

主論文の要旨

Safety and feasibility of fat injection therapy with adipose-derived stem cells in a rabbit hypoglossal nerve paralysis model: A pilot study

ウサギ舌下神経麻痺モデルにおける脂肪由来幹細胞を用いた
脂肪注入療法の安全性と実現可能性: A pilot study

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
頭頸部・感覚器外科学講座 耳鼻咽喉科学分野

(指導: 曾根 三千彦 教授)

和田 明久

【背景と目的】

脂肪由来幹細胞 (adipose-derived stem cells: ADSCs) は、脂肪組織に存在し脂肪細胞の前駆細胞として機能する。幹細胞は脂肪、骨、軟骨といった間葉系細胞への多分化能を有し、従来は骨髄から生成する方法がとられていた。近年では脂肪組織からも生成可能となり、骨髄よりも低侵襲かつ大量に採取が可能であることから ADSCs を用いた再生医療が注目されている。現在では血行再建、心筋再生、乳房再建、尿失禁、腎障害の低減などの領域で臨床試験が行われている。

一方、耳鼻咽喉科領域における臨床課題として、頭頸部癌治療や神経筋疾患、加齢による舌や咽頭の筋肉の欠損・委縮により嚥下時の圧力形成が不十分になることで生じる嚥下障害が挙げられる。それはすなわち QOL の低下に直結するため、改善策として様々な介入が行われているが、未だ満足できるような治療介入のコンセンサスは得られていない。そこで我々は、ADSCs を用いた嚥下改善への第一歩となるパイロットスタディを考案した。

本研究の目的は、まず中型動物であるウサギの舌下神経を離断することにより片側性舌萎縮モデルを確立し、安全性を評価する。さらに、脂肪注入術に ADSCs を高濃度で混ぜることで、舌での筋線維の萎縮が改善するかを検討する。

【方法】

12 匹のウサギを ADSCs+脂肪群 (n=4)、脂肪群 (n=4)、および対象群 (n=4) の 3 グループに無作為に割り付けた。全てのウサギの左舌下神経を離断し、追跡期間 (8 週間) 中に体重や摂食量などの状態を確認した。神経離断後 4 週間でウサギの舌の除神経側に、ADSCs+脂肪群には ADSCs 0.5mL+脂肪組織 0.5mL+生理食塩水 (PBS) 0.5mL を、脂肪群には脂肪組織 1.0mL+PBS 0.5mL を、対照群には PBS 1.5mL を舌先端から 2cm 後方に注入した。注入後は脂肪の漏出を防ぐために、注入部位を綿棒で 5 分間圧迫した。(Fig1)

治療後 8 週間でウサギを安楽死させ、切除した舌を収集しホルマリン固定した後にパラフィン包埋した。内舌筋の変化を評価するために、1 匹あたり 5 つの連続した HE 染色スライドを作成し評価することで注入した周囲の筋線維を分析した。また、免疫組織化学染色として筋線維再生過程で初期に発現する、PAX7 の発現を確認した。

【結果】

ADSCs+脂肪群・脂肪群・対照群の全てのウサギにおいて、神経離断後も食物摂取量は減少しなかった。また、脂肪採取や舌下神経離断の術中に特に合併症は生じず、術後創部離開や感染等の周術期合併症も見られなかった。神経離断後 4 週間と 8 週間の時点で、3 群間に有意な体重変化は見られなかった ($p>0.05$)。また、神経離断後 4 週間での舌の状態を注意深く観察したところ、全てのウサギの患側舌で線維束性収縮が確認できた。これらは、ウサギ舌下神経麻痺モデル作成が安全に可能であることを示している。

8週間後に安楽死させたウサギを解剖し、舌を切離採取し 4%パラホルムアルデヒドで固定した。まずは対照群において、左右の舌の萎縮を比較したところ、神経離断側の舌は健側と比較して視診上も萎縮が確認できた。その後、それぞれのウサギの舌標本を作成し、各々 5 枚ずつ HE 染色スライドを作成し、筋繊維を顕微鏡下に評価した。視診上と同様に HE 染色スライドにおいても舌の神経離断側の筋線維断面積は有意に小さかった ($405 \pm 220 \mu\text{m}^2$ 対 $602 \pm 28 \mu\text{m}^2$, $p < 0.05$)。また同様に神経離断側の筋繊維短径も優位に短かった。

ADSCs による脂肪注入療法の効果を評価するために、3 グループ間で神経切断側の内舌筋の面積及び短径を比較した。12 匹のウサギ (1 匹あたり 5 枚) からの HE スライドから合計 3780 個の筋線維を分析して評価した。ADSCs+脂肪群は、脂肪群及び対照群と比較して、筋線維断面積がより大きいことが示された (ADSCs+脂肪群 対 脂肪群 対 対照群: $582 \pm 312 \mu\text{m}^2$ 対 $405 \pm 220 \mu\text{m}^2$ 対 $413 \pm 226 \mu\text{m}^2$; $p < 0.05$)。同様に、ADSCs+脂肪群では、脂肪群及び対照群と比較して、筋線維の短径が優位に短かった ($24 \pm 8 \mu\text{m}$ 対 $20 \pm 6 \mu\text{m}$ 対 $20 \pm 7 \mu\text{m}$, $p < 0.05$)。 (Fig2)

また、免疫組織化学染色として PAX7 の発現を確認したところ ADSCs+脂肪群の脂肪組織周囲で発現が多く確認された。

【考察】

脂肪由来幹細胞 (ADSCs) は、骨髄間葉系幹細胞と同様に、脂肪細胞の前駆細胞として機能するが、骨および軟骨の間葉細胞に分化する多能性もある。このため、細胞、足場、成長因子を含む 3 つの要素は、組織や臓器の再生、および再生療法の長期的な効果を達成するために不可欠である。本研究においては萎縮した舌に注入された ADSCs と自家脂肪の混合組織 (足場および成長因子) は、神経離断された舌での組織再生を支援する。ADSCs+脂肪群は対照群および脂肪群と比較して、有意な筋線維の肥大を示し、ADSCs が神経離断後の筋萎縮の回復に不可欠であることを示している。今回の結果は、声帯麻痺動物モデルで高濃度 ADSCs を用いた注入療法を用いて甲状軟骨筋線維肥大を起こしたことを示した以前の我々の研究と一致している。また、男性の腹圧性尿失禁患者に対する ADSCs 注入療法においても長期的な有効性と安全性が臨床試験で示されている。我々の研究の結果は、声帯麻痺への注入法と同様に舌や咽頭の萎縮や麻痺等に応用でき、それはすなわち嚥下障害患者への適応も期待される。

また、我々は今回ウサギを舌萎縮モデルとして選択し脂肪注入療法の安全性と実現可能性を評価したが、ウサギを選択した理由としては、ウサギの舌下神経の解剖及び分岐が人間のそれと非常に類似しているためである。

一方、本研究の臨床応用にはいくつかの制限がある。まず、神経離断された舌に注入された ADSCs 及び脂肪のうち実際に注入された量は不明確であり、自家脂肪の吸収率を正確に評価できていない。3 群での脂肪吸収率の評価、及び PKH-26 などの ADSCs の細胞標識を用いて追跡することは、今後の研究で必要となるかもしれない。また、ウサギ舌下神経麻痺モデルで ADSCs による脂肪注入の安全性と効率を評価し

たが、フォローアップ期間は短く(8 週間)、筋組織の再生を評価するには不十分だった可能性がある。神経離断された舌における ADSCs の役割を評価するには、長期フォローアップでの前臨床試験が必要かもしれない。

【結論】

ウサギにおいて舌下神経を切断することで、安全に片側舌萎縮モデルを作成することができた。脂肪と高濃度の ADSCs を舌に注入することで、神経離断後の筋萎縮を防ぐことが示され、今後のヒトへの臨床応用が期待できる。