

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09480

研究課題名(和文) Direct neurotizationと幹細胞移植による皮膚知覚回復促進の試み

研究課題名(英文) Attempt to promote skin reinnervation by direct neurotization and stem cell transplantation

研究代表者

矢野 健二 (YANO, KENJI)

大阪大学・医学系研究科・招へい教授

研究者番号：40174560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：【背景】人工乳房による再建乳房を知覚化する手段は存在しない。本研究では、損傷知覚神経を直接皮膚へ導くdirect neurotization (DN)法に着目した。【方法】ラット背部で左Th13内側枝(mDCN-T13)以外を切除し無知覚領域に囲まれた知覚領域を作成した。mDCN-T13を切断し、別部位の真皮下へ縫合、皮筋反射により知覚領域変化を検討した。【結果】術後4週以降でDN部に一致して、皮筋反射が出現した。新生知覚領域はその後、徐々に拡大した。【結論】皮膚へのDNは、神経断端が存在しなくとも、任意の部位に新規知覚領域を作成できる。本法は、再建乳房の知覚化のための有力な手法となり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DN法は、損傷神経中枢端を脱知覚された真皮へ直接縫合し、知覚再生を得る画期的な方法である。何らかの障害で、軸索伸長が阻まれ、側芽形成のみに頼る状況下では、高度な感覚の再生は望めず、防御知覚すら脱失してしまい問題となる。DN法により神経再生を誘導できたならば、その問題解決の糸口となるだろう。再建乳房においては、DN法により肋間神経切断端をmastectomy flapへ縫合することで実現可能かもしれない。人工神経や神経移植などを介すれば、インプラントや皮弁を障害とせず、神経再生を誘導できる可能性があると考えられる。

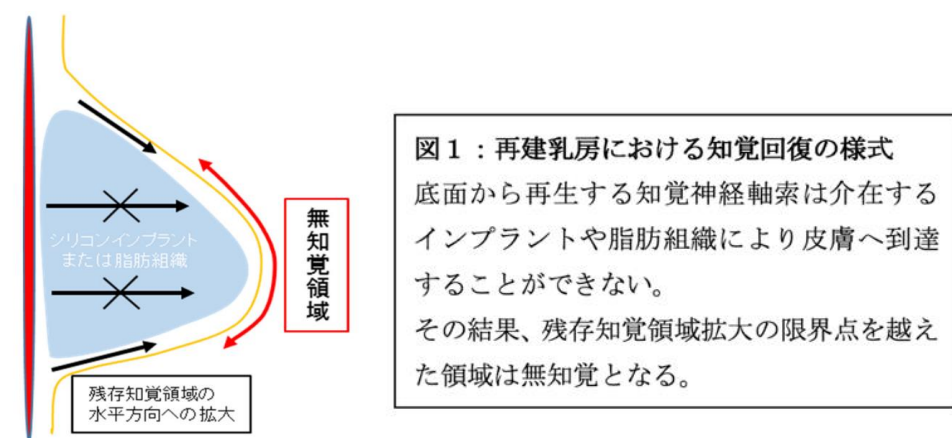
研究成果の概要(英文)：Background: There is no means of reinnervation in implant-based breast reconstruction. In this study, we focused on the direct neurotization (DN) method, which guides damaged sensory nerves directly to the skin. Methods: An innervated area surrounded by a non-innervated area was created by excising the part other than the left Th13 medial branch (mDCN-T13) on the back of the rat. The mDCN-T13 was cut, sutured to the dermis at another site, and the change in the innervated area was examined by the cutaneous muscle reflex. Results: Four weeks after the operation, a cutaneous muscle reflex appeared in agreement with the DN part. The new sensory area then gradually expanded. Conclusion: DN to the skin can create a new innervated area at any site without the presence of nerve stumps. This method can be a powerful method for the perception of reconstructed breasts.

研究分野：乳房再建

キーワード：末梢神経再建 再建乳房の知覚化 Direct neurotization

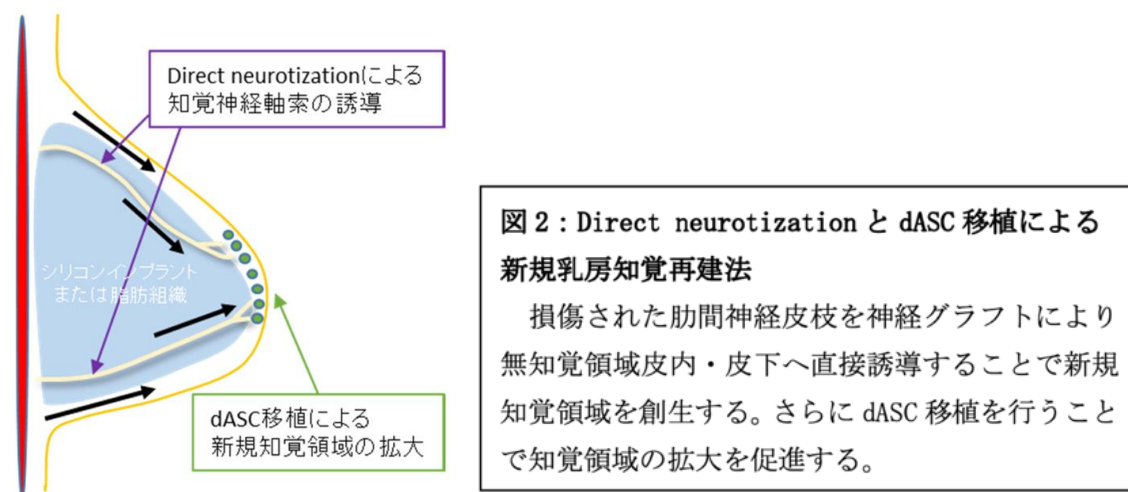
1. 研究開始当初の背景

近年における乳癌手術の低侵襲化と再建技術向上により再建乳房の整容性は格段に向上した。しかし、その機能性すなわち再建乳房の知覚に関しては殆ど改善されていないと言える。特に、現在症例数の多い皮下乳腺全摘術後の再建においては再建乳房に違和感の訴えが多く、また乳房知覚の鈍麻は低温熱傷の原因にもなり得ることから、知覚回復が重要であると考えられる。皮下乳腺全摘後の再建においては、シリコンインプラントまたは自家組織によって乳腺組織が置換されるが、底面から皮膚への知覚神経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ため、再建乳房の知覚は周囲の残存知覚領域の水平方向への拡大にのみ依存することとなる(図1)。一方、皮膚のみを胸壁へ移植した症例においては底面からの知覚神経軸索再生によって比較的良好な知覚回復が得られる。すなわち、再建乳房の知覚改善においては水平方向からの知覚領域の拡大促進に加え、シリコンインプラントや脂肪組織といった、底面からの知覚神経軸索再生を阻害する因子をいかに克服するかが重要となる。



2. 研究の目的

再建乳房の更なる知覚向上を達成するには底面からの知覚神経軸索再生を促すことが必要であるが、介在するシリコンインプラントや脂肪組織によって再生が阻害されてしまう。そこで本研究においては、損傷知覚神経を神経グラフトによって直接標的組織へ導く direct neurotization 法(以下、DN法)に着目し、その可能性を検証し、新規治療法の開発を目指す(図2)。



3. 研究の方法

ラット背部皮膚知覚脱失モデルを用いた DN 法の確立: ラット背部の肋間神経を切除することで広範な知覚脱失領域を作成し、DN 法による新規知覚領域の創生を試みる。さらに新知覚領域における再生神経の動態を検討することで、DN 法による知覚神経再支配の機序を解明する。

(1) ラット背部広範知覚脱失モデルの作成

ラット背部に切開を加え、肋間より出る背部皮神経を同定し、左側 Th13 の内側枝以外は全て切除することにより、Th13 固有知覚領域が島状に残った背部皮膚知覚脱失モデルを作成する。本モデルにおいては全身麻酔下に背部皮膚をピンチすることにより皮下に存在する cutaneous trunci muscle の反射収縮(以下 CTM reflex)が可視化できるため、侵害受容感覚の評価が可能となる。Th13 固有知覚領域の知覚評価の後に、Th13 内側枝は皮膚直下で切断し、頭側遠隔部位の皮膚に縫合し、DN 法を試みる。皮膚側縫合部においては CTM は切除し、真皮直下または真皮を分層で切除し真皮内へ縫合する。実験群として以下の 3 群を作成した。

1. DN 真皮内縫合群: Th13 内側枝を皮膚真皮内縫合固定する群
2. DN 真皮下縫合群: Th13 内側枝を真皮直下に縫合固定する群
3. 神経圧挫損傷群: Th13 内側枝を切除せず挫滅のみ施す神経移植を行わない群

術後侵害受容知覚領域 (innervated) と非知覚領域 (denervated) の境界線の変化を経時的に評価する (Fig. 1)。

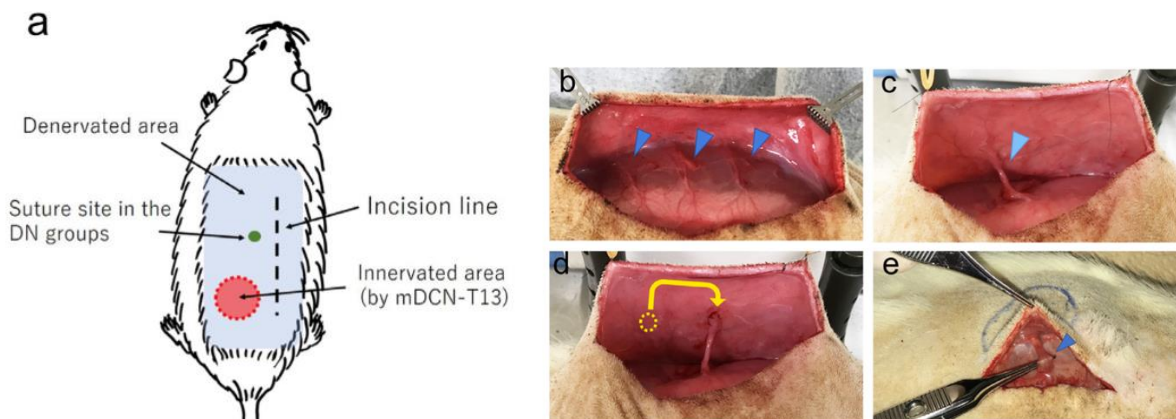


Fig. 1. Rat model of back skin sensory denervation. (a) Schematic of the model. DN: direct neurotization, mDCN-T13: medial branch of the dorsal cutaneous nerve of thoracic segment 13. (b) Dorsal cutaneous nerves (arrow heads), which emerge from the latissimus dorsi muscle and innervate the skin, were exposed. (c) DCNs were removed from the region exposed from the muscle body up to the subdermis and buried within the muscle to prevent regeneration, except for the mDCN-T13 (arrow head).. (d) In the DN groups, the mDCN-T13 was transected at the subdermis, and the proximal end was sutured to the dermis of the denervated area 2-3 cm cranial to the stump. (e) At postoperative week 12, the rats were euthanized. After subcutaneous detachment and confirming the mDCN-T13 (arrowhead), skin samples were harvested with the portion of the mDCN-T13 that entered the skin at the center.

(2) DN 法における知覚再支配機序の解明

知覚領域拡大がプラトーに達した後、新生知覚領域の皮膚組織を採取し、組織学的に再生神経の太さ、髄鞘の有無、密度などを検証する。

4. 研究成果

再生知覚領域:左側 1 本のみ残した mDNC-T13 の固有知覚領域面積は、神経圧挫損傷群 $3.60 \pm 0.84 \text{cm}^2$ 、DN 真皮下縫合群 $2.66 \pm 0.53 \text{cm}^2$ 、DN 真皮内縫合群 $2.36 \pm 0.63 \text{cm}^2$ で各群に差はなかった ($P=0.0624$)。 (Fig. 2)

新生知覚領域の出現は、神経圧挫損傷群で最も早く、2W 後には 5 個体全てで CTM reflex が観察された。DN 群は、4w ~8W 後に CTM reflex が出現し、DN 真皮内縫合群では、4w 後に 4/5 個体 (80%)、8w 後に 1/5 個体 (20%)、DN 真皮下縫合群では、4w 後に 3/6 個体 (50%)、8w 後に残り 3 個体 (50%) に出現した。発現は、神経圧挫損傷群で最も早く、次いで DN 真皮内縫合群、DN 真皮下縫合群という結果であった。CTM reflex の出現後、知覚領域は各群で経時的に拡大し、最終観察時点の 12w 後には、神経損傷前の固有領域より広い面積となり、いずれの観察時点においても、知覚領域の面積は有意に各群間に差が生じていた (Fig. 2 と 3)。

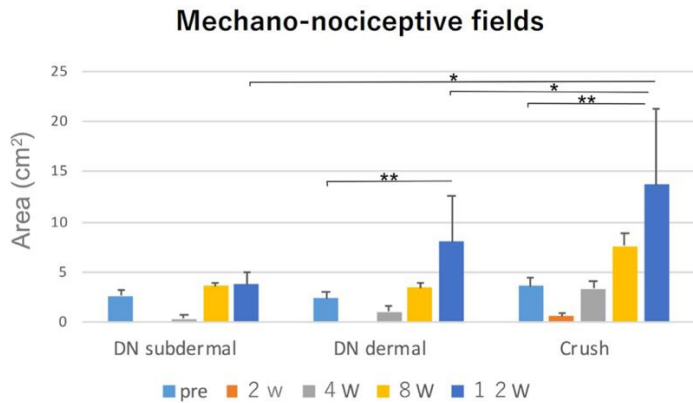


Fig. 2. Mechano-nociceptive fields. In the DN dermal group, the area of the mechano-nociceptive field at postoperative week 12 was significantly larger than the preoperative area. In contrast, at the same time point, areas of mechano-nociceptive fields in both DN subdermal and DN dermal groups were significantly smaller than that of the Crush group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ as indicated (Kruskal–Wallis nonparametric ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test, and Mann-Whitney U test, respectively).

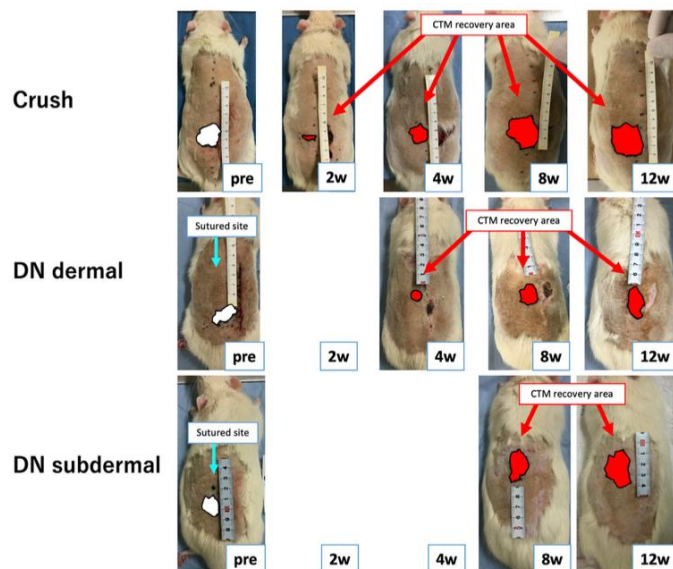


Fig. 3. Temporal changes in cutaneous trunci muscle (CTM) reflex-positive area. Representative images for the Crush group, DN dermal group, and DN subdermal group are shown. In the Crush group, a CTM reflex-positive area (red area) appeared at postoperative week 2 in the area innervated by mDNC-T13 preoperatively (white area) and gradually expanded. In the DN groups, a CTM reflex-positive area appeared slightly caudal to the DN region at postoperative weeks 4 to 8 and gradually expanded.

再生神経組織学的評価:再生知覚領域の真皮内には、PGP9.5、S100 共に陽性の有髄繊維が点在して観察された (Fig. 4)。

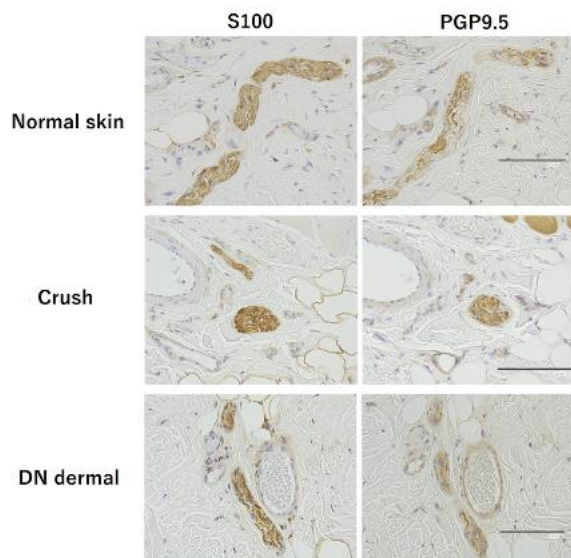


Fig. 4. Immunostaining analysis. Images of S100 and PGP9.5 immunostaining of sections from normal skin, the Crush group, and the DN dermal group (scale bars: 100 μ m).

有髄繊維は、いずれの群においても、真皮深層から乳頭層まで見られ、それは非実験正常真皮内においても同様であった。真皮内の新生有髄神経の総計は、神経圧挫損傷群 $47.05 \pm 19.36/cm$ 、DN 真皮下縫合群 $41.27 \pm 14.66/cm$ 、DN 真皮内縫合群 $44.57 \pm 13.29/cm$ であり、非実験正常真皮内の $44.64 \pm 5.36/cm$ と有意差はなかった ($P=0.95$) (Fig. 5)。有髄繊維の平均直径は、神経圧挫損傷群 $3.44 \pm 1.12 \mu m$ 、and in the DN 真皮下縫合群 $3.16 \pm 1.00 \mu m$ 、DN 真皮内縫合群 $3.24 \pm 1.03 \mu m$ 、正常真皮内 $3.80 \pm 1.63 \mu m$ であった。それは、神経圧挫損傷群、DN 真皮内縫合群、DN 真皮下縫合群の順に大きく、CTM reflex 出現の早かった順と等しかった。非実験正常真皮内の有髄繊維の平均直径はどの群よりも有意差をもって大きく、神経圧挫損傷群は DN 群より有意に大きかった。DN 群間には有意差はなかった (Fig. 5)。

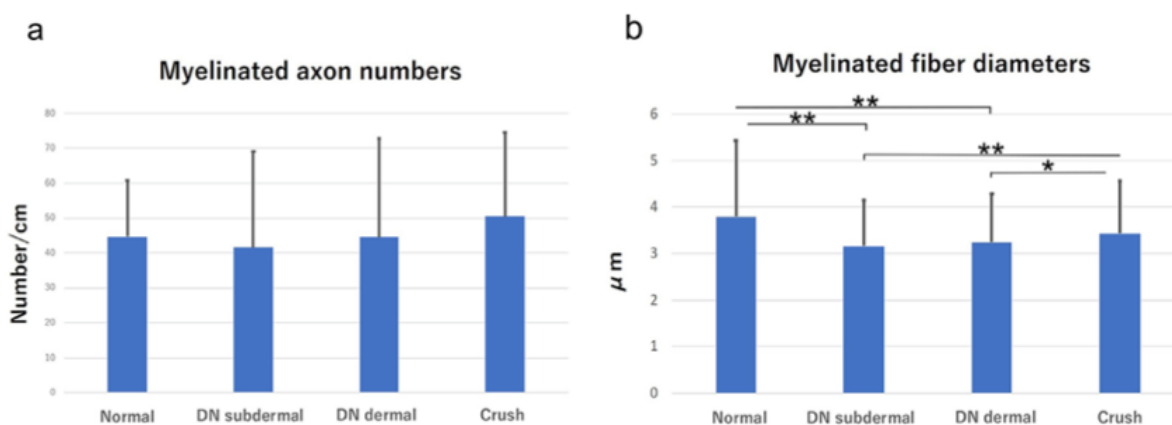


Fig. 5. Histomorphometric analysis of S100-positive regenerating fibers within the dermis in the mechano-nociceptive field. (a) The total number of myelinated fibers did not significantly differ between the four groups ($P=0.95$, one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer multiple comparisons test). (b) Mean diameters of myelinated fibers in the DN groups were significantly smaller than those in the Crush group and normal skin. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ as indicated (Kruskal-Wallis nonparametric ANOVA followed by Dunn's multiple comparisons test).

本モデルによる DN 法により、無知覚領域内に新生知覚領域が発生することが確認できた。知覚の再生は、真皮内に縫合した群でより早く、肉芽組織や脂肪組織の介在によって軸索伸長が遅延することが示唆された。真皮内の再生神経には髄鞘が見られ、軸索伸長より有髄繊維が再生されたと考えられた。その繊維の太さは、正常皮膚、神経圧挫損傷群、DN 真皮内縫合群、DN 真皮下縫合群の順に大きく、再生時期の早い群ほど太くなっており、再生軸索は経時的に大きく成熟していく過程を見ていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Taminato Mifue, Tomita Koichi, Yano Kenji, Otani Naoya, Kuroda Kazuya, Kubo Tateki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Targeted sensory reinnervation by direct neurotization of skin: An experimental study in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bjps.2020.12.101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田港 見布江、富田興一、矢野健二、ほか
2. 発表標題 Direct neurotization法による知覚領域誘導の試み ~ 再建乳房の知覚化を目指して ~
3. 学会等名 第28回 日本形成外科学会基礎学術集会
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
研究分担者	富田 興一 (TOMITA KOICHI) (90423178)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	
研究分担者	田港 見布江 (TAMINATO MIFUE) (80815697)	大阪大学・医学系研究科・特任助教（常勤） (14401)	

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
---------	---------