

主論文の要旨

**SUCCESSFUL TRANSPLANTATION OF MOTONEURONS
INTO THE PERIPHERAL NERVE DEPENDS ON THE
NUMBER OF TRANSPLANTED CELLS**

〔 末梢神経内への運動ニューロンの奏功する移植は
移植細胞数に依存する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 手の外科学分野

(指導：平田 仁 教授)

加藤 宗一

【緒言】

神経系疾患に対する治療戦略として、細胞移植治療が注目されてきている。しかしながら、中枢神経の複雑な構造を再建するためには非常に多数の細胞数が必要となり、未分化な細胞が混入することによる腫瘍化のリスクがある。一方、末梢神経への細胞移植は Erb らが 1993 年に末梢神経内への胎児運動ニューロン移植を動物実験レベルで報告して以来、いくつかの報告がされてきた。我々は中枢神経から軸索の連続性が絶たれた脱神経筋を再建するアプローチとして、末梢神経内に運動ニューロンを移植する方法を研究、報告してきた。我々はこの手法を ‘motoneuron integrated striated muscle’ (MISM) と命名し、これにコンピュータープログラムされた機能的電気刺激 (FES) を組み合わせることで麻痺筋の再建および運動再建を試みている。しかしながら、この手法において筋の機能が十分に回復するために必要な細胞数はまだ知られていない。本研究の目的は脱神経筋に対する MISM による再建において、十分な機能を獲得するための最適な運動ニューロンの細胞数を決定づけることである。

【対象および方法】

8 週齢の F344 ラットを用い、左坐骨神経切断による麻痺モデルを作成した (Fig. 1A, B)。神経切断から 1 週後に左腓骨神経内に細胞を移植した (Fig. 1C)。移植細胞数の違いによって 2 群 (グループ A : 20 万、グループ B : 100 万) に分け各群 6 匹ずつとした。移植する細胞は胎生 14 日の F344 ラットの腹側脊髄細胞を酵素処理によって分離し、B27、GlutaMAX、N-2 supplement を加えた Neurobasal 培地に浮遊させた状態で腓骨神経内に注射することによって移植した。移植後 12 週で評価を行い、電気生理学的解析として、前脛骨筋の複合筋活動電位 (CMAP) を測定した。筋機能解析は細胞移植を行った腓骨神経に対して手術的に電極を設置し (Fig. 1D)、電気刺激を与えることで前脛骨筋を収縮させ、足関節角度 (下腿と足部のなす角) を測定し筋の機能を評価した。組織学的解析として、腓骨神経において再生した軸索数、軸索横断面積を計測した。また、前脛骨筋の筋質重量、筋線維横断面積の計測、神経筋接合部におけるアセチルコリンレセプター (AChR) の形態評価を行った。

【結果】

電気生理学的解析において、平均運動神経伝導速度 (MCV) はグループ B で速く (グループ A : 8.5 ± 0.7 m/s, グループ B : 12.4 ± 1.0 m/s, $P = 0.011$, Fig. 2A)、CMAP の平均振幅はグループ B で大きかった (グループ A : 0.7 ± 0.2 mV, グループ B : 1.6 ± 0.4 mV, $P = 0.034$, Fig. 2B)。筋機能解析において、足関節角度はグループ B で小さく、すなわちグループ B でより強い背屈を示す結果であった (最大収縮時足関節角度, グループ A : $75^\circ \pm 8^\circ$, グループ B : $27^\circ \pm 5^\circ$, $P = 0.002$, Fig. 2C, D)。腓骨神経に再生した有髄軸索のトルイジンブルー染色を Figure 3A, B に示す。有髄軸索の横断面積に統計学的有意差はなかったが (グループ A : $11 \pm 0.8 \mu\text{m}^2$, グループ B : $13 \pm 1.2 \mu\text{m}^2$, Fig. 2F)、軸索数はグループ B で多かった (グループ A : 104 ± 17 , グループ B :

317 ± 33, Fig. 2E, $P < 0.001$)。前脛骨筋の質重量はグループ B で大きく(グループ A : 0.046 ± 0.002% BW, グループ B : 0.063 ± 0.003% BW, Fig. 2G)、筋線維横断面積もグループ B で大きかった(グループ A : (187.0 ± 7.3 μm^2 , グループ B : 512.3 ± 45.8 μm^2 , Fig. 2 H)。神経筋接合部の組織像を Figure 3G に示す。再生軸索が AChR に到達し共染していることが示された。軸索が到達、共染している AChR は神経再支配化されていると考え、その割合を算出し、グループ B で神経再支配された AChR が多いことが示された(グループ A : 40.6 ± 7.7%, グループ B : 82.1 ± 5.9%, $P = 0.005$, Fig. 4)。

【考察】

本研究で移植に用いた胎児ラット腹側脊髄細胞を 16 時間培養し、免疫染色を施行したところ、islet-1 陽性細胞の割合は約 83%であった。すなわち、各群における移植時点での運動ニューロン細胞数はそれぞれ約 17 万、83 万であると推定される。このうち、後者において全てのラットが少なくとも MMT グレード 3 以上の筋力を発生することが確認された。

末梢神経への神経細胞移植はその構造が中枢と比べて単純であること、治療機会の扉が広いという理由から、神経細胞移植治療の理想的な標的であると考えられる。

本研究で用いた移植細胞は胎児ラット脊髄細胞であるが、Yohn らはマウス ES 細胞由来の運動ニューロンを末梢神経内に移植する研究を報告し、その生着に成功しており、今後は ES 細胞や iPS 細胞由来の運動ニューロン細胞による麻痺再建が期待される。

本方法では再建した運動ユニットは中枢神経から独立しており、筋収縮を起こすためには FES のような神経刺激装置やブレイン・コンピュータ・インターフェイスの技術応用が必要となる。我々は筋電図と外部センサーのフィードバックによってコントロールする筋電義手について研究しており、これらの医用生体工学を応用することで、筋収縮をコントロールすることができると考えている。

【結論】

本研究において筋機能を再建するために最適な運動ニューロンの数を検討し、推定 83 万の移植および移植神経に対する電気刺激によって MMT グレード 3 以上の筋力発生が示された。麻痺筋に対する治療戦略として、MISM に FES を組み合わせる本方法は、近年進歩している幹細胞研究および医用生体工学の臨床応用の対象になり得ると考える。