

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 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：26861500

研究課題名(和文)皮膚脱神経後における代償性軸索側芽形成促進による再建乳房知覚向上の試み

研究課題名(英文) Differentiated adipose-derived stem cells promote the recovery of nociceptor function

研究代表者

西林 章光 (AKIMITSU, NISHIBAYASHI)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：00647133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：脱神経後における皮膚知覚の回復は、損傷された知覚神経軸索再生によるものの他、周辺の非損傷知覚神経からの側芽形成による代償性神経再支配によることが知られている。脂肪幹細胞から分化誘導させたdASCを脱神経皮膚へと移植することによる、非損傷神経からの軸索側芽形成および神経軸索再生に与える影響を検証した。dASC移植による移植早期からの知覚領域拡大を確認することができた。その機序として、NGFに依存した非損傷神経からの側芽形成と損傷神経の再生のいずれもが関与していると考えられた。拡大領域には限界が確認されたが、dASC移植は知覚領域の早期回復に対する一つの選択肢となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The loss of nociceptive function in the skin due to trauma or surgery can impair the quality of life. The recovery of nociceptor function is mediated by two different axonal behaviors: collateral sprouting of undamaged nerves, and regeneration of damaged nerves. We previously reported that adipose-derived stem cells (ASCs) can transdifferentiate into Schwann cell (SC)-like cells (dASCs), and that transplantation of dASCs increases axonal density in skin flaps. In the present study, we used an animal model that allowed for the individual assessment of collateral sprouting and regeneration. In vivo experiments revealed that dASC and SC transplantation significantly increased the area of the mechano-nociceptive field in both collateral sprouting and regeneration models, while ASC transplantation had no significant effect. dASC transplantation could present a new approach for improving nociceptive function in denervated skin.

研究分野：脂肪幹細胞

キーワード：脂肪幹細胞

1. 研究開始当初の背景

腫瘍切除や外傷後における皮膚知覚低下はその後の患者の QOL を著しく低下させる要因となり得る。特に乳癌切除後乳房再建においては再建乳房の違和感や低温熱傷の原因となることがしばしば経験される。これまで我々は移植皮弁を知覚皮弁とすることで再建乳房の知覚向上を試みてきた。しかしながら、近年の乳癌術式の低侵襲化に伴い乳房皮膚の温存が可能となった反面、知覚皮弁の有用性は低下してきた。

脱神経後における皮膚知覚の回復は、損傷された知覚神経軸索再生によるものの他、周辺の非損傷知覚神経からの側芽形成による代償性神経再支配によることが知られている。皮下乳腺全摘後においては通常インプラントまたは自家組織による再建が行われるが、底面から皮膚への軸索再生は介在するインプラントや脂肪組織により阻害されることが考えられる。すなわち再建乳房の知覚回復は前述の非損傷神経による代償性神経再支配が主となり、これを促進することが再建乳房の知覚回復において最も有効ではないかと我々は考えている。過去の研究からこのような代償性神経再支配は脱神経皮膚におけるシュワン細胞、表皮細胞、線維芽細胞より分泌される NGF により制御され、また外因性 NGF 投与はその速度、程度を向上させることが報告されている。しかしながら、連日の NGF 局注は患者の負担が大きく、また全身性 NGF 投与は知覚過敏発症のリスクも伴うことから、我々は適度な量の NGF を一定期間分泌する細胞を適切な部位へ移植することが有効ではないかという仮説を立てた。

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。さらに、申請者らの研究グループはASCが胚葉を超えてシュワン様細胞(dASC)へと分化することを世界に先駆けて報告した。またdASCはNGF、BDNFといった神経栄養因子を高いレベルで産生し、皮弁内へ移植されたdASCは移植後約2週間のみ生存、その後マクロファージにより貪食され消失することを明らかとした。以上の結果を踏まえ、脱神経皮膚へのdASC移植が非損傷神経からの軸索側芽形成を促進し、神経再支配領域を拡大するという仮説をラットモデルを用いて検証する。NGFが側芽形成に関与するのと同様にBDNFは損傷軸索の再生に関与することが知られる。dASC移植が損傷神経再生に与える影響についても同様に検討する。

2. 研究の目的

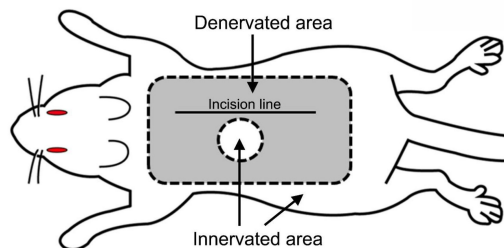
乳癌を始めとする悪性腫瘍切除後における皮膚知覚障害は患者の QOL を著しく低下させる要因となり得る。脱神経後における皮膚知覚回復は、周辺の非損傷知覚神経からの側芽形成による代償性神経再支配によるものと、障害された神経軸索再生によるものに大別される。本研究においては非損傷神経の側芽形成および、障害された神経軸索再生を促進する細胞治療法の開発を目指す。その細胞候補としては、セル・アクセス面で非常に優れている脂肪組織由来間葉系幹細胞

(ASC) から分化誘導により得られるシュワン細胞様細胞 (dASC) に着目する。

3. 研究の方法

(1) ラット背部知覚部分残存モデルの作成
ラット背部において正中線から約1センチ右側寄りで縦切開を加え、各肋間より出る背部皮神経を左右ともに Th10 から L3 まで露出する。その後左 Th13 の内側枝を残し全て切断、中枢端を広背筋下へ埋没することにより再生を防ぐ。その結果、脱神経された領域の中に Th13 内側枝に支配される領域のみが知覚領域として残存する (Figure 1)。このモデルにおいては全身麻酔下にて痛覚を皮下に存在する cutaneous trunci muscle の反射収縮により評価可能となる。それら知覚領域 (innervated) と非知覚領域 (denervated) の境界線の変化を経時的に評価した。このモデルは非損傷知覚神経からの側芽形成による代償性神経再支配を評価する (collateral sprouting model)。また、このモデルの他に残存神経に圧座損傷を加えて、障害された神経軸索再生による知覚領域の拡大も評価する (regeneration model)。

Figure 1

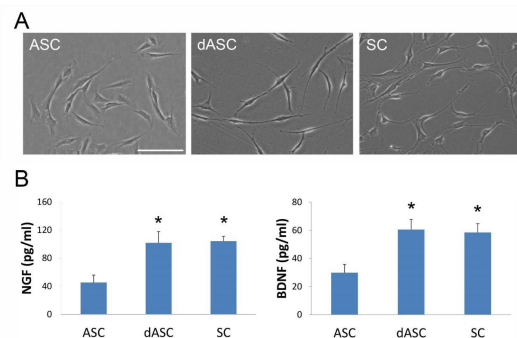


(2) ラット dASC およびラット坐骨神経由来シュワン細胞の初代培養

近交系 Lewis ラットの皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理、遠心分離により ASC を得る。第 2 継代目において、これまで我々が報告してきた方法、すなわち各

種増殖因子添加により dASC への分化誘導を行った。コントロール細胞としてラット坐骨神経由来のシュワン細胞の初代培養も行った。また獲得した ASC、dASC、SC 培養上清から神経栄養因子である NGF、BDNF を ELISA を用いて定量した (Figure 2)。

Figure 2



(3) ラット背部知覚部分残存モデルへの細胞移植

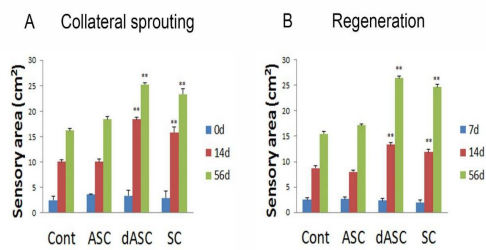
collateral sprouting モデル作成時に残存知覚領域辺縁に各種細胞を移植し、知覚領域の経時的変化を調べた。また、regeneration model ではモデル作成後 7 日後に回復してきた知覚領域辺縁に各種細胞を移植し経時的変化を調べた。

4. 研究成果

移植前の ELISA では dASC は ASC より NGF、BDNF を産生し、SC と同程度であった。collateral sprouting model 群で、細胞移植後 14 日後および 56 日後において dASC 移植群はコントロールおよび ASC 移植群よりも有意に知覚領域の拡大を認め、SC 移植群と同程度であった

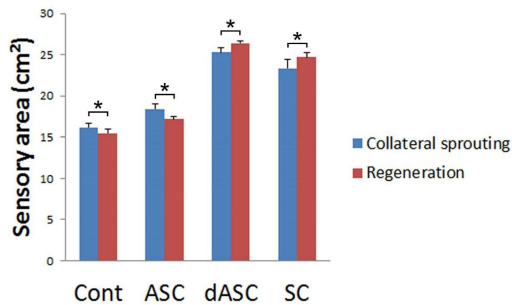
(Figure 3) 。

Figure 3



regeneration model 群でも同様の結果であった。56 日目における最終的な知覚領域の面積は collateral sprout 群と regeneration 群では差は認めなかった (Figure 4)。

Figure 4



まとめ

dASC 移植による移植早期からの知覚領域拡大を確認することができた。その機序として、NGF に依存した非損傷神経からの側芽形成と損傷神経の再生のいずれもが関与していると考えられた。拡大領域には限界が確認されたが、dASC 移植は知覚領域の早期回復に対する一つの選択肢となりうる可能性が示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

西林章光、富田興一、矢野健二、細川互
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

2015 年 10 月 8 日 (木) - 9 日 (金) 岩手県盛岡市

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

西林章光 (AKIMITSU NISHIBAYASHI)
大阪大学医学部附属病院 形成外科 医員
研究者番号：00647133

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

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