

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11362

研究課題名(和文) 鼻粘膜由来組織幹細胞による顔面神経再生の研究

研究課題名(英文) Using olfactory stem cell for facial nerve regeneration after injury

研究代表者

濱島 有喜 (Hamajima, Yuki)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：30343403

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)：我々はいくつかの研究で顔面神経圧挫麻痺モデルを用いたが、圧迫を強くしても2週間で治る程度の麻痺モデルしか作成できないのが問題である。そこで本研究では顔面神経を切断して、より高度な顔面神経障害モデルマウスの治療に応用することを目的とした。顔面神経を切断し、離れた群では顔面神経の再生は認められなかったが、神経再生誘導チューブを用いた群は、神経を直接吻合した群と比べて劣らない神経再生効果を認めた。その効果を電気生理学的、組織学的にも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顔面神経麻痺は致死性の疾患ではないが、顔が歪み表情を失うため、患者の精神的苦痛、社会生活におよぼす影響は大きい。耳下腺悪性腫瘍などの側頭部の悪性腫瘍では、顔面神経を合併切除せざるを得ないことがある。大耳介神経などを移植神経として用い顔面神経に吻合すると、1年半後に半分程度まで麻痺は回復する。しかし完全な回復は望めないため、神経再生をさらに促す治療法が必要である。側頭骨手術において、顔面神経を切断しなければならぬ場面は多くないが、本治療法で顔面神経の再生が促進されれば、臨床応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have used a facial nerve crush paralysis model in our previous studies, but the problem is that we can only create a paralysis model that can be cured in 2 weeks even if the pressure is intensified. Therefore, in this study, we aimed to cut the facial nerve and apply it to the treatment of a more advanced mouse model of facial neuropathy. In the group in which the facial nerve was severed and separated, no regeneration of the facial nerve was observed, but the group using the nerve regeneration induction tube showed a nerve regeneration effect that was not inferior to that of the group in which the nerve was directly anastomosed. This effect was confirmed electrophysiologically and histologically.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：顔面神経麻痺 組織由来幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

顔面神経麻痺は致死性の疾患ではないが、顔が歪み表情を失うため、患者の精神的苦痛、社会生活におよぼす影響は大きい。耳下腺悪性腫瘍などの側頭部の悪性腫瘍では、顔面神経を合併切除せざるを得ないことがある。大耳介神経などを移植神経として用い顔面神経に吻合すると、1年半後に半分程度まで麻痺は回復する。しかし完全な回復は望めないため、神経再生をさらに促す治療法が必要である。

古くから、末梢神経は再生するが中枢神経は再生しないと考えられてきた。その後の研究により中枢神経系には神経回復を阻害する因子があることが判明してきた。2006年に脊髄損傷部位に鼻粘膜を移植し、手足の運動機能回復を認めたとの報告があった。これは鼻粘膜が神経再生を促進させるサイトカインを分泌していることを示唆するものであり、本研究ではここで申請者は鼻粘膜を利用した神経再生研究に着目した。

嗅粘膜由来組織幹細胞を用いた機能再生の研究に着目し、嗅粘膜由来の組織幹細胞の分離、培養に成功した。この組織幹細胞が RT-PCR、免疫染色にて、神経幹細胞マーカー (Sox-1、Sox-2、Musashi-1、Nestin、Nanog) を発現し、6ヶ月間以上培養が可能であり、神経幹細胞の性質をもつことを証明した。また、神経栄養因子 (NGF) や、神経再生を促進するサイトカイン (Galectin-1、Growth Arrest Specific-1 等) を分泌することを示した。次に、この組織幹細胞が顔面神経の再生を促す可能性を考え、顔面神経麻痺モデルマウスを作成し、神経麻痺の再生効果を検討した。顔面神経本幹を圧挫して組織幹細胞をハイドロゲルと共に損傷神経上に留置したところ、顔面神経麻痺からの回復が促進された。

近年は、骨髄由来の多能幹細胞や、iPS 細胞を利用する研究が数多く報告されているが、癌化の問題や、細胞の安定性、遺伝子導入の必要性、他人の細胞であることなど、臨床応用にはまだ解決されなければならない課題が多い。しかし嗅粘膜由来の組織幹細胞は、より分化した神経前駆細胞であることから、より簡便で有効な治療になると考えられる。また、耳鼻咽喉科医にとって鼻粘膜は採取も容易であることから、治療への応用への障害が低く、自己への移植も可能であると考えられる。また、これら幹細胞の持つ特性である多能性や、放出される成長因子等は、他の末梢神経障害の治療にも応用できると考えられ、顔面神経麻痺のみならず、様々な末梢神経障害にも広く応用できる可能性を持っている。

鼻腔より得られる組織幹細胞は、骨髄より分離した多能幹細胞に比べ、より嗅上皮に近い細胞であると考えられる。また、組織幹細胞の分化する過程が解明されれば、骨髄由来の幹細胞に応用し、同様に分化させられることが可能であり、多方面において意義深い研究となると考えられる。嗅粘膜の採取は耳鼻科医としては容易であり、将来、臨床応用する上で有用な方法になりうると確信している。また、神経再生誘導チューブに幹細胞を加えることにより顔面神経麻痺からの回復がさらに促進されることがわかれば、側頭骨手術などで顔面神経が切断された時の新たな治療選択肢となりうる。

2. 研究の目的

本研究では顔面神経を切断して、より高度な顔面神経障害モデルマウスの治療に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 様々な顔面神経麻痺切断モデルマウスの作成

(a) 顔面神経切断吻合マウス

6週齢の ICR もしくは Balb/c マウスを麻酔し、耳下腺下で顔面神経本幹を露出し、ハサミで切断、10-0 ナイロンで吻合する。

(b) 顔面神経欠損マウス

顔面神経本幹をハサミで2ヶ所切離し、3mm の gap を作成する。

(c) 顔面神経再生誘導マウス

顔面神経本幹をハサミで2ヶ所切離し、3mm の gap を作成する。両端を 10-0 ナイロンで神経再生誘導チューブ「ナブリッジ」に固定する。チューブ内はあらかじめ培養液で浸したあとに、幹細胞を含む培養液もしくは含まない培養液を注入する。

(2) 神経再生効果の比較

上記で作成した顔面神経麻痺モデルマウスに対して、麻痺の回復を臨床的に検討する。麻痺の評価は我々の過去の報告と同様に、瞬目と髭の動きを観察し (動き無し: 0点、若干の動きあり: 1点、動きはあるが左右差有り: 2点、左右差無し: 3点)、そのスコアの合計を顔面神経麻痺スコアとする。

(3) 電気生理学的検討

ほぼ麻痺が回復した時期、50%程度麻痺が回復した時期を検討する。その両日で、マウスを麻酔し、顔面神経本幹を露出して電気刺激する。頬筋の筋電位を記録し、誘発筋電図 (ENoG) を測定する。

(4) 再生髄鞘数の組織学的検討

生理学的検査と同じ日程で組織学的検討を行う。具体的には、マウスを深麻酔し、寒流固定を行う。その後頭部を切断して採取し、EDTA・2Na で脱灰、パラフィンブロックを作成する。切片を作成し、Klüver-Barrera 染色を行う。各群の再生髄鞘の本数を測定し、神経再生効果を検討する。また、神経軸索のマーカースとして Neurofilament Light 鎖 (NF-L) を免疫染色し、Klüver-Barrera 染色で対比染色したもので再生髄鞘の中に認められる再生軸索の数を測定する。

4. 研究成果

(1) 様々な顔面神経麻痺切断モデルマウスの作成

(a) 顔面神経切断吻合マウス

耳下腺下で顔面神経本幹を露出し、ハサミで切断、10-0 ナイロンで吻合したところ、8週間程度まで徐々に回復するが、軽度の顔面神経麻痺が残存した。

(b) 顔面神経欠損マウス

顔面神経本幹をハサミで2ヶ所切離し、3mm の gap を作成したところ、完全麻痺が認められた。

(c) 顔面神経再生誘導マウス

顔面神経本幹をハサミで2ヶ所切離し、3mm の gap を作成し、両端を10-0 ナイロンで神経再生誘導チューブ「ナーブリッジ」に固定したところ、(a)と同様に8週間程度まで徐々に回復し、軽度の顔面神経麻痺の残存が認められた。

(2) 神経再生効果の検討

臨床的な神経回復の程度は(a)、(c)は同程度の回復を示すと考えられた。

(3) 電気生理学的検討

電気生理学的には(a)、(c)とも(b)より著明に広い振幅が認められた。しかし、(a)のほうが(c)よりやや振幅が高い傾向にあった。

(4) 再生髄鞘数の組織学的検討

組織学的には1週間後にはほとんどの髄鞘、神経軸索が変性していたが、2-8週にむけて徐々に髄鞘、神経軸索の再生が認められた。(a)、(c)の間に明らかな差異は認められなかった。

(5) 将来展望

以上の結果をまとめると、神経吻合した結果が最も良好な神経再生効果を認めたが、ナーブリッジで架橋した群も神経吻合に劣らない神経再生効果を認めた。今後は我々が作成した嗅神経由来組織幹細胞と組み合わせて、神経再生がさらに促進されるか検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	江崎 伸一 (Esaki Shinichi) (20620983)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	勝見 さち代 (Katsumi Sachiyo) (60625565)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関