

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15649

研究課題名(和文)末梢神経再生技術の形成外科領域への導入

研究課題名(英文) Introduction of some kind of artificial axon to peripheral nerve repair

研究代表者

関堂 充 (Sekido, Mitsuru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40372255

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)：現在、末梢神経損傷後の治療として、神経縫合、神経移行、自家腓腹神経移植等が行われるが、再生軸索の伸張速度は約 1mm/day と遅い。関堂(代表)は、ラットにおいて血管結紮クリップを用いて顔面神経不全麻痺モデルを構築し術式検討を行ってきた。一方、木田(分担)、高山(分担)は、神経前駆細胞誘導法の開発、神経細胞培養法の開発・デバイス化を行ってきた。

今回、申請者らは、本研究において、マウス間質血管細胞群(SVF)からの神経前駆細胞誘導法を改善するための条件検討を図り、効率的に神経前駆細胞を誘導する条件を明らかにした(業績参照)。

研究成果の概要(英文)：When patients injured peripheral nerve, nerve suture or transfer is performed now in operation rooms. But axon grows approximately 1 mm per day after surgeries, so we have to wait a lot of time to get injured nerve function recovered. Sekido has researched incomplete facial nerve palsy with murine model. Kida and Takayama have researched ways of direct reprogramming of stem cells to neural progenitor cells.

In this research, we tried to make artificial bundles of axon from neural progenitor cells. We have finally revealed how to induce neural progenitor cells effectively from murine stromal vascular fraction.

研究分野：形成外科学

キーワード：末梢神経再生 人工神経 脂肪由来幹細胞

1. 研究開始当初の背景

現在、末梢神経損傷後の治療としては、神経縫合、神経移行、自家腓腹神経移植等が行われている。

末梢神経が断裂すると、断裂した神経軸索の末梢端は遠くは Waller 変性に陥るが、この変性軸索を scaffold として中枢端から再生軸索が伸長し、神経機能が回復していく。このため、再生軸索の伸張速度は約 1mm/day と順調に行っても 1mm/day とされ、長期を要する。この間に末梢効果器までの距離が長い場合には、支配筋が廃用性萎縮に陥り、神経伝達が回復しても機能回復が得られないこともある。また、癒痕組織が遠位近位の両軸索断端間に介在し、再生軸索の伸長が阻害される場合もある。このため、形成外科領域においては、顔面神経麻痺や、手の神経損傷後の治療において、未だに難渋する症例がある。

顔面は、全身の露出部位の中でも最も目立ち、文字通りその人の『顔』となる部位である。種々の原因で顔面表情筋機能が障害される顔面神経麻痺の治療においては、原因と病期病態に対してさまざまな治療法が行われている。しかし、臨床では未だ顔面表情筋の運動に左右非対称性が残り、リハビリを行っても協調運動が十分に得られない症例が多い点は解決されていない。

また、手も人の目に入り易く、顔の次に目立つと言われるが、手外科領域の末梢神経障害、中でも腕神経叢損傷など特に高位においての末梢神経損傷において、運動および感覚機能障害に苦しむ患者が多い。

現在のところ、自家神経移植、移行を大きく上回る治療成績をもたらす移植用人工神経はなく、現状では自家神経を用いた治療が主流で、主に腓腹神経や大耳介神経等の感覚神経が移植用に、また顔面神経麻痺への神経移行に舌下神経等が用いられている。しかし、採取部の知覚脱失等の犠牲は不可避であり、術式選択に当たり躊躇することもある。

このように、ここ数十年間にわたり神経縫合法・移行法、移植法の研究が進められてきたが、臨床経過が劇的に改善するような進展はなく、研究はプラトー相に達していると考えられる。更なる術後成績の改善には、別の観点からのアプローチが必要であり、われわれは幹細胞等の細胞を利用した治療の可能性が有力であると考えている。

間質血管細胞群 (stromal vascular fraction, 以下 SVF) は、脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cell, ADSC) の割合が約半分程度と豊富だけでなく、血管内皮前駆細胞も多く含む¹⁾。このため、SVF は ADSC よりも神経組織再生能が高い可能性がある。以前より、神経再生には血流が重要

であり、血流付加吻合のない神経移植よりも、血流を付加した血管柄付き神経移植の方が良好な神経機能の回復が得られると考えられてきた^{2), 3), 4), 5), 6)}。中でも、血管柄付き腓腹神経移植の 21 症例の検討をしたところ、Tinel 徴候の前進が全例で平均 2~3mm/day にも達していたとの報告さえある⁶⁾。しかし、長期間の追跡ができておらず、不明な点も多かった。

このような考えから、関堂 (代表) は、ラットにおいて血管結紮クリップを用いて顔面神経不全麻痺モデルを構築し、術式検討の研究を行ってきた。

2. 研究の目的

上述の課題に対して、申請者らは、「幹細胞や誘導した神経前駆細胞由来の、デバイス化した培養神経前駆細胞を動物モデルに移植、解析し、末梢神経再生への新規幹細胞利用治療法の礎を築く」可能性探索へのチャレンジを目指した。

3. 研究の方法

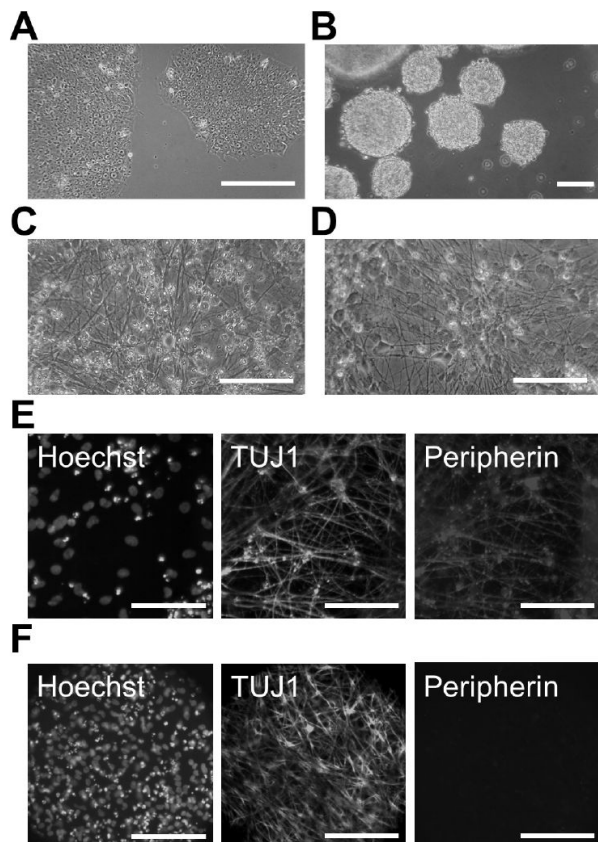
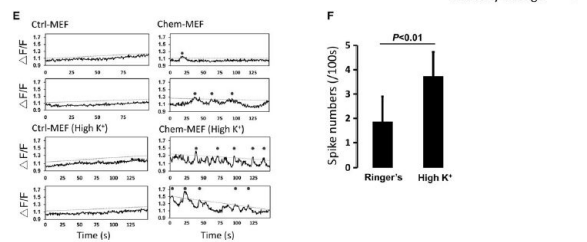
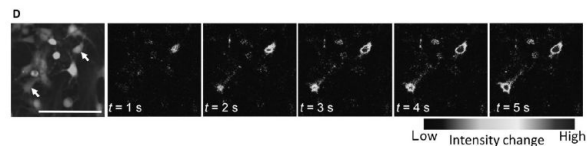
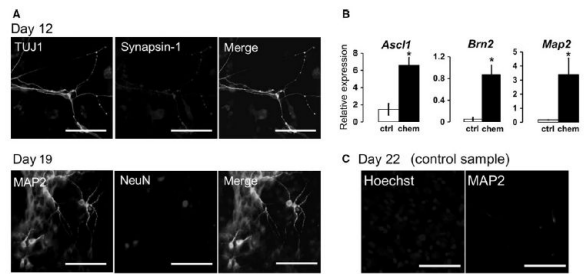
マウス皮下脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処理等を行って、細胞分画である SVF を調製した。SVF は、Zuk らが今世紀に入って最初に報告した脂肪由来幹細胞⁷⁾を、豊富に含む細胞分画である。

採取・調製した SVF を、まずは非接着培養で培養を開始し、その後接着培養に切り替えることなどにより分化誘導し、神経前駆細胞誘導法を検討した。続いて、SVF からコリン作動性神経細胞の誘導を効率的に行う条件の検討を行った。

また、これらの誘導細胞を用いて、移植用神経軸索束の作製を目指し、条件検討を行った。神経軸索束作製は、微細加工技術を利用して、シリコンゴムの一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いて作製した培養用チャンバー上で、神経細胞の接着位置の固定技術、および流体作用に基づき一定方向の力学的作用を印加する技術を組み合わせ、SVF から誘導した神経前駆細胞の軸索伸長方向を制御した神経培養を行い、移植用誘導神経軸索束作製を試みた。PDMS 製チャンバー内は、各種濃度のコラーゲンをういて検討を試みた。

4. 研究成果

この結果、マウス皮下脂肪組織由来の間質血管細胞群 (SVF) から効率的に神経前駆細胞を誘導することに成功し (下図。引用文献^{8), 9)}より改変・引用) その条件を明らかにした^{8), 9)}。



一方、誘導神経軸索束の伸長実験では、各種条件下において検討したが、いずれも移植可能な強度を持った束を形成するには至らなかった。

引用文献

- 1) Yoshimura K, et al. Characterization of Freshly Isolated and Cultured Cells Derived from the Fatty and Fluid Portions of Liposuction Aspirates. *J Cell Physiol* 208: 64-76, 2006.
- 2) Doi, K, et al: The free vascularized sural nerve graft. *Microsurgery* 5: 175-184, 1984.
- 3) Fachinelli, A, et al: The vascularized sural nerve, *Int. J. Micro.* 3: 57-62, 1981.
- 4) Koshima, I, Harii, K, et al: Experimental study of vascularized nerve grafts transplanted in scar, *Orthop. Surg.* 33:1501-1503, 1982.
- 5) Taylor, G.I. et al.: The free vascularized nerve graft, a further experimental and clinical application of microvascular techniques, *Plast. Reconstr. Surg.* 57: 413-427, 1976.
- 6) 酒井ら. 血管柄付遊離腓腹神経移植術の検討. *整形外科と災害外科.* 36:(1)13 ~ 16,1987.
- 7) Zuk PA et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295.
- 8) Yuza Takayama, Tamami Wakabayashi, Hiroko Kushige, Yutaka Saito, Yoichiro Shibuya, Shinsuke Shibata, Wado Akamatsu, Hideyuki Okano, Yasuyuki S. Kida. Brief exposure to small molecules allows induction of mouse embryonic fibroblasts into neural crest-like precursors. *FEBS Letters.* Feb; 591(4) 2017. 590-602.
- 9) Yuza Takayama, Yasuyuki S. Kida. In Vitro Reconstruction of Neuronal Networks Derived from Human iPS Cells Using Microfabricated Devices. *PLoS One.* Feb 5;11(2): e0148559. 2016.

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)

Yuzo Takayama, Tamami Wakabayashi, Hiroko Kushige, Yutaka Saito, Yoichiro Shibuya, Shinsuke Shibata, Wado Akamatsu, Hideyuki Okano, **Yasuyuki S. Kida**. Brief exposure to small molecules allows induction of mouse embryonic fibroblasts into neural crest-like precursors. *FEBS Letters*. Feb; 591(4) 2017. 590-602. 査読あり

Yuzo Takayama, **Yasuyuki S. Kida**. In Vitro Reconstruction of Neuronal Networks Derived from Human iPS Cells Using Microfabricated Devices. *PLoS One*. Feb 5;11(2): e0148559. 2016. 査読あり

[学会発表](計 4 件)

Mitsuru Sekido. End to side venous anastomosis to a stump of blinde end in head and neck reconstruction. The 35th Autumn Meeting of the Korean Society of Microsurgery. Seoul, South Korea. November 5th, 2016.

Mitsuru Sekido. The Plastic Surgery Milestone Training program in Japan. The 6th Congress of Vietnam Society of Aesthetic Plastic Reconstructive Surgery. Hanoi, Vietnam. October 1st, 2016.

関堂 充. テーマ1.総論 (3)形成の基本手技. 第 7 回日本頭頸部癌学会 教育セミナー. 2016 年 6 月 8 日. ソニックシティ(埼玉県大宮市)

佐々木 薫, 中山 瑛子, 江藤 綾乃, 相原 有希子, **足立 孝二**, **関堂 充**, 會沢 哲士. Paired Abdominal flaps の有用性. 第 59 回日本形成外科学会総会・学術集会. 2016 年 4 月 15 日. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

坂井 重信, 赤澤 俊文, 坂井 香, **関堂 充**. Bipedicle flap と穿通枝皮弁による組織欠損の再建. E ポスター. 第 59 回日本形成外科学会総会・学術集会. 2016 年 4 月 13 日-15 日. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

笠井 丈博, **佐々木 薫**, **足立 孝二**, 相原 有希子, 赤澤 俊文, 江藤 綾乃, 伊藤 佐知子, **関堂 充**. 当院における頭頸部再建術後の皮弁トラブルとその救済. 第 59 回日本形成外科学会総会・学術集会. 2016 年 4 月 13 日. 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

関堂 充 (SEKIDO, Mitsuru)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号: 40372255

(2)研究分担者

足立 孝二 (ADACHI, Koji)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 70572569

佐々木 薫 (SASAKI, Kaoru)
筑波大学・医学医療系・講師
研究者番号: 10536220

木田 泰之 (KIDA, S. Yasuyuki)
産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・
ステムセルバイオテクノロジー研究グループ長
研究者番号: 20396526

高山 祐三 (TAKAYAMA, Yuzo)
産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・
ステムセルバイオテクノロジー研究グループ研究員
研究者番号: 60608438