

令和元年5月20日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11363

研究課題名(和文) 脂肪組織由来間葉系幹細胞を用いた末梢神経再生の質的向上の試み

研究課題名(英文) Attempt to improve quality of peripheral nerve regeneration using adipose tissue-derived mesenchymal stem cells

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経切断損傷においては圧挫損傷と異なり、切断神経間を繋ぐ神経ガイダンスが消失する。シュワン細胞により神経ガイダンスは再形成されるが、癒痕形成により無秩序に形成される。その結果、過誤支配(誤った標的組織への再生)等の異常な神経再生が起こり、異常共同運動や筋痙攣の原因となる。本研究では抗炎症作用や、癒痕形成を抑制する脂肪組織由来間葉系幹細胞(以下、ASC)に着目し、ASCの移植が末梢神経再生の質に及ぼす影響を検証した。その結果、ASC移植による有意な機能回復向上効果は認めなかったものの、関節拘縮による機能の悪化の頻度が減少した。ASC移植が何らかの調整作用を及ぼした可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経再生の研究分野では、神経再生の質的向上を目指したものは少ない。しかし、実診療ではむしろ質的な問題が機能回復と患者さんのQOLに大きく影響している。本研究で用いる手法は、全ての末梢神経再建において適応が可能という点においてその波及効果は高いと思われる。またASCは比較的安全性が高い体性幹細胞であり、数gの吸引脂肪から2週間以内に移植に足る細胞数を得ることができるという点でも実際的であると言える。したがって、今回の研究成果により年間数万人にも及ぶ末梢神経損傷を受傷される患者さんにおいて、最小限の犠牲による新規治療の可能性が広がり、QOL向上・早期社会復帰に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In peripheral nerve transection injury, unlike crush injury, the nerve guidance connecting the dissecting nerves is lost. Neural guidance is recreated by Schwann cells but formed disorderly by scarring. As a result, abnormal nerve regeneration such as misdirection (regeneration to a wrong target tissue) occurs, which causes abnormal synkinesis and muscle spasms. In this study, we focused on adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (ASCs) that suppress anti-inflammatory activity and scar formation, and examined the effect of ASC transplantation on the quality of peripheral nerve regeneration. As a result, although there was no significant functional recovery improvement effect by ASC transplantation, the frequency of deterioration of function due to joint contracture decreased. It has been suggested that ASC transplantation may have some regulatory effects.

研究分野：再建外科

キーワード：末梢神経再生 脂肪組織由来間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

末梢神経は中枢神経と異なり、優れた再生能力を有していることは良く知られている。近年のマイクロサージャリー技術の進歩によって、外傷や腫瘍切除により神経欠損が生じた場合でも自家神経移植により良好な軸索再生が得られることも多い。一方で、良好な軸索再生が得られたにもかかわらず機能的には十分な回復を得られない症例にしばしば遭遇する。これらは過誤支配や多重支配といった異常な神経再支配に起因しており、すなわち神経再生の質的な問題であるといえる。特に顔面神経は多数の標的組織を支配しているにもかかわらず、神経束構造を欠いているために神経束間縫合・神経移植は現在の技術では不可能である。

この問題を解決するためには新たなアプローチが必要と考えられるが、これまで我々は軸索再生阻害因子である MAG を短期間切断神経間へ徐放投与すること、自家神経グラフトを移植前に体内で脱分化させてから用いることがそれぞれ神経再生の質的向上につながる可能性を報告してきた。また臨床的には、顔面神経上行枝と下行枝をそれぞれ舌下神経、顔面神経で支配させることで異常共同運動を軽減できることも報告した。しかしながら、神経縫合部における癒痕侵入による異常な軸索ガイダンス形成という問題に関しては未だ有効なアプローチがないのが現状である。

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(引用文献 )。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 は抗炎症作用や、細胞外マトリックスを分解する MMP 群とそれを阻害する TIMP のバランス調整作用によって癒痕形成を抑制することが報告されている(引用文献 )。

以上の結果から、我々は神経縫合部へ ASC を局所的に移植することで神経断端間における癒痕形成が抑制され、シュワン細胞による良好な軸索ガイダンス形成、および神経再生の質的向上へつながるのではないかという仮説を立てた。本研究では動物モデルを用いてそれらの検証を行った。

### <引用文献>

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13: 4279-4295, 2002.

Kang JW, et al. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 17(4):681-93, 2008

Yun IS, et al. Effect of human adipose derived stem cells on scar formation and remodeling in a pig model: a pilot study. *Dermatol Surg* 38(10):1678-88, 2012

Lozito TP, et al. Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biol* 34:132-43, 2014

## 2. 研究の目的

末梢神経切断損傷(neurotmesis)においては神経内膜が残存している圧挫損傷(axonotmesis)と異なり、切断神経間における軸索ガイダンスが消失する。脱分化したシュワン細胞によって軸索ガイダンスは再形成されるものの、切断神経間における癒痕形成に

よりそれらは無秩序に形成される。その結果、過誤支配(誤った標的組織への再生)や多重支配(単一の神経細胞が複数の標的組織を支配)といった異常な神経再生が頻繁に起こり、それらは異常共同運動や筋痙攣の原因となる。本研究では抗炎症作用や、炎症に付随して生じる癒痕形成の抑制効果を有する ASC に着目し、ASC の末梢神経切断損傷部への移植が末梢神経再生の質に及ぼす影響を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ASC の抽出・培養

動物モデル作成に先立ち、近交系ラットの皮下脂肪を採取し、コラゲナーゼ処理を行うことで脂肪組織由来間葉系幹細胞(ASC)を含む細胞群を抽出し、その後接着培養を行った。その後細胞免疫染色、および細胞表面マーカー解析により培養細胞群において CD29、CD90、CD44 陽性、CD45 陰性である ASC の割合を検討し、細胞の質検討を行った。

#### (2) 動物モデルの作成

ラット坐骨神経切断モデルでは、以下の4群を作成した。すなわち 神経切断後、即時に神経上膜縫合による再建を行いフィブリン固定した群、 神経切断後、即時に同様の再建を行い、60万個のASCを損傷部へ移植、フィブリン固定した群、 坐骨神経へマイクロ撮子で挫滅損傷を加え、フィブリン固定した群、および 坐骨神経の露出のみを行い、フィブリン固定を行った群、をそれぞれ作成した。

#### (3) 機能的評価

神経損傷後、経時的に足跡分析により sciatic functional index(SFI)を測定、坐骨運動機能回復の程度を評価した。また術後12週後において、筋電図計測装置にて conduction velocity, peak amplitude, contraction force を計測した。

#### (4) 逆行性神経トレーサーによる神経再生の質的評価

Lewis ラット坐骨神経切断・縫合を行い、同時に GFP 標識された同系ラット ASC をフィブリンと混合して損傷部へ移植する。12週後、損傷部より末梢側の腓骨神経、脛骨神経各々より神経トレーサーであるフルオロゴールド(FG)、フルオロルビー(FR)を注入し、逆行性に脊髄前角細胞及び後根神経節細胞をラベルした(同時二重標識法)。各々の凍結切片を蛍光顕微鏡下で観察すると、それぞれ単独にて標識された細胞、及び双方にて標識された細胞が観察される。後者の細胞数が、単一神経細胞が複数のターゲットを支配する、いわゆる多重支配の程度を示すので、その数を対照群(ASC移植なし)と比較、検討した。また、標識された神経細胞の総数も同時に評価する。もう一方で、神経損傷前に FG を腓骨神経若しくは脛骨神経より注入しておいたラットに対し、1週間後同様の神経損傷+ASC移植を行い、12週間後同一箇所より FR を注入した(連続二重標識法)。この場合、双方のトレーサーにて標識された細胞数は、神経損傷後オリジナルのターゲットへの再生をした神経細胞の数を表す。すなわち、この数が多いほど過誤支配が少ない事を意味するので、その数を対照群と比較した。

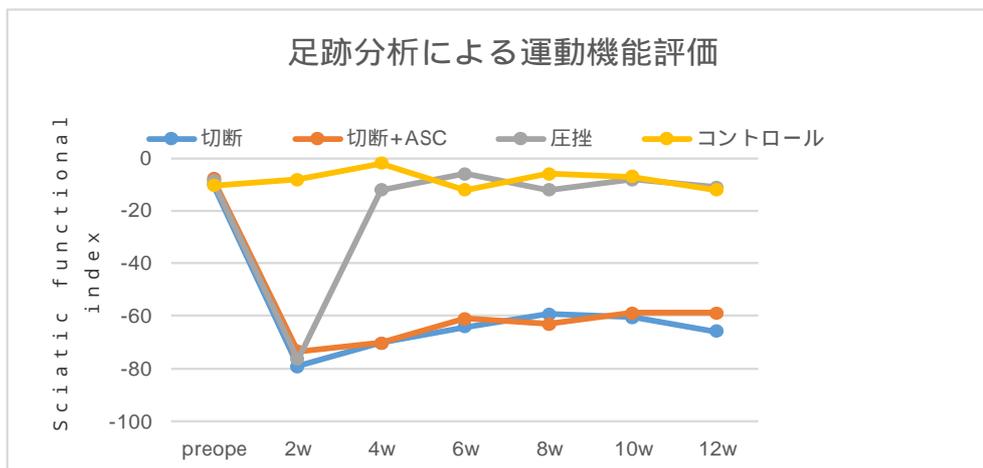
### 4. 研究成果

#### (1) 術後神経再生の質的評価

## 足跡分析

術後、経時的に歩行時の足跡をトレース、sciatic functional index(SFI)を算出することで坐骨神経運動機能回復を評価した。術前において、SFI は全ての動物において 10 前後の値を示した。術後 2 週目において、坐骨神経露出のみの群を除き、SFI 値は-70~-80 に低下した(図 1)。術後 4 週目において、圧挫損傷を加えた群では、SFI 値はほぼ術前のレベルに回復した。一方、神経切断を加えた 2 群では術後 6 週目までは徐々に SFI 値の回復を認めたものの、その後はほぼ横ばいを示し、ASC 移植群と非移植群間に統計学的な有意差は認めなかった(図 1)。

しかしながら、切断のみ群では全 14 匹中 6 匹において足関節拘縮を来したため、SFI 測定が不可能となったのに対し、切断+ASC 移植群においては 14 匹中、足関節拘縮を来したのは 2 匹のみであった。



(図 1)

## 逆行性神経トレーサーによる評価

術後 12 週目において、損傷部より末梢側の腓骨神経、脛骨神経各々より神経トレーサーであるフルオロゴールド(FG)、フルオロルビー(FR)を注入し、逆行性に脊髄前角細胞及び後根神経節細胞をラベルした。このモデルでは、2 重にラベルされた細胞が多い程、単一神経細胞による多重標的支配が多いことを示唆する。また、神経損傷前に FG を腓骨神経若しくは脛骨神経より注入しておいたラットモデルを別に作成し、1 週間後同様の神経損傷+ASC 移植を行い、12 週間後同一箇所より FR を注入した。このモデルでは 2 重にラベルされた神経細胞が多い程、正しい標的への軸索再生が多い(過誤支配が少ない)ことを示唆する。その結果、圧挫損傷群ではほぼコントロール群に近い精度の回復を認めた。一方、切断群、切断+ASC 移植群ではともに圧挫損傷群に比べて多重支配、過誤支配が有意に多い結果であった。また、2 群間に有意な差を認めなかった。

## (2) 術後神経再生の量的評価

術後 12 週目において、筋電図を測定することにより、peak amplitude および conduction velocity の評価を行った。さらに、損傷部より末梢の坐骨神経を採取し、薄切切片にトルイジンブルー染色を施すことにより、軸索数、平均軸索径、および平均のミエリン厚の測定も行った。筋電図測定では平均 peak amplitude 値に関しては圧挫損傷群、切断を行った 2 群間で有意な差を認めなかった。一方、conduction velocity では、圧挫損傷群は切断を行った 2 群に比して有意に大きな値を示した。これらの何れにおいても、ASC 移植による

有意な影響を認めなかった。トルイジンブルー染色による再生神経の組織形態学的評価では、圧挫損傷群では切断を行った2群に比して、有意に軸索数が少なく、平均軸索径・ミエリン厚が大きな値を示した。切断のみ群と切断+ASC移植群の間に有意な差は認めなかった。

### (3) 考察

本研究では、軸索ガイダンスが消失する切断損傷において、ガイダンス再構築の正確性を向上させるべく、ASCを局所に移植し、その瘢痕形成抑制作用と抗炎症作用に期待した。しかしながら、今回作成した動物モデルにおいては、有意な神経再生の質的改善を認めなかった。考えられる原因の一つとして、移植後におけるASCの生存期間が挙げられる。過去の我々の研究において、ラット皮下組織へ移植されたASCの生存期間はおよそ14日未満であることを報告している(引用文献)。一方、軸索ガイダンスが構築され、軸索再生が開始されるまでには、通常7日程度の期間が必要とされる。また、本格的な瘢痕形成が開始されるのは、移植ASCの生存期間よりも後の時期となる。このことから、今後、ASCの移植時期、および生存期間を延長させる移植法を再検討することで、異なった結果が得られる可能性があると思われる。また、足跡分析の結果には反映されなかったものの、ラット坐骨神経切断・縫合モデルにおいて頻繁に認める足関節の拘縮を、ASC移植群において殆ど認めなかった。正確な機序は不明であるが、このことは神経損傷部位へのASC移植が、軸索ガイダンス再構築とその後の軸索再生において、何らかの調整的作用を及ぼすことを示唆している。今後、今回得られた結果を踏まえ、末梢神経再生の質的改善へ向けたASCの有効な利用法を更に検討していく必要がある。

<引用文献>

Tomita K, Nishibayashi A, Yano K, Hosokawa K. Differentiated adipose-derived stem cells promote reinnervation of rat skin flaps. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open* 1(3):e22, 2013

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 4件)

Mori D, Miyagawa S, Matsuura R, Sougawa N, Fukushima S, Ueno T, Toda K, Kuratani T, Tomita K, Maeda N, Shimomura I, Sawa Y. Pioglitazone strengthen therapeutic effect of adipose-derived regenerative cells against ischemic cardiomyopathy through enhanced expression of adiponectin and modulation of macrophage phenotype. *Cardiovascular Diabetology*, 査読有, 18(1):39, 2019

Nishibayashi A, Tomita K, Yano K, Taminato M, Hosokawa K. Shaping a flap using a bioabsorbable mold - A preliminary report. *Plastic and Reconstructive Surgery Global Open*, 査読有, 6(8):e1890, 2018

Sowa Y, Kishida T, Tomita K, Yamamoto K, Numajiri T, Mazda O. Direct conversion of human fibroblasts into Schwann cells that facilitate regeneration of injured peripheral nerve in vivo. *Stem Cells Translational Medicine*, 査読有, 6(4):1207-1216, 2017

Nishibayashi A, Tomita K, Kiya K, Yano K, Hosokawa K. Differentiated adipose-derived stem cells promote the recovery of nociceptor function in rats.

Neuroreport, 査読有, 27(15)1134-9, 2016

〔学会発表〕(計 3件)

富田興一 他、The role of fat grafting in breast reconstruction. The 14th KOREA-JAPAN Congress of PRS、2018年6月5日、平昌

富田興一 他、Autologous breast reconstruction using three-dimensional imaging techniques. 9th Congress of World Society for Reconstructive Microsurgery、2017年6月16日、ソウル

西林章光 他、3Dシミュレーションと印刷技術を駆使した乳房再建 埋込型乳房鋳型使用へ向けての試み 第25回日本形成外科学会基礎学術集会、2016年9月16日、大阪府大阪市

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：細川 亙

ローマ字氏名：(Hosokawa, ko)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：20181498

研究分担者氏名：西林 章光

ローマ字氏名：(Nishibayashi, akimitsu)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：医学部附属病院

職名：医員

研究者番号(8桁)：00647133

研究分担者氏名：金澤 成行

ローマ字氏名：(Kanazawa, shigeyuki)

所属研究機関名：大阪大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：招へい教員

研究者番号(8桁)：50506243

研究分担者氏名：峯岸 芳樹

ローマ字氏名：(Minegishi, yoshiki)

所属研究機関名：福井大学

部局名：学術研究院医学系部門(附属病院部)

職名：助教

研究者番号(8桁)：10467566

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。