2版

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ５ 月 ２７ 日現在

機関番号：３２６４４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2012～2015
課題番号：２４５９２６１０

研究課題名（和文）多能性幹細胞移植による頭頸部癌術後機能回復のための再生医療の研究

研究課題名（英文）Head and Neck Nerve Regeneration Using Skeletal Muscle-Derived Multipotent Stem Cell Transplantation

研究代表者
大上　研二（OKAMI, Kenji）
東海大学・医学部・教授
研究者番号：９０２６３７８０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：　神経障害モデルとして，顔面神経損傷モデル動物を確立した．マウス骨格筋から骨格筋間質由来幹細胞を分離・増殖培養し，幹細胞シートペレットを作成し，損傷部位に幹細胞シートペレットを移植した．ドナーより移植した細胞の著床状況，生体内での貢献度を蛍光実体顕微鏡下で観察すると，神経組織が再生，伸長し，切断された神経を連続する所見が得られた．また組織学的に神経軸索の再生やシュワン細胞への分化，perineurium，endoneuriumへの分化も観察された．れた．機能評価としては顔面の麻痺が移植群で良好な回復結果が得られた．また筋電図による神経組織の再生，神経筋接合部の再構築が確認された．

研究成果の概要（英文）：Facial nerve injury animal model was established. A skeletal muscle-derived multipotent stem cells (Sk-MSCs) and a 3D patch transplantation system using Sk-MSC sheet-pellets were developed. The transplanted group showed significant facial nerve recovery. In addition, engrafted GFP+ cells formed complex branches of nerve-vascular networks, with differentiation into Schwann cells and perineurial/endoneurial cells, as well as vascular endothelial and smooth muscle cells. Thus, Sk-MSC sheet-pellet transplantation is potentially useful for functional reconstitution therapy of large defects in facial nerve-vascular networks.

研究分野：再生医療科学

キーワード：骨格筋間質幹細胞　神経再生　血管再生　シート・ペレット　顔面神経麻痺

１．研究開始当初の背景

頭頸部癌は診断時点で進行しているものが多く，予後不良である．進行癌に対する治療にともなう臓器，機能の欠損は，嚥下，咀嚼，発声，構音，肩腕関節障害など治療後QOL（生活の質）を著しく損なっている．近年，頸部リンパ節郭清術後の肩関節運動制限に対してリハビリテーションによる改善効果が報告されてきている．我々も現在までに手術方法の改良（神経温存手術）や手術以外の治療方法の開発（放射線化学療法）などのアプローチで研究を行ってきた．しかし，広範囲の腫瘍切除やリンパ節郭清とそれに伴う神経，筋肉の欠損を来した場合は，失われた機能の回復は望めないことが多く，実際に術後症状出現後の治療法の開発は過去に試みられていない．

最近になって研究が進められてきた再生医療技術はめざましいものがあり，臨床応用への可能性が広がっている．自己の多能性幹細胞からの臓器再生の可能性が開ければ，副作用なしに様々な疾患への応用が考えられる．神経，筋組織の再生の試みは，頭頸部領域の術後機能障害へも有用な可能性を広げられると考える．

２．研究の目的

本研究では，現状では非常に困難な複雑な神経ネットワークを多角的に再構築することを試みた．頭頸部の機能再生には複雑な神経ネットワークとその配下の効果器である筋・血管を複合的に再構築することが重要である．骨格筋由来多能性幹細胞群（Sk-MSC）を培養系で増幅し，かつ細胞間の接着性を維持したシート・ペレットとして採取・移植し，欠損した顔面の筋・血管・神経ネットワークの再構築ができれば，治療後のQOLの回復に大きく役立つものと考えた．

そこで以上の背景をふまえ，本研究の目的を以下の三点に焦点を絞った．

１） 頭頸部癌根治術後の顔面神経欠損動物実験モデルを確立する．

２） 下肢骨格筋間質由来の多能性幹細胞（Sk-MSC）を用いて，これらの細胞がシュワン細胞や骨格筋細胞，ひいては血管系の細胞に分化することを明らかにする．

３） これらの細胞が顔面運動障害モデルの機能改善，治療に役立つこと明らかにし，自己の多能性幹細胞で頭頸部癌手術後の神経，筋組織再生治療を開発する．

以上の3点から，最終的に頭頸部癌根治手術後の治療後QOLの改善治療を開発することが本研究の目的である．

３．研究の方法

レシピエントとして正常マウスおよびラットを用い，顔面神経枝周辺の組織を大きく摘出し2-4㎜の軸索欠損部を作成し，顔面神経麻痺モデル動物を作成した．組織化学的検索を中心に行うGFP-Tgマウスから正常マウスへの移植実験群と，機能回復の解析を行うラットの自家移植実験の二つの系を用いた．

実験動物から下肢骨格筋群（前脛骨筋，長趾伸筋，ヒラメ筋，足底筋，腓腹筋，大腿四頭筋）を採取し，0.1%コラゲナーゼで１時間処理、個々の筋線維を分離した．大型のデブリスをこし取り，コラゲナーゼをＰＢＳで洗浄，分離した筋線維群をフラスコで3日間培養し，筋間質の細胞群を総合的に増幅培養した．その後、トリプシンEDTAで処理後，筋線維群と増幅細胞群を分離，再び筋線維及びデブリスを除去．得られた細胞群を増幅培養して細胞シートを形成させた．このシートに対して，EDTA単独処理を行い，細胞同士の接着を維持した状態で回収，これらを集積・遠心して幹細胞シート・ペレットを作成した．以上のドナー骨格筋から得たSk-MSC幹細胞シート・ペレットを損傷部位に移植し，フィブリン糊で固定し創を閉鎖した．対照群には培地のみを移植した．

顔面麻痺回復期の機能評価はマウス顔面神経麻痺スコア評価を用い，継続的に8週間評価した．評価には眼瞼の動きと髭の動きに、上唇の動きを加えた3項目で行った．客観的機能評価として洞毛筋張力測定実験を行った．顔面左側に皮膚切開し，顔面神経頬骨枝を同定．双極銀電極を神経頬骨枝損傷部より上流にセットし刺激電極とした．洞毛筋4-5本を張力トランスデューサ―を接続し，電気刺激装置により頬骨枝へ電気刺激を与え，最大強縮張力を決定し，回復筋張力を測定した．

移植後のマクロ観察での評価として，蛍光実体顕微鏡及び蛍光透過型顕微鏡を用いて，移植8週間後にドナー細胞の着床状況，分化状況，組織再構築への貢献度をGFP陽性組織・細胞群として評価した．また移植8週後に，灌流固定した移植モデル動物に対して免疫組織化学的検索を用いた組織学的な回復の評価を行った.使用抗体は、N200，MBP，GLT-1），p-75NTR，CD31，α-SMA，α-Bungarotoxinを用いた．

培養により得られたSk-MSC細胞群に対して，血管・末梢神経の分化・誘導，栄養因子等をRT-PCRで網羅的に解析した．マーカーとして末梢神経系(NGF，BDNF，GDNF，Galectin，Ninjurin，CNTF，LIF,FGF2，IGF-1)，血管系(VEGF，PDGF，EGF，HGF，TGFb，HPRT)のプライマーを作成し，検討した．

４．研究成果

移植8週後の顔面神経麻痺スコアにおいて、移植群は対照群に比して良好な回復（約50%）を示し，幹細胞移植の効果が認められた．また，移植群では損傷時に大幅減少（5%以下vs. Normal）した洞毛筋張力が，非移植群（約25%）に比べて、優位な回復（60%以上）を示していた（図1)．

実体顕微鏡下のマクロ評価では，幹細胞シート・ペレットを移植した損傷顔面神経周囲を中心にGFP陽性(ドナー由来)組織が認めら

れた（図２）．これらの着床した GFP 陽性組織は断裂した神経枝を架橋するように網目状の構造を示していた．

組織学的評価において、着床した GFP 陽性移植細胞が，シュワン細胞、神経周膜細胞に分化し、レシピエント由来の軸索を保護する形で髄鞘，神経周膜を形成し，顔面神経ネットワークにおける複数の神経分枝再生に貢献していた．さらに，血管内皮細胞，血管平滑筋，繊維芽細胞にも分化し，大小の血管再構築にも貢献していた．GFP 陽性の神経内膜・周膜内を走行する軸索は神経-筋接合部へ到達しており，機能的な回復を裏付けていた．これらの結果は、シート・ペレットとして移植した Sk-MSC が幹細胞特有の「損傷組織環境に順応した分化能」を示し，顔面神経の再生，機能回復に貢献したことを示していた．

本研究の成果としてシートペレットの有用性と臨床応用への可能性，血管再生への貢献，機能回復への効果などがあげられる．また自家細胞移植により拒絶反応のリスクがない，倫理的問題もクリアしたより臨床応用への可能性をもった研究成果が得られたものと考える．

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１件）

1. Saito K, Tamaki T, Okami K, et al. Reconstruction of Multiple Facial Nerve Branches Using Skeletal Muscle-Derived Multipotent Stem Cell Sheet-Pellet Transplantation. PLoS One.査読有 10, 2015 e0138371

〔学会発表〕（計３件）

1. 酒井 昭博，齋藤 弘亮，大上 研二，他．骨格筋間質由来多能性幹細胞を用いた顔面神経再生の試み．頭頸部癌学会．2012.06.7．島根県松江市
2. 齋藤 弘亮，酒井 昭博，大上 研二，他．骨格筋間質由来多能性幹細胞シート・ペレットによる損傷顔面神経ネットワークの再生と機能回復．日本耳鼻咽喉科学会総会．2013.05.17．北海道札幌市
3. 齋藤 弘亮，酒井 昭博，大上 研二，他．骨格筋間質由来多能性幹細胞シート・ペレットによる顔面神経ネットワークの再生．日本耳鼻咽喉科学会総会．2015.05.21．東京都千代田区

６．研究組織

(1)研究代表者

大上　研二　（OKAMI, Kenji）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：90263780

(2)連携研究者

玉木　哲朗　（TAMAKI, Tetsuro）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10217177

図１

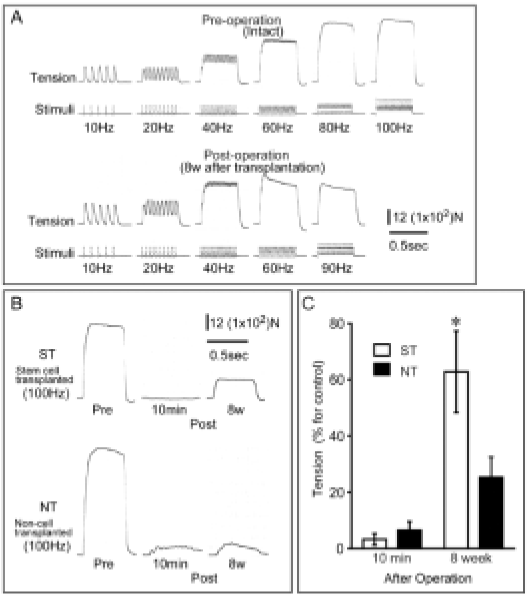
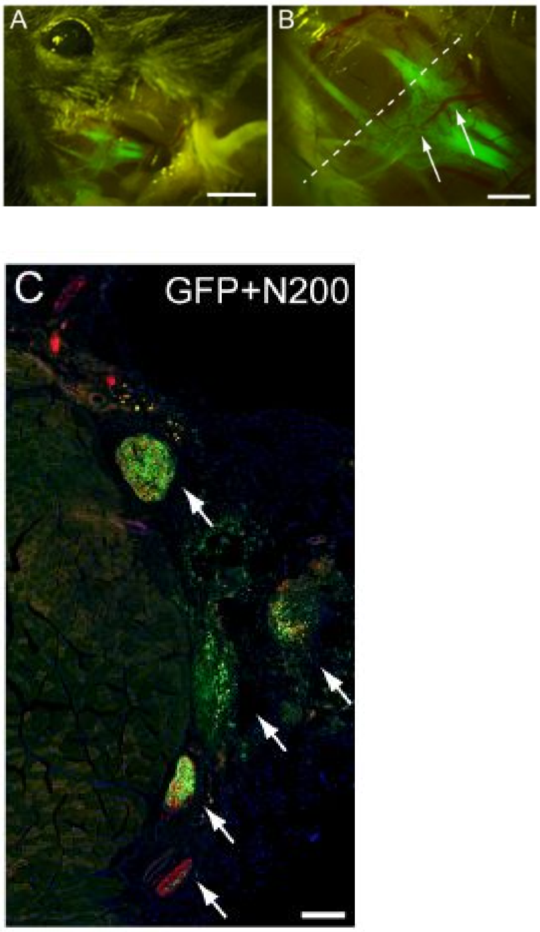
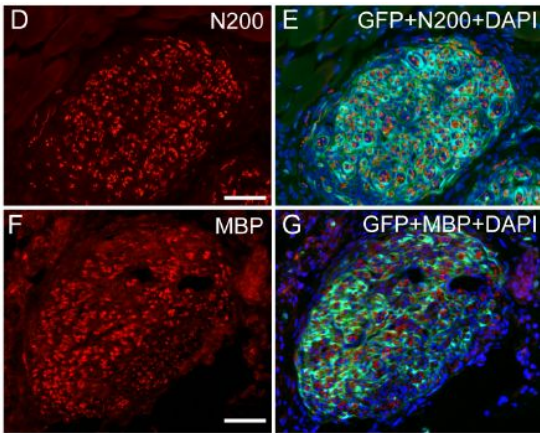


図２




D
N200
E
GFP+N200+DAPI
F
MBP
G
GFP+MBP+DAPI