

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20515

研究課題名（和文）末梢神経をターゲットとした神経幹細胞移植による脱神経横隔膜の機能再建

研究課題名（英文）Functional reconstruction of denervated diaphragm by neural stem cell transplantation into peripheral nerves

研究代表者

浅見 雄太（Asami, Yuta）

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90908740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：脱神経された横隔膜の機能再建を目的に、ラットの胎児脊髄由来細胞を同種のラットの末梢神経内へ移植した。細胞移植の3ヶ月後、移植部位の免疫蛍光染色を行うと、移植した細胞の末梢神経内で生着が確認された。また電気刺激により機能的な横隔膜の運動が観察された。また、横隔膜の免疫蛍光染色と逆行性トレーサーを用いた組織学的評価により、神経再支配された横隔膜は移植した細胞由来であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では脳や脊髄など中枢神経での再生医療とは異なるアプローチにより、脱神経された横隔膜が機能的に再支配可能であることを初めて示した。これまでに有効な治療法が無かった頸髄損傷や神経変性疾患による難治性の呼吸筋麻痺に対する新たな治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To reconstruct the function of the denervated diaphragm, fetal rat spinal cord-derived cells were transplanted into the peripheral nerve of a rat. Three months after cell transplantation, immunofluorescent staining of the transplanted site confirmed the engraftment of the transplanted cells within the peripheral nerve. Functional contraction of the diaphragm was also observed by electrical stimulation. Immunofluorescent staining of the diaphragm and histological evaluation using retrograde tracer indicated that the transplanted cells reinnervated the denervated diaphragm.

研究分野：末梢神経

キーワード：再生医療 末梢神経 横隔膜麻痺 機能再建 神経幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

横隔膜は呼吸運動における最も主要な吸気筋であり、その麻痺はときに重篤な呼吸不全の原因となり、致命的な転帰となりうる。現状では脊髄損傷や筋萎縮性側索硬化症(ALS)などの神経変性疾患による横隔膜麻痺に対する有効な治療法はなく、これらの患者の呼吸不全に対する治療は人工呼吸器による延命治療となっているのが現状である。近年、iPS細胞を代表とする神経幹細胞移植による再生医療の研究が盛んに行われており、我々のグループでは過去に末梢神経内への胎児脊髄由来細胞(神経幹細胞を含む)移植による四肢運動機能再建に取り組んできた。

2. 研究の目的

末梢神経内への神経幹細胞移植による脱神経横隔膜の機能再建の可能性につき検討すること。

3. 研究の方法

8週齢のFischer 344ラットを用い、横隔神経の切離により左横隔膜を脱神経した。腹腔側より坐骨神経・脛骨神経を1本の神経片として採取し横隔膜に縫合した。縫合部位は横隔膜の中央、周辺部など様々な部位で検討した。脱神経、神経縫合の1週間後、日齢14日のFischer 344ラットの胎子の脊髄より採取した細胞を遊離神経内に注射した。対照群には末梢神経片内にmediumのみを注射した。細胞移植から3ヶ月後、機能評価として電気生理学的検査(CMAP)と透視を用いた末梢神経片の電気刺激による横隔膜の滑動距離を測定した。また、組織学的評価として免疫蛍光染色による神経片と神経筋接合部の評価を行った(図1)。

また横隔膜を神経再支配した細胞の由来を調べるため、Fischer 344ラットの前脛骨筋の支配神経である腓骨神経を切離し、同側の下肢から採取した脛骨神経を遊離末梢神経片として前脛骨筋に縫合した。その1週間後、前述のごとく胎児から採取した脊髄由来細胞を末梢神経片内に移植した。7ヶ月後、脱神経した前脛骨筋が遊離末梢神経片の電気刺激により収縮し、足関節が背屈することを確認し、前脛骨筋内に逆行性トレーサーであるFluoro goldを注入した。その1週間後、免疫蛍光染色による末梢神経片の組織学的評価を行った(図2)。

4. 研究成果

横隔膜の周辺部に遊離末梢神経片を縫合したラットでは、末梢神経片内での細胞の生着や、横隔膜のごく一部での神経筋接合部の神経再支配を認めたものの、CMAPの測定は不能であり、肉眼的に明らかな横隔膜の収縮を認めなかった。

横隔膜中央部に神経を縫合したラットでは、8匹中6匹で横隔膜の運動とCMAPの測定が可能であった。透視上の横隔膜滑動距離は平均 3.22 ± 0.98 mmであり、CMAPの振幅は平均 1.24 ± 0.78 mVであった。また、免疫蛍光染色では末梢神経片内に移植した細胞の生着を認めた。これらの細胞はニューロンだけではなく、アストロサイトといったグリア系の細胞も認め、胎児の脊髄由来の細胞には神経幹細胞といった多分化能を持つ細胞が含まれていることが示唆された。また神経筋接合部の観察では、再生軸索による再支配を認めた。一方で対照群では末梢神経片の刺激による横隔膜の運動やCMAPは測定されず、組織学的にも末梢神経内にニューロンやアストロサイトなどのグリア系細胞は認めず、神経筋接合部も再支配を認めなかった(図3)。以上より遊離末梢神経片内に移植した胎児脊髄由来細胞は生着し、組織学的に神経筋接合部を再支配可能であることが示された。また、神経の縫合部位としては横隔膜の中央部が最も有効な縫合部位であることが示された。

前脛骨筋を用いた逆行性トレーサーを注入したモデルでは、遊離神経片内のニューロンにFluoro gold陽性細胞を認めた(図4)。これにより、実際に脱神経された横隔膜を神経再支配した細胞は、移植した胎児脊髄由来細胞によるものである可能性が示された。

本研究は脱神経横隔膜の機能再建が、胎児脊髄由来細胞により可能であることを初めて示した研究であり、難治性呼吸筋麻痺患者の再生医療による治療に新たな可能性をもたらす可能性がある。今後の展望としては、移植細胞ソースの検討としてiPS細胞やブタといった異種の胎児由来細胞をもちいた研究が考えられる。とくに後者については、我々のグループではブタの胎児脊髄由来細胞をFischer 344ラットに移植し、電気刺激により脱神経された下肢の運動機能再建が可能であることを示した。またブタの心臓のヒトへの移植も報告されており、異種由来細胞は今後有望な移植細胞ソースとなる可能性がある。更に我々は電気刺激による神経刺激であったが、optogeneticsによる光刺激といった新しい方法も研究課題の一つとして挙げられる。

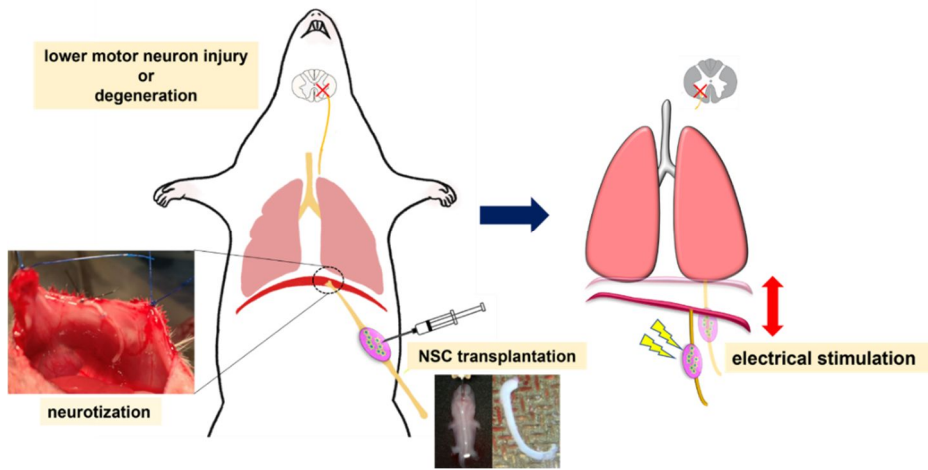


図1 横隔膜機能再建の実験モデル

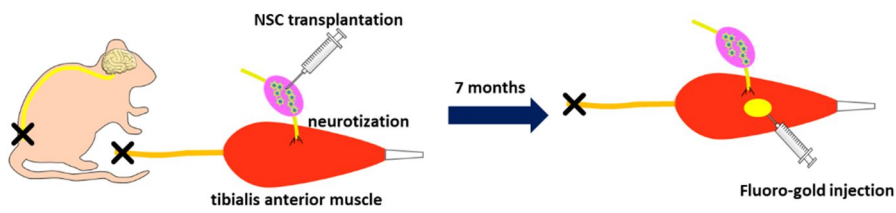


図2 逆行性トレーシングモデル

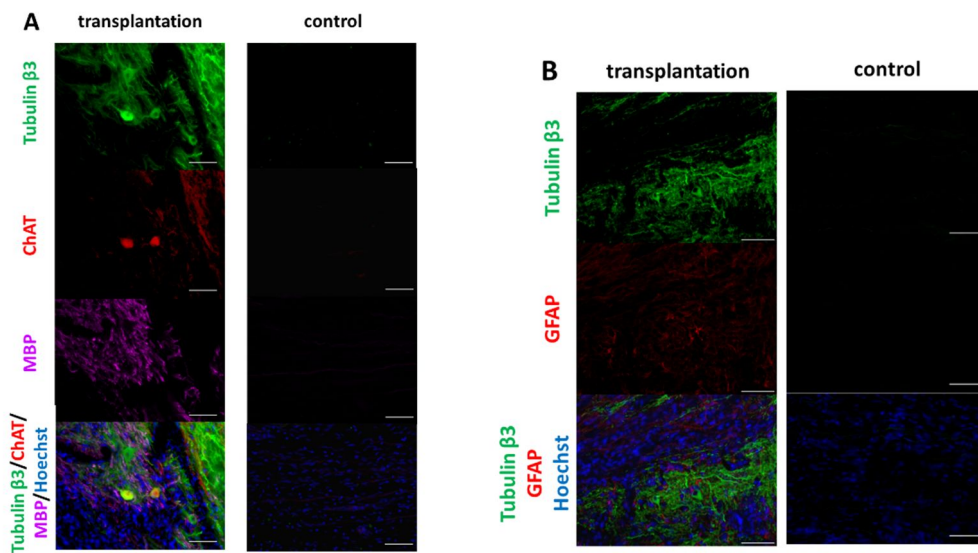


図3 細胞移植部の免疫染色

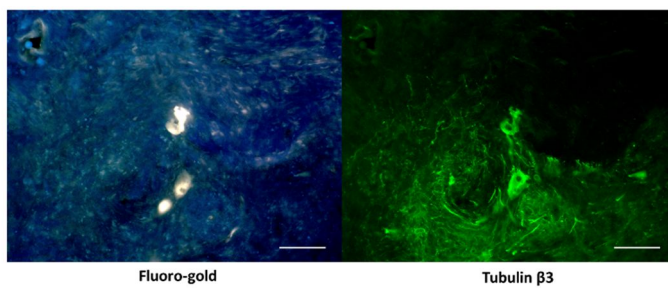


図4 細胞移植部のニューロンの生着と Fluoro-gold の取り込み

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅見 雄太 徳武 克浩 佐伯 総太 栗本 秀 平田 仁
2. 発表標題 末梢神経をターゲットとした神経幹細胞移植による横隔膜機能の再建
3. 学会等名 第65回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅見 雄太 徳武 克浩 佐伯 総太 栗本 秀 平田 仁
2. 発表標題 難治性呼吸筋麻痺に対する胎児由来神経幹細胞を用いた新たな治療戦略
3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅見 雄太 徳武 克浩 佐伯 総太 栗本 秀 平田 仁
2. 発表標題 難治性呼吸筋麻痺に対する末梢神経内胎児脊髄由来神経幹細胞移植による新たな治療戦略
3. 学会等名 第33回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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