

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18016

研究課題名(和文)末梢神経再生に至適な線維芽細胞の同定

研究課題名(英文)Identification of optimal fibroblasts for peripheral nerve regeneration

研究代表者

遠藤 健(Endo, Takeshi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：50849148

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)：ラットの神経上膜、神経実質部、皮膚から、線維芽細胞(Fibroblast: Fb)を高純度に採取し、ラット後根神経節神経細胞と共培養した。その結果、末梢神経特異的Fbは、神経突起伸長効果に優れ、中でも神経上膜由来のFbが優れていた。Fbの神経突起伸長効果には液性因子と接着因子の両方が関与していたが、ラット坐骨神経の再生軸索とFbが接着している所見は認めなかった。また、この3種の細胞の分子的特徴は、それぞれ大きく異なっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、末梢神経由来Fbは皮膚由来Fbよりも神経突起伸長能に優れ、中でも神経上膜由来Fbが神経実質由来Fbよりも優れていること、Fbは神経組織内の局在によって分子的・機能的に異なること、神経上膜由来Fbが末梢神経損傷後の軸索再生に関与している可能性を示し、末梢神経内の局在の異なるFbは、異なる機能を有するという仮説を支持した。Fbは一般的に調製や増殖が容易であることから、細胞治療の材料として探索されてきたが、本研究の知見は、神経組織特異的Fbはこれらの細胞治療材料としての可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The current study investigated the capacity of fibroblasts (Fb) derived from peripheral nerves to stimulate the neurite outgrowth of DRG neurons and clarified their molecular characteristics. The Fb derived from epineurium (Fb-Epn) showed the greatest neurite outgrowth, followed by the Fb derived from parenchyma, indicating that nerve-derived Fb promote neurite outgrowth more effectively than skin-derived Fb. In vivo, Fb were not closely associated with regenerating axons, indicating that only soluble factors from Fb are available to regenerating axons. A transcriptome analysis revealed that the molecular profiles of these Fb were distinctly different and that the gene expression profiles of soluble factors that promote axonal growth are unique to each Fb. These findings indicate that Fb are molecularly and functionally different depending on their localization in nerve tissue and that Fb-Epn might be involved more than was previously thought in axon regeneration after PNI.

研究分野：神経科学

キーワード：線維芽細胞 軸索再生 末梢神経損傷

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢神経は再生可能であるが、末梢神経損傷後の臨床成績は必ずしも満足できるものではなく、PNI 治療のための有効な治療法の新規開発が求められている。しかし、末梢神経損傷後の再生を担う詳細な細胞学的・分子学的メカニズムは、未だ十分に解明されていない。末梢神経損傷後の再生は、シュワン細胞、マクロファージ、血管内皮細胞、線維芽細胞(Fibroblast; Fb)を含む様々な細胞の一連の相互作用によって誘導される。シュワン細胞は、ミエリンの残骸を除去し、損傷した神経細胞の生存を助け、再生軸索を再髄鞘化する機能を有する修復型 SC と呼ばれる表現系を獲得することで軸索再生を促進する。マクロファージは、切断損傷部を橋渡しする架橋組織の形成に寄与し、再生軸索を正確な標的へ導くとともに、ミエリン破片を除去することでワラー変性部での軸索再生を促進する。血管内皮細胞は、損傷部を移動するシュワン細胞を誘導し、ワラー変性部ではマクロファージの集積を促進することで、再生に必要な神経栄養因子を供給する。

Fb については、病変部位を移動するシュワン細胞の方向付けを担うことが示されているが、軸索再生への直接的関与の有無は不明である。一般に Fb は高い増殖能力を有し、様々な臓器の組織欠損を細胞外マトリックスで埋めることができることから、組織修復には欠かせない存在と考えられている。近年の研究により、組織特異的 Fb は、定常状態の維持、病的状態の発症、組織修復の促進において、それぞれ異なる役割を持つことが明らかになってきた。例えば、腎臓間質に存在する Fb は定常状態ではエリスロポエチンを産生することで赤血球の産生を維持する一方、腎貧血を引き起こすような腎障害後には産生を抑制する。さらに、同じ臓器であっても存在する解剖学的位置によって Fb の機能が異なることに注目する必要がある。例えば肺では、肺動脈周囲 Fb と気管支血管束の外膜に存在する Fb の機能は大きく異なる。以上を踏まえると、解剖学的位置の異なる Fb は、末梢神経損傷後の軸索再生を含む修復過程の中で直接的、あるいは細胞間相互作用を介して異なる役割・能力を持つと考えた。

2. 研究の目的

以上より、解剖学的位置の異なる Fb は、末梢神経損傷後の軸索再生を含む修復過程で異なる役割・能力を持つという仮説を立て、本研究の目的は、末梢神経組織由来の Fb の成体後根神経節 (Dorsal root ganglia: DRG) 神経細胞の神経突起伸長能力と分子的特徴を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1)Fb の調製

ラット坐骨神経の神経上膜、神経実質、腹部の皮膚組織を 1-2mm に切断し、2% collagenase および 0.125% trypsin による 1 時間の酵素処理を行い、細胞を単離後、フラスコに播種し、30 分後に培養液を交換した。4 日後に 1 回継代した後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) による固定、または DRG ニューロンとの共培養に用いた。余剰の Fb は凍結保存し、後の網羅的遺伝子発現解析に使用した。

(2)DRG 神経細胞の調製

ラット腰椎 DRG を 1%コラゲナーゼ XI で 1 時間培養後、DMEM/Ham's F-12 に 2%B27 supplement および 1%P/S を添加したニューロン培養液 1ml に再懸濁させ、1ml ピペットで穏やかに攪拌して、DRG 神経細胞の単細胞懸濁液を得た。

(3)培養細胞の蛍光免疫染色

PFA 固定した細胞を、5%ウマ血清でブロッキングし、一次抗体とともに 4 日に一晩培養、二次抗体で 1 時間室温で培養した。

(4)Fb と DRG 神経細胞の共培養

2 種類の Fb-DRG 神経細胞共培養アッセイを用いた。一つは Fb の上に DRG 神経細胞を播種した。24 well plate に神経上膜、神経実質、皮膚由来の 3 種類の Fb(それぞれ Fb-Epn, Fb-Par, Fb-Par とする)を播種し、翌日、Fb の上に DRG 神経細胞を播種、48 時間後に 4%PFA で固定した。もう一つは、各 Fb をインサート (孔径 0.4 μm) 上で培養後、翌日、同一 well 内に DRG 神経細胞を播種し、48 時間後に 4%PFA で固定した。

(5)神経突起伸長アッセイ

3Tublin の免疫染色画像を取得した。NeuronJ を使用して神経突起長を定量した。長さ 50 μm 以上の神経突起を伸ばした神経を神経突起伸長ニューロンと定義した。1 ウェルあたり少なくとも 50 個の神経細胞を無作為に選択し、最長神経突起長の平均値と神経突起伸長ニューロンの割合を算出した。

(6) 軸索再生部の Fb の局在

ラットの坐骨神経を露出し、一方は大腿中央部で切断し、もう一方はマイクロ鉗子で圧挫した。損傷から7日後に灌流固定し、10 μmの厚さで縦方向の切片を作成した。切片を一次抗体で一晩培養後、2次抗体で1時間培養した。

(7) 網羅的遺伝子発現解析

合計9サンプル(各Fb3サンプル)からRNAを抽出し、NEBNext® UltraTMII Directional RNA Library Prep Kitを用いてそれぞれのライブラリを調製し、イルミナ NovaSeq 6000 で Paired end reads (150 bp)を取得した。Rattus norvegicus genome rn6 にアラインメントし、FastQCで品質チェック、Trimomaticでトリミング、HISAT2でマップし、p値<0.01かつlog2 fold change (FC) > 2の遺伝子を差分発現遺伝子と定義した。GeneOntology (GO) および KEGG パスウェイ解析は、DAVID ([https:// david.ncifcrf.gov/](https://david.ncifcrf.gov/))を用いて実施した。

4. 研究成果

(1) Fb の細胞学的特徴

3種類のFbはいずれも類似した形態を示し、1型コラーゲン(Co11)やThy1などのFbマーカーを発現していたが、SCやECの存在はごくわずかであり、培養Fbの純度が高いことが示された。SCやECは末梢神経から構成され、付着性の細胞であるにもかかわらず、ラット坐骨神経から培養された初代Fbは高い純度を有していた。これは、細胞を播種してから1時間後に細胞培養液を交換したことに起因すると考えられ、また、FbがSCや血管ECに比べて著しく高い接着性を持っていることを示す。

(2) 神経突起伸長効果 (接触共培養)

PLLでコーティングしたプレート上では、神経突起が伸長した神経細胞は少数であったが、Fb上では有意に多くのDRG神経細胞が伸長した(図1B-E)。3種類のFbのうち、Fb-Skn共培養では28.2%の神経細胞が神経突起伸長ニューロンであったが、Fb-EpnとFb-Par共培養の場合は45.9%と43.9%であった(図1D)。最長神経突起長の平均を測定したところ、Fb-Epnと共培養した神経細胞が最も長く、次いでFb-Parと共培養した神経細胞、Fb-Sknだった(図1E)。これらの結果は、FbがDRG神経細胞の神経突起伸長を促進すること、PNS由来のFbはFb-Sknよりも神経突起伸長効果が有意に大きいこと、Fb-EpnはFb-Parよりも効果的に神経突起の伸長を促進することを示している。

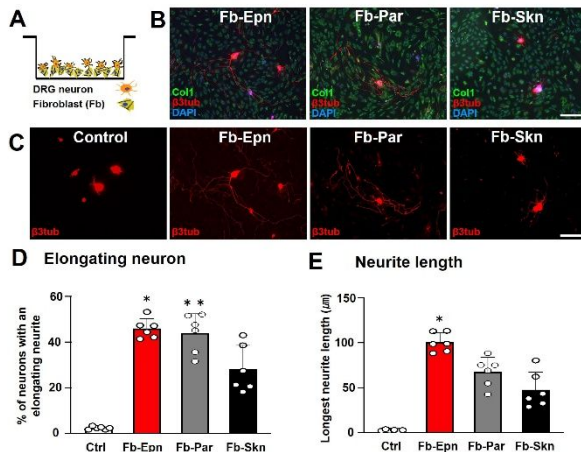


図1. 各FbとDRG神経細胞の接触共培養による神経突起伸長効果

A. 実験の模式図。B. DRG神経細胞とFbの代表画像。C. 3tubで標識したDRGニューロンの代表的な画像。D. 神経突起伸長ニューロンの割合。一元配置分散分析とTukey-Kramer検定。n=6well/条件。E. DRG神経細胞の最長の神経突起の定量化。一元配置分散分析とTukey-Kramer検定。n=6well/条件。*; P<0.05 compare to others, †; P<0.05 compare to the control. Scale bar: 150 μm.

(3) 神経突起伸長効果 (非接触共培養)

共培養したFbを同じウェル内のインサート上に置き、神経細胞と分離した。48時間後、すべての種類のFbは、Fbと共培養していないコントロールと比較して、神経突起伸長ニューロンの割合を有意に増加させた。Fb-Epnが最も高く、次いでFb-Par、Fb-Sknであった。また、最長神経突起長を定量したところ、Fb-Epnと共培養した神経細胞が最も長く、次いでFb-Par、Fb-Sknと共培養した神経細胞が長く神経突起を伸ばした。先の実験の数値と比較すると、神経突起が伸長している神経細胞では、Fb-Epn、Fb-Par、Fb-Sknがそれぞれ53%、51%、64%減少し、神経突起長が最も長い神経細胞ではFb-Epn、Fb-Par、Fb-Sknがそれぞれ45.3%、56.0%、45.8%減少していることが判明した。これらの結果は、Fb-EpnとFb-Parの神経突起促進作用は、液性因子と接着因子に同程度に起因することを示している。

(4) 軸索再生部の Fb の局在

圧挫損傷と切断損傷の2つの損傷モデルを用いて、損傷後7日目のFbの位置と再生中の軸索先端との位置関係を調べた。圧挫損傷後では、ワラー変性領域に再生軸索が観察され、Fb

は主に上膜に存在し、再生軸索の周囲には存在しなかった（図2A, B）。一方、切断損傷後では、損傷部位に多数のFbが観察され（図2C）、再生軸索が損傷部位を横断していたが（図2C, D）いずれのFbも再生軸索との接触はなかった（図2D）。これらの結果は、Fbが発現する細胞表面因子が軸索再生を促進する能力を有していても、PNI後の再生軸索にはFb由来の液性因子しか利用できないことを示唆している。

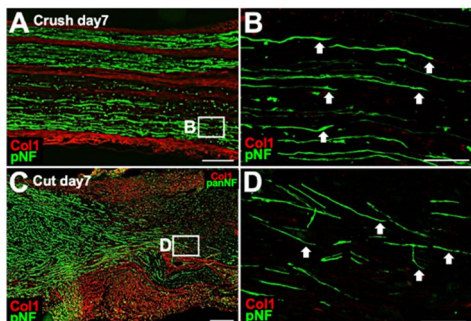


図2. 圧挫損傷と切断損傷後7日目の再生軸索先端部
A. ラット坐骨神経縦断面の低倍率画像（圧挫損傷後7日目）。左側が近位で、損傷部位から18mm遠位部分の画像。1型collagen (Col1) と pan Neuro Filament (pNF) による二重免疫組織像。Scale bar; 300 μ m。B. 矢印は再生軸索の先端。Fbと再生軸索の接触を認めない。Scale bar; 50 μ m。C. D 切断損傷後7日目のラット坐骨神経縦断面における損傷部位。左側が近位。矢印は再生軸索の先端。Fbと再生軸索の接触を認めない。Scale bar; 300 μ m。

(5) 網羅的遺伝子発現解析

Fb-Epn と Fb-Skn の間で 2811 遺伝子、Fb-Epn と Fb-Par の間で 2681 遺伝子の発現レベルが有意に異なり ($p < 0.01$)、3つのFbの分子プロファイルが明確に異なることを示している。Fb-Skn に対して、Fb-Epn と Fb-Par で有意に発現が増加した 196 個の遺伝子について GO 解析の結果、細胞増殖関連語が同定され、KEGG 解析では、恒常性の維持・調節および炎症細胞の動員において機能していることが示唆された。また、Fb-Par に対して Fb-Epn で有意に発現が上昇した 403 個の遺伝子について、GO 解析の結果、血管新生、細胞移動、炎症反応が同定され、KEGG 解析により、細胞周期、サイトカイン-サイトカイン受容体相互作用、ケモカインシグナル伝達経路が確認され、Fb-Epn は炎症反応制御と免疫細胞の産生誘導で、傷害反応に関与している可能性が示唆された。Fbからの分泌遺伝子を検討した結果、Fb-Epn は、HGF、プリオトロピン、セルビン2、ネクチン3、エファ3の遺伝子を上昇させ、Fb-Par はオステオポンチンと IGF1 の遺伝子を上昇させた。興味深いことに、Fb-Skn は Fb-Epi や Fb-Par と比較して、神経成長因子、グリア細胞由来神経栄養因子、脳由来神経栄養因子といった主要な軸索再生因子をコードする遺伝子を発現した。これらのことから、Fbの神経突起促進作用は、各Fbに固有の分泌因子が介在していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Endo T, Kadoya K, Suzuki T, Suzuki Y, Terkawi MA, Kawamura D, Iwasaki N	4. 巻 7
2. 論文標題 Mature but not developing Schwann cells promote axon regeneration after peripheral nerve injury.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41536-022-00205-y	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 -
1. 著者名 Hara Masato, Kadoya Ken, Endo Takeshi, Iwasaki Norimasa	4. 巻 108
2. 論文標題 Peripheral nerve derived fibroblasts promote neurite outgrowth in adult dorsal root ganglion neurons more effectively than skin derived fibroblasts	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Experimental Physiology	6. 最初と最後の頁 621 ~ 635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/EP090751	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 -
1. 著者名 Suzuki Tomoaki, Kadoya Ken, Endo Takeshi, Iwasaki Norimasa	4. 巻 -
2. 論文標題 Molecular and Regenerative Characterization of Repair and Non-repair Schwann Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10571-022-01295-4	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 Suzuki Yuki, Nakagawa Shinsuke, Endo Takeshi, Sotome Akihito, Yuan Rufeif, Asano Tsuyoshi, Otsuguro Satoko, Maenaka Katsumi, Iwasaki Norimasa, Kadoya Ken	4. 巻 19
2. 論文標題 High-Throughput Screening Assay Identifies Berberine and Mubritinib as Neuroprotection Drugs for Spinal Cord Injury via Blood-Spinal Cord Barrier Protection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurotherapeutics	6. 最初と最後の頁 1976 ~ 1991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13311-022-01310-y	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 Yamamoto Yasuhiro, Kadoya Ken, Terkawi Mohamad Alaa, Endo Takeshi, Konno Kohtarou, Watanabe Masahiko, Ichihara Satoshi, Hara Akira, Kaneko Kazuo, Iwasaki Norimasa, Ishijima Muneaki	4. 巻 5
2. 論文標題 Neutrophils delay repair process in Wallerian degeneration by releasing NETs outside the parenchyma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202201399	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 -

1. 著者名 Matsui Yuki, Kadoya Ken, Nagano Yusuke, Endo Takeshi, Hara Masato, Matsumae Gen, Suzuki Tomoaki, Yamamoto Yasuhiro, Terkawi Mohamad Alaa, Iwasaki Norimasa	4. 巻 79
2. 論文標題 IL4 stimulated macrophages promote axon regeneration after peripheral nerve injury by secreting uPA to stimulate uPAR upregulated in injured axons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁 289
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00018-022-04310-5	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10件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 原健人、角家健、鈴木智亮、松居祐樹、山本康弘、遠藤健、岩崎倫政
2. 発表標題 末梢神経特異的線維芽細胞の神経突起伸長効果に関する検討
3. 学会等名 第140回北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原健人、角家健、鈴木智亮、松居祐樹、山本康弘、遠藤健、岩崎倫政
2. 発表標題 末梢神経特異的線維芽細胞の神経突起伸長効果に関する検討
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、原健人、松前元、Alaa Terkawi、岩崎倫政
2. 発表標題 M2マクロファージはuPAを介して末梢神経損傷後の軸索再生を制御する
3. 学会等名 第64回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、原健人、松前元、Alaa Terkawi、岩崎倫政
2. 発表標題 M2マクロファージはuPAを介して末梢神経損傷後の軸索再生を制御する
3. 学会等名 第94回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木智亮、角家健、遠藤健、山崎美和子、渡辺雅彦、岩崎倫政
2. 発表標題 新規軸索再生因子GFR 1の末梢神経再生効果とその分子機構
3. 学会等名 第140回北海道整形災害外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木智亮、角家健、遠藤健、山崎美和子、渡辺雅彦、岩崎倫政
2. 発表標題 GFR 1のNCAM、Integrin複合体を介した末梢神経軸索再生促進効果
3. 学会等名 第32回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木智亮、角家健、遠藤健、山崎美和子、渡辺雅彦、岩崎倫政
2. 発表標題 新規軸索再生因子GFR 1の末梢神経再生効果とその分子機構
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Suzuki Y, Kadoya K, Endo T, Matsui Y, Rufe Y, Asano T, Maenaka K, Nakagawa S, Iwasaki N.
2. 発表標題 Development of High-throughput assay to screen potential drugs to protect blood-brain spinal cord barrier identifies Berberine as neuroprotection drug for spinal cord injury
3. 学会等名 The 59th International Spinal Cord Society Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、原健人、松前元、Alaa Terkawi、岩崎倫政
2. 発表標題 M2マクロファージによる末梢神経軸索再生の制御
3. 学会等名 第31回日本末梢神経学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、原健人、松前元、Alaa Terkawi、岩崎倫政
2. 発表標題 M2マクロファージによる末梢神経軸索再生の制御
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 GFR 1を含む神経突起伸長促進剤及び神経再生誘導用医療材料	発明者 角家健、鈴木智亮、 遠藤健	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-218091	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------