

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09492

研究課題名(和文)人工神経に対するシュワン細胞供給法としての端側神経縫合の有用性について

研究課題名(英文)End-to-side neurorrhaphy as Schwann cells provider to artificial nerve

研究代表者

林 礼人(Hayashi, Ayato)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10365645

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)：人工神経のより有効な使用方法を検討するため、端側神経縫合によるシュワン細胞充填を施行し、その有用性について検討を行った。トランスジェニックマウスの坐骨神経を用いて検討を行ったが、人工神経の硬さやマウスの坐骨神経の短さゆえに、一定したモデル作成が困難であった。その為、モデルをラットに変更し、軸索が蛍光発色するトランスジェニックラット(Thy1-GFPラット)を米国の研究室から特別に譲渡頂き実験を継続した。

その結果、端側神経縫合によるシュワン細胞遊走群の方が遊走を行わない群に対して、軸索やシュワン細胞の面積率が高い傾向にあった。ただし、人工神経独特の自己融解現象に伴う固有の難しさも存在した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在人工神経の適応は3cm以下の神経欠損に限られており、感覚神経のみの回復に留まっている。シュワン細胞を付加した人工神経が、より長い欠損に使用可能となれば、より多くの神経欠損症例に使用することが出来、神経採取を要する症例を少なく出来る。

神経採取後に生じる知覚鈍麻や痺れが術後長期にわたって問題となる場合もあるため、人工神経による再建の幅を広げることは、神経採取に伴う合併症の回避につながり、非常に意義深いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the more effective use of artificial nerves(AN), we utilize the end-to-side neurorrhaphy as Schwann cells provider to the AN and evaluate how it affect to the axonal regeneration. We examined a bilateral end-to-side neurorrhaphy model using the sciatic nerve of transgenic mice in which axons or Schwann cells have fluorescence. However, due to the stiffness of the AN and the shortness of the sciatic nerve of the mouse, it was difficult to create uniform animal models. Therefore, we switched animal model from the mouse to the rat, and transgenic rat whose axons were fluorescenced was specially transferred from a laboratory in the United States and further experiment was conducted.

As a result, the area ratio of axons and Schwann cells tend to be higher in the Schwann cell migrated model with end-to-side neurorrhaphy. However, there were also inherent difficulties associated with the autolysis phenomenon of the AN and further investigation seems to be required.

研究分野：再建外科

キーワード：人工神経 神経移植 端側神経縫合 神経再建 シュワン細胞充填 無細胞化神経

研究成果報告書

1：研究開始当初の背景

これまで四肢外傷による神経損傷や悪性腫瘍切除後に生じた長い神経欠損に対して、自家神経移植術が標準術式として用いられてきた。しかし、移植神経採取部の合併症、採取可能な神経長の限界などが問題となっている。この問題を解決する方法として、人工神経や無細胞化した同種神経といった移植材料が近年注目されており、本邦でも2013年3月から人工神経の臨床応用が可能となった。現時点で、無細胞な移植神経の有用性については3cm以内の短い感覚神経欠損に限られており、外傷に伴う四肢の長い運動神経欠損や悪性腫瘍切除後の神経欠損の架橋に対する人工神経の有用性は示されていない。長い神経欠損に対する治療成績を向上させるには、軸索栄養因子を供給するシュワン細胞の導入が必要不可欠となる。

我々は、シュワン細胞の同種神経移植内への遊走について、人工神経の様に移植神経内にシュワン細胞が存在しなければ、非常に速やかな遊走を移植母体から生じることをトランスジェニックマウスによる検討で明らかにした(Hayashi et al. 2008)。また、端側神経縫合における軸索再生のメカニズムについては、独自モデルの考案や軸索が蛍光発色するトランスジェニックマウスなどを用い、Collateral sproutingの存在(Hayashi et al. 2004)や軸索発芽に関わる軸索損傷刺激の必要性など、様々な報告を行ってきた(Hayashi et al. 2008)。

我々は、端側神経縫合が無細胞な移植神経に対するシュワン細胞供給法として有用なものではないかと考え、その有効性について検討を始めた。先行研究として、幼弱化したシュワン細胞が蛍光発色するNestin-GFPマウスを用いて、蛍光発色しない無細胞化した同種神経を、蛍光発色するマウスの坐骨神経に様々な端側神経縫合法でモデルを作成し、シュワン細胞の遊走程度について検討した。その結果、マウスにおける1cmの無細胞化神経において、移植神経片側に対する端側神経縫合でも移植神経内全体にシュワン細胞を遊走させることが判明した。さらに、移植神経の両側に端側神経縫合を行うことで、より多くのシュワン細胞が無細胞化神経内へ遊走させる事がわかり、シュワン細胞を充填させた同種の無細胞化神経(Hybrid ANG)を神経欠損部に移植すると、遊走させていないコントロール群に比べ有意差を持って軸索再生が促進されることを確認した(Yoshizawa, Hayashi et al. 2016)。

これらの同種神経における研究成果や知見を活かし、端側神経縫合を用いてシュワン細胞を充填した人工神経の有用性を検討することが、より長い欠損の再建を可能にするなど人工神経の有効性をより向上させるのではないかと考え研究を開始した。

2：研究の目的

現在人工神経の有効性向上のために、軸索再生をサポートする幹細胞のシュワン細胞への分化誘導やシュワン細胞又は神経栄養因子の人工神経内への補充といった基礎研究が様々な形で取り組まれている。そうした中、端側神経縫合でシュワン細胞を供給する方法の報告は我々が調べ得た限り無く、世界的にも新規の特徴ある手法である。さらに、端側縫合法により人工神経にシュワン細胞を供給する手法は、幹細胞移植に伴う倫理的な側面や細胞培養など*In vitro*での作業が不要で臨床への応用に直結する。

無細胞な同種神経に対するシュワン細胞の供給法として、端側神経縫合が有用であることは、今までの研究結果である程度確認することが出来、移植神経の両側端を端側縫合して、シュワン細胞を遊走させた移植神経において、最も旺盛な神経再生が得られた。

本研究では、無細胞化した同種神経を既に臨床応用されている人工神経に変更し、人工神経においても同様の結果が得られるかを検討することを主な目的とした。

本手技は、すぐにでも臨床応用が可能な手技と考えるが、シュワン細胞を遊走させprefabricateするのに必要な期間や遊走可能な移植神経の長さ、遊走にかかわる因子の解明など、その手法を具体化するための検討を行っていくこととした。

3：研究の方法

(1) 人工神経を用いて端側神経縫合を行った蛍光発色マウスの坐骨神経の神経再生の評価

幼弱化したシュワン細胞が蛍光発色するNestin-GFPマウスの坐骨神経の近位端に損傷を加えperineural windowを作成する。0.4mm幅で長さ10mmのコラーゲン性人工神経(リナーブ：ニプロ社)を用いて11-0ナイロンで3針、端側神経縫合を行った。2、4週で人工神経内に

遊走しているシュワン細胞を共焦点型顕微鏡で評価を行う。

(2) シュワン細胞充填型人工神経移植群の有用性について

両側端側神経縫合を行う際に使用するラットは、8~12週齢オスの Sprague Dawley ラット坐骨神経を使用した。また、アジアでは初となる軸索が蛍光発色するトランスジェニックラット(Thy1-GFPラット:以下TGラット)をワシントン大学セントルイスの末梢神経外科ラボから譲って頂き、神経欠損作成後の端端神経縫合要のモデルで使用した。評価群は以下の3群に分類した。

Group 1 (以下 G1) は、コントロール群で TG ラット坐骨神経に 20mm の神経欠損を作成し、1.0mm 幅 20mm 長の人工神経 20mm を端端縫合し、4 週で評価する群(N=4)。

Group 2 (以下 G2)は、SD ラット坐骨神経両端に perineural window を作成し、1.0mm 幅で長さ 25mm のコラーゲン性人工神経(Re Nerve: ニプロ社)を 8-0 ナイロン、10-0 ナイロンで端側縫合する。端側縫合 2 週後に人工神経を切離し、縫合部両端を約 2.5mm ずつカットし 20mm 長の人工神経とする。その後、TG ラットの対側の坐骨神経 20mm 欠損を作成し、欠損部に端側縫合後 2 週経過した人工神経を 8-0 ナイロン、10-0 ナイロンを用いて端端縫合する。端端縫合 4 週後に評価した群を Group2(2-4ES 群)とした(N=4)。

Group3(以下 G3)は G2 同様に人工神経を端側縫合施行しシュワン細胞遊走 4 週後に採取し、TG ラットの坐骨神経 20mm 欠損に移植した群を Group3 とした。(4-4ES 群)。(図1)

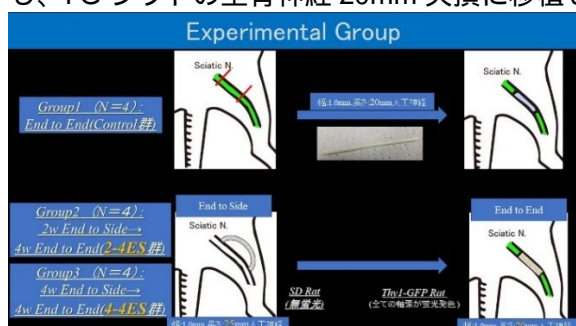


図1: 実験グループ

評価法については、1. 人工神経全面積に対するシュワン細胞占有面積と、軸索専有面積の面積率: 人工神経の神経縫合部から各々5mm の近位断端,遠位断端の横断切片を凍結切片で作成し、免疫染色(抗 Neurofilament 抗体,抗 S-100 抗体)を施行して、染色される領域の面積率を評価した(図2)。

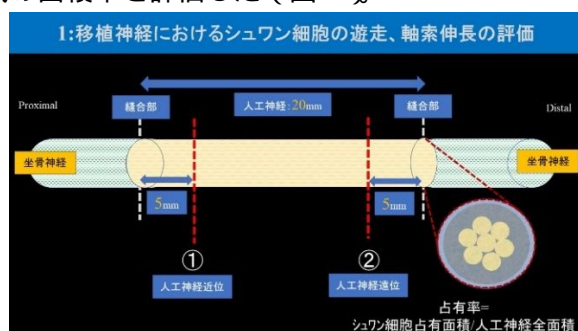


図2: シュワン細胞占有面積と軸索専有面積の面積率の評価

2.前脛骨筋横断面積: 前脛骨筋の筋腹中央部横断面の関心領域における筋細胞 1 個の平均面積を算出した。

3.人工神経内へのシュワン細胞遊走状況: 移植前の端側縫合法における人工神経内へのシュワン細胞の遊走状況について、遊走後の人工神経の縦断面を作成し

S-100 抗体にて染色した上で、蛍光顕微鏡下にて人工神経全体の観察を行なった。

4: 研究成果

(1) 人工神経を用いて端側神経縫合を行った蛍光発色マウスの坐骨神経の神経再生の評価

蛍光発色マウスの坐骨神経の両断端に perineural window を作成し、人工神経を用いて両側端側縫合を試みたが、無細胞化した自家神経の様に人工神経では柔軟性がなく、組織が硬い

ため人工神経ではループを作成することができず両側端側縫合は困難であった。そこで坐骨神経近位のみ perineural window を作成し、0.4mm 幅で 10mm 長の人工神経を端側縫合し、遠位断端は盲端のままのモデルを作成した。4 週後に live imaging で軸索の伸長を確認した。しかし、4 週の時点では人工神経の分解が進んでしまい評価が難しかった（図 3）。

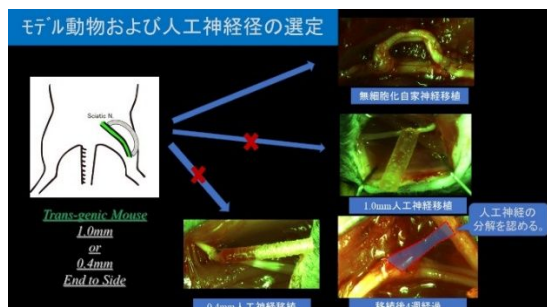


図 3

そのため、坐骨神経と同側の大腿神経を同定し、各々の神経に perineural window を作成、0.4mm 幅で 10mm 長の人工神経を端側縫合したモデルを作成した。10 日後に採取し、別の TG マウスの坐骨神経 10mm 欠損に端々縫合で移植し 10 日後に人工神経を採取して組織学的評価を行った。

まだ標本数は少ないが、人工神経近位断端では人工神経管内中央部に軸索の伸長を認めている。また、遠位断端では近位断端ほどではないが、軸索の伸長が見られる。今後 N 数を増やして評価を行う予定である。

(2) シュワン細胞充填型人工神経移植術の有用性について

1: 移植神経におけるシュワン細胞の遊走、軸索伸長の評価

人工神経近位横断面におけるシュワン細胞の遊走状況は、G1 で 2%、G2 で 17%とあまり差を認めなかったが、G3 では多くのシュワン細胞を認め、その占有率は 47%に達していた（図 4）。人工神経近位断端における軸索の面積率は、G1,G2 では差はなかったが、G3 では、多数の再生軸索を認め、その占有率は 30%と他群と比較して有意に多い印象であった。（図 5）

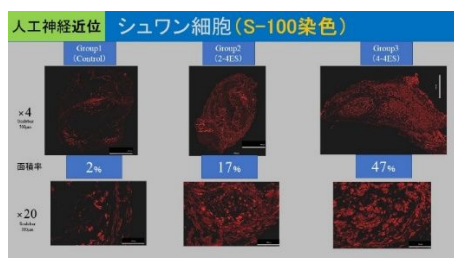


図 4

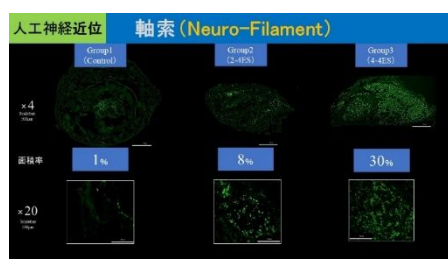


図 5

人工神経遠位横断面における比較を示す。シュワン細胞は、G1,2 では、G1:5%、G2:10%とほとんど認めなかったが、G3 では 36%とシュワン細胞の存在を認めた（図 6）。

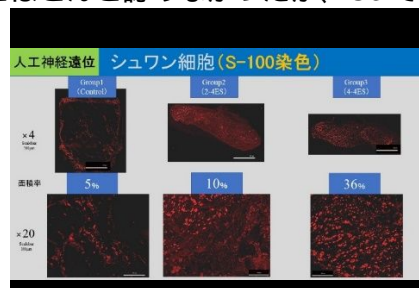


図 6

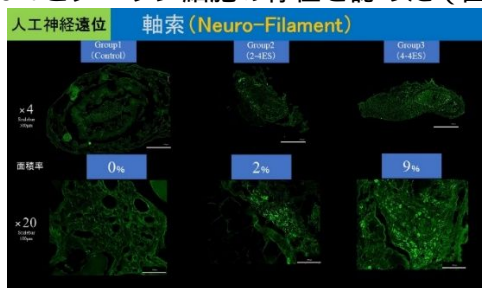


図 7

人工神経遠位横断面での軸索の占有率では G1:0%、G2:2%、G3:9%と差は得られなかったが、G3 で占有面積が大きい傾向が見られた（図 7）。

また、G1 と G3 の縦断切片を作成し、免疫染色の写真と、無細胞化自家神経の Whole Mount 写真についての比較を行った。先行研究で、シュワン細胞充填型の無細胞化自家神経におい

て、神経全体への旺盛なシュワン細胞の遊走と、軸索再生について報告した。本研究のシュワン細胞充填型人工神経の縦断面の染色画像ではシュワン細胞の遊走は緩徐な印象であった。また、無細胞化自家神経は、神経内を均一に遊走するのに対して、人工神経管内はまず外膜に沿ってシュワン細胞が遊走し、その後内部のコラーゲン線維に遅れて遊走することが分かった。また、G1とG3を比較するとシュワン細胞を付加した方が人工神経内に多くのシュワン細胞が分布し、再生軸索も多い傾向であった(図8)。

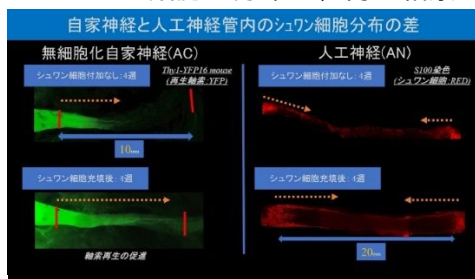


図 8

2:前脛骨筋の横断面積における関心領域の平均

Keyence社のBZ-X800 Analyzerを用いて細胞カウント、細胞面積の計測を行った。健常なラット前脛骨筋は、多核を伴う多角形の形状を呈しており平均関心領域は $1471 \mu\text{m}^2$ であった、一方G1,G2,G3は、G1: $322 \mu\text{m}^2$ 、G2: $340 \mu\text{m}^2$ 、G3: $356 \mu\text{m}^2$ であり、3群間における平均関心領域の差はなく、いずれも脂肪変性を伴う所見であった。

3:端側縫合後2,4週の人工神経縦断像

ラット坐骨神経に端側縫合2週後、4週後に人工神経を採取し、凍結切片を作成し、人工神経の縦断面を免疫染色(抗S-100抗体、抗Neuro-Filament抗体)した。端側縫合2週群は、人工神経管内へのシュワン細胞の遊走ははっきりと確認できなかったが、端側縫合4週群では、人工神経管内3.5mmの部分においてシュワン細胞の遊走を確認出来た。上記の結果より坐骨神経に人工神経を端側縫合した場合でもしっかりとシュワン細胞が遊走していることが確認できた(図9)。

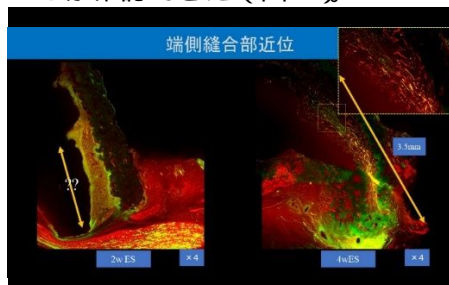


図 9



図 10

【本研究の Limitation】

端側神経縫合でシュワン細胞を付加することで軸索再生促進を示唆する所見が得られた。しかし、人工神経の経時的な分解により、移植神経の形状も経時的に細くなっている所見が見られた(図10)。図10に示す通り端側縫合後4週経過した人工神経は比較的保たれているが、8週の時点では中央部は分解が進んでいる印象であった。上記より、人工神経の分解が進むのは異物反応を起きにくくするための重要な過程であるが、二期的に移植する場合には、その影響を加味する必要がある。

人工神経の分解を制御できないかと考え、分解反応の減弱や、分解速度調整のために、2015年にカラマン(Kahraman)らが報告したPolytetrafluoroethylene(PTFE)に注目した。PTFEとは、生体内非吸収性の合成化合物であり、周囲の癒着組織との癒着を防止し、栄養因子の流入や血管新生を促す効果を有している。この素材で端側縫合部の人工神経を被覆することで分解反応を減弱化したり、分解速度を緩徐にしたりすることが可能なのではないかと考え使用し始めている。PTFEを使用した実験方法については今後実験数を増やして報告をする予定である。また、本研究はラットにおける坐骨神経20mm欠損モデルで、神経欠損長が大きいため、軸索の再生、前脛骨筋評価には、現時点の4週よりも長い12週、24週での評価が必要と考え、今後さらに実験を継続して、本手技の人工神経に対する有用性を検証していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Orgun Doruk, Hayashi Ayato, Yoshizawa Hidekazu, Shimizu Azusa, Horiguchi Masatoshi, Mochizuki Mariko, Kamimori Tomoki, Aiba-Kojima Emiko, Mizuno Hiroshi	4. 巻 30
2. 論文標題 Oncoplastic Lower Eyelid Reconstruction Analysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Craniofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 2396 ~ 2400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SCS.0000000000005639	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 -

1. 著者名 Fukuta Taro, Ichikawa Yuichi, Mizuno Hiroshi, Hayashi Ayato	4. 巻 7
2. 論文標題 Split-skin Paddle Anterolateral Thigh Flap for Reconstruction of Giant Dermatofibrosarcoma Protuberans in Groin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plastic and Reconstructive Surgery - Global Open	6. 最初と最後の頁 e2528 ~ e2528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000002528	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 林 礼人	4. 巻 143
2. 論文標題 側頭筋を利用した動的再建術 Lengthening Temporalis Myoplasty 施行手技の詳細と留意点	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PAPERS	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 上森友樹 林礼人 吉澤秀和 小坂健太郎 名取悠平 須田俊一	4. 巻 62
2. 論文標題 耳下腺浅葉切除術における広頸筋弁移植術の長期成績について	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 形成外科	6. 最初と最後の頁 414-421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 林 礼人	4. 巻 268
2. 論文標題 閉瞼不全に対する静的再建術	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 824-830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 林 礼人、吉澤秀和	4. 巻 34
2. 論文標題 顔面神経麻痺に対する静的再建術の治療アルゴリズム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本頭蓋顎顔面外科学会誌	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 林 礼人	4. 巻 143
2. 論文標題 側頭筋を利用した動的再建術 Lengthening Temporalis Myoplasty	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PAPERS	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Orgun D and Hayashi A	4. 巻 44
2. 論文標題 Medial canthal reconstruction with malar advancement flap combined with cutaneous island flap created using "conventionally discarded" tissue	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dermatol Surg	6. 最初と最後の頁 1220-1223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/DSS.0000000000001037	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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 11件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hayashi A, Yoshizawa H, Ichihara S, Suzuki M
2. 発表標題 End-to-side neurorrhaphy as Schwann cells provider to acellular nerve graft or conduit
3. 学会等名 The 10th Congress of World Society for Reconstructive Microsurgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 顔面神経麻痺再建のこれまでとこれから～アメリカ留学時代のエピソードを交えて～
3. 学会等名 第110回九州・沖縄形成外科学会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 これまでの顔面神経麻痺再建(臨床並びに基礎研究の変遷)
3. 学会等名 第62回日本形成外科学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 顔面神経麻痺再建における次の一步～不完全治療例に対する再建術をふまえて～
3. 学会等名 第42回日本顔面神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 頭頸部における末梢神経再建の基本と実践
3. 学会等名 第31回日本内分泌外科学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 顔面神経麻痺の基礎と臨床の最先端
3. 学会等名 第30回日本末梢神経学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 手外科・頭頸部再建における人工神経の使用について（末梢神経再生・再建と人工神経の応用について）
3. 学会等名 第46回日本マイクロサージャリー学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayashi Ayato
2. 発表標題 Our Modified Lengthening Temporalis Myoplasty for established facial paralysis
3. 学会等名 The 12th Congress of Asian Pacific Craniofacial Association（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi A, Yoshizawa H, Kosaka K, and Kamimori T
2. 発表標題 Combination of hypoglossal nerve and masseter nerve transfer for acute to subacute facial paralysis
3. 学会等名 The 14th Korea-Japan Congress of Plastic and Reconstructive Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi A, Yoshizawa H, Kosaka K, and Kamimori T
2. 発表標題 Combination of hypoglossal nerve transfer using an interpositional nerve graft with end-to-side neurorrhaphy and masseter nerve transfer for the acute to subacute facial reanimation.
3. 学会等名 2018 AAHS/ASPN/ASRM annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 顔面神経麻痺に対する神経再建術 ~基礎研究から実際の臨床まで~
3. 学会等名 末梢神経を語る会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 林 礼人
2. 発表標題 顔面における末梢神経再建へのいざない ~顔面神経麻痺に対する神経再建に基礎研究を加えて~
3. 学会等名 第45回日本マイクロサージャリー学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 林 礼人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 克誠堂出版	5. 総ページ数 11
3. 書名 形成外科治療手技全書 5巻 唾液腺の腫瘍 耳下腺	

〔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	市原 理司 (Ichihara Satoshi) (40599247)	順天堂大学・医学部・助教 (32620)	
研究分担者	上森 友樹 (Kamimori Tomoki) (70773836)	順天堂大学・医学部・助手 (32620)	
研究分担者	吉澤 秀和 (Yoshizawa Hidekazu) (10512593)	順天堂大学・医学部・非常勤助教 (32620)	2018年度にて異動に伴い分担者削除

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