

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792386

研究課題名(和文) 歯髄を細胞ソースとした末梢神経再生

研究課題名(英文) Regeneration of the peripheral nerve using dental pulp cells

研究代表者

佐々木 亮 (Sasaki, Ryo)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：60524709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：親知らずの歯髄を末梢神経再生に役立てることを研究目標とした。ラットの歯から歯髄を採取し、歯髄細胞をチューブ内に注入して人工神経を作成した。そして、ラットの顔面神経欠損に同人工神経を移植した。同人工神経は、ラット顔面神経欠損を機能的、電気生理学的に再生させた。次に、ミニブタの歯の抜歯を行い、ミニブタ歯髄細胞を組み込んだ人工神経を作成した。そして、同ミニブタの顔面神経欠損に人工神経移植を行った。術後4ヶ月の評価において、人工神経は神経断端を架橋しているものの、チューブ内に再生神経は確認できなかった。チューブの形態、歯髄細胞の移植数が影響しているものと考えられ、条件のさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Dental pulp is an easily obtainable cell-source of viable cells including Schwann and neural progenitor cells for peripheral nerve regeneration. A silicone tube containing rat dental pulp cells was transplanted into a gap of the facial nerve in rats. Tubulation with dental pulp cells could recover facial-nerve defect functionally and electrophysiologically in rats. Moreover, a silicone tube containing miniature pig dental pulp cells was transplanted into a gap of the facial nerve in miniature pigs. However, no nerve regeneration was observed 4 months after surgery. Further investigation was necessary for the peripheral nerve regeneration in miniature pigs.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：神経再生 歯髄 智歯 顔面神経

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦では外傷や手術などによる末梢神経欠損の患者が年間25万人のいるとされ、米国では年間20万人が末梢神経治療の手術を受けているとされる。現在、外傷や腫瘍切除に伴う末梢神経欠損には自家神経移植が主になされているが、ドナーサイドの知覚麻痺などの合併症があり、外科的侵襲性が高い。またドナー神経の採取量には限界があり長い欠損の再生は困難である。自家神経移植に代わる治療法としてチューブにSchwann細胞や神経前駆細胞を組み込んだハイブリッド型の人工神経の研究が進んでいる。しかしながら、脳、脊髄などの神経組織からそれらの細胞を採取することは外科的侵襲の大きさから困難であることが予想され、より低侵襲に採取可能な細胞ソースが必要である。

2. 研究の目的

われわれは、末梢神経再生のための細胞移植治療における細胞ソースとしてSchwann細胞や神経前駆細胞を含んでいる歯髄に着目し、歯髄細胞を組み込んだハイブリッド型の人工神経を作製しラットおよびブタにおいて顔面神経欠損の再生を検証することを研究目的とした。

3. 研究の方法

(1) ミニブタにおける歯髄を用いた顔面神経再生

- ・ 静脈鎮静および局所麻酔下に、ミニブタの下顎切歯の抜歯を行い、歯髄を採取し酵素処理を行い、歯髄細胞混濁液を作成した。ミニブタ歯髄細胞を Type I コラーゲンゲルに混和、25 mm のシリコンチューブ(内径 2 mm)内に注入しミニブタ歯髄細胞を組み込んだハイブリッド型神経誘導管を作成した。そして、同ミニブタに全身麻酔を行い、顔面神経下顎縁枝欠損の作成および同神経欠損に誘導管移植を行った。

- ・ 現在末梢神経欠損の治療法には自家神経移植が主にされている。そのため末梢神経再生研究におけるコントロール群としては自家神経移植が望ましい。しかしながら、ブタにおける使用可能なドナー神経は明らかになっておらず、臨床で最も多く用いられているドナー神経である腓腹神経の外科解剖を行った。

(2) ラットにおける歯髄を用いた顔面神経再生

Lewis ラットの上顎切歯から歯髄を採取し、酵素処理にて歯髄細胞を得た。歯髄細胞を Type I collagen gel と混合した後、10mm のシリコンチューブ内に注入してハイブリッド型神経誘導管を作成した。次に、Lewis ラットの顔面神経類筋枝および下顎縁枝に 7mm の神経欠損を作り、片側髭運動麻痺を作成後、類筋枝神経欠損に歯髄細胞を組み込んだ神経誘導管を顕微鏡下に移植した。髭運動および鼻の対称性を点数化した顔面神経麻痺スコア(0点:完全麻痺、7点:正常)を用いて移植13週目までスコアリング評価を行い、自家神経移植群と比較した。そして、移植13週目の再生神経・感覚毛筋における複合筋活動電位(CMAP)測定を行い、正常な顔面神経と比較した。

4. 研究成果

(1) ミニブタにおける歯髄を用いた顔面神経再生

- ・ ミニブタの歯髄はラットと異なり弾性に富んだ硬い組織であった。現在まで行っていたラット歯髄細胞採取で用いていた 0.25%Trypsin/EDTA を用いた方法や、Gronthos らの報告にある 3mg/mL Collagenase /4mg/mL Dispase による歯髄幹細胞採取法では安定したミニブタの歯髄細胞の採取は行うことができなかった。そこで、Iwata らの報告した Collagenase (Serva) 10PZ-U/ml/Dispase (Godo-syusei)

10000PU/ml を用いた歯根膜細胞採取法を用いることにより、安定したミニブタ歯髓細胞を得ることができた。

ミニブタ顔面神経下顎縁枝に神経欠損を作成し、同神経欠損に歯髓細胞を組み込んだ神経誘導管の移植を行った。術後4ヶ月の評価において、神経誘導管は癒痕組織に覆われ、神経断端を架橋しているものの、チューブ内に再生神経は確認できなかった。チューブの形態、内径、歯髓細胞の移植数が影響しているものと考えられ、条件のさらなる検討が必要である。

ブタ腓腹神経は大腿二頭筋下を坐骨神経から分岐し、小伏在静脈と併走して踵部で分岐した。神経刺激による筋収縮は認めなかった。腓腹神経は14.5 ± 0.5 cm 採取可能であり、術後の機能障害も認めなかった。ブタ腓腹神経はミニブタにおける末梢神経再生研究におけるコントロールとしてのドナー神経として有用と思われた。

(2) ラットにおける歯髓を用いた顔面神経再生

顔面神経麻痺スコア評価において、歯髓細胞移植群は、移植11週目より自家神経移植群と有意差を認めず、自家神経移植群と同等な機能回復を認めた。CMAP測定において、歯髓細胞移植群におけるlatencyはintact群に比べ、有意に延長していたが、amplitudeおよびdurationには有意な差を認めず、電気生理学的に良好な神経再生を認めた。歯髓細胞を組み込んだ神経誘導管は、ラット顔面神経欠損を機能的、電気生理学的に再生させることが可能であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6件)

1. Ryo Sasaki, Hajime Matsumine, Yorikatsu Watanabe, Yuichi Takeuchi, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Mariko Miyata, Tomohiro Ando. Electrophysiological and functional evaluations of regenerated facial-nerve defect with a tube containing dental pulp cells in rats. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 2014 (*in press*)
2. Ryo Sasaki, Hajime Matsumine, Yorikatsu Watanabe, Masayuki Yamato, Tomohiro Ando. Anesthesia for research on reconstructive facial surgery in rats. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, 29(03): 209-210, 2013
3. Ryo Sasaki, Hajime Matsumine, Yorikatsu Watanabe, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Tomohiro Ando. Surgical anatomy of the sural nerve for peripheral nerve reconstruction research in swine. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 2013 (*in press*)
4. 佐々木 亮、内山博人、扇内秀樹、安藤智博. "歯髓細胞を組み込んだPLGA神経誘導管は顔面神経再生を促進する", 日本口腔外科学会雑誌59(6), 404-411, 2013
5. Ryo Sasaki, Hajime Matsumine, Naoyuki Matsumoto, Yorikatsu Watanabe, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Tomohiro Ando. Spontaneous fibrosarcoma in an experimental aged Lewis rat. *Laboratory Animals*. 2012; 46: 352-355
6. Ryo Sasaki, Shunsuke Aoki, Masayuki Yamato, Hiroto Uchiyama, Keiji Wada, Hideki Ogiuchi, Teruo Okano,

Tomohiro Ando. PLGA artificial nerve conduits with dental pulp cells promote facial nerve regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5, p823-830, 2011

〔学会発表〕(計 7件)

1. 佐々木 亮, 安藤智博. 歯髄細胞を組み込んだハイブリッド型神経誘導管によるラット顔面神経再生: 機能的・電気生理学的検討. 第68回NPO法人日本口腔科学会学術集会. 2014年5月7-9日
2. Ryo Sasaki, Hajime Matsumine, Yorikatsu Watanabe, Masayuki Yamato, Tomohiro Ando. Anesthesia for research on facial reconstructive surgery in rats. 21st International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, ICOMS2013, Barcelona, Spain, October 21-24, 2013
3. Ryo Sasaki, Yorikatsu Watanabe, Hajime Matsumine, Masayuki Yamato, Sunsuke Aoki, Hiroto Uchiyama, Keiji Wada, Hideki Ogiuchi, Teruo Okano and Tomohiro Ando. Rat facial nerve defect model for facial nerve regeneration study. 12th International Facial Nerve Symposium, Liberty Hotel, Boston, MA, Jun 28-30, 2013
4. 佐々木 亮, 松峯 元、渡辺頼勝. 顔面神経再生研究におけるラット顔面神経欠損モデル. 第35回日本顔面神経研究会. 福島県猪苗代. 2012年5月31日から6月1日
5. Ryo Sasaki, Yorikatsu Watanabe,

Hajime Matsumine, Masayuki Yamato, Teruo Okano, Tomohiro Ando, SURGICAL ANATOMY OF THE SWINE FACE FOR MAXILLOFACIAL SURGERY, 20th International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Santiago, Chile, November 1-4, 2011

6. 佐々木 亮, 渡辺頼勝, 安藤智博, 「ティッシュ・エンジニアリングのためのブタ顔面外科解剖」, 第65回NPO法人日本口腔科学会学術集会, 東京都 タワーホール船越, 平成23年4月21-22日
7. 佐々木 亮, 青木俊介, 大和雅之, 渡辺頼勝, 松峯元, 内山博人, 扇内秀樹, 和田圭司, 岡野光夫, 安藤智博, 「歯髄を細胞ソースとした神経再生」, 第36回日本外科系連合学会学術集会, 共通シンポジウム「再生医療の現状と将来展望」, ヒルトン東京ベイ, 千葉, 平成23年6月16-17日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 亮(Sasaki, ryo)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号: 60524709