

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11248

研究課題名(和文) 骨格筋由来多能性幹細胞による頭頸部癌切除後神経ネットワークの再生医療

研究課題名(英文) Neural Network Regeneration using Skeletal Muscle-Derived Multipotent Stem Cell

研究代表者

大上 研二 (OKAMI, Kenji)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90223734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経切除後障害モデル動物を確立し、肩関節、股関節、上肢、下肢の運動を観察・記録した。マウス骨格筋から骨格筋間質由来多能性幹細胞を分離・培養し、*in vitro*培養系、細胞移植により神経系細胞への分化誘導を確立した。幹細胞移植により神経ネットワークが再生された。培養上清の抽出された分泌サイトカインを解析し、再生に対する効果を評価した。神経ネットワーク再生後の筋の緊張力、筋重量、組織学的評価をし、サイトカインカクテルの再生促進効果を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

治療によって失われた機能を、幹細胞移植による再生医療で回復させ、幹細胞移植なしに神経ネットワークが再生されれば、低侵襲かつ拒絶反応のない機能再生が実現できる。さ倫理的問題も少なく臨床応用が可能であり、治療後の患者のQOL(生活の質)を改善させる大きな福音となる。

研究成果の概要(英文)：Nerve resection animal model was established and extremities and joint movements were observed. A skeletal muscle-derived multipotent stem cells (Sk-MSCs) were developed and transplanted to the injured lesion and the differentiation into neural cells were observed. Secretory cytokines in the culture supernatant were analyzed and the effect to the regeneration were evaluated. Muscle tonus, weight, and histochemical changes were investigated. The effect for regeneration of the cytokine cocktail were analyzed.

研究分野：再生医療科学

キーワード：骨格筋間質幹細胞 神経ネットワーク QOL

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は診断時点で進行しているものが多く、予後不良である。進行癌に対する治療にともなう臓器、機能の欠損は、嚥下、咀嚼、発声、構音、肩腕関節障害など治療後 QOL (生活の質) を著しく損なっている。特に頭頸部癌の根治切除に伴う神経合併切除は患者の術後神経脱落症状が QOL に関わる。この神経損傷に対しては、リハビリテーションが主な治療法であるが、失われた機能を回復させるには困難な点が多く、解決すべき問題点が多かった。

最近になって研究が進められてきた再生医療技術はめざましいものがあり、臨床応用への可能性が広がっている。自己の多能性幹細胞からの臓器再生の可能性が開ければ、副作用なしに様々な疾患への応用が考えられる。神経、筋組織の再生の試みは、頭頸部領域の術後機能障害へも有用な可能性を広げられると考える。我々は神経機能の回復を目指した再生医療を目的とした実験を続けている。

平成 24-27 年度科学研究費「研究課題：多能性幹細胞移植による頭頸部癌術後機能回復のための再生医療の研究」で、多能性幹細胞移植による顔面神経の再生・修復の可能性を明らかにし、機能再生の可能性も示すことが出来た (Saito K、Tamaki T、Okami K、et al. PLoS One、2015、図 1、2)。しかし、その再生の距離的限界や神経ネットワーク機能の詳細は解明できていない点が多く、頸部神経の再生や肩関節運動の機能再生については未解明で課題を残している。

### 2. 研究の目的

本研究では頸部郭清術後の肩頸関節運動障害について治療体系が確立されていない現状を打破するために、幹細胞移植による神経・筋再生を応用した治療応用を目指す。本研究の目的を以下の三点に焦点を絞った。

(1) 多能性幹細胞をシート・ペレット法による移植法を確立すること。

(2) 人工的には不可能な複雑な頸神経・副神経のネットワークの再構築に対して、骨格筋間質由来の多能性幹細胞群が有する「損傷組織環境依存性の分化能」が有効に働くかどうかを明らかにする。

(3) 細胞移植を必要としない「サイトカイン治療」の可能性について検討する。神経再生の効果が見られた場合には、どのサイトカインが、あるいはどの組み合わせのサイトカインが最も効果的かを判定する。

以上の3点から、最終的に頭頸部癌根治手術後の治療後 QOL の改善治療を開発することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

神経合併切除術後の動物実験モデルを確立し、肩関節、股関節、上肢、下肢の運動を観察・記録する。多能性幹細胞を抽出、精製し、in vitro 培養系、細胞移植により神経系細胞への分化誘導を確立する。モデル実験動物頸部への移植、生着を実体顕微鏡下に、また移植細胞の分化状況を免疫組織化学、分子生物学的に確認する。分化した神経、筋組織により肩関節、上肢の機能が改善したことを、筋電図モニターや組織学的、免疫組織学的に証明する。複雑な頸神経ネットワークを、幹細胞が持つ独特の性質である「損傷組織環境依存性の分化能」を最大限に利用しその再構築を目指す。

(1) レシピエントとして正常マウスおよびラットを用い、顔面神経枝周辺の組織を大きく摘出し 2-4mm の軸索欠損部を作成し、顔面神経麻痺モデル動物を作成した。組織化学的検索を中心に行う GFP-Tg マウスから正常マウスへの移植実験群と、機能回復の解析を行うラットの自家移植実験の二つの系を用いた。

実験動物から下肢骨格筋群 (前脛骨筋、長趾伸筋、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、大腿四頭筋) を採取し、0.1% コラゲナーゼで 1 時間処理、個々の筋線維を分離した。大型のデブリスをこし取り、コラゲナーゼを PBS で洗浄、分離した筋線維群をフラスコで 3 日間培養し、筋間質の細胞群を総合的に増幅培養した。その後、トリプシン EDTA で処理後、筋線維群と増幅細胞群を分離、再び筋線維及びデブリスを除去。得られた細胞群を増幅培養して細胞シートを形成させた。このシートに対して、EDTA 単独処理を行い、細胞同士の接着を維持した状態で回収、これらを集積・遠心して幹細胞シート・ペレットを作成した。以上のドナー骨格筋から得た Sk-MSC 幹細胞シート・ペレットを損傷部位に移植し、フィブリン糊で固定し創を閉鎖した。対照群には培地のみを移植した。

(2) 先行研究において確立された神経障害モデルについて運動機能をモニターする実験系はすでに安定した結果が得られている。多能性幹細胞移植の神経再生促進効果は十分に立証されている。幹細胞の培養系をさらに発展させ、培養上清の抽出された分泌サイトカインを解析し、再生に対する効果を評価する。これにより幹細胞移植なしに各種サイトカインの投与による神経ネットワークの再生に至る過程を ELISA プロテインアレイキットで評価、解析する。

(3) 神経再生促進に最も重要な因子を抽出できるように絞り込みを行う。幹細胞群を抽出し、通常の 20% ウシ血清を含む培養液で 5 日間培養・増幅する。10% マウス血清を含む培養液に交換し、24 時間培養後に各種サイトカインの含まれた培養上清を得る。さらに超遠心にて不要物を沈殿させ、上清をサイトカインカクテルとする。神経切断モデル実験動物を作成し、人工神経管および神経のセグメントを移植する。末梢端あるいは中枢端からの神経の伸長を経過観察するとともに、各種サイトカインの混合培養上清を注入することによる神経再生への影響を評価す

る。

#### 4. 研究成果

神経障害モデル実験動物頸部への移植、生着を実体顕微鏡下に、また移植細胞の分化状況を免疫組織化学、分子生物学的に確認する。また多能性幹細胞移植の神経再生促進効果を確認、証明した(図1, 2)。幹細胞の培養系をさらに発展させ、培養上清の抽出された分泌サイトカインを解析し、再生に対する効果を評価した。各種サイトカインの投与による神経ネットワークの再生に至る過程を ELISA プロテインアレイキットで評価、解析した。神経再生促進に最も重要な因子を抽出すべく、網羅的解析で分泌サイトカインとして 17 の候補に絞り込んだ。以上の結果を実験動物系に応用し、実験をすすめた。

(1) 培養上清(サイトカインカクテル)が坐骨神経再生への効果を、神経切断モデル実験動物を作成し、人工神経管および神経のセグメントを移植し、末梢端あるいは中枢端からの神経の伸長を経過観察した。坐骨神経が支配する下腿筋肉群の筋張力、下腿筋肉群の筋重量、神経断裂部の組織学的評価を用いて評価した。

健常側に対して移植側の筋張力の比は、サイトカイン非注入群、注入群でそれぞれ 14%、27%の結果で、注入群で有意に張力が維持されている結果であった。

下腿の底屈筋肉群の重量の健常側に対する移植側の重量比はサイトカイン非注入群、注入群でそれぞれ 37%、43%であり、注入群で有意に筋重量が維持されていた。

免疫染色については実験途中の段階であるが、再生した神経ネットワークの再生所見が得られている。実験動物での運動生理学的効果が示され臨床応用に直結する成果が挙げられた。

(2) 各種サイトカインの混合培養上清を注入することによる神経再生への影響を評価した。神経再生に最も適切な「神経再生促進カクテル」を使用し、組織学的変化を評価した。k-MSC 培養上清、挫滅 3 日後及び正常坐骨神経ホモジネートの上清の計 3 群について網羅的に比較解析し、Sk-MSC 培養上清群のみで産生が亢進している神経再生に有用なサイトカインを同定した。サイトカインの組成、配合を神経再生に最も適切なものに調整することで「神経再生促進カクテル」の生成とともに、臨床応用に直結する結果が得られた。

図 1

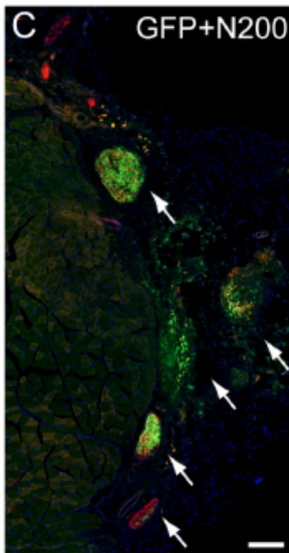
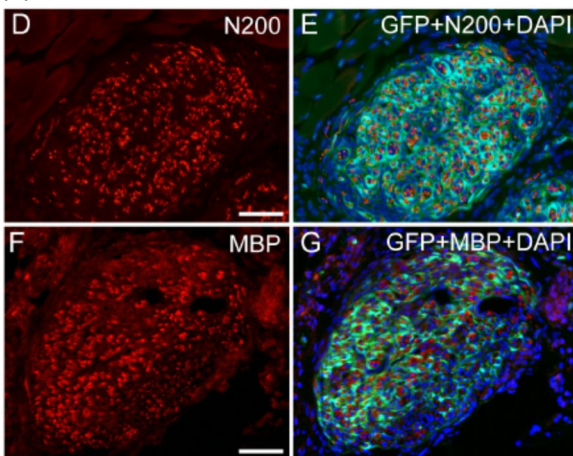


図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Saito K, Tamaki T, Ebisumoto K, Iida M, Okami K
2. 発表標題 3D RECONSTRUCTION OF THE FACIAL NERVE-VASCULAR NETWORKS; TRANSPLANTATION OF SKELETAL MUSCLE-DERIVED MULTIPOTENT STEM CELL SHEET PELLETT
3. 学会等名 9th International Conference on Head and Neck Cancer (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 榎 大輔、大上研二
2. 発表標題 骨格筋由来幹細胞移植による神経再生
3. 学会等名 第7回南関東頭頸部腫瘍懇話会（招待講演）
4. 発表年 2019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
研究協力者	玉木 哲朗  (TAMAKI Tetsuro)  (10217177)	東海大学・医学部・教授    (32644)	