

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09030

研究課題名(和文) 脂肪由来幹細胞の細胞シートによる末梢神経の再生に関する研究

研究課題名(英文) peripheral nerve regeneration using cell sheet of adipose derived stem cells

研究代表者

多田 薫 (Tada, Kaoru)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：90543645

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)：生体吸収性チューブ内に脂肪幹細胞の細胞シートを封入するモデル、同種処理神経に脂肪幹細胞の細胞シートを付加するモデルについて検討しました。その結果、細胞シートを封入、付加した群はしない群に比べ有意に機能的な回復が得られることが判明しました。またその機序として、再生組織内のシュワン細胞数の増加やVEGFやNeuregulin-1等の遺伝子発現の増加が関与していることを確認しました。細胞シートの神経再生促進効果について今後も研究を継続する計画です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動や知覚という大切な機能を司る「神経」の欠損に対して、いろいろな幹細胞を用いて神経を再生させる研究が行われています。私たちの研究の結果、脂肪幹細胞は「細胞シート」の形で使用することで、神経を再生する力をより有効に発揮できると考えられました。

研究成果の概要(英文)：We examined a model in which a cell sheet of adipose derived stem cells was enclosed in a bioabsorbable tube, and a model in which a cell sheet of adipose derived stem cells was added to decellularized allogeneic nerve. As a result, it was revealed that the group with the cell sheet had significantly higher functional recovery than the group without the cell sheet. In addition, we confirmed that the mechanism involved was an increase in the number of Schwann cells and an increase in gene expression of VEGF and Neurogulin-1 in the regenerated tissue. We plan to continue research on the neural regeneration promoting effect of cell sheet of adipose derived stem cells.

研究分野：手外科

キーワード：末梢神経 脂肪幹細胞 細胞シート 人工神経 同種処理神経 神経移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は脂肪幹細胞を用いた末梢神経の再生について研究を行ってきた。まず、脂肪細胞をコラゲナーゼ処置して得られる adipose derived regenerative cells (ADRCs)をシリコンチューブ内に封入した人工神経を作成し、ラット坐骨神経欠損モデルを用いて評価を行った。その結果 ADRCs は VEGFA や Neuregulin-1 などの液性因子を分泌することにより、末梢神経の再生を促進することが判明した (Suganuma S, et al. J Orthop Sci, 2012)。次に、ADRCs をシリコンチューブではなく生体吸収性の神経再生誘導チューブ内に封入したハイブリッド型の人工神経を作成し、より長期の成績について評価を行った。その結果 ADRCs を封入することにより末梢神経の再生は促進されるものの、その成績は自家神経移植には及ばないことが判明した。その理由としては、チューブ内に十分な細胞数を担持できなかった可能性や、ADRCs がシュワン細胞としての役割ではなく、単純に液性因子を分泌するだけの役割しか担っていなかった可能性が考えられた。以上の結果から、チューブ内に封入する細胞数を増やすと共に細胞の停留性を向上させること、また ADRCs ではなく ADRCs から分離培養した adipose derived stem cells (ADSCs)を使用することが成績を向上させると考え、これらの条件を満たす方法として「ADSCs の細胞シート」を用いる本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ADSCs の細胞シートが末梢神経の再生に与える影響を評価することである。細胞シートの担体として 生体吸収性チューブ、同種処理神経の 2 つを使用する。

3. 研究の方法

・ラット坐骨神経欠損モデルの作成

10~12 週齢のラットの大腿部外側中央に 4cm の皮切を加え、坐骨神経を展開して全周性に剥離した後、15mm の坐骨神経の欠損を作成する。

・細胞シートの作成

10~12 週齢のラットの鼠径部から 2g の脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ処置の後 FBS 入り培地で中和後、抽出した ADRCs から ADSCs を分離培養する。培養皿へ 1×10^6 個の ADSCs を播種し、confluent となった所でアスコルビン酸を添加した培地へ交換し細胞シートを作成する (Fang X, et al. PLoS One, 2014)。

・同種処理神経の作成

12~14 週齢の SD ラットから 15mm の坐骨神経を採取し、PBS で洗浄した後 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 中で 24 時間攪拌する。その後脱イオン水で 30 分間洗浄後、1% Triton-X 100 中で 1 時間攪拌し、さらに脱イオン水で 30 分間洗浄後、抗生剤入り PBS 中で 7 日間洗浄する。

生体吸収性チューブを用いた検討

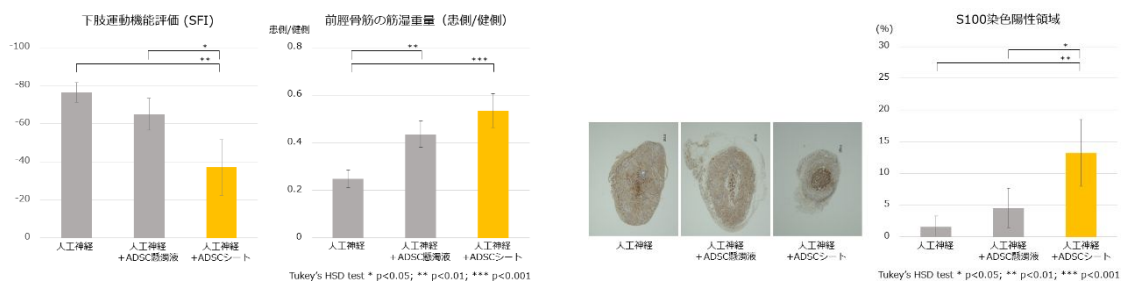
15mm の坐骨神経の欠損を生体吸収性チューブ(人工神経: ナーブブリッジ®)で架橋する。チューブ単独群、チューブ内に細胞シート内と同数の ADSCs をコラーゲンゲルと共に封入した群、チューブ内に ADSCs の細胞シートを封入した群の 3 群を作成した。12 週間後に下肢運動機能評価 (Sciatic Functional Index: SFI)、前脛骨筋の筋湿重量、再生組織中央横断面の抗 S100 抗体染色により評価した。

同種処理神経を用いた検討

15mm の坐骨神経の欠損を同種処理神経で架橋する。同種処理神経単独群、同種処理神経の周囲に ADSCs の細胞シートを付加した群、自家神経群の 3 群を作成した。12 週間後に下肢運動機能評価 (Sciatic Functional Index: SFI)、前脛骨筋の筋湿重量、再生組織中央横断面の抗 S100 抗体染色、Neurofilament 染色により評価した。

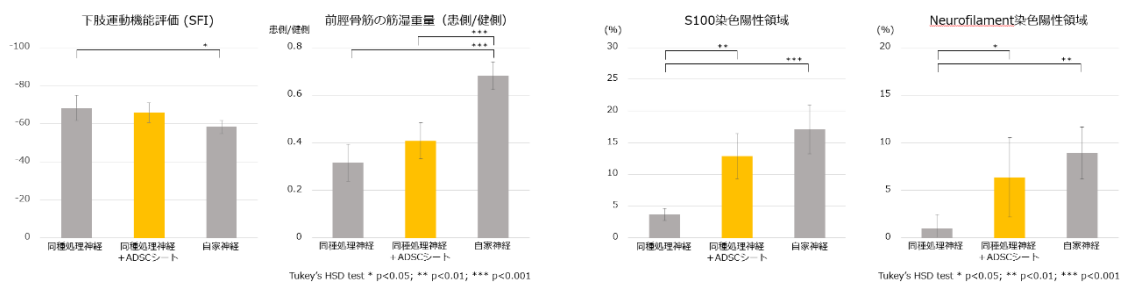
4. 研究成果

生体吸収性チューブを用いた検討



ADSCs の細胞シートの封入により人工神経の成績は有意に向上したこと、ADSCs の細胞シートは ADSCs の懸濁液よりも治療効果が大きかったことが判明した。

同種処理神経を用いた検討



同種処理神経に ADSCs の細胞シートを付加した群の成績は、自家神経群の成績には及ばなかったこと、同種処理神経に付加した ADSCs の細胞シートは髄鞘形成や軸索再生に寄与していたことが判明した。

本研究では、ADSCs の細胞シートは大量の幹細胞を担持し局所に停溜させることで、ADSCs を単純に投与するよりも神経の再生を促進する効果があるという建設的な結果が得られた一方、人工神経に変わる神経再建材料として注目されている同種処理神経に ADSCs の細胞シートを付加するという理想的な方法であっても自家神経の成績には及ばなかった、という厳しい結果が得られたとも言える。そこで現在は、細胞シートの担体について再検討をするとともに、ADSCs シートにより得られた効果について細胞分子生物学的な検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中田美香, 伊藤聡一郎, 多田薫, 中嶋宰大, 松田匡司, 土屋弘行	4. 巻 36
2. 論文標題 脂肪由来幹細胞シートで被覆した脱細胞化同種神経の移植成績について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本手外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 516-518
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 中田美香, 伊藤聡一郎, 多田薫, 中嶋宰大, 松田匡司, 土屋弘行	4. 巻 30
2. 論文標題 人工神経 脱細胞化同種神経を用いた末梢神経再建	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 末梢神経	6. 最初と最後の頁 177-179
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 多田薫, 山本大樹, 中嶋宰大, 中田美香, 松田匡司, 土屋弘行	4. 巻 54
2. 論文標題 最新基礎科学 知っておきたい人工神経の適応と限界	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床整形外科	6. 最初と最後の頁 720-723
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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中田美香, 多田薫ほか
2. 発表標題 脱細胞化同種神経を用いた末梢神経再建の研究
3. 学会等名 日本末梢神経学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田美香、多田薫ほか
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞シートを付加した脱細胞化同種神経の移植成績について
3. 学会等名 日本手外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田美香、多田薫ほか
2. 発表標題 自動処理により脱細胞化した同種神経の治療成績について
3. 学会等名 日本マイクロサージャリー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋幸大、多田薫ほか
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞シートを使用した自家神経移植の成績について
3. 学会等名 日本手外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中嶋幸大、多田薫ほか
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞シートを充填した人工神経の末梢神経再生促進効果について
3. 学会等名 日本マイクロサージャリー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中嶋 幸大
2. 発表標題 脂肪由来幹細胞(Adipose-derived stem cells: ADSCs)シートを充填した人工神経の末梢神経再生促進効果について
3. 学会等名 日本末梢神経学会
4. 発表年 2017年～2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究紹介 http://ortho.w3.kanazawa-u.ac.jp/intro/pages/hnds_group.php

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	菅沼 省吾 (Suganuma Seigo) (10622889)	金沢大学・医学系・協力研究員 (13301)	
研究分担者	林 克洋 (Hayashi Katsuhiko) (80507054)	金沢大学・医薬保健学総合研究科・特任教授 (13301)	
研究協力者	伊藤 聡一郎 (Itoh Soichiro)		