

今泉敏史 論文内容の要旨

主 論 文

Acceleration of Sensory Neural Regeneration and Wound Healing with Human Mesenchymal Stem Cells in Immunodeficient Rats

免疫不全ラットにおけるヒト間葉系幹細胞を用いた知覚神経再生促進と創傷治癒促進

Toshifumi Imaizumi, Sadanori Akita, Kozo Akino, Akiyoshi Hirano

今泉敏史、秋田定伯、秋野公造、平野明喜
STEM CELLS;25:pp2956-2963,2007

長崎大学大学院医学研究科医療科学専攻
(指導教授：平野明喜教授)

緒 言

知覚神経は下肢の創傷治癒に大きく関与しており、特に糖尿病などでは知覚神経麻痺と血流障害により創傷治癒の遅延が起こることが良く知られている。これまでの研究によりヒト間葉系幹細胞(以下 hMSCs と略す)は神経・血管病変の治療に応用可能と考えられている。また、線維芽細胞増殖因子 FGF-2 はマウスにおいて坐骨神経破砕後に神経再生を促進させることが報告されている。

hMSCs と FGF-2 の併用治療は創傷治癒においても効果が確認されており、神経再生にとって有用であると期待できる。そこで、われわれはラットの伏在神経を切断・結紮後、血管茎付き腹壁組織弁を通して hMSCs と FGF-2 の投与を行い、末梢神経再生と足底に作成した創の創傷治癒を検討した。

対象と方法

最初に、移植後の hMSCs の局在を明確にするため緑色蛍光タンパク質(以下 GFP と略す)cDNA を遺伝子導入した GFP-hMSC 細胞を作成し以後の実験に用いると共に、その遺伝子導入効率と細胞増殖性を検討した。次に、50 匹の雄性ヌードラット (F344/ NJCl-rnu) の大腿血管と伏在神経を切断・結紮し血管茎付き腹壁結合織膜弁で同部を2週間被覆した。この組織弁の栄養血管内に GFP-hMSC 細胞、FGF-2 またはその両方の組み合わせを注入した。同側足底に 4mm のパンチ生検器具を用いて全層欠損創を作成した。ラットを各群 10 匹の 5 群に分けて検討した。①非再建群; 伏在神経と大腿血管の両方を切断・結紮した後再建を行わない群、②コントロール群(血管茎付き浅腹壁組織弁のみ); 5 μ l の DMEM のみを浅腹壁動脈を通して注入した群、③ hMSC 群; 5 $\times 10^6$ 個の GFP-hMSCs を含む DMEM 溶液の 5 μ l を浅腹壁組織弁へ移植注入した群、④ FGF-2 群; 10 μ g の FGF-2 を含む DMEM 溶液の 5 μ l を腹壁組織弁へ移植注入した群、⑤併用群(n=10); 5 $\times 10^6$ 個の GFP-hMSCs と 10 μ g の FGF-2 の両方を浅腹壁組織弁へ移植注入した群である。

各群につき、組織血流量、神経伝導速度、足の創傷治癒、組織、免疫染色組織を検

討した。組織血流測定には非接触レーザー血流計(ALF 21N、Advance 社)を用い、最大知覚神経伝導速度はデジタルスティミュレータ(モデル PG4000A、Cygnus Technology 社)、閉鎖定電流源刺激絶縁体(モデル SIU90、Cygnus Technology 社)及び細胞外増幅器(モデル ER-1、Cygnus Technology 社)を使用して計測した。創傷のサイズは、仰臥位で6メガ d.p.i.デジタルカメラ(サイバーショット、ソニー)とマッキントッシュパーソナルコンピュータのイメージ分析器(NIH イメージ ver 1.62)を用いて写真解析した。ヘマトキシリン・エオジン染色による組織像、軸索再生マーカー (GAP-43)、神経線維 S-100 抗体の免疫染色組織像で検討した。

結 果

hMSCs への GFP の DNA 導入効率は GFP-hMSCs の 1 継代目から 3 継代目のインキュベーション時間が 3 時間か 6 時間の細胞で効率がよかった。GFP- hMSCs の増殖は 3 時間か 6 時間のインキュベーション時間の 1 継代目がコントロール(遺伝子導入をしていない細胞)と同等の増殖を示した。したがって、3 時間か 6 時間のインキュベーション時間の 1 継代目の GFP-hMSCs を生体内実験で利用した。

組織血流は hMSC 群と併用群は、それぞれ 1 週間目、2 週間目ともに有意な増加を認めた。2 週間目で併用群は最も有意な血流増加を示した。2 週間目の最大神経伝導速度は併用群で手術前のレベルの 70%に回復した。同側足の創傷治癒は併用群の 1 週間目で有意に改善した。組織学的には併用群は血管と神経は形態を保ち、再生神経は GAP-43 で免疫染色され、実験 2 週間目の併用群で、再生神経は S-100 発現による神経再伸展を顕著に認めた。

考 察

知覚神経の再生、血流、および創傷治癒は血管茎付き筋膜弁を通した hMSC と FGF-2 の投与によって改善した。GAP-43 の発現部位は主に神経と動脈の間の神経周囲組織であったことから、血流増加が神経再生を促したと示唆された。S-100 蛋白を用いた免疫組織像で示された神経線維の再生は併用群で観測され、このことは神経再生に関する新知見と考えられた。本実験では 1 週間目と 2 週間目で FGF-2 群は非再建群と比べて組織血流増加を認め、神経再生と神経伝導速度の回復には神経周囲の血流改善が貢献することが明らかになった。組織血流は GFP- hMSC 細胞と FGF-2 を併用した群で FGF-2 群と比較してもより増加しており、GFP- hMSC 細胞の血流増加作用を示唆した。このことは、2 層のコラーゲンスポンジを使用した別の創傷治癒モデルで観測したように、FGF-2 が動脈茎を通して血流増加を引き起こすだけでなく、直接 hMSCs に対して増殖と分化の効果を有する事を示唆した。

この研究では血管茎付き腹壁組織弁を介してヒト間葉系幹細胞をサイトカインとともに投与すると、知覚と血流の低下した患肢の創でも創傷治癒を促進することが証明され、臨床的に同様な知覚と血流の低下状態を呈する外傷や糖尿病などでも創傷治癒遅延を改善する可能性が示唆された。