

～間葉系幹細胞移植による末梢神経再生～

Effects of Canine and Murine Mesenchymal Stromal Cell Transplantation on Peripheral Nerve Regeneration

Diego Noe Rodriguez Sanchez et al. (2017) *International Journal of Stem Cells Vol. 10*

«Intro»

- ・細胞治療は間葉系幹細胞がもつ再生能力から神経損傷の治療法として注目されている。
 - ・本研究では坐骨神経欠損ラットモデルでマウス脂肪幹細胞（mMSC）およびイヌ脂肪幹細胞（cMSC）と脱細胞化静脈を組み合わせて神経再生効果を調査、比較する。
- ※「脱細胞化生体組織」とは、動物から採取した生体組織から、細胞を取り除いて残った組織のこと。主成分はコラーゲンなどの細胞外マトリックスといったタンパク質。

«Experimental Design»

- ・ラット：40匹（♂20匹、♀20匹、体重200-300g、平均日齢90日）
 - ・ラットを各グループ8匹ずつ5つのグループに分ける。
 - グループ1（CG）：コントロール（神経切除なし）
 - グループ2（DG）：坐骨神経切除（10mm）左側を切除し、右側はコントロールとして保存。
 - グループ3（VG）：坐骨神経切除した部位に脱細胞化静脈にHBSSを13μl充填して縫合。
 - グループ4（cMSC）：坐骨神経切除した部位に脱細胞化静脈にQtracker 655でラベリングしたイヌADSCを 10^6 個を溶解した液充填して縫合。
 - グループ5（mMSC）：坐骨神経切除した部位に脱細胞化静脈にQtracker 655でラベリングしたマウスADSCを 10^6 個を溶解した液を充填して縫合。
- ※HBSS（Hanks' Balanced Salt Solution）：平衡塩溶液

«ADSC»

- ・イヌおよびマウスの皮下脂肪を採取し、ADSCを分離、培養。
- 本研究ではポジティブマーカーをCD44、CD90とし、ネガティブマーカーをイヌではCD34、CD45、CD105、マウスではCD11b、CD31、CD45としてフローサイトメトリー測定を行った。
- ・Fig1には、イヌの測定結果を示す
- イヌADSCでは、CD44(+),CD90(+),CD34(-),CD45(-),CD105(-)
マウスADSCではCD44(+),CD90(+),CD11b(-),CD31(-),CD45(-)
であった。

・それぞれの MSC 生存率 : 70-80%

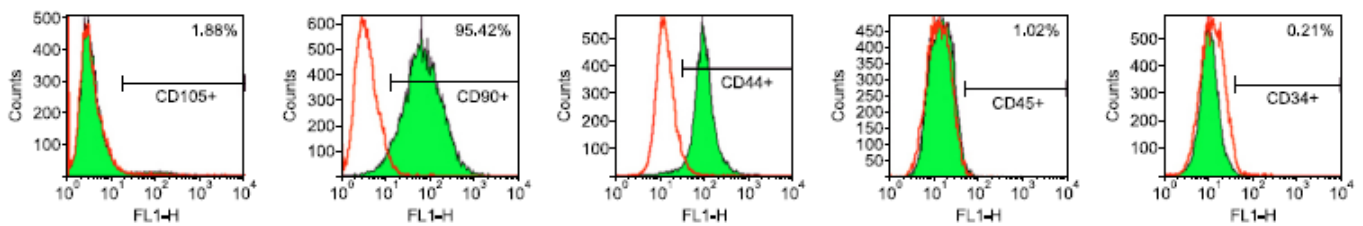


Fig. 1. Surface markers expression in the canine Ad-MSC. The white area indicates the negative control of the respective marker and the green area represents the sample tested.

《坐骨神経機能指標 (SFI)》

- ・SFI 測定 : Day9,18,27,35 に実施。
- ・インクで足跡を取り、スコア化して測定。(0~-100 で測定。0 が通常、値が小さくなるほど機能が低下)

《神経筋電図検査 (ENMG)》

- ・潜時 (m/s) と振幅 (mV) を坐骨神経切除前と Day35 に測定。

《形態学的検査》

- ・神経の数 (N)、密度 (N/mm²) を Day35 に剖検して測定。
- ・頭側脛骨量と腓腹筋量の左右肢比較。
- ・cMSC と mMSC グループは坐骨神経の中心部を採取し、ラベリングされた MSC を蛍光顕微鏡 (650nm、×10,40) で追跡調査。

《免疫組織学的検査 (IHC)》

- ・脳由来神経栄養因子 (BDNF) と S-100 タンパク (坐骨神経に発現) を Day35 に測定。
- ・抗 BDNF 抗体および抗 S-100 抗体を用いて免疫組織学に測定

《結果》

- ・SFI : Day9,18,27 では各群に有意差はなかった。Day35 では mMSC(-53.38)と DG(-90.00),GV(-86.73),cMSC(-86.6.)に有意差がみられた。(Fig2)

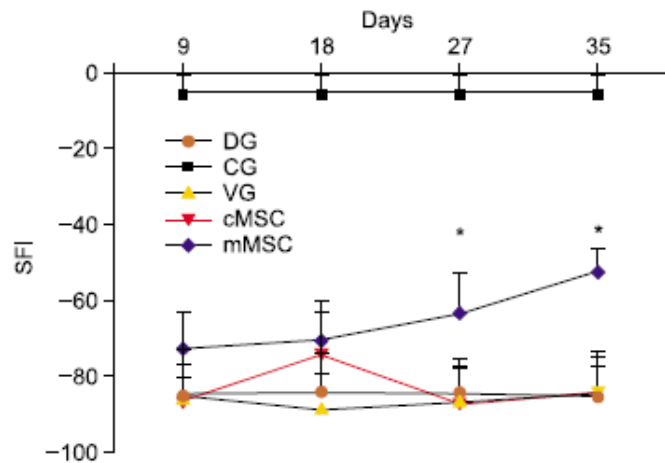


Fig. 2. Graph representing the typical footprint obtained from a normal animal with their respective variables and gait assessment. The effect of MSC transplant on the nerve sciatic function was determined in CG (n=7), DG (n=7), VG (n=7), cMSC (n=7), mMSC (n=7) on 9, 18, 27 and 35 days after surgery (1~4 weeks). *Difference among the groups ($p < 0.05$ tested by repeated measures Friedman).

- ENMG 潜時 : DG, VG \Rightarrow Day0; 1.73m/s、Day35; 値を示さなかった。
 mMSC \Rightarrow Day0; 1.75m/s、Day35; 3.1m/s ($p < 0.05$) コントロールに近い値を示した。
 cMSC \Rightarrow Day0; 1.61m/s、Day35; 1.73m/s ($p > 0.05$)
- ENMG 振幅 : DG \Rightarrow Day0; 15.03mV、Day35; 0.0mV ($p < 0.05$)
 VG \Rightarrow Day0; 16.95mV、Day35; 0.0mV ($p < 0.05$)
 このことは有髄繊維が筋肉に届いていないことを示す。
 cMSC \Rightarrow Day0; 16.95mV、Day35; 3.23mV ($p < 0.05$)
 mMSC \Rightarrow Day0; 17.45mV、Day35; 9.76mV ($p < 0.05$) コントロールに近い値を示した。

(Fig3)

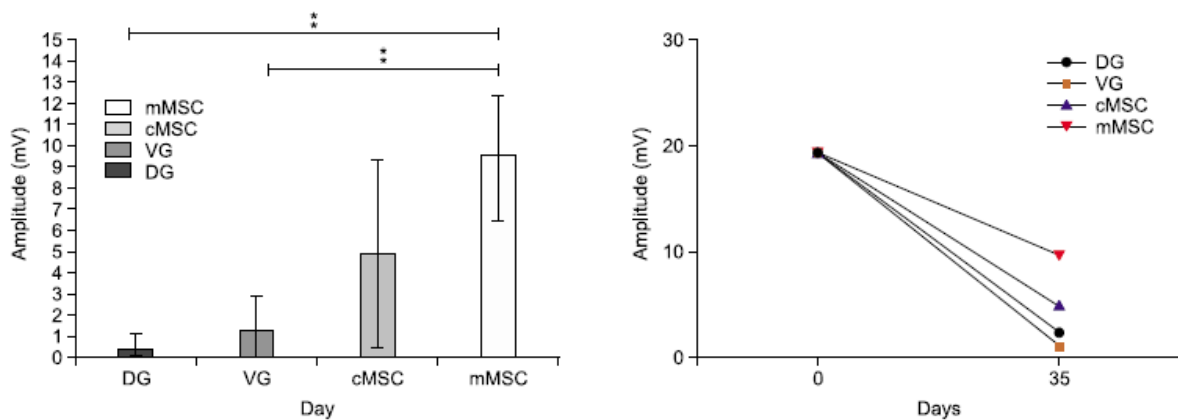


Fig. 3. Graph depicting the distal amplitude of the experimental groups on day 0 before the experimental procedures and day 35 after repair of the left sciatic nerve. The effect of MSC transplantation on the sciatic nerve on ENMG was determined in DG (n=7) CG (n=7), VG (n=7), cMSC (n=7), mMSC (n=7). *Difference among the groups ($p < 0.05$).

•神経密度 (N/mm²) : DG;2.2±0.71、VG;3.65±2.65、cMSC;4.8±1.97、mMSC;2.43±0.29

•神経数 (N) : DG;431.5、VG;1353、cMSC;2802、mMSC;1499

•神経密度と神経数において、DG と cMSC とで有意差がみられた。(P<0.05)

(Fig4)

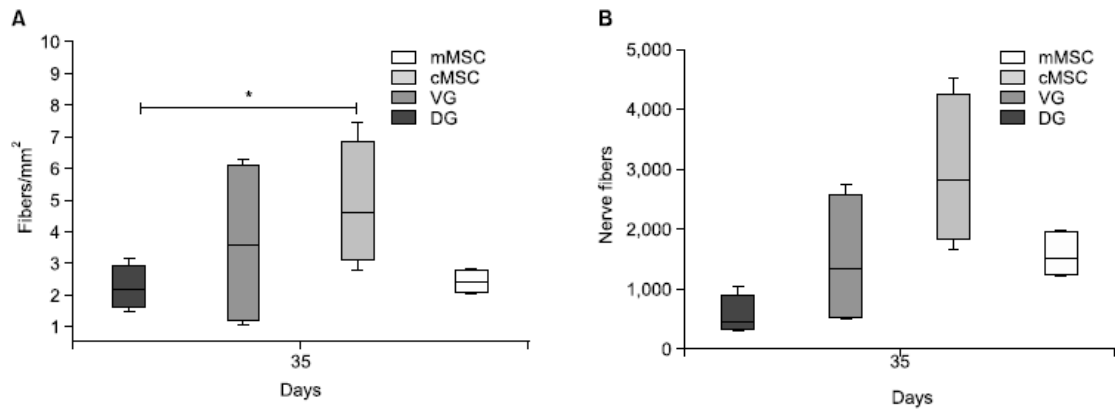


Fig. 4. Graphs representing the density of nerve fibers (A) and the total number of fibers (B). Groups CG (n=7), DG (n=7), VG (n=7), cMSC (n=7) and mMSC (n=7), at the end time of the experiment (35 days). *Difference among the groups (p<0.05).

•S-100 発現⇒cMSC と mMSC は DG と VG に比べて高かった。(Fig.5)

•Fig5 : A,D,G,J,M⇒神経線維断面 (10×)

B,E,H,K,N⇒軸索密度 (100×)

C,F,I,L,O⇒S-100 発現 (40×)

P,Q⇒ラベリングした cMSC。cMSC の移動がみられる (図中矢印)

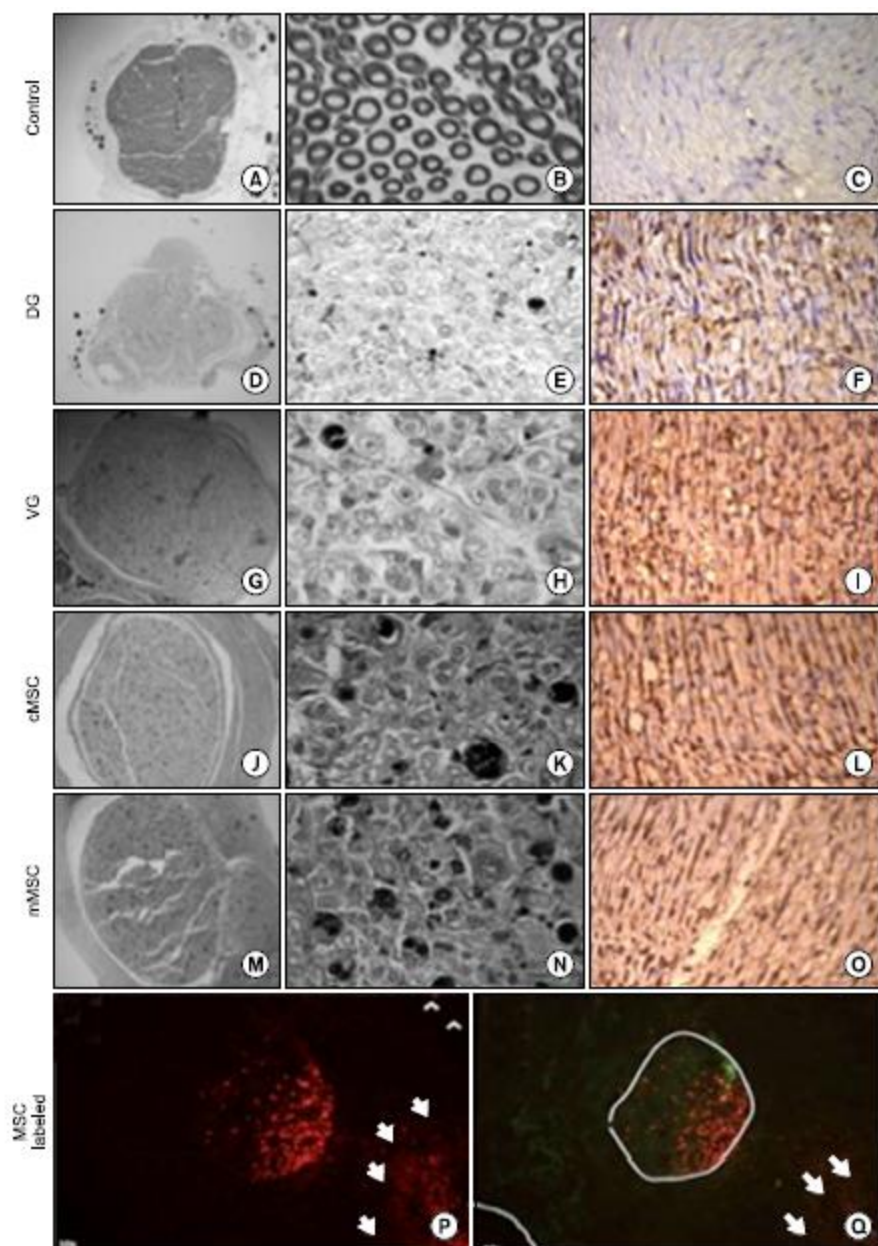


Fig. 5. Panoramic and zoom of the distal portion of the sciatic nerve injured in the CG (A, B, C), DG (D, E, F), VG (G, H, I) cMSC (J, K, L) mMSC (M, N, O) groups, showing the overall diameter nerve fibers (A, D, G, J, M, magnification 10 \times), axon density (B, E, H, K, N, magnification, 100 \times) and positive S-100 expression (C, F, I, L, O, magnification 40 \times). The persistence of labeled Ad-MSC was observed in the proximal portion of the sciatic nerve in the cMSC group (P, Q, magnification 10 \times). The arrows represent the cMSC. In the demarcated region is observed cMSC concentration, mainly in the proximal region (Q). Note the cell migration to the distal stump (arrows). cMSC migrating to the proximal region (arrowhead).

- ・頭側脛骨量と腓腹筋量の左右肢比較 (Table.1)
- ・Day35 において、頭側脛骨量と腓腹筋量は左 (実験群) と右 (コントロール群) で有意差がみられた。 ($p<0.05$)
- ・しかし、実験群では各グループによる有意差は頭側脛骨量と腓腹筋量共にみられなかった。 ($p>0.05$)

Table 1. The weights of the left cranial tibial and gastrocnemius muscles at day 35

Groups	Right Gastrocnemius (g)		Left Gastrocnemius (g)		Right Tibial Cranial (g)		Left Tibial Cranial (g)	
	Mean/SD	Median min/max	Mean/SD	Median min/max	Mean/SD	Median min/max	Mean/SD	Median min/max
1. DG	1.70±0.28 Ac	1.60 (1.13/2.20)	0.40±0.02 Ac	0.42 (0.27/0.50)	0.63±0.07 Ab	0.65 (0.48/0.87)	0.16±0.02 Ab	0.15 (0.13/0.22)
2. VG	1.90±0.52 Bc	1.85 (1.27/2.60)	0.47±0.11 Bc	0.45 (0.37/0.74)	0.61±0.15 Ac	0.60 (0.45/0.82)	0.17±0.03 Ac	0.17 (0.12/1.22)
3. mMSC	2.0±0.76 Ab	1.90 (0.91/3.10)	0.61±0.16 Ab	0.59 (0.11/0.26)	0.48±0.20 Db	0.44 (0.22/0.85)	0.17±0.06 Db	0.16 (0.11/0.26)
4. cMSC	1.80±0.16 Da	1.60 (1.30/2.50)	0.50±0.16 Da	0.47 (0.33/0.83)	0.55±0.14 Ba	0.49 (0.39/0.72)	0.15±0.05 Ba	0.13 (0.11/0.27)

Data are presented as, mean±SD median; minimum (min); maximum (max); SD: standard deviation; g: grams; right tibial cranial muscles: DG=VG=mMSC=cMSC; left tibial cranial muscles: DG=VG=mMSC=cMSC; right gastrocnemius muscles: DG=VG=mMSC=cMSC; left gastrocnemius muscles: DG=VG=mMSC=cMSC. Mean values followed with lower case differ statistically from each other ($p<0.05$).

- ・IHC : BDNF 発現⇒DG;0.14、VG;0.17、cMSC;0.032、mMSC;0.29
mMSCとDG間で有意差がみられた。 ($p<0.05$)
S-100 発現⇒cMSCとmMSCはDGとVGに比べて高かった。

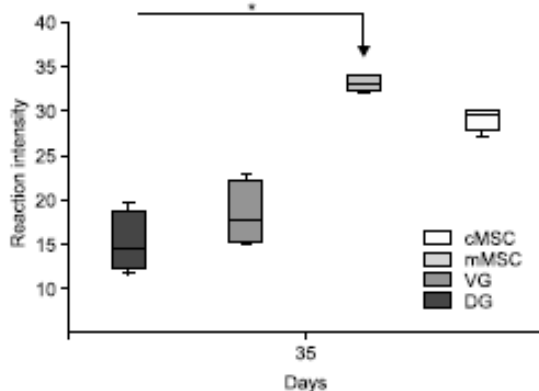


Fig. 6. Graph representing immunohistochemistry staining with BDNF. DG (n=7) control group (n=7), VG (n=7), cMSC (n=7), mMSC (n=7) on day 35 after the repair of the left sciatic nerve. *Difference among the groups ($p<0.05$).

《まとめ》

- ・本研究では、実験モデルラットにおけるcMSCおよびmMSCが神経再生に効果があることが示唆された。
- ・今後は cMSC の有用性について、臨床における適応の可能性を探っていくことが必要となってくるであろう。