

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462270

研究課題名(和文) ヒト脂肪組織由来幹細胞を用いた新たな末梢神経再生促進療法の開発

研究課題名(英文) Transplantation of human adipose tissue-derived regenerative cells for peripheral nerve regeneration.

研究代表者

横田 和典 (YOKOTA, Kazunori)

広島大学・病院(医)・教授

研究者番号：20403529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：移植8週間後再生組織を採取し、トルイジンブルー染色や抗S100抗体による免疫染色で組織学的評価を行ったところ、ADRC移植群でより多くの神経再生を認めた。しかし運動誘発筋電図や歩行解析の機能的評価では著しい改善は認めなかった。神経損傷部への移植と同時に骨格筋にADRCを移植することで、筋萎縮予防の効果も期待できると考えた。

in vivo imaging でADRCの信号が消失したこと、免疫染色でヒト由来細胞が特定できなかったことから、ADRC移植による神経再生の作用機序として、ADRCの神経・血管等へ直接分化は考えにくく、ADRC移植により何らかのパラクライン効果が働いたと推測した。

研究成果の概要(英文)：In the histologic evaluation by the toluidine blue and anti S-100 antibody staining, there were more nerve regeneration in ADRC transplantation group. However, by the functional evaluation of the exercise-induced EMG and walk analysis, the meaningful difference between each group were not recognized. The effect of the amyotrophy prevention was expected with porting ADRC to a skeletal muscle as well as nerve defect. Because of the ADRC signal disappearance in in vivo imaging and of few human derived cells in immunostaining, it was difficult to consider that ADRC differentiated to a nerve and blood vessel directly as the mechanism of the nerve regeneration by the ADRC transplantation, and was supposed that some kind of paracrine effects worked by ADRC porting.

研究分野：整形外科学

キーワード：筋・神経病学 運動器外傷学 再生医学

1. 研究開始当初の背景

(1) 末梢神経再生の研究として神経欠損部を架橋する種々の試みがなされてきた。一般的には腓腹神経等を用いた自家神経移植が行われてきたが、採取できるドナー神経の長さに限界があることやドナー神経の支配領域における知覚障害の問題が存在する。また培養 Schwann 細胞、間葉系幹細胞、神経幹細胞などの細胞移植の研究が試みられてきたが、実際の臨床応用には技術的、倫理的な問題が残存しており実現化していないのが現状である。

(2) 近年、脂肪組織から骨髄由来間葉系幹細胞や臍帯血由来幹細胞と同様の細胞群の存在が報告されている脂肪組織由来再生細胞 (Adipose tissue regenerative cell: ADRC) に注目した。ADRC は比重遠心法で採取可能のため培養が不要である。脂肪組織は骨髄や臍帯血と比較すると組織採取に倫理上の障壁が高くない。脂肪組織 100ml から約 5×10^7 個の細胞が獲得可能で、CD34 陽性細胞に富み強力な血管新生促進作用を有する細胞集団であるとの報告がある。

(3) また実際の臨床では、末梢神経を修復しても、さらに末梢神経損傷によって生じた骨格筋萎縮を改善するというハードルを越えなければ機能改善は得られない。

2. 研究の目的

(1) 脂肪組織由来再生細胞の血管新生促進能を利用した、新たな末梢神経再生治療の確立を目指す。

(2) さらに、脂肪組織由来再生細胞を末梢神経とその支配筋に移植し、神経損傷による筋萎縮を防ぐ発展的な治療法の開発も目指す。

3. 研究の方法

患者の同意の下、手術で本来破棄される脂肪組織を採取し、遠心分離機 (Celution System) により ADRC を単離した。免疫不全ラットの坐骨神経欠損モデルを作製し、神経欠損部はアテロコラーゲンを内包したシリコンチューブ (15mm 長) で架橋した。PBS のみ投与した PBS 群、hFB を移植した hFB 群、ADRC を移植した ADRC 群、神経欠損部に ADRC を移植し、さらに患側腓腹筋に ADRC を直接注入した ADRC-M 群を作製した。移植後経時的に in vivo imaging による移植細胞の残存を評価した。移植 8 週後、歩行解析、運動誘発電位測定 (人工神経架橋部中枢を電気刺激し腓腹筋から電位を測定) による機能的評価を行った。また組織学的評価として、再生組織中央部で組織切片を作製し、トルイジンブルー染色と抗 S-100 抗体、抗 RECA-1 抗体等による免疫染色を行った。腓腹筋重量を測定し、マッソントリクローム染色を行った。

4. 研究成果

(1) in vivo imaging

坐骨神経欠損部の移植細胞の信号は、細胞コントロール群の hFB 群では移植後 4 週まで信号を維持していたが、ADRC 群では移植後 3 日をピークに減衰した。移植した ADRC が生着しなかった可能性が考えられた。

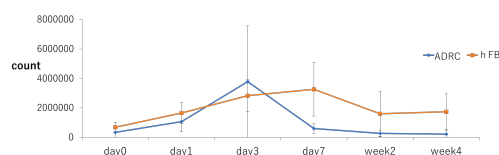


図1 in vivo imaging

(2) 電気生理学的評価

PBS 群では電位を検知しなかった。hFB 群で 2 例、ADRC 群で 4 例、ADRC-M 群で 4 例で、波形を認めた。ADRC・ADRC-M 群より hFB 群のほうが latency は遅延し、ampiltitude は低い値をしめす傾向にあった。

(3) 組織学的評価

① トルイジンブルー染色

全有髄線維数、軸索直径、軸索充填密度について測定した。軸索直径に関しては各群間に有意差は認めなかった。全有髄線維数・軸索充填密度に関しては、PBS 群・hFB 群と比べ ADRC 群・ADRC-M 群で大きく有意差を認めた。

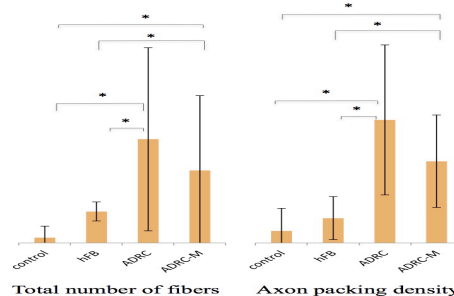


図2 トルイジンブルー染色による組織学的評価

② 免疫染色

抗 S-100 抗体で免疫染色を行った。ADRC 移植群では、PBS 群・hFB 群より多くの抗 S-100・DAPI 双方陽性となる領域を認めた。抗ヒトミトコンドリア抗体陽性となる領域は認めず、ヒト由来の細胞の存在は確認できなかった。抗 RECA-1 抗体での免疫染色を行いました。reca1 抗体陽性となる領域の面積

を計測し、各群間で比較した。ADRC・ADRC-M群の方が、PBS・hFB群に比べて有意に大きい値を示した。

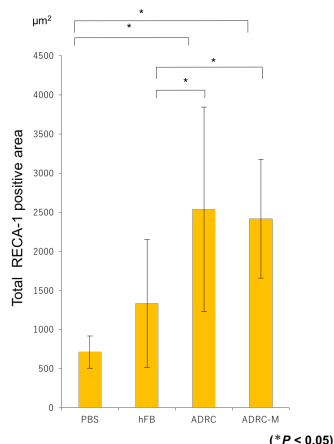


図3 抗RECA-1抗体陽性領域の面積比較

(4)

実健側腓腹筋を健側腓腹筋で除した筋湿重量比を評価した。ADRC群・ADRC-M群で、PBS・hFB群より有意に大きな値をとった。マッソントリクローム染色を行い、各群間で筋線維径を測定し比較した。PBS群・hFB群と比べADRC群・ADRC-M群で有意に大きな値を示した。また、ADRC群よりもADRC-M群で有意に大きい値を示した。

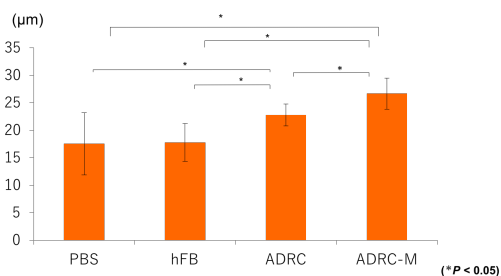


図4 筋線維径の比較

再生神経の連続性、機能的評価、組織学的評価から、本実験での神経再生は、過去に報告したCD133陽性細胞などの移植には及ばない。これはADRCがヘテロな細胞集団であることが影響しているものと考えられる。しかし神経再生に一定の効果は認められ、培養が不要であること、組織採取のハードルが比較的低いことから、臨床応用しやすい細胞ソースと考える。また、in vivo imagingでADRCの信号が消失したこと、組織学的評価でヒト由来細胞が特定できなかったことから、ADRCの神経・血管等へ直接分化は考えにくい。ADRC移植による神経再生の作用機序としてはADRC移植により何らかのパラクライン効果が働いているのではと推測されるが、細胞

が消失することで癌化など細胞移植に伴うリスクも低いと考えられ、臨床的に安全性にも優れた方法と考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 8 件)

①Fujioka Yumio, Kamei Naosuke, Miyamoto Junpei, Yokota Kazunori, Higashi Yukihiro, Ochi Mitsuo, Transplantation of Human Adipose Tissue-Derived Regenerative Cells for Peripheral Nerve Injury, ORS 2017 Annual Meeting, 19-22 Mar 2017, San Diego U.S.A

②藤岡弓朗, 亀井直輔, 宮本純平, 東幸仁, 横田和典, 越智光夫, ヒト脂肪組織由来再生細胞 (adipose tissue derived regenerative cell: ADRC) を用いた新たな末梢神経再生促進療法, 第31回日本整形外科学会基礎学術集会, 13-14 Oct 2016, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

③藤岡弓朗, 亀井直輔, 宮本純平, 横田和典, 東幸仁, 越智光夫, ヒト脂肪組織由来再生細胞 (adipose tissue derived regenerative cell: ADRC) を用いた新たな末梢神経再生促進療法, 第25回日本形成外科学会基礎学術集会, 15-16 Sep 2016, ナレッジキャピタルコングレ・コンベンションセンター(大阪府大阪市)

④Fujioka Yumio, Kamei Naosuke, Miyamoto Junpei, Yokota Kazunori, Higashi Yukihiro, Ochi Mitsuo, Development of New Peripheral Nerve Regeneration Therapy Using Human Adipose Tissue-Derived Regenerative Cells for Peripheral Nerve Regeneration, ORS 2016 Annual Meeting, 5-8 Mar 2016, Orlando U.S.A

⑤藤岡弓朗, 亀井直輔, 宮本純平, 横田和典, 東幸仁, 越智光夫, ヒト脂肪組織由来再生細胞 (adipose tissue derived regenerative cell: ADRC) を用いた新たな末梢神経再生促進療法の開発, 第30回日本整形外科学会基礎学術集会, 22-23 Oct 2015, 富山国際会議場 (富山県富山市)

⑥藤岡弓朗, 亀井直輔, 宮本純平, 横田和典, 東幸仁, 越智光夫, 末梢神経再生に対するヒト脂肪組織由来再生細胞 (adipose tissue derived regenerative cell: ADRC) の効果, 第24回日本形成外科学会基礎学術集会, 8-9 Oct 2015, 岩手県民会館(岩手県盛岡市)

⑦藤岡弓朗, 亀井直輔, 宮本純平, 横田和典, 東幸仁, 越智光夫, 末梢神経欠損に対するヒト脂肪組織由来再生細胞移植 (in vivo), 第34回日本運動器移植・再生医学研究会, 25-26

Sep 2015, ANA クラウンプラザホテル宇部(山口県宇部市)

⑧藤岡弓朗, 亀井直輔, 宮本純平, 横田和典, 東幸仁, 越智光夫, ヒト脂肪組織由来再生細胞 (adipose tissue derived regenerative cell: ADRC) を用いた新たな末梢神経再生促進療法の開発、第 26 回日本末梢神経学会学術集会, 18-19 Sep 2015, ホテルブエナビスタ (長野県松本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 和典 (YOKOTA KAZUNORI)

広島大学・病院・教授

研究者番号：20403529

(2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)

広島大学・その他部局等・学長

研究者番号：70177244

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)

広島大学・病院未来医療センター・講師

研究者番号：70444685

宮本 純平 (MIYAMOTO JUNPEI)

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：90365312

(平成 26 年 4 月 1 日～平成 28 年 3 月 31 日まで研究分担者)

(3) 連携研究者

東 幸仁 (HIGASHI YUKIHITO)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：40346490