

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16507

研究課題名（和文）T細胞による血管新生促進を介した末梢神経再生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of peripheral nerve regeneration via T cell-mediated angiogenesis

研究代表者

北條 寛典（Hohjoh, Hirofumi）

神戸薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80824838

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：末梢神経切断後の神経再生におけるT細胞機能の解明を行った。その結果、末梢神経切断後の末梢神経組織にT細胞が集積すること、またT細胞が血管新生を促進することで末梢神経再生を亢進させることが明らかになった。さらに新生血管による末梢神経再生メカニズムを調べたところ、新生血管はIGF1、PDGF、NT3産生を介して、神経損傷遠位部からのシュワン細胞遊走を促進させ、末梢神経再生を促す可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経系は中枢神経系とは異なり、神経損傷後にも再生することが知られている。しかし、事故による末梢神経切断のような、大きな神経損傷が起きた際には神経再生が不十分となり、現在の治療法では神経機能を回復させることは困難である。

本研究では、末梢神経切断後の神経再生にT細胞が誘導する血管新生が重要な役割を担うことやそのメカニズムを明らかとした。本研究成果の応用により、血管新生促進や、新生血管による神経再生促進をサポートする新たな薬剤や治療戦略が展開できると期待される。

研究成果の概要（英文）：I investigated T cell function in nerve regeneration after peripheral nerve transection.

As a result, I found that T cells accumulate in peripheral nerve tissue after peripheral nerve transection and that T cells enhance peripheral nerve regeneration by promoting angiogenesis. Furthermore, I investigated the mechanism of peripheral nerve regeneration by newly formed-blood vessels and found that newly formed-blood vessels could promote Schwann cell migration from distal nerve injury via IGF1, PDGF, and NT3 production, thereby promoting peripheral nerve regeneration.

研究分野：末梢神経再生

キーワード：末梢神経再生 T細胞 シュワン細胞 血管新生

1. 研究開始当初の背景

末梢神経系は中枢神経系とは異なり、神経切断後においても神経軸索が標的組織へ再伸長し機能が回復する。しかしながら末梢神経損傷の程度が大きな場合には、神経再生が不十分となり神経機能が回復しない。このため末梢神経再生を効率よく促すことができる治療法の確立が求められている。

末梢神経の再生は炎症状態を伴い、損傷神経組織にはマクロファージに代表される多くの免疫細胞が存在する。しかし、これら免疫細胞が軸索再生に対してどのような役割を担っているのかは不明である。そこで研究代表者は、T細胞が脳や筋肉など多様な組織の再生を誘導することに着目し、末梢神経損傷時においてもT細胞が軸索再生に対して促進的に働くのではないかと仮説をたてた。本仮説を検証した結果、研究代表者はT細胞が損傷末梢神経に集積し、軸索再生を促進することを発見した。

さらに研究代表者は、軸索再生促進のメカニズムとして、損傷末梢神経においてT細胞が、新生血管周囲に集積し血管新生を促進する可能性を見出していた。

そのため、研究代表者はT細胞による血管新生の促進が軸索再生に必須のプロセスであると考え、T細胞による血管新生の促進メカニズムや新生血管による軸索再生促進メカニズムを明らかにすることで、T細胞による末梢神経再生メカニズムの解明を目的とし、研究を進めていた。

2. 研究の目的

本研究では、損傷末梢神経において、T細胞による血管新生促進がどのようなメカニズムによって制御されるのか、また軸索再生へどのように関与するのかを明らかにすることを目的とした。特に新生血管は末梢神経再生において、シュワン細胞機能を制御することで軸索再生を促進することが近年示唆されていたことから、新生血管がシュワン細胞に与える影響、また新生血管の機能を媒介する因子の解明を目的とした。

3. 研究の方法

6~8週齢の野生型オスマウスを用いた。坐骨神経を露出後にハサミで切断し、切断神経端の間に1mmのギャップを生じるように縫合することで、末梢神経損傷-再生モデルマウスを作製した。坐骨神経切断-再縫合の7日後のマウスから損傷坐骨神経を採取し、総RNAを抽出、定量的RT-PCR法にて遺伝子量を解析した。また、坐骨神経切断-再縫合の10日後のマウスから採取した損傷坐骨神経をparaformaldehyde固定し、凍結切片を作製後、抗体を用いた免疫組織染色を行った。

末梢神経再生における新生血管の影響を検討する目的として、VEGFR2阻害剤であるCediranibを投与した。坐骨神経切断-再縫合直後より坐骨神経単離の前日まで0.1% tween20/PBSに溶かしたCediranib(体重1kgあたり6mg)を腹腔内投与した。

4. 研究成果

(1) 末梢神経再生に関与するT細胞サブセットの探索

坐骨神経切断-再縫合7日後のマウスから採取した損傷坐骨神経を用いて、Th1、Th2、Th17、Tregマーカー遺伝子の発現量を調べることで、損傷坐骨神経に集積するT細胞のサブセットの同定を試みた。その結果、損傷7日後の坐骨神経組織ではTh1マーカーであるIFN- γ 遺伝子が高レベルで検出された。従って、末梢神経再生を担うT細胞サブセットはTh1であることが示唆された。

またCediranib投与により血管新生を抑制した損傷坐骨神経において、CD4遺伝子発現量を解析した。その結果、Vehicle投与と比較してCediranib投与によってCD4遺伝子発現量が半分程度に減少した。この結果は、T細胞が新生血管の形成を促進するだけでなく、新生血管もT細胞の損傷坐骨神経組織への集積に一部寄与する可能性を示していると考えられ、T細胞と新生血管が相互に制御していることを示唆している。

(2) 末梢神経再生における新生血管の役割

これまでに研究代表者はT細胞が末梢神経再生を促進すること、またT細胞の末梢神経再生促進には末梢神経損傷部における血管新生が重要である可能性を見出していた。そこで、実際に新生血管が末梢神経再生を促進するかを調べるために、Cediranib投与が末梢神経再生に与える影響を解析した。坐骨神経切断-再縫合10日後の坐骨神経を用いて抗CD31抗体及び抗 β 3-tubulin抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、Cediranibの投与により損傷坐骨神経における新生血管数が減少し、血管新生を抑制できていることが確認できた。この時、再生軸索の伸長が顕著に減弱していた。これらの結果より、新生血管は末梢神経再生時において、再生軸索の再生に必須であることが明らかとなった。

さらに、新生血管による再生軸索伸長促進メカニズムの解明を試みた。末梢神経再生時には、

シュワン細胞が軸索伸長に先立って、神経損傷部に遊走し再生軸索の足場形成や軸索伸長促進因子を産生することで、軸索伸長を強力に促進することが知られている。そこで、抗 S100 抗体を用いた免疫組織染色によりシュワン細胞を調べたところ、血管新生抑制によって神経損傷部へのシュワン細胞の遊走、特に損傷遠位部からの遊走が抑制されることを見出した。そこで次に、新生血管がいかなる因子を介してシュワン細胞の遊走を制御するかを調べた。既報のデータより、坐骨神経における血管内皮細胞が高発現する分泌タンパク質の内、シュワン細胞遊走を促進することが知られている因子を選択し、定量的 RT-PCR 法により遺伝子発現量を解析した。その結果、IGF-1、NT-3、PDGF β 遺伝子の発現が坐骨神経損傷により上昇し、またこの発現上昇は血管新生の抑制により減弱した。

以上の結果より、末梢神経損傷時において、神経損傷部に集積した T 細胞は新生血管促進を介して末梢神経再生を促進することを見出し、またこのメカニズムとして新生血管が IGF-1、NT-3、PDGF β 産生を介して、シュワン細胞の神経損傷部への遊走を制御することで、再生軸索伸長を促進する可能性を明らかとした。

(3) 末梢神経損傷の大きさと新生血管による末梢神経再生促進の関係

末梢神経損傷の度合いが大きく神経組織のないギャップ部の距離が長くなると、神経再生の効率が減少することが知られている。そこで末梢神経損傷時のギャップの有無によって、本研究で見出した、新生血管による末梢神経再生促進作用が変化するかを検討した。坐骨神経を切断後、ギャップが生じないように再縫合した場合には、Cediranib 投与により末梢神経再生は影響を受けなかったのに対し、ギャップの距離が 1 mm となるように再縫合を行った場合には、Cediranib 投与により末梢神経再生は顕著に抑制された。従って、新生血管は神経組織のないギャップ部が存在する、比較的損傷度合いが大きい末梢神経損傷時において、末梢神経再生作用を発揮することが示唆された。この理由としては、新生血管が再生軸索のギャップ部分の横断をサポートするためであると考えられた。

本解析の結果より、T 細胞による血管新生を介した末梢神経促進メカニズムの解明は、現時点では効率的な治療の難しい、より重度の末梢神経損傷における治療戦略に展開できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Saio Shingo, Konishi Kanna, Hohjoh Hirofumi, Tamura Yuki, Masutani Teruaki, Iddamal goda Arunasiri, Ichihashi Masamitsu, Hasegawa Hiroshi, Mizutani Ken-ichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Extrace llular Environment-Controlled Angiogenesis, and Potential Application for Peripheral Nerve Regeneration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 11169 ~ 11169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222011169	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北條寛典、長谷川潤
2. 発表標題 T細胞による坐骨神経再生促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第70回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒木郁海、北條寛典、長久葵、長谷川潤
2. 発表標題 末梢神経再生に対するFTY720作用の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上舞子、北條寛典、辻橋沙紀、田中寿弥、黒木郁海、長谷川潤
2. 発表標題 新生血管による末梢神経再生促進メカニズムの解明
3. 学会等名 第67回 日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北條寛典、辻橋沙紀、井上舞子、田中寿弥、長谷川潤
2. 発表標題 新生血管による末梢神経再生促進機構の解析 —新生血管のシュワン細胞遊走促進作用を担う分子の探索—
3. 学会等名 第71回 日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------