

論文の内容の要旨

論文題目「骨格筋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構築と機能再生」

学位申請者 齋藤 弘亮

キーワード：再生医療 幹細胞移植 顔面神経 神経再生 血管再生

【背景】： 頭頸部癌は診断時点で進行しているものが多く、その根治的な治療に伴い、不可避に顔面神経を傷害（欠損）する症例がしばしば見られる。加えて顔面神経鞘腫などの良性腫瘍に対する外科治療や外傷によっても顔面神経が障害されるケースがある。この顔面神経欠損による顔面神経麻痺は顔の歪みや顔の拘縮を引き起こし、整容面の問題や兎眼といった眼症状のほか、味覚障害や唾液分泌の低下、構音障害を合併し、術後QOL（生活の質）を著しく損なう要因となっている。こういった症例において、神経断裂距離が短い場合は、神経の直接吻合が可能であるが、機能的な回復が見込めるのは5mm以内が限界とされている。しかし、実際の臨床では、神経欠損距離が5mm以上のケースが多く、一般的には自家神経移植や皮弁移植術が施行されている。しかし機能的に満足いく結果は得られておらず、さらに採取する神経領域の麻痺や疼痛が引き起こされるというデメリットがある。こういった自家神経・皮弁移植の不利益回避するために、人工神経管が開発された。しかし、この方法は単独の神経断端同士を接合する方法でありと同時に、現状、自家神経移植術同様に満足いく結果は得られていない。この理由としては、壁面の血管新生の不足やチューブ外との電解質、栄養の交通路が確保できないこと、また、疎水性、低接着性などの組織親和性の問題や、細胞増殖活性の欠如、強度の不足等が問題視されている。

一方、顔面神経支配の表情筋は20個以上あり、それらの筋肉には複雑に神経と血管がネットワークを形成し、入力している。よって麻痺に対する外科治療の成績は、いかに多くの表情筋に必要な神経と血管の再生を果たせるかに大きく依存しており、単一の神経再生でさえ困難な前述の手法では限界がある。こういった背景から近年、幹細胞移植による治療が世界的に試みられている。骨髄間葉系細胞や脂肪由来幹細胞、シュワン細胞様間葉系細胞、歯髄由来幹細胞などを用いた研究が報告されているが、これらの研究は、人工神経管を併用した単一の神経再生を目的したものである。つまり複雑な顔面神経ネットワークを幹細胞単独で再生させることは現状困難であり、試みられていない。

【目的】： 近年、筋・血管・神経をユニットとして再構築できる多能性幹細胞群が骨格筋間質に存在することが報告された。本研究では、この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、大幅に損傷した顔面の筋・血管・神経ネットワークの複合的再構築を試みた。

【方法】： 本研究では 2 種類の実験を行った。実験 1. マウスを用いた免疫組織学的評価及び顔面神経麻痺スコアによる機能評価。GFP-Tg マウスをドナー、同系正常マウスをレシピエントとした。実験 2. ラットを用いた電気生理学的な機能評価。SD ラットを用い、自家細胞移植で実験を行った。レシピエント動物に対し、顔面神経枝周辺の組織を大幅に摘出することで複数の軸索欠損部を作成し、顔面神経麻痺モデルを作成した。移植群には GFP-Tg マウスおよび SD ラット (自家) 骨格筋から得た幹細胞シート・ペレットを損傷部位に移植し、対照群には培地のみを移植した。回復期の機能評価は Most 法を発展させたマウス顔面神経麻痺スコア評価 (眼瞼・髭・上口唇の動き) を隔週で行った。移植 8 週後に免疫組織化学的 (N200、MBP、GLT-1、p-75NTR、CD31、 α -SMA、 α -Bungarotoxin) を行い、組織学的な回復の評価と細胞着床・分化を検討した。ラットに対しては、神経損傷部上流より電気刺激を行い、洞毛を介した間接的筋張力測定による機能評価を行った。さらに培養により得られた移植直前の Sk-MSC シート・ペレットに対して、血管・末梢神経の分化・誘導、栄養因子等の RT-PCR を行い、パラクライン効果を検討した。

【結果・考察】： 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、優位な機能改善が認められた。さらに、移植群では損傷時に大幅減少した洞毛筋張力が、非移植群 (約25%) に比べて、優位な回復 (60% 以上) を示していた。組織学的評価においては、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、複数の神経分岐を同時に再構築し、顔面神経ネットワークの再生に貢献していた。加えて、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。さらに、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、移植細胞の神経に沿った遠位部への遊走能示すと同時に、上述の機能的な回復を裏付けていた。RT-PCRにおいては、複数の神経・血管成長因子が同定され、Sk-MSC シート・ペレットのレシピエント、ドナー由来の細胞に対するパラクライン効果が期待された。これらの結果は、シート・ペレットとして移植した骨格筋由来幹細胞が幹細胞特有の「損傷組織環境に順応した分化能 : milieu-dependent differentiation」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。

【結論】：以上の結果は、Sk-MSCシート・ペレット移植法が、複雑な顔面神経・血管ネットワークを再生治療に有効であることを示していた。現在、ヒト骨格筋由来幹細胞の最適な抽出・精製・培養増幅法の開発、及びその分化能 (ほとんどマウスに匹敵する) を確認していることから、頭頸部癌治療や外傷などにおける不可避な顔面神経損傷による顔面神経麻痺に対する、有用な治療法として期待される。