外マトリックスである Matrigel で細胞濃度 5.6×10^6 /ml になるように懸濁した。移植用細胞の懸濁液を生体に吸収される素材である 75% L-lactic acid and 25% E-caprolactone ポリマーチューブ 11 μ l チューブに充填し移植した。



ヒト皮膚線維芽細胞の移植

Wisking amplitude の測定から開始した。Wisking amplitude は移植後 8 週まで緩やかな回復傾向を示した。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。しかしながら、今回の条件では、NHDF の投与による上乗せ効果は、Wisking amplitude の実験からは得られていない。今後、NHDF 投与細胞数を再検討し、NHDF の投与による上乗せ効果の有無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、組織学的にミエリン鞘の厚さを確認する必要がある。生理学的には、nerve action potentials を測定するための測定装置の設定も完了したため、機能回復をより詳細に検討する予定である。さらに、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、再生神経断面の免疫染色(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

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

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 (査読有り)

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 (査読有り)

[学会発表](計 2 件)

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, 帝京平成大学池袋キャンパス(東京); 2014 年 5 月

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、兎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, 山形大学医学部交流会館(山形); 2013 年 12 月

6 . 研究組織

(1)研究代表者

欠畑 誠治 (KAKEHATA Seiji)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：90261619

(2)研究分担者

渡辺 知緒 (WATANABE Tomoo)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：60344793

伊藤 吏 (ITO Tsukasa)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：50344809

古川 孝俊 (FURUKAWA Takatoshi)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：80466630