

東海大学大学院令和元年度博士論文

骨格筋由来幹細胞と吸収性ポリグリコール
酸(PGA)フェルトのハイブリッド移植
による断裂反回神経の再生

數野 暁人

- ・ この学位申請論文は Journal of Clinical Medicine に掲載された主要公刊論文を基に作成された。

- ・ Journal of Clinical Medicine に掲載された主要公刊論文の一部を学位申請論文に用いることに加えて、学位申請論文を機関リポジトリ[電子書庫システム]で公開することの承諾を得ている。

Summary (総括)

【目的・背景】 反回神経は迷走神経の左右非対称な分枝であり、左側は大動脈弓の下で、右側は右鎖骨下動脈の下でそれぞれ分岐した後、ループを描いて上行し喉頭に至る。その主な役割として、内喉頭筋の動作と声門下の喉頭粘膜の感覚を支配し、頸部食道と気管の感覚・分泌・運動を支配している。この反回神経が不慮の事故あるいは周辺組織・器官の手術時に不可避に断裂・損傷した場合、いわゆる「反回神経麻痺」となり、片側断裂による声帯運動麻痺、嗄声や会話時の息切れをきたす。したがって、患者の精神的負担は大きく、QOL を著しく低下させる結果となっている。これまで、ヒト及びげっ歯類を用いた研究で、断裂した反回神経が自然回復することは極めて希で、ほとんど不可能であることが報告されており、有効な治療法も確立

されていないのが現状である。この背景となる因子として、反回神経の走行位置の問題が考えられる。即ち、気管と食道の間の狭い隙間を走行しているため、気管と食道の動きによる圧変化の影響を直接受けることになる。さらに、この狭い空間に発生する表面張力による毛细管現象が物質の移動・拡散を助長するため、神経成長・再生因子や細胞等を神経欠損部にとどめることが極めて難しく、組織再生を困難にしていると考えられる。一方、著者らのグループは末梢の筋・血管・神経系をユニットとして再構築できる多能性幹細胞群 (Sk-MSCs) が骨格筋間質に存在することを報告し、その臨床応用を目指して研究を進めてきている。本研究では、この Sk-MSCs 移植と細胞の足場となる PGA フェルトの特性を組み合わせたハイブリッド移植法を用いて、移植細胞や分泌された神経成長因子の拡散を防ぎ、断裂した反回神経を再生させることを試みた。

【方法】 骨格筋由来幹細胞 (Sk-MSCs) は green fluorescence protein transgenic mouse (GFP-Tg マウス、C56BL/6N, EGFP-Tg) より抽出した。同系正常マウス左反回神経を鎖骨上部で切断し、5mm のギャップを作成、「反回神経断裂モデル」とした。Sk-MSCs は培養・増幅の後、無血清培地に浮遊、PGA フェルトに吸着させて反回神経断裂部に直

接ハイブリッド移植した(HY 群)。対照には培地のみを移植した M 群と PGA フェルト+培地を移植した PGA 群を設定した。術後 2, 4, 8 週間後に、吸入麻酔下でファイバースコープカメラ（直径 3.9mm）を用いて自発呼吸中の声帯運動を動画記録、点数化（0～3 ポイント）することで機能回復経過の指標とした。組織学的評価として、連続切片を用いた蛍光免疫組織化学染色を行い、移植・生着した GFP 陽性組織・細胞の同定、細胞分化の状況を、連続組織切片を用いた断層撮影的画像取得により確認した。さらに、移植細胞が分泌する神経成長因子を定量的リアルタイム PCR 法で確認した。

【結果】 HY 群では多くの GFP 陽性組織が断裂幹部に局限して認められ、PGA が移植細胞の拡散を確実に防いでいた。声帯運動の評価では、M 群が評価ゼロとなり、本反回神経断裂モデルは自然治癒が不可能な不可逆的モデルであることが明らかとなった。これに対し、PGA 群ではごく僅かな回復 (0.3 ± 0.2 ポイント) に止まったが、HY 群では画期的な回復 (2.5 ± 0.3 ポイント) が認められ、80%の機能回復を示した。組織学的解析でも M 及び PGA 群の断裂部には神経軸索の再生は認められなかった。一方、HY 群の断裂部では着床した GFP 陽性細胞群に保護されるように再生軸索 (N200 陽性) が多数

認められ、軸索再生率は 86%であった。さらに GFP 陽性細胞はシュワン細胞 (p75 陽性)、神経周膜・周皮細胞 (GLUT-1 陽性)、血管内皮細胞 (CD31 陽性) に分化し、再生軸索を保護しつつ、それぞれ神経周膜、神経周皮、血管構築に貢献していた。加えて、着床した GFP 陽性細胞群からは神経成長因子である BDNF,CNTF,GDNF の mRNA 発現上昇が認められ (リアルタイム PCR 法)、Sk-MSCs 移植のパラクラインによる神経再生効果も大きいことを示していた。

【結論】 これらの結果は、今回細胞移植の足場として用いた PGA が、細胞分化能を妨げる事無く、細胞拡散を有意に防御し、Sk-MSCs の神経再生能を十分に発揮させることを示していた。従って、今回の Sk-MSCs と PGA フェルトのハイブリッド移植法による幹細胞とサイトカインの供給システムは実用的であり、細胞や液状物質に対して、極めて流動的な条件下に位置する反回神経の断裂再生に有効であると考えられる。

Introduction

反回神経は迷走神経の左右非対称な分枝である。左側は大動脈弓の下で、右側は右鎖骨下動脈の下でそれぞれ分岐した後にループを描いて上行し喉頭に至る。反回神経の役目は内喉頭筋の動作と声門下の喉頭粘膜の感覚を支配し、頸部食道と気管の感覚・分泌・運動の

支配である。この反回神経が不慮の事故、あるいはその周辺組織・器官（甲状腺、肺、食道、縦隔、心臓など）の手術時に不可避に損傷または断裂することで反回神経麻痺となる。通常その顕著な症状として、片側損傷による片側声帯運動麻痺により嗄声や会話時の息切れをきたす。現在のところ有効な治療法は確立されておらず、自然治癒は極めて難しいとされている。従って、患者にかかるストレスは大きく、QOLを著しく低下させる結果となっている。この自然治癒の難しさは、ヒト同様にげっ歯類モデルにおいても証明されており、種を超えた難治障害と考えられる。現状の標準的な治療法は神経グラフトの自家移植であるが、健常な神経グラフトの必要性から、当然、関連末梢組織の機能（運動・感覚・自律神経）を代償として失うことになる。しかし、術後の機能回復は必ずしも十分ではなく、犠牲の大きさにもかかわらず得られる効果が不確実であるという現状がある。加えて、反回神経は気管と食道の間の狭い空間を走行しているため、気管と食道の動きによる様々な圧変化の影響を受ける。また、この狭い空間に発生する表面張力による毛細管現象が液状物質の拡散を助長し、このことが神経成長あるいは再生因子や、それらの分泌細胞そのものを神経欠損部にとどめることを極めて難しくし、治癒・治療を

困難にしていると考えられる。

これらの状況を打破すべく、断裂反回神経を再生するためにいくつかの方法が試みられている。 1) 生体適合物質の足場を用いた薬物輸送（投与）系で、脳由来神経栄養因子(BDNF)やグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)を自家神経グラフトの代用として用い、筋電図的な改善を示した。 2) 甲状披裂筋内に培養ラット CD56 陽性筋芽細胞を直接注入し、隣接する反回神経断裂部に対する、移植細胞からの間接的パラクライン効果（毛様体由来神経栄養因子：CNTF）を期待した実験で、喉頭筋の筋電図的改善が認められた。 3) 反回神経損傷モデルに対する骨髄間葉系幹細胞の経静脈的投与で、声帯運動の改善が示されたと報告されているが、移植幹細胞が神経再生に直接貢献したかどうかは不明である。従って、これらの報告からは反回神経の組織学的回復と機能的回復の因果関係を明らかにする根拠は見出せず、声帯運動改善への直接的証明にはなり得ていない。それゆえ断裂反回神経の再生治療法の開発には、まだまだ改善の余地が多く残されていると考えられる。

一方著者らのグループは、マウス坐骨神経断裂モデルに対し、マウス骨格筋由来多能性幹細胞(Sk-MSCs)およびヒト骨格筋由来幹細胞(Sk-

SCs)を移植し、著しい機能的改善が認められたことを報告している。即ち、マウス Sk-MSCs およびヒト Sk-SCs は、共にシュワン細胞、神経周膜/神経内膜細胞、血管周皮細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に分化し、損傷した末梢神経を組織学的にも機能的にも再生する。そしてその再生能力は、損傷した坐骨神経、骨格筋、顔面神経ネットワーク、尿道括約筋、膀胱壁、さらに骨盤内神経血管束といった様々な環境で発揮されることが証明されている。さらに、気管支断端瘻の抑制効果を期待し、Sk-MSCs と PGA のハイブリッド移植を行い、気管支断端における神経・血管の有意な再生を達成している。さらに、断裂反回神経再生に対する PGA チューブ使用の有用性は、ラットモデルを用いてすでに報告されている。従って、本研究の目的は、ギャップを伴う反回神経断裂をマウス Sk-MSCs と PGA フェルトを用いたハイブリッド移植により再生し、その効果を機能的（声帯運動）かつ組織学的に証明し、断裂反回神経の新たな再生治療法を開発・確立することである。

Discussion (考察と展望)

一般的に細胞ペレットは液体浮遊した細胞群、即ち、細胞懸濁液と考えられる。そのような液体は、今回のような気管と食道の間の狭

い三角地帯では、周囲の圧力または表面張力による毛細管現象に強く影響を受ける。したがって、このような場所では、細胞移植の拡散を防ぐのは極めて難しいということである。このことは、その他のサイトカイン、増殖因子あるいは薬物等のような液体を添加した場合でも同様に起こると考えられ、液体は直ちに隙間に沿って上下に広がってしまう。しかし、今回の Sk-MSCs と PGA のハイブリッド移植では、移植した細胞の拡散を効果的に防ぐことで、細胞着床および、それらからの分泌因子の拡散までも防ぐことが可能であった。同様の PGA 細胞拡散予防効果が、胸腔内での気管支断端への細胞移植として報告されている。即ち、空所の組織表面で細胞の移動抑制が難しい箇所で（表面張力が発生する）、移植細胞を局所に留め置くことを可能とした。今回のハイブリッド細胞移植システムでは、さらにその他の物理的力、即ち気管・食道の動き、表面張力＋毛細管現象が加わった状況でも、より良い細胞拡散の防止を行ったことになる。逆説的に言えば、何らかの足場を用いた細胞拡散の予防が、組織や臓器の表面または間質に対する細胞・増殖因子・サイトカインの供給には必要不可欠であることが明らかとなったといえる。したがって今回の結果は、今後の細胞移植治療における幹細胞デリバリーシステムとし

て、重要な第一歩であったと確信している。

今回のハイブリッド移植では、上述の細胞拡散予防効果に加えて、従来の報告同様に、移植・生着した細胞は軸索を支えるシュワン細胞・神経周膜/内膜細胞・骨格筋細胞・内皮細胞に十分に分化していた。この細胞分化の結果、断裂神経の近位成長端の軸索は、断裂中央部で移植細胞の保護を受けてさらに末端部へと導かれ、遠位断端の目標軸索と再接続した。そして、その結果が今回の良好な機能回復を達成したとも考えられる。この点に関して、これまでの Sk-MSCs 移植に関連する報告（PGA を用いない報告）と良く一致している。したがって、今回のハイブリッド移植システムは Sk-MSCs の持つ細胞分化と組織再構築能力を全く妨害しなかったと判断できる。

損傷を受けた末梢神経系の機能的な回復においては、支配臓器（効果器）の機能回復が最も重要な治療目的である。この点を考慮して、本研究では喉頭鏡を用いて経口的に声帯運動を評価した。その結果、HY群で80%の回復を認めた。我々の知る限りこれは画期的な結果である。例えばその比較例として、ラット反回神経断裂モデルで、1mm神経ギャップをコラーゲン繊維で満たしたPGAチューブによる架橋を行った群と、直接縫合した対照群を比較した研究にお

いて、術後15週で両群ともに肉眼的な神経線維の接合が認められたが、より良い有髄線維形成と喉頭筋萎縮の予防が、チューブ治療群にのみ認められたと報告されている。しかし、実際の声帯運動の回復はどちらの群にも認められず、反回神経の伝導速度にも差がなかったとされており、形態学的データと機能的データの整合性に欠けている。

同様に、ラットにおける断裂反回神経の治療で、ラミニンおよびラミニン結合BDNF・GDNFを負荷したコラーゲンを足場とした治療群は自家神経移植群と比較して、発声や披裂軟骨の角度と複合筋活動電位および再生線維の著しい改善 ($p<0.05$) を認めたが、術後12週間でも、声帯運動の回復は認めなかったと報告されている。さらに、この研究は重要な点として、コラーゲンやラミニンの足場単独では十分な神経再生は得られなかったことを同時に報告している。このことに関連して、本研究でもPGA単独群ではほとんど機能回復は認められなかったことから、この点に関しては一致している。しかし、HY群では、生着したSk-MSCsからのBDNF・CNTF・GDNF mRNAのより高い発現 (3.7から24倍) が認められ、これらは末梢神経再生促進因子であることがすでに報告されている。これら

の情報を総合すると、以下の5つのキーポイントが明らかとなる。即ち、1)生体吸収剤による神経架橋は、神経断端の直接縫合や自家神経片移植よりも、むしろ良い回復をもたらす傾向ある。2)PGAはおそらく神経欠損架橋物質としてコラーゲンより優れていると考えられる。3)神経再生において神経栄養因子の応用には、PGAのような足場との組み合わせが重要である。4)PGAの使用は、添加された神経増殖因子を供給するより有利な方法である。そして、5)今回のハイブリッド移植システムは上記全ての条件を満たしており、かつ移植幹細胞が末梢神経支持細胞に分化し、実際に軸索伸展を補助することが加わったシステムと言える。本ハイブリッド移植システムでは、このような複合的・総合的な効果により80%におよぶ声帯運動の改善を可能にしたと考えている。

一方、神経再生において最も注意を払うべき合併症は、軸索が誤った目標と再接続してしまうこと、即ち、「過誤支配」が起こることである。これは神経の断端どうしを直接縫合した場合や自家神経片を直接縫合した場合にしばしばみられ、機能回復を制限する可能性を高めてしまうおそれがある。この点に関して本実験結果では、まず、近位部の既存神経断端部で正常対照群の約倍量におよぶ軸索

数がHY群で認められた。これは、断裂神経成長円錐部での活発な軸索形成を反映しているものと考えられる。そして、この倍量におよぶ軸索には「増殖再生し遠位側の断端と再結合したもの」と、

「増殖したが遠位側の断端と再結合せず変性し始めているもの」の両方が含まれていると考えられる。したがって、前述した大量の無髄で、小径の神経の集合は、術後8週時点での変性中、または変性した線維と考えられる。このことは、このような無髄小径軸索集団がHY群の近位断端で共通した傾向であることでも裏付けられる。

したがって、結果として断裂部手前で増加した軸索数は、欠損部の中央で減少し、断裂後部で対照群と同程度の個数となったと考えられる。これらのデータをまとめると、次のような機序が成立する；即ち、1) 再生の初期段階で、断裂した神経の近位端より軸索新芽が起こり、神経成長円錐内で軸索を一度増加させる。2) それらの軸索分岐は遠位方向へと伸展していく。3) そして目標の遠位軸索にたどり着いて再接続することで、再生が完了する。4) 結果として、余った軸索分岐は次第に脱髄と変性をきたして最終的に消失していくと考えられる。この機序の中で最も重要な点は、これらの軸索選択が神経欠損部の中央で起きたことと、この選択過程に移植さ

れたSk-MSCsが細胞分化（細胞生物学的貢献）と組織再構築（形態的貢献）、さらにパラクライン効果（神経成長因子の分泌）で関与したことである。これが今回のハイブリッド移植システムの優れた効果である。そして、この自然で細胞・組織が本来持つ能力による選択力が、軸索の誤接続を減少させ、正しい軸索の再接続を促して、80%におよぶ声帯運動の回復につながったと考える。このような概念は、神経断端どうしを直接縫合する場合より、むしろ3~5mmの間隔を持たせたチューブ・ブリッジの方が、より良い機能回復が認められたというランダム試験結果からも支持される。同様の、断端間の間隙による良好な回復結果がげっ歯目モデルでも確認されている。最後に、我々の研究グループは、マウスおよびヒトSk-MSCs/Sk-SCs の最適な抽出・培養増幅法の確立と、体性幹細胞としての神経修復能力に関する多くの報告を行ってきている。現在、これらの研究結果を臨床応用するための大型動物を用いた、前臨床研究をMMP（マイクロミニブタ）を用いて行っている。今回の研究結果が、将来の胸部外科手術における幹細胞移植治療の実践的な第一歩であると信じている。

Conclusion（結論）

今回のSk-MSCs+PGAフェルトのハイブリッド移植法は、今回細胞移植の足場として用いたPGAが移植幹細胞の多分化能を妨げること無く、細胞拡散を有意に防御し、Sk-MSCsの神経再生能を十分に発揮させることを示していた。従って、本法による幹細胞とサイトカインの供給システムは実用的であり、物理的に極めて流動的な条件下に位置する反回神経の断裂再生に有効であると考えられた。

