

ラットモデルにおける PGA conduit、DFAT を使用した顔面神経再生能の検討

Study of facial nerve regeneration using PGA conduit and DFAT cells
in a rat model

藤巻 弘¹⁾, 松峯 元¹⁾, 尾崎弘展³⁾, 植田禎史³⁾, 亀井 航²⁾, 清水真理¹⁾,
橋本一輝²⁾, 新美陽介²⁾, 風間智彦⁴⁾, 松本太郎⁴⁾, 宮田麻里子³⁾, 櫻井裕之²⁾
Hiroshi FUJIMAKI¹⁾, Hajime Matsumine¹⁾, Hironori OZAKI³⁾, Yoshifumi Ueta³⁾, Wataru
KAMEI²⁾, Mari SHIMIZU¹⁾, Kazuki HASHIMOTO²⁾, Yosuke NIIMI²⁾, Tomohiko KAZAMA⁴⁾,
Taro MATSUMOTO⁴⁾, Mariko MIYATA³⁾, Hiroyuki SAKURAI²⁾

¹⁾東京女子医科大学八千代医療センター 形成外科, ²⁾東京女子医科大学病院 形成外科, ³⁾東京女子医科大学医学部生理学講座, ⁴⁾日本大学医学部機能形態学系細胞再生・移植医学分野

【要旨】

生体分解性人工神経誘導管内(PGA conduit)にDedifferentiated fat cell (DFAT) を封入したハイブリッド型人工神経を作成し、顔面神経再生能力についてラット動物実験モデルを用いて検証した。

【はじめに】

現在、臨床で使用されている生体分解性人工神経誘導管内(PGA conduit)は末梢神経の再建に有用とされている。また Dedifferentiated fat cell (DFAT)は適切な分化誘導培地にて培養することにより、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞、骨格筋細胞、筋線維芽細胞などに分化する事が既に報告されている。今回我々は PGA conduit に Dedifferentiated fat cell (DFAT) を封入したハイブリッド型人工神経を作成し、ラット動物実験モデルを用いて顔面神経再生能力について検証した。

【対象及び方法】

吸入麻酔下にルイス系ラットの顔面神経 Buccal branchを露出し7mmの神経欠損を作成した。次にラットの皮下脂肪組織から作成したDFATを1型コラーゲンを足場としてPGA conduitに充填したハイブリッド型人工神経(DFAT群)を作成し、先の神経欠損部に顕微鏡下に移植した¹⁾。PGA conduit単独(control群)を同様に神経欠損部に移植し、術後13週に逆行性トレーサーを用いた神経再支配を確認した後、再生神経の組織学的、生理学的比較検討を行なった。

【結果】

Myelinated fiberの平均数ではDFAT群(1605 ± 806.23)、control群(543.6±478.66)でありDFAT群が人工神経群に対して有意に高値であった。Myelin thicknessではDFAT群(0.57 ± 0.17 μm)、control群(0.46 ± 0.14 μm)でありDFAT群がcontrol群に対して有意に厚かった。CMAPのAmplitudeはDFAT群(2.84 ± 2.47 mV)、control群(0.88 ± 0.56 mV)でありDFAT群、

control群で有意差は認めなかったが、Whisker motionはDFAT群($9.22 \pm 0.65^\circ$)、control群($1.9 \pm 0.84^\circ$)でありDFAT群はcontrol群に対して有意に高値であった。

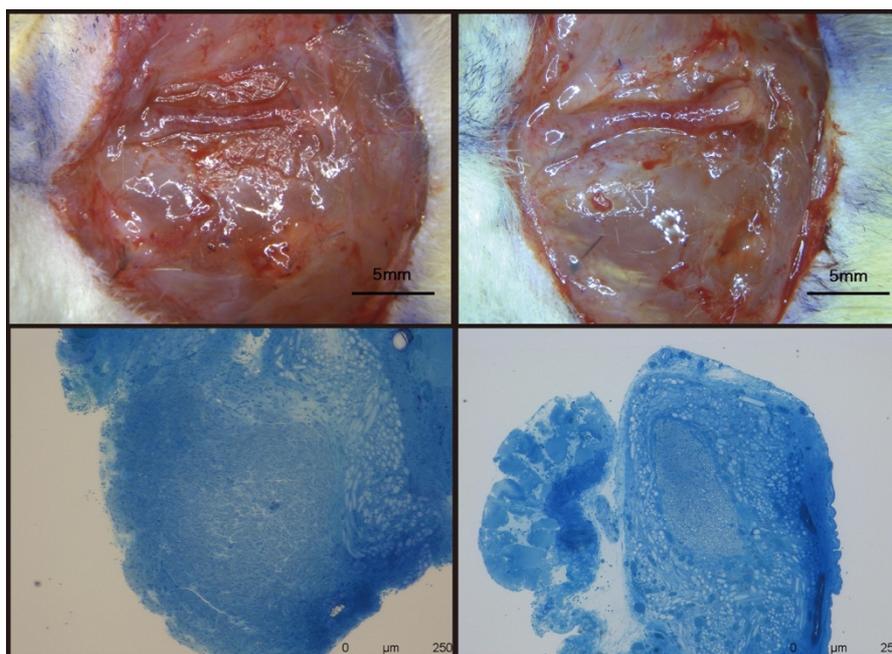


図 2. 再生神経の顕微鏡所見

上段左: DFAT 含有 PGA conduit 光学顕微鏡所見

上段右: PGA conduit 単体 光学顕微鏡所見

下段左: DFAT 含有 PGA conduit トルイジンブルー染色顕微鏡所見

下段右: PGA conduit 単体 トルイジンブルー染色顕微鏡所見

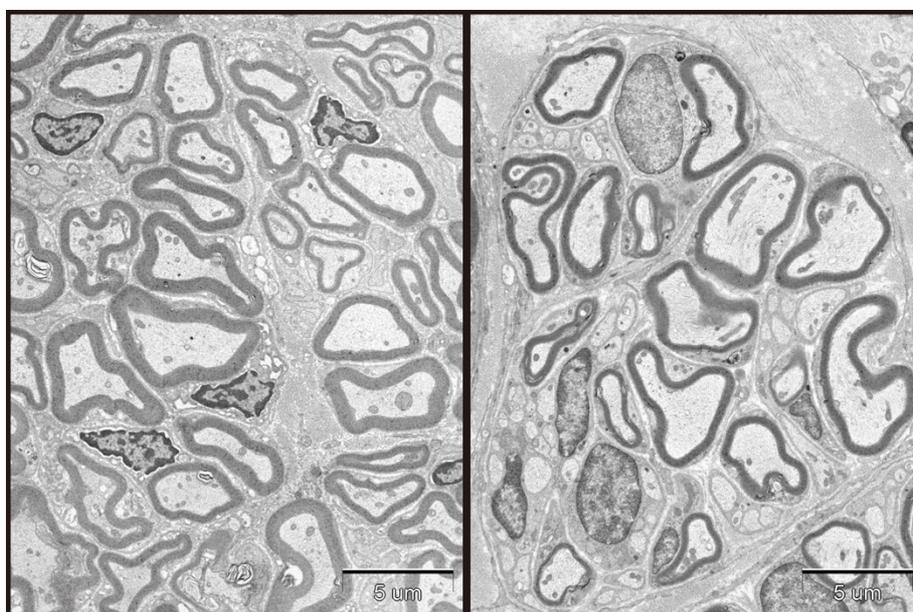


図 3. 再生神経の電子顕微鏡所見

左: DFAT 含有 PGA conduit TEM 所見

右: PGA conduit 単体 TEM 所見

【考察】

本研究では、現在で臨床使用されている PGA conduit 単体と DFAT 含有 PGA conduit とで顔

面神経再生能を組織学的、生理学的に比較検討し、DFAT 群の著しい神経再生促進効果を確認することができた。本実験において DFAT を充填することにより神経再生が促進された理由として第 1 に DFAT からの成長因子の放出である。タンパク質アレイ分析では血管内増殖因子(VEGF)を多量に放出されるとされる。第 2 に DFAT の多能性である。我々の研究グループは二重免疫染色によって、緑色蛍光色素陽性の DFAT が緑色蛍光色素蛋白/S100 二重陽性のシュワン細胞に分化したことを報告してきた²。

外傷や悪性腫瘍切除後などによる顔面神経損傷に対する治療は自己神経移植にとってかわる様々な幹細胞の移植が試みられており、今回実験で用いた DFAT もそのうちの一つである。DFAT は以下の特徴を有している^{3,4}。

- ・Adipose-derived stem cell(ADSC)や stromal vascular fraction(SVF)と比較し成熟脂肪細胞から調製され、複雑な細胞選択なしに高純度の細胞が得られる。
- ・成熟脂肪細胞は少量の採取(1g 以下)しか必要とせず、採取部位の犠牲が少ない。
- ・遺伝子操作やウイルスベクターを使用せずに簡単な方法で大量の細胞を短時間で調製できる。

我々の研究グループはシリコンチューブを使用し、DFAT を充填することにより顔面神経再生が促進されることを報告してきたが、今回は臨床により近づける為に PGA conduit を使用した。その結果、PGA conduit においても DFAT は組織学的、生理学的に顔面神経再生が促進される可能性を示すことができた。

【結語】

ラットの 7 mm の顔面神経欠損モデルでは、PGA conduit への DFAT の充填が、再生神経軸索の増殖、成熟、および生理学的機能を有意に促進し、PGA conduit の機能をさらに改善する可能性を示した。

【参考文献】

1. Matsumine, H., Sasaki, R., Takeuchi, M., Yamato, M., Sakurai, H. Surgical procedure for transplanting artificial nerve conduits for peripheral nerve regeneration. *Plast Reconstr Surg* 2011;128:95e-97e.
2. Matsumine, H., Takeuchi, Y., Sasaki, R., et al. Adipocyte-derived and dedifferentiated fat cells promoting facial nerve regeneration in a rat model. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:686-697.
3. Matsumoto, T., Kano, K., Kondo, D., et al. Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008;215:210-222.
4. Obinata, D., Matsumoto, T., Ikado, Y., et al. Transplantation of mature adipocyte-derived dedifferentiated fat (DFAT) cells improves urethral sphincter contractility in a rat model. *Int J Urol* 2011;18:827-834.