

令和 2 年 5 月 17 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：17K11527

研究課題名(和文) 複合細胞移植による新規末梢神経再生方法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy for peripheral nerve regeneration by combinatorial cell therapy

研究代表者

永野 裕介 (Nagano, Yusuke)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：30600168

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)：本研究の目的は、マクロファージの亜型による軸索再生効果の違いを明らかにし、末梢神経の軸索再生に有効な複合細胞治療方法の基礎を確立することである。ラット坐骨神経の圧挫モデルを使用して、軸索再生とマクロファージの時空間的な変化を検討したところ、M2細胞は軸索再生部位と比較的一致していた。M2マクロファージ移植は軸索再生効果を認めたが、M1マクロファージでは認めなかった。その効果は、同系移植でのみ認め、同種移植では認めなかった。また、M2マクロファージ移植は、運動機能、神経生理機能の回復を部分的に促進することも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経を損傷後、残存する麻痺に悩む患者は多く、より効果的な末梢神経再生方法が求められている。神経再生の機序に炎症反応が関わっていることは知られているが、その鍵となる特異的免疫反応は未だ同定されていない。本研究により、M2マクロファージは末梢神経軸索再生効果を持つことが明らかになり、新しい細胞治療法の開発に寄与する可能性がある。また、M2マクロファージが有する再生効果の分子機構の詳細を明らかにすることで、新しい分子治療方法の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：The objectives of the current study are to investigate spatiotemporal distribution of macrophage subtypes after peripheral nerve injury and to clarify their axon-promoting effects. Immunolabeling study in rat sciatic nerve crush injury demonstrated that the distribution pattern of M2 but not M1 macrophage was similar to that of regenerating axons in injured peripheral nerve. The graft of M2 but not M1 macrophage promoted axon regeneration. Further, the graft of M2 macrophage had partial effect on motor and sensory recovery after peripheral nerve injury. Elucidation of the molecular and cellular mechanisms of the effect of M2 macrophage on axon regeneration might lead to the new therapeutic strategy for peripheral nerve injury.

研究分野：整形外科学

キーワード：末梢神経 軸索再生 マクロファージ 細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢神経を損傷後、残存する麻痺に悩む患者は多く、より効果的な末梢神経再生方法が求められている。神経再生の機序に炎症反応が関わっていることは知られているが、その鍵となる特異的免疫反応は未だ同定されていない。近年、免疫細胞の一種であるマクロファージは大きく M1 と M2 に二分されることが知られており、組織再生における役割が、M1 は抑制、M2 は促進と全く異なることがわかってきた^{1, 2, 3}。末梢神経においては、Scaffold に IL-4 を添付することで M2 が増加し、軸索再生が促進したという報告はあるが⁴、末梢神経の軸索再生における M2 の役割の詳細は未だに不明である。

2. 研究の目的

上述の点から、本研究の目的は、マクロファージの亜型による軸索再生効果の違いを明らかにし、末梢神経の軸索再生に有効な複合細胞治療方法の基礎を確立することである。

3. 研究の方法

実験 1: 再生軸索と M2 マクロファージの時空間的關係

成熟ラットの坐骨神経を用いた。坐骨神経近位部で圧挫損傷を作成し、術後 1 日、3 日、1 週、2 週、4 週で灌流固定し、坐骨神経を採取した。採取した神経は 4%PFA に 1 日保存後、30%スクロース溶液に 2 日以上浸透させた。クライオスタットを用いて 14mm 厚で矢状面切片を作成し、免疫蛍光染色 (Beta 3 tubulin, SCG10, CD68, CD163) を行った。All-In-One 蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-80) で撮像した。評価点は圧挫近位部から 0mm, 5mm, 10mm, 15mm, 20mm, 25mm とした。

実験 2: M1, M2 マクロファージ移植実験

まず、同系成熟ラットの腹腔内にチオグリコレート培地を注射し無菌性腹膜炎を作成。注射後 7 日目に腹腔内に PBS を注入し、マクロファージを採取した。M1 マクロファージは採取したマクロファージに IFN- γ と LPS を付加、M2 マクロファージは IL-4 を付加することで、それぞれ分化させた。次に成熟ラット坐骨神経を近位部と遠位部で圧挫し、その間に液体窒素で凍結・融解を繰り返して無細胞野を作成する、当科で報告したラット坐骨神経無細胞モデルを作成した⁵。作成した細胞 (M1 マクロファージか M2 マクロファージ) を 50 万個ずつ移植した。M2 マクロファージ移植群、M1 マクロファージ移植群、移植なし群の 3 群 (n=6/group) に分けて評価した。術後 2 週で灌流固定し、坐骨神経を作成した。実験 1 と同様に神経を保存し、切片を作成。免疫蛍光染色で軸索再生 (pan-NF)、総マクロファージ (CD68)、M2 マクロファージ (CD163) を評価した。評価点は近位部から 7.5mm, 15mm, 22.5mm とした。

実験 3: 同種 M2 マクロファージ移植実験

実験 2 と同様に成熟ラットの坐骨神経を用いてラット坐骨神経無細胞モデルを作成し、同種 M2 マクロファージを 50 万個移植した。同種 M2 マクロファージは GFP ラットから実験 2 と同様にマクロファージを採取して IL-4 で分化誘導させることで作成した。同種 M2 マクロファージ移植群、移植なし群の 2 群 (n=5/group) に分けて評価した。免疫蛍光染色にて軸索再生 (pan-NF)、総マクロファージ (CD68)、M2 マクロファージ (CD163)、リンパ球 (CD3) を評価した。

4. 研究成果

実験 1

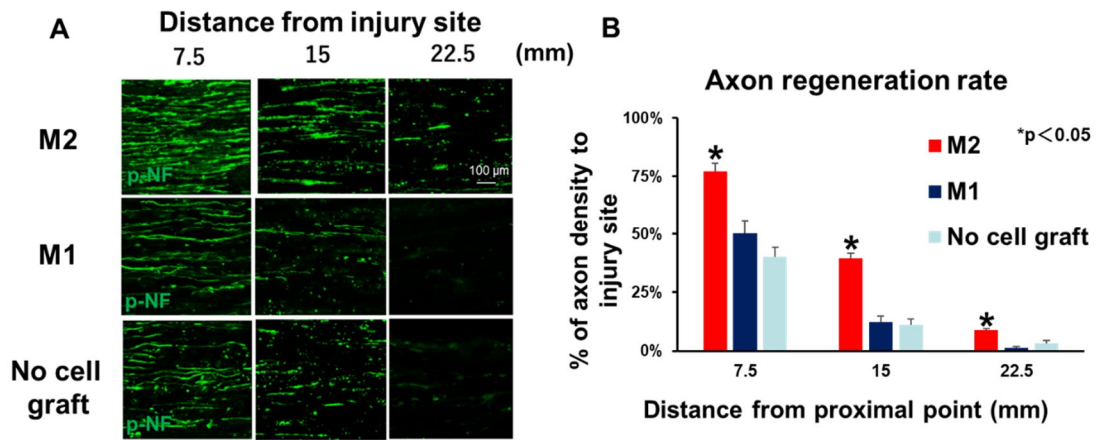
Beta 3 tubulin による再生軸索評価では、受傷早期では Waller 変性している軸索も染色されており、再生軸索の評価は困難であった。そのため SCG10 を再生軸索の評価に用いた。SCG10 は再生軸索の評価が可能であり、時系列に沿って遠位に軸索円錐部が多く存在していた。総マクロファージは、受傷後 3 日で出現し、受傷後 2 週をピークに、空間的に均一に存在していた。それに対して M2 マクロファージは受傷 3 日に近位部から出現し、時系列とともに徐々に遠位に多く存在していた。

実験 2

Pan-NF による軸索再生評価では、M2 マクロファージ群が近位から、7.5mm, 15mm の部位で有意に軸索再生効果を認めていた。それに対して M1 マクロファージ群は明らかな軸索再生効果を認めなかった (図)。総マクロファージ密度は各群で有意差はなかったが、M2 マクロファージ密度は M2 マクロファージ移植群で有意に多い結果であった。

実験 3

Pan-NF による軸索再生評価では、同種 M2 マクロファージ移植群では移植なし群と比べて、近位から 7.5mm の部位でのみ有意に軸索再生を認めていた。総マクロファージ密度、M2 マクロファージ密度は各群で有意差を認めなかった。リンパ球 (T 細胞) の浸潤は同種移植群で有意に認められており、移植細胞に対する拒絶反応を示唆していた。



図：同系M2 および M1 マクロファージの軸索再生効果

A: 蛍光免疫染色像 (pan-NF)、B: 各群の軸索再生率 M2 移植群では近位部から 7.5mm, 15mm の部位で有意に軸索再生が促進していた。M1 群では軸索再生の促進を認めなかった。

(引用文献)

1. Miron VE, Boyd A, Zhao JW, Yuen TJ, Ruckh JM, Shadrach JL, et al. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci.* 2013;16(9):1211-8.
2. Leblond AL, Klinkert K, Martin K, Turner EC, Kumar AH, Browne T, et al. Systemic and Cardiac Depletion of M2 Macrophage through CSF-1R Signaling Inhibition Alters Cardiac Function Post Myocardial Infarction. *PLoS One.* 2015;10(9):e0137515.
3. Mokarram N, Merchant A, Mukhatyar V, Patel G, Bellamkonda RV. Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair. *Biomaterials.* 2012;33(34):8793-801.
4. Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Kawamura D, Iwasaki N. A Novel Experimental Model to Determine the Axon-Promoting Effects of Grafted Cells After Peripheral Nerve Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience.* 2019;13.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nagano Y, Kadoya K, Endo T, Iwasaki N.
2. 発表標題 M2 macrophages promote 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 永野裕介、角家 健、遠藤 健、Alaa Terkawi、岩崎 倫政
2. 発表標題 M2マクロファージが持つ末梢神経損傷後の軸索再生促進効果
3. 学会等名 第61回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、鈴木智亮、福井隆史、山本康弘、袁儒非、鈴木裕貴、遠藤健、永野 裕介、Terkawii Alaa、岩崎倫政
2. 発表標題 末梢神経損傷後の再生軸索とマクロファージにおける時空間的検討
3. 学会等名 第136回北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永野 裕介 角家 健 遠藤 健 岩崎 倫政
2. 発表標題 M2マクロファージが持つ末梢神経損傷後の軸索再生促進効果
3. 学会等名 第28回日本末梢神経学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永野 裕介 角家 健 遠藤 健 岩崎 倫政
2. 発表標題 M2マクロファージが持つ末梢神経損傷後の軸索再生促進効果
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 永野 裕介 角家 健 遠藤 健 岩崎 倫政
2. 発表標題 M2マクロファージが持つ末梢神経損傷後の軸索再生促進効果
3. 学会等名 第134回北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Nagano, Ken Kadoya, Takeshi Endo, Matsui Yuki, Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki
2. 発表標題 The graft of M2 macrophage promotes 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 永野裕介、角家健、遠藤健、松居祐樹、Alaa Terkawi、岩崎 倫政
2. 発表標題 M2マクロファージ移植の末梢神経軸索再生効果とその限界
3. 学会等名 第62回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、Alaa Terkawi、岩崎倫政
2. 発表標題 M2マクロファージの末梢神経損傷後の時空間的推移と軸索再生効果
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 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、Alaa Terkawi、岩崎倫政
2. 発表標題 M2マクロファージの末梢神経損傷後の時空間的推移と軸索再生効果
3. 学会等名 第38回日本運動器移植・再生医学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、Alaa Terkawi、岩崎倫政
2. 発表標題 M2マクロファージの末梢神経損傷後の時空間的推移と軸索再生効果
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

1. 発表者名 Matsui Y, Kadoya K, Endo T, Nagano Y, Terkawi A, Iwasaki N.
2. 発表標題 Spatiotemporal investigation and transplantation analysis show an association of M2 macrophage with regenerating axons after peripheral nerve injury.
3. 学会等名 The XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease
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	テルカウィ アラー (Terkawi Alaa) (00723074)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	
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)	