

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861499

研究課題名(和文)自家神経グラフトと幹細胞を融合した強化型神経グラフトの開発

研究課題名(英文)Development of enhanced nerve graft combined with autologous nerve graft and stem cells.

研究代表者

富田 興一(Tomita, Koichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90423178

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文):自家神経グラフト(ANG)の問題点の一つにANG内シュワン細胞(SC)生存率の低下がある。本研究では脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)の細胞保護効果に着目し、ASCをANGへ付加することでANG内SCの生存率が向上するのではないかと仮説を検証した。無血清培養下におけるASCのSCに対する保護効果を確認した後、ラット末梢神経損傷モデルにおいてASCを付加したANGを移植した。その結果、ANG内における細胞死数の減少、および運動機能回復速度の向上を認めた。ASCを付加したANGは末梢神経再建において有力な方法となりえる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):One of the major problems with nerve grafts is that the survival of a graft segment, including endoneurial Schwann cells (SCs), is uncertain. In this study, we investigated whether the survival of nerve grafts improves when adipose-derived stem cells (ASCs) are incorporated into the grafts. Grafts were entubulated to isolate them from the blood supply of surrounding tissues, mimicking the clinical conditions of a poorly vascularized recipient bed. When ASCs were transplanted to the epineurial layer of the grafts, the number of endoneurial TUNEL-positive cells decreased significantly, as compared to grafts without ASCs, at 10 days postoperatively. Walking track analysis also revealed that animals with the ASC-transplanted grafts had significantly faster motor function recovery, as compared to those with grafts without ASCs. These results suggest that nerve autografts, in combination with ASC therapy, could offer a new approach to obtaining optimal outcomes after peripheral nerve injury.

研究分野：再建外科

キーワード：脂肪組織由来間葉系幹細胞 シュワン細胞 神経グラフト

1. 研究開始当初の背景

近年におけるマイクロサージャリー技術の発展により末梢神経再建後の治療成績は向上したが、3 cm以上の神経欠損や径の大きい運動神経欠損の症例においては依然として自家神経移植が唯一の再建材料であり、その治療成績は決して満足のいくものではない。特に問題となるのは、ある程度径の大きな神経を移植した際、神経内の血行不良により再生軸索支持に極めて重要なシュワン細胞の生存率が低下することである。その結果、シュワン細胞による再生軸索の橋渡しとしてのビュングナー帯形成や神経栄養因子分泌といった再生軸索伸長に必要な支持効果が十分に得られない。

現在この問題を解決する方法としては血管柄付き神経移植や、細い知覚神経を束ねて移植する方法が報告されている。前者においては技術的に容易ではない、適応症例に限られるという理由から未だ一般化には至っていない。後者においては長距離の神経再建に対しては適応が難しい、縫合部において癒着形成しやすいという問題がある。このような現状から自家神経移植における新たなブレークスルーが期待される場所である。

近年、様々な体性幹細胞が同定され臨床においても応用されつつあるが、2002年にはZukらにより脂肪組織の前駆細胞の中に多分化能を持つ細胞(ASC)が存在することが報告された。ASCは脂肪吸引により極めて低侵襲に大量採取が可能であることから、骨髄に代わる有力な体性幹細胞源として注目されている。特筆すべき点として、ASCは虚血状態により血管新生、アポトーシス抑制、線維化抑制作用を有するHGFをはじめとする種々の増殖因子を産生するのに加え、それ自身が血管内皮細胞へ分化し血管新生に寄与することが挙げられる。実際に移植脂肪にASCを混入することでその生着率が向上することも臨床試験で確認されている。これらの報告はASCを自家神経移植に付加することで内在性シュワン細胞生存率が向上する可能性を示唆するものである。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究ではASCが持つ特徴を自家神経グラフトへ付加することで末梢神経再建後機能回復向上へ向けた新たな治療戦略を提唱し、それを検証することを目的とした。具体的には(1)虚血ストレス下シュワン細胞におけるASCが及ぼす効果の解明、(2)自家神経グラフトにおけるASC付加が及ぼす効果の解明、および(3)ASC付加型自家神経グラフト移植による運動機能回復促進効果の解明をそれぞれ目標とした。

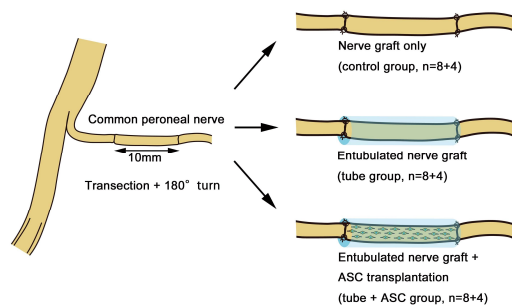
3. 研究の方法

(1)虚血ストレス下シュワン細胞へASC付加が及ぼす影響の検討

近交系GFPラット皮下脂肪からASCを得た後、虚血ストレスを模倣する目的で、一定期間シュワン細胞の培養を行った。ストレスによって引き起こされるネクローシス、アポトーシスを7-Amino-Actinomycin D、TUNEL染色を用いてそれぞれ検出し、ストレス条件の最適化を行った。その後、シュワン細胞をASCと非接触共培養することにより各ストレス下におけるASCのシュワン細胞に対する保護効果を検討した。

(2)自家神経グラフトにおけるASC付加が及ぼす効果の検討

10mmの近交系ラット腓骨神経欠損に対し、自家神経グラフトをシリコンチューブ内に挿入した状態で移植することで移植床血行不良神経グラフトモデルを作成した。移植時においてASCを神経グラフト神経上膜内にマイクロシリンジで注入することでASC付加型自家神経グラフトを作成した。対照群として、シリコンチューブなしの群、シリコンチューブは使用しASC付加を行わなかった群を作成した(図1)。移植後10日目において神経グラフトを採取し凍結切片をTUNEL染色することでアポトーシス細胞数を評価した。



(図1)動物モデルのまとめ

(3)ASC付加型自家神経グラフト移植による運動機能回復促進効果の検討

長期生存モデルを上記の如く作成し、術後経時的に足跡分析を行った。Peroneal function index (PFI)を算出することで運動機能回復の程度を評価した。また術後12週目において遠位神経を採取し、横断切片のトルイジンブルー染色によって形態組織学的評価を行った。

4. 研究成果

ASCとの共培養は無血清下におけるSCの細胞死を抑制する

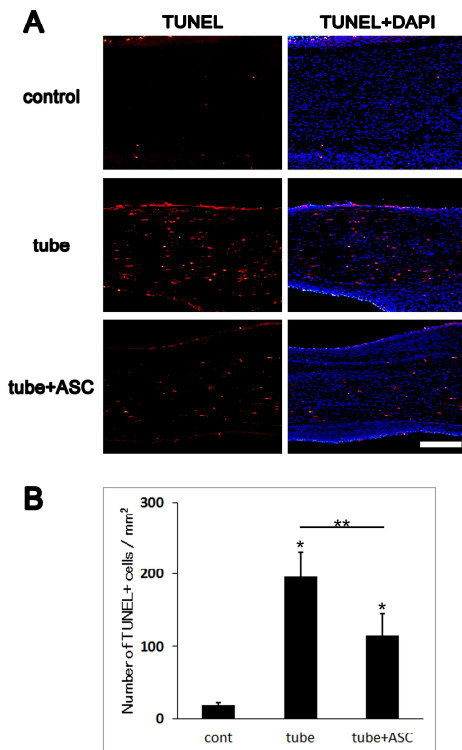
ASCとSCの非接触共培養においては両細胞群は物理的には分離されているが、インサートの微小孔を通じて相互にパラクライン作用を及ぼすことが可能となる。血清入り倍地下においては7-AADおよびTUNEL陽性の死細胞はほとんど認めず、ASCとの共培養によってもその数は影響を受けなかった。一方、24時間の無血清下培養後においては $10.4 \pm 1.4\%$ 、 $5.9 \pm 0.4\%$ のSCがそれ

ぞれ 7-AAD および TUNEL 陽性であった。しかしながら、ASC との共培養を行った群においては $5.4 \pm 1.4\%$ 、 $2.7 \pm 1.0\%$ の SC がそれぞれ 7-AAD および TUNEL 陽性であり、統計学的に有意な死細胞数の減少を認めた。これらの結果より、ASC はパラクライン作用により間接的に無血清下 SC を細胞死から保護することが示唆された。

ASC 移植は虚血下における神経グラフト内細胞死を抑制する

我々は ASC を神経グラフトに付加することでグラフト内細胞の生存率が向上するか検討を行った。一般的に、ラット総腓骨神経をグラフトとして再移植した場合、非常に良好なグラフト生着および機能回復が得られる。そこで我々は移植床の血行が不良である臨床例を模倣するため、グラフトをシリコンチューブにより被覆し移植床からの血行再開を阻害した。

術後 10 日目においてグラフトを採取、切片作成を行った。神経上膜内には GFP 陽性細胞が僅かに認められたものの、神経周膜内に GFP 陽性は認めなかった。このことから神経上膜内に移植された GFP の生存期間は比較的短期間であり、神経周膜下への細胞遊走は起こらないことが示唆された。次に TUNEL 法により死細胞数を評価した。通常のグラフト内においては TUNEL 陽性細胞はほとんど認めなかった (19 ± 3 cells/mm²) のに対し、チューブ被覆群では多くの TUNEL 陽性細胞を認めた (196 ± 34 cells/mm²) (図 2)。

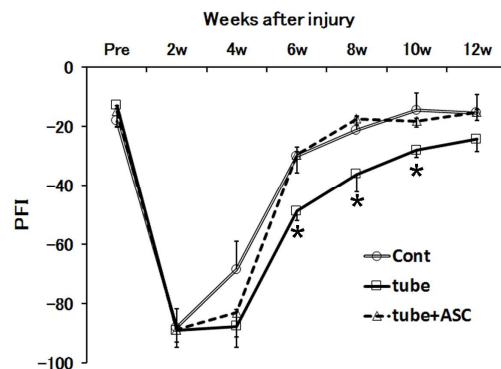


(図 2) ASC 移植が虚血下神経グラフト内細胞に及ぼす保護効果の検討

興味深いことに、チューブ被覆 + ASC 移植群においては TUNEL 陽性細胞数の有意な減少を認めた (115 ± 31 cells/mm²)。これらの結果より、ASC を神経上膜内移植することで虚血による神経内膜内細胞死を抑制できることが示唆された。

神経グラフトへの ASC 付加は神経損傷後機能回復を加速する

上記の ASC による SC 保護効果が神経再生に有益かどうかを検討した。術後から 2 週間ごとに足跡分析 (PFI) による総腓骨神経の運動機能回復を評価した。術前において、PFI 値は何れの動物でも約 -10 程度であったが、術後 2 週目には約 -80 まで低下し、腓骨神経機能喪失が示唆された。その後神経グラフトのみの群とシリコンチューブ被覆 + ASC 移植群では PFI 値は徐々に回復し、術後 6 週目において PFI 値は両群とも平均約 -30 に達した。術後 10 週ではほとんどの動物において PFI 値は術前のレベルまで回復した (図 3)。一方シリコンチューブ被覆のみの群では PFI 値の回復は遅く、術後 6、8、10 週目では他の 2 群に比べて有意に低い PFI 値を示した。しかしながら、術後 12 週目において PFI 値は 3 群間で有意差を認めなかった。

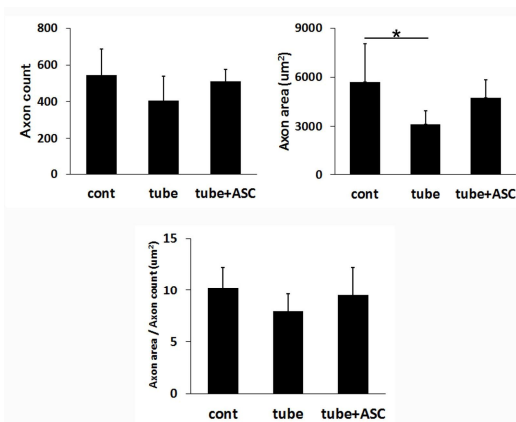


(図 3) 足跡分析 (Peroneal functional index, PFI) による総腓骨神経機能回復評価

最後に遠位神経の組織形態学的評価を行った。全軸索数、全軸索の縦断面積、軸索 1 本あたりの断面積をそれぞれ評価したところ、何れの項目でもシリコンチューブ被覆 + ASC 移植群はシリコンチューブ被覆のみの群より大きな値を示したものの、統計学的有意差は認めなかった (図 4)。

考察

遊離神経グラフトにおける主な血行再開機序として、神経グラフト全長にわたる移植床からの血管新生が挙げられる。移植床が血行良好である場合、移植後約 3 日目から血行が再開していくことが知られている。グラフト内 SC が血行のない状態で生存できるのは約 7 日間程度であることから、血行再開の遅延はグラフト内 SC の生着率低下と軸索再生の障害につながると考えられる。



(図4)再生神経の組織形態学的評価

この問題を解決するアプローチの一つとして、虚血状態における SC の生存期間を延長し得る細胞または薬剤の局所投与が考えられる。本研究において我々は ASC が虚血状態の SC に対する細胞保護効果を有するか検討した。ASC と SC の非接触共培養において、ASC はパラクライン作用により無血清下における SC 保護効果を有することが明らかとなった。ラット総腓骨神経グラフトモデルを用いた実験では、これらの保護効果が *in vivo* でも確認された。これらの細胞保護効果は神経再生の初期段階において有益であろうと推測される。グラフト内 SC によるピュングナー帯形成、および神経栄養因子産生の促進により軸索再生の促進が期待でき、我々の動物モデルでも術後機能回復の加速効果が認められた。一方、術後 12 週目では PFI 値および神経組織形態学的評価の何れにおいても ASC 移植群と非移植群間で有意差を認めなかった。これは我々のモデルの比較的短い神経欠損 (10 mm) が影響していると思われる。すなわち、遠位・近位神経断端からの SC 遊走により、最終的に神経欠損が橋渡しされたものと推測される。

本研究では ASC は神経上膜層へ移植された。正常神経では神経周膜が blood-nerve barrier (BNB) を形成することで、内部の軸索を周囲環境から保護している。しかしながら、神経損傷が生じると BNB 機能は急速に破綻し、その後の神経回復と共に BNB 機能も回復することが知られている。我々の動物モデルにおいては、移植 ASC から分泌される因子は神経損傷後早期に破綻する BNB を介して神経周膜下へ影響を及ぼしたであろうと推測される。移植 ASC の生存期間は比較的短期間であったものの、BNB 機能が回復した後においては ASC が神経周膜下へ与える影響は小さいと思われる。

神経上膜は比較的疎な組織であることもあり、我々の動物モデルにおいてグラフト遠位端より注入された ASC は容易にグラフト全長にわたり移植することが可能であった。このことは本移植法が長距離グラフトにも適していることを示唆する。一方で、神経周膜下への移植は ASC と神経内膜内細胞との

直接的な作用、および移植 ASC の長期生存につながる可能性があるものの、細胞移植手技自体がグラフト内部構造を大きく破壊し、また複数箇所からの細胞注入は内部環境保持に重要な BNB 機能も大きく損傷してしまう可能性が考えられる。

パラクライン作用に加え、ASC は虚血状態において血管内皮細胞へ分化し、直接血管新生に関与することが報告されている。しかしながら、本研究においてはそのような作用は認められなかった。その理由としては動物モデルの違いが考えられる。過去の研究においては ASC は虚血肢や腸間膜といった血流のある組織内へ移植されていたのに対し、本研究では ASC を移植床から分離されたグラフト内に移植した。移植後は、グラフト遠位・近位端よりゆっくりと血行再開が起こっていくと考えられる。ASC 移植が神経グラフトの血管新生に直接関わる可能性があるのかに関しては、今後放射線照射後の動物モデル等を用いてさらに検討していく必要があると思われる。

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 1 件)

Tomita K, Nishibayashi A, Yano K, Hosokawa K. Adipose-derived stem cells protect against endoneurial cell death: Cell therapy for nerve autografts. *Microsurgery*, 35(6) 474-80, 2015
doi: 10.1002/micr.22451.

〔学会発表〕(計 3 件)

富田 興一 他、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた末梢神経損傷治療、第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会、平成 27 年 10 月 9 日、岩手県盛岡市

西林 章光 他、脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた皮膚知覚回復向上の試み、第 24 回日本形成外科学会基礎学術集会、平成 27 年 10 月 9 日、岩手県盛岡市

富田 興一 他、幹細胞を融合した強化型自家神経グラフトの開発：グラフト内シュワン細胞に対する細胞治療法、第 23 回日本形成外科学会基礎学術集会、平成 26 年 10 月 10 日、長野県松本市

6. 研究組織

(1)研究代表者

富田 興一 (TOMITA KOICHI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90423178