

193. 間葉系幹細胞を融合した強化型自家神経グラフトの開発

富田 興一

Key words : adipose-derived stem cell, Schwann cell, nerve autograft, peripheral nerve

大阪大学 大学院医学系研究科
器官制御外科学講座 形成外科学

緒 言

マイクロサージャリー技術の発展に伴い末梢神経損傷後の機能回復は飛躍的に向上したが、径の大きな長距離神経欠損においては自家神経グラフトが唯一の方法であり、その術後成績はしばしば不良である。その大きな原因の一つにグラフト内シュワン細胞 (SC) を含む神経グラフトの生着が不安定なことが挙げられる。その生着率はグラフトの移植床の血行が不良である場合（放射線治療後や強度の瘢痕組織）に特に低下すると考えられる^{1,2)}。グラフト内 SC による軸索再生支持（ビュングナー帯形成や神経栄養因子分泌）が不十分となる結果、神経軸索再生も障害される。血管柄付き神経移植はグラフトの早期血行回復に有効ではある³⁾が、解剖学的理由によりその適応は限られる。

過去 10 年間で成人の脂肪組織に多能性幹細胞が同定され (ASC)、それらは脂肪吸引などの低侵襲手技により採取することができる。特筆すべきこととして、ASC は hepatocyte growth factor や vascular endothelial growth factor などの成長因子を分泌し、虚血状態において血管新生に貢献することが明らかとなった。また脂肪注入に ASC を併用することで移植脂肪の生着率が向上することも実験的、臨床的に確認されている。これらの結果より、我々は ASC を神経グラフトに融合することでグラフト生着率が向上するのではないかという仮説を立てた。本研究においては ASC の SC に対する保護効果を *in vitro* および *in vivo* において検証し、それらが実際に末梢神経損傷後機能回復を向上するかどうかを動物モデルを用いて検討した。

方 法

全身に GFP を発現する近交系 Lewis ラットベースのトランスジェニックラット³⁾の皮下脂肪組織より ASC を単離・培養した⁴⁾。また GFP ラット坐骨神経から SC の初代培養も行った⁴⁾。

1. 非接着共培養による ASC の SC に対する保護効果の検討

セルカルチャーインサートを用いて ASC と SC の非接着培養を行った。まず SC を 6-well プレートで培養し、同時に同数の ASC をインサート内で別個で培養した。24 時間後、SC の培地を無血清培地へ交換し、その内のいくつかのプレート上に ASC を含むインサートを挿入、非接触培養を行った。さらに 24 時間後に死細胞数を 7-amino-actinomycin D (7-AAD) 染色、および terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) にて評価した。

2. 動物モデル作製

36 匹の Lewis ラットにおいて全身麻酔下、坐骨神経およびその末梢枝である総腓骨神経を露出した。総腓骨神経より約 10 mm の神経グラフトを採取し、180 度回転したのち、10-0 ナイロンを用いて神経欠損部へ再移植を行った。その後移植床血行不良モデルを作製すべく、24 匹のラットにおいて 10 mm 長のシリコンチューブを用いて神経グラフトを被覆した。これにより移植床と神経グラフトの分離が可能となる。24 匹中 12 匹において、ASC (5×10^5) を神経上膜内へマイクロシリンジを用いて移植した。残りの 12 匹においては無血清培地のみを同様にマイクロシリンジにて注入した。3つの実験群のまとめは図 1 の通りである。

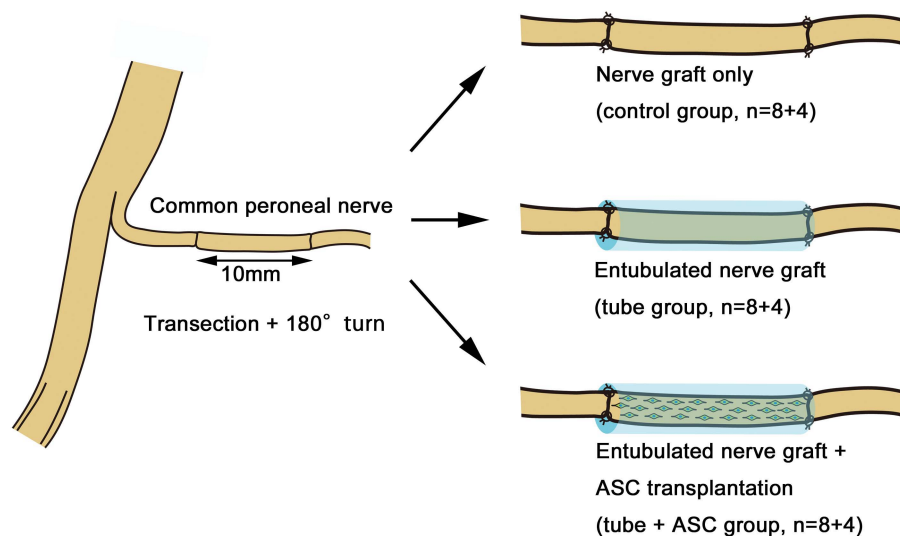


図1. 動物実験モデル群のまとめ.

神経グラフトのみの群 (control), シリコンチューブ被覆群 (tube), シリコンチューブ被覆 + ASC 移植群 (tube + ASC) の3群を作製した.

各群において12匹中8匹は術後12週まで長期フォローを行い, 経時的に足跡分析 (Peroneal functional index, PFI)⁵⁾を行った. 術後12週目においてグラフトより遠位神経を採取後, 短軸方向の薄切切片を作製し, トルイジン・ブルー染色による組織形態学的評価を行った. 残りの4匹においては術後10日目にグラフトを採取, 長軸方向の凍結切片を作製し, TUNEL法による死細胞数の評価を行った.

統計学的処理は一元配置分散分析 (One-way ANOVA) を用い, 事後検定は Tukey-Kramer 法により行った. P 値 <0.05 を統計学的有意差ありと設定した.

結 果

1. ASC との共培養は無血清下における SC の細胞死を抑制する

ASC と SC の非接触共培養においては両細胞群は物理的には分離されているが, インサートの微小孔を通じて相互にパラクライン作用を及ぼすことが可能となる. 血清入り培地においては 7-AAD および TUNEL 陽性の死細胞はほとんど認めず, ASC との共培養によってもその数は影響を受けなかった. 一方, 24 時間の無血清下培養後においては $10.4 \pm 1.4\%$, $5.9 \pm 0.4\%$ の SC がそれぞれ 7-AAD および TUNEL 陽性であった (図2). しかしながら, ASC との共培養を行った群においては $5.4 \pm 1.4\%$, $2.7 \pm 1.0\%$ の SC がそれぞれ 7-AAD および TUNEL 陽性であり, 統計学的有意な死細胞数の減少を認めた. これらの結果より, ASC はパラクライン作用により間接的に無血清下 SC を細胞死から保護することが示唆された.

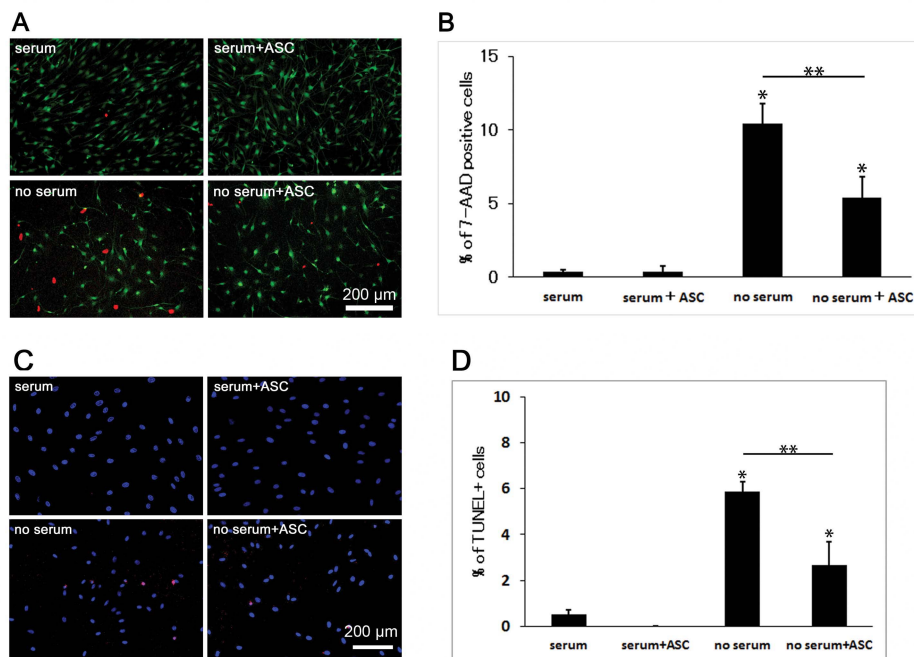


図2. ASCが無血清下培養シュワン細胞に及ぼす細胞保護効果の検討.

(A) 無血清下にて24時間培養後、7-AAD染色（赤）によりシュワン細胞（緑）の生存率を評価した. (B) ASCとの非接触共培養により7-AAD陽性シュワン細胞数は有意に減少した (* P < 0.05 vs serum group, ** P < 0.05, one-way ANOVA followed by post hoc Tukey-Kramer test). (C) 無血清下にて24時間培養後、TUNEL（赤）によりアポトーシスを生じたシュワン細胞を評価した. 青：DAPI (D) ASCとの非接触共培養によりTUNEL陽性シュワン細胞数は有意に減少した (* P < 0.05 vs serum group, ** P < 0.05, one-way ANOVA followed by post hoc Tukey-Kramer test).

2. ASC移植は虚血下における神経グラフト内細胞死を抑制する

次に我々はASCを神経グラフトに融合することでグラフト内細胞の生存率が向上するか検討を行った. 一般的に、ラット総腓骨神経をグラフトとして再移植した場合、非常に良好なグラフト生着および機能回復が得られる. そこで我々は移植床の血行が不良である臨床例を模倣するため、グラフトをシリコンチューブにより被覆し移植床からの血行再開を阻害した.

術後10日目においてグラフトを採取、切片作製を行った. 神経上膜内にはGFP陽性細胞が僅かに認められたものの、神経周膜内にGFP陽性は認めなかった. このことから神経上膜内に移植されたGFPの生存期間は比較的短期間であり、神経周膜下への細胞遊走は起こらないことが示唆された. 次にTUNEL法により死細胞数を評価した. 通常のグラフト内においてはTUNEL陽性細胞はほとんど認めなかった (19 ± 3 cells/mm²) のに対し、チューブ被覆群では多くのTUNEL陽性細胞を認めた (196 ± 34 cells/mm²) (図3). 興味深いことに、チューブ被覆 + ASC移植群においてはTUNEL陽性細胞数の有意な減少を認めた (115 ± 31 cells/mm²). これらの結果より、ASCを神経上膜内移植することで虚血による神経内膜内細胞死を抑制できることが示唆された.

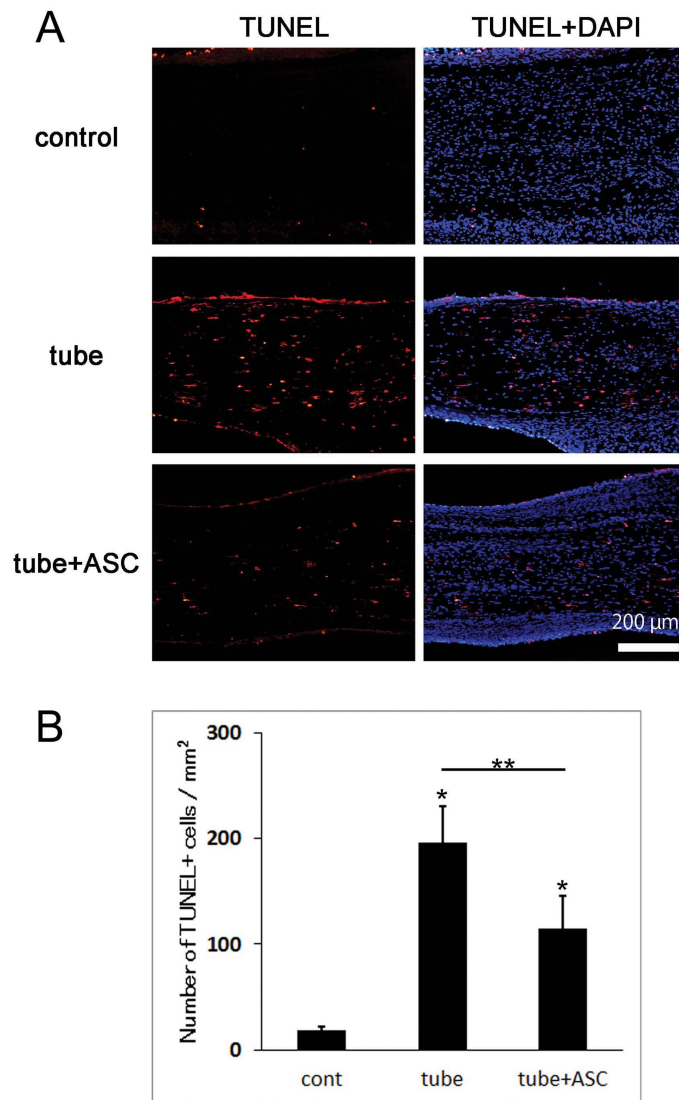


図3. ASC 移植が虚血下神経グラフト内細胞に及ぼす保護効果の検討.

A) 移植術後 10 日目の神経グラフト内における TUNEL 陽性細胞 (赤色) 数を評価した. B) ASC 移植により神経グラフト内 TUNE 陽性細胞数が有意に減少した (* P < 0.05 vs nonentubulated grafts (cont), ** P < 0.05, one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey-Kramer test).

3. 神経グラフトへの ASC 移植は神経損傷後機能回復を加速する

次に我々はこれらの ASC による SC 保護効果が神経再生に有益かどうかを検討した. 術後から 2 週間ごとに足跡分析 (PFI) による総腓骨神経の運動機能回復を評価した. 術前において, PFI 値は何れの動物でも約 -10 程度であったが, 術後 2 週目には約 -80 まで低下し, 腓骨神経機能喪失が示唆された. その後神経グラフトのみの群とシリコンチューブ被覆 + ASC 移植群では PFI 値は徐々に回復し, 術後 6 週目において PFI 値は両群とも平均約 -30 に達した. 術後 10 週ではほとんどの動物において PFI 値は術前のレベルまで回復した (図 4). 一方シリコンチューブ被覆のみの群では PFI 値の回復は遅く, 術後 6, 8, 10 週目では他の 2 群に比べて有意に低い PFI 値を示した. しかしながら, 術後 12 週目において PFI 値は 3 群間で有意差を認めなかった.

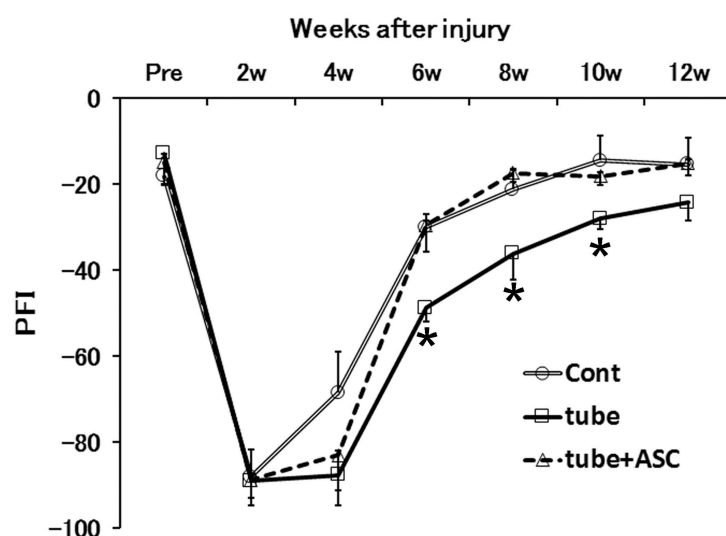


図 4. 足跡分析 (Peroneal functional index, PFI) による総腓骨神経機能回復評価.

ASC 移植群 (tube+ASC) においては非 ASC 移植群 (tube) に比して有意に機能回復速度が向上した (* $P < 0.05$ vs entubulated (tube + ASC) and nonentubulated (cont) animals, one-way ANOVA followed by a post hoc Tukey-Kramer test).

最後に遠位神経の組織形態学的評価を行った. 全軸索数, 全軸索の総断面積, 軸索 1 本あたりの断面積をそれぞれ評価したところ, 何れの項目でもシリコンチューブ被覆 + ASC 移植群はシリコンチューブのみの群より大きな値を示したものの, 統計学的有意差は認めなかった.

考 察

遊離神経グラフトにおける主な血行再開機序として, 神経グラフト全長にわたる移植床からの血管新生が挙げられる. 移植床が血行良好である場合, 移植後約 3 日目から血行が再開していくことが知られている^{1,6,7}. グラフト内 SC が血行のない状態で生存できるのは約 7 日間程度であることから⁷, 血行再開の遅延はグラフト内 SC の生着率低下と軸索再生の障害につながると考えられる.

この問題を解決するアプローチの一つとして, 虚血状態における SC の生存期間を延長し得る細胞または薬剤の局所投与が考えられる. 本研究において我々は ASC が虚血状態の SC に対する細胞保護効果を有するか検討した. ASC と SC の非接触共培養において, ASC はパラクライン作用により無血清下における SC 保護効果を有することが明らかとなった. ラット総腓骨神経グラフトモデルを用いた実験では, これらの保護効果が *in vivo* でも確認された. これらの細胞保護効果は神経再生の初期段階において有益であろうと推測される. グラフト内 SC によるビュングナー帯形成, および神経栄養因子産生の促進により軸索再生の促進が期待でき, 我々の動物モデルでも術後機能回復の加速効果が認められた.

本研究では ASC は神経上膜層へ移植された. 正常神経では神経周膜が blood-nerve barrier (BNB) を形成することで内部の軸索を周囲環境から保護している^{8,9}. しかしながら, 神経損傷が生じると BNB 機能は急速に破綻し, その後の神経回復と共に BNB 機能も回復することが知られている. 我々の動物モデルにおいては, 移植 ASC から分泌される因子は神経損傷後早期に破綻する BNB を介して神経周膜下へ影響を及ぼしたと推測される. 移植 ASC の生存期間は比較的短期間であったものの, BNB 機能が回復した後においては ASC が神経周膜下へ与える影響は小さいと思われる.

神経上膜は比較的疎な組織であることもあり, 我々の動物モデルにおいてグラフト遠位端より注入された ASC は容易にグラフト全長にわたり移植することが可能であった. このことは本移植法が長距離グラフトにも適していることを示唆する. 一方で, 神経周膜下への移植は ASC と神経内膜内細胞との直接的な作用, および移植 ASC の長期生存につながる可能性がある⁴ものの, 細胞移植手技自体がグラフト内部構造を大きく破壊し, また複数個所からの細胞注入は内部環境保持に重要な BNB 機能も大きく損傷してしまう可能性が考えられる.

パラクライン作用に加え、ASCは虚血状態において血管内皮細胞へ分化し、直接血管新生に関与することが報告されている。しかしながら、本研究においてはそのような作用は認められなかった。その理由としては動物モデルの違いが考えられる。過去の研究においてはASCは虚血肢や腸間膜といった血流のある組織内へ移植されていたのに対し、本研究ではASCを移植床から分離されたグラフト内に移植した。移植後はグラフト遠位・近位端よりゆっくりと血行再開が起こっていくと考えられる。ASC移植が神経グラフトの血管新生に直接関わる可能性があるのかに関しては、今後放射線照射後の動物モデル等を用いてさらに検討していく必要があると思われる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院医学系研究科の細川 亙および西林章光である。また本研究結果は、*Microsurgery* 誌に投稿し受理された¹⁰⁾。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Prpa, B., Huddleston, P. M., An, K. N. & Wood, M. B. : Revascularization of nerve grafts: a qualitative and quantitative study of the soft-tissue bed contributions to blood flow in canine nerve grafts. *J. Hand Surg.*, **27** : 1041-1047, 2002.
- 2) Koshima, I. & Harii, K. : Experimental study of vascularized nerve grafts: morphometric study of axonal regeneration of nerves transplanted into silicone tubes. *Ann. Plast. Surg.*, **14** : 235-243, 1985.
- 3) Inoue, H., Ohsawa, I., Murakami, T., Kimura, A., Hakamata, Y., Sato, Y., Kaneko, T., Takahashi, M., Okada, T., Ozawa, K., Francis, J., Leone, P. & Kobayashi, E. : Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **329** : 288-295, 2005.
- 4) Tomita, K., Madura, T., Sakai, Y., Yano, K., Terenghi, G. & Hosokawa, K. : Glial differentiation of human adipose-derived stem cells: implications for cell-based transplantation therapy. *Neuroscience*, **236** : 55-65, 2013.
- 5) Bain, J. R., Mackinnon, S. E. & Hunter, D. A. : Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast. Reconstr. Surg.*, **83** : 129-138, 1989.
- 6) Lind, R. & Wood, M. B. : Comparison of the pattern of early revascularization of conventional versus vascularized nerve grafts in the canine. *J. Reconstr. Microsurg.*, **2** : 229-234, 1986.
- 7) Penkert, G., Bini, W. & Samii, M. : Revascularization of nerve grafts: an experimental study. *J. Reconstr. Microsurg.*, **4** : 319-325, 1988.
- 8) Hirakawa, H., Okajima, S., Nagaoka, T., Takamatsu, T. & Oyamada, M. : Loss and recovery of the blood-nerve barrier in the rat sciatic nerve after crush injury are associated with expression of intercellular junctional proteins. *Exp. Cell Res.*, **284** : 196-210, 2003.
- 9) Hackel, D., Brack, A., Fromm, M. & Rittner, H. L. : Modulation of tight junction proteins in the perineurium for regional pain control. *Ann. New York Acad. Sci.*, **1257** : 199-206, 2012.
- 10) Tomita, K., Nishibayashi, A., Yano, K. & Hosokawa, K. : Adipose-derived stem cells protect against endoneurial cell death: Cell therapy for nerve autografts. *Microsurgery*, **35** : 474-480, 2015.