

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10914

研究課題名(和文) 軸索再生に至適なシュワン細胞の同定

研究課題名(英文) Identification of optimum Schwann cell for peripheral nerve regeneration

研究代表者

河村 太介 (Kawamura, Daisuke)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：00374372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：移植細胞の末梢神経軸索再生効果を定量する独自の動物モデルを開発し、シュワン細胞、線維芽細胞、骨髄間質性細胞を比較した結果、シュワン細胞のみが軸索再生効果を持ち、移植細胞の種類に関わらず、軸索再生量はシュワン細胞量に相関していた。引き続いて、4種類のシュワン細胞(前駆、未熟、修復、非修復)を比較した結果、修復細胞が最も軸索再生効果に優れ、前駆細胞と未熟細胞には軸索再生効果がないことを明らかにした。培養神経細胞の神経突起伸張効果、神経栄養因子分泌量、トランスクリプトームもこの結果を支持していた。これらの知見は、末梢神経の軸索再生の機序解明、再生促進方法の開発に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経と比較すると、末梢神経の再生能力は旺盛であるが、近位部損傷や重度損傷例においては、未だ臨床成績が不良である。また、医療の発展にも関わらず、半世紀以上、自家神経移植に優る末梢神経再建方法はなく、自家組織を犠牲にしない、新規再建方法の開発が望まれている。今回の研究成果は、末梢神経の主たる構成細胞であるシュワン細胞が、末梢神経再生に重要であること、移植する場合は、未熟な状態ではなく、成熟した状態で、しかも、修復能に優れた状態であるものを使用した方が良いことが明らかとなった。これは、末梢神経損傷に対する、新規細胞治療方法を開発して行く際に重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：The current project has developed a new experimental model, which can elucidate the axon-promoting effects of grafted cells. It succeeded in clearly demonstrating that the graft of Schwann cells (SCs) but not marrow stromal cells or fibroblasts promoted axonal growth. In addition, this model demonstrated that there was a linear relationship of the SC amount with the extent of axon regeneration. Then, we tested four types of SCs (SC precursors (SCPs), immature SCs (ISCs), repair SCs (RSCs), and non-RSCs) using this model. RSCs had the greatest axon regeneration, and non-RSCs was the next. But, SCPs and ISCs failed to support axon regeneration. Further, in vitro co-culture of dorsal root ganglion (DRG) neurons, transcriptome, and quantification of neurotrophic factor productions also support this finding. These findings indicate that peripheral axon regeneration depends on types of SCs, contributing to the development of a novel therapy for peripheral nerve injury.

研究分野：末梢神経

キーワード：末梢神経 シュワン細胞 細胞移植 軸索再生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中枢神経と比較すると、末梢神経の再生能力は旺盛であるが、近位部損傷や重度損傷例においては、軸索再生の量および速度が十分でないため、臨床成績が不良である(Lundborg, 2000)。また、医療の発展にも関わらず、半世紀以上、自家神経移植に優る末梢神経再建方法はなく、自家組織を犠牲にせず、軸索再生を促進する新規治療法の開発が望まれている(Daly et al., 2012)。なかでも、近年の幹細胞研究の発展から、細胞治療に対する期待は大きい(Assinck et al., 2017)。軸索再生に対する細胞治療法の一つに、グリア細胞を移植する手法がある。近年、中枢神経のグリア細胞は分化度や局在によって多くの亜型があり、その機能は様々に異なることがわかってきた(Ben Haim and Rowitch, 2017)。また、中枢神経の軸索再生を目的として移植する際に、至適な亜型があることも判明してきた。しかし、末梢神経の主たるグリア細胞であるシュワン細胞 (Schwann cell: SC) の分化度や局在による機能の違いは未だ不明なままであるし、軸索再生に至適な亜型も確定していない。

### 2. 研究の目的

上記より、我々は SC にも多様性があり、末梢神経の軸索再生に至適な SC の亜型があるという仮説を立て、一連の研究を行った。本研究の目的は、(1) 軸索再生に至適な移植細胞を簡単に同定するための実験モデルを作成すること、(2) 分化度の異なる SC は、異なる軸索再生効果を持つかが明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

(1) 移植細胞の軸索再生効果定量用の実験モデル作成のため、野生型 LEWIS ラットの坐骨神経に 2ヶ所(25mm 間隔)の圧挫損傷を鉗子により作成した。続いて、液体窒素を用いた凍結融解処理で圧挫に挟まれた範囲を無細胞化した。圧挫単独群、圧挫 + 凍結融解処理 1 回群、5 回群、10 回群の 4 群を検討し (N=5/群)、軸索断裂、死細胞の割合を組織学的に定量した。また、処置後 2 週の軸索再生量を定量した。

(2) 作成したモデルの妥当性を検討するため、SC または 骨髄間葉系間質細胞 (Mesenchymal stromal cell: MSC) を移植した。対照群として 線維芽細胞 (Fibroblast: Fb) 移植、細胞移植なし、無細胞処置なし(圧挫単独)の 3 群を作成した。移植細胞は全て同系 RFP 発現ラットから採取した。処置後 2 週の軸索再生、移植細胞、SC の分布に関して、矢状断切片の pNF、RFP、S100b に対する免疫染色で組織学的評価を行った(N=6/群)。

(3) SC と神経細胞の接触を介した軸索再生効果を検討するため、LEWIS ラットから DRG 神経細胞、SC を単離し、共培養した。まず、SC 上に DRG 神経細胞を培養した群 (接触あり群) インサートを使用し、両細胞の接触を無くした群 (接触なし群)、DRG 神経細胞のみ (単培養群) の 3 群 (N=6/群) で、神経突起を伸長させた細胞の割合 (伸長細胞率) および、最長伸長距離を定量した。続いて、低密度培養の SC と DRG 神経細胞を共培養し、神経突起とシュワン細胞の接触の有無による、伸長細胞率と最長伸長距離への影響を比較検討した。

(4) SC の分化度による軸索再生効果の違いを比較検討するため、胎児あるいは成体 RFP 発現 LEWIS ラットの坐骨神経を用い、SC の未分化細胞 2 種類(前駆・未熟)と成熟細胞 2 種類(修復・非修復)を作成した。上述のモデルに各細胞を移植した(N=6/群)。次に、胎児・成体由来の DRG 神経細胞を前駆細胞・修復細胞と共培養し神経突起伸長効果を比較検討した(N=6/群)。さらに前駆細胞・修復細胞のトランスクリプトーム解析と、ELISA 法での神経栄養因子分泌量 (NGF, BDNF) を定量した(N=3/群)。

### 4. 研究成果

(1) 圧挫により全群で全軸索が断裂していた。死細胞の割合は、非凍結野では全群とも 1%前後であり、群間に有意差はなかった。一方、凍結融解野では凍結処理を 1 回行うと 50.2% ~ 67.6%、5 回以上の処理により全例で 100%となり、群間に有意差を認めた。また、無細胞処理を行った場合の軸索再生は圧挫単独群と比較して有意に劣っていた。

(2) 移植細胞は全群で良好に生着し、無細胞野を充たしていた。自家神経移植に相当する圧挫単独群が最も良好な軸索再生を示し、中央部で約 80%の再生を認めた。次に SC 移植群が 67%で、MSC 移植、Fb 移植、細胞移植なしの 3 群は 20%前後であった(図 1)。全群で、SC の無細胞処理野への遊走を観察し、移植細胞の有無、種類に関わらず、全群で再生軸索には SC が密接しており、特に、再生軸索の先端にも。また、再建近位部と中央部では、SC の分布量と軸索再生に強い正の相関を認めた( $r=0.9$ )。

(3) DRG 神経細胞の伸長細胞率、および、最長伸長距離は、SC との接触あり群、なし群、単培養群の順に良好で、各群間に有意差を認めた。続いて、神経突起とシュワン細胞が接触した場合の、伸長細胞率および最長伸長距離は接触しない場合よりも有意に優れていた。

(4) 分化度の異なる SC の生着に群間差はなかったが、増殖能は2種の未分化細胞が優れていた。しかし、軸索再生効果に関しては修復細胞群が最も良好で、次に非修復細胞群が続き、前駆・未熟細胞群は移植なし群と変わらなかった。DRG 神経との共培養では、修復細胞が最も優れた神経突起伸長効果を示した。また、修復細胞と前駆細胞では、遺伝子発現様式が全く異なり、NGF、BDNF の分泌量も、修復細胞が前駆細胞よりも有意に多かった。

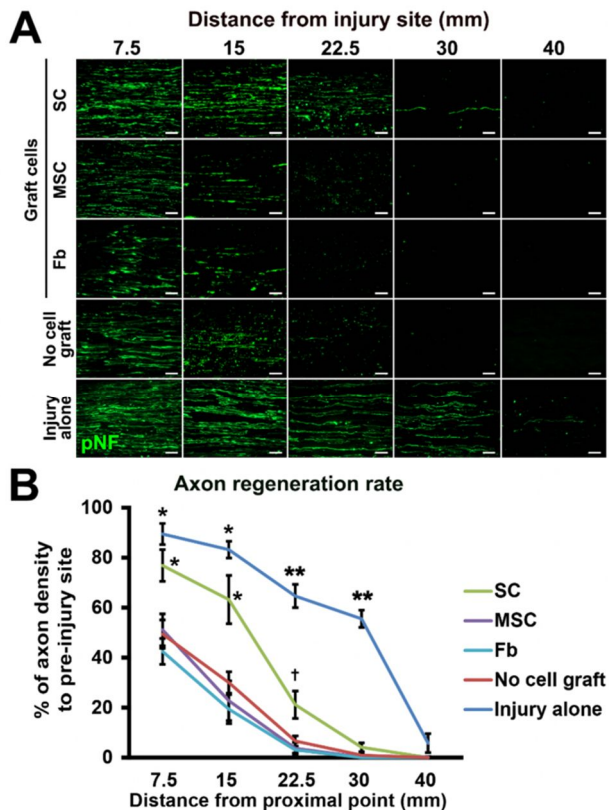


図1 . シュワン細胞は軸索再生を促進したが、MSC の効果は認めなかった。A, 代表的組織画像。B, 軸索再生率定量結果。\*P < 0.05 to MSC and Fb, no cell graft, \*\* P < 0.05 to SC, MSC, Fb, and no cell graft, †P < 0.05 to MSC and Fb. One-way ANOVA with Tukey-Kramer test. Error bars represent s.e.m. scale bar: 50  $\mu$ m (A).

(引用文献)

Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., and Tetzlaff, W. (2017). Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nature Neuroscience* 20, 637.

Ben Haim, L., and Rowitch, D.H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 18, 31-41.

Daly, W., Yao, L., Zeugolis, D., Windebank, A., and Pandit, A. (2012). A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *Journal of the Royal Society Interface* 9, 202-221.

Lundborg, G. (2000). A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am* 25,

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Endo Takeshi, Kadoya Ken, Kawamura Daisuke, Iwasaki Norimasa	4. 巻 104
2. 論文標題 Evidence for cell contact factor involvement in neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons stimulated by Schwann cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Physiology	6. 最初と最後の頁 1447 ~ 1454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/EP087634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Kawamura D, Iwasaki N	4. 巻 13
2. 論文標題 A novel experimental model to determine the axon-promoting effects of grafted cells after peripheral nerve injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in cellular neuroscience	6. 最初と最後の頁 280-291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2019.00280	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Endo T, Kadoya K, Iwasaki N
2. 発表標題 A new experimental model highlights the importance of Schwann cells for axon regeneration after peripheral nerve injury.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Matsui Y, Yuan R, Nagano Y, Kawamura D, Iwasaki N
2. 発表標題 Mature Schwann cells but not developing Schwann cells support axon regeneration after peripheral nerve injury
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research 2018 annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Matsui Y, Yuan R, Nagano Y, Kawamura D, Iwasaki N
2. 発表標題 Mature Schwann cells but not developing Schwann cells support axon regeneration after peripheral nerve injury
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤健、角家健、永野裕介、岩崎倫政
2. 発表標題 分化度の異なる各種シュワン細胞の末梢神経軸索再生効果
3. 学会等名 第29回日本末梢神経学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤健、角家健、鈴木裕貴、松居祐樹、袁儒非、永野裕介、河村太介、岩崎倫政
2. 発表標題 分化度の異なる各種シュワン細胞の末梢神経軸索再生効果
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤健、角家健、鈴木智亮、鈴木裕貴、松居祐樹、河村太介、岩崎倫政
2. 発表標題 分化度の異なる各種シュワン細胞の末梢神経軸索再生効果
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Endo T, Kadoya K, Suzuki T, Suzuki Y, Matsui Y, Yuan R, Kawamura D, Iwasaki N
2 . 発表標題 Repair Schwann cells but not Schwann cell precursors have axon regeneration effects after peripheral nerve injury.
3 . 学会等名 5th International symposium on peripheral nerve regeneration ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Kawamura D, Iwasaki N
2 . 発表標題 A novel experimental model to determine the axon-promoting effects of grafted cells after peripheral nerve injury.
3 . 学会等名 5th International symposium on peripheral nerve regeneration ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Endo T, Kadoya K, Suzuki T, Suzuki Y, Matsui Y, Yuan R, Kawamura D, Iwasaki N
2 . 発表標題 Repair Schwann cells but not Schwann cell precursors have axon regeneration effects after peripheral nerve injury.
3 . 学会等名 The XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Endo T, Kadoya K, Suzuki T, Matsui Y, Kawamura D, Iwasaki N.
2 . 発表標題 Repair Schwann Cells but Not Schwann Cell Precursors Have Axon Regeneration Effects After Peripheral Nerve Injury.
3 . 学会等名 The 74th Annual Meeting of the ASSH ( 国際学会 )
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤健、角家健、鈴木智亮、松居祐樹、袁儒非、永野裕介、河村太介、岩崎倫政
2. 発表標題 軸索再生に至適なシュワン細胞の分化度に関する検討
3. 学会等名 第62回日本手外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤健、角家健、鈴木智亮、松居祐樹、袁儒非、山本康弘、河村太介、岩崎倫政
2. 発表標題 修復シュワン細胞の末梢神経軸索再生効果は未分化シュワン細胞に優る
3. 学会等名 第30回日本末梢神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤健、角家健、鈴木裕貴、松居祐樹、袁儒非、鈴木智亮、福井隆史、山本康弘、河村太介、岩崎倫政
2. 発表標題 シュワン細胞の接着因子を介した神経突起伸長効果の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	角家 健  (Kadoya Ken)  (30374276)	北海道大学・医学研究院・特任准教授    (10101)	