

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22994

研究課題名(和文) シュワン細胞由来エクソソームの局所送達による重度末梢神経障害治療法の確立

研究課題名(英文) Schwann cell derived small extracellular vesicles function as TNF α decoys in peripheral nerve injury

研究代表者

廣澤 直也 (Hirosawa, Naoya)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：10882748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経障害において、シュワン細胞は神経の変性、炎症反応、疼痛にまず寄与する細胞として知られている。TNF α は末梢神経障害時、早期に関与しワーラー変性を引き起こす因子であり、末梢神経障害治療においてTNF α をいかに制御するかが鍵と考える。今回我々は、ラットシュワン細胞由来のエクソソームの抽出を行い、今回新たに純度の高いエクソソームの抽出方法を確立した。シュワン細胞由来エクソソームはTNF α の受容体であるTNF α 1を豊富に含んでいることが判明し、シュワン細胞由来エクソソームが炎症の抑制、生体内における疼痛の抑制を行い、TNF α に対しおとりの役割を果たしていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性末梢神経障害は、依然確立された治療がなく、患者さんの肉体的精神的負担のみならず、疼痛の慢性化に伴う医療費の増大に繋がる。我々は今回、末梢神経内でメインの細胞であるシュワン細胞、近年注目を集めている細胞外小胞体、エクソソームに注目し研究を行った。シュワン細胞由来エクソソームは末梢神経障害におけるキーとなるTNF α の抑制を行うことを見出し、より確実に末梢神経障害部位にエクソソームを寄与することを目的とし更なる研究を行う。このエクソソームを活用した末梢神経障害治療が今後大きくこの分野の治療を変えていく可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In peripheral nerve injury (PNI), Schwann cells (SCs) serve as first responders and regulate neuro-inflammation, regeneration, and pain. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) is expressed by SCs early in PNI and orchestrates Wallerian degeneration (WD). The spatial and temporal regulation of TNF α is key in PNI. Herein, we demonstrate that SCs release small extracellular vesicles (sEVs) that attenuate TNF α responses. The activity of SC-derived sEVs reflect TNF α receptor (TNFR1), which is abundant in the sEV membrane and serves as a decoy, inhibiting TNF α from binding to SC TNF α receptors that trigger pro-inflammatory responses. SC-derived sEVs attenuate WD and pain induced by TNF α in sciatic nerves and thus, constitute a previously unrecognized, naturally occurring regulatory system in PNI.

研究分野：末梢神経

キーワード：シュワン細胞 エクソソーム 末梢神経障害性疼痛

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷性末梢神経障害、絞扼性神経障害、CRPS (複合性局所疼痛症候群) などの末梢神経障害、中でも疼痛が遷延する重度末梢神経障害は、薬物療法に抵抗性を示し、効果を確実に期待できる外科的治療はわずかである。神経障害性疼痛に加え、入院および通院加療による医療費増大、社会復帰遅延による多大な経済損失に直結する。従って、その治療法の開発は急務である。申請者はこれまでに重度末梢障害に対する治療法を確立すべく、既存の治療方法の作用メカニズムの解明、それを基盤とした新規治療シーズの開発を行ってきた。

2. 研究の目的

高密度コラーゲンシートにシュワン細胞由来エクソソームを搭載した新規材料の重度末梢神経障害モデルに対する有用性を明らかにすることを目的とする。その前段階として、シュワン細胞由来エクソソームが末梢神経障害の Waller 変性のきっかけ、末梢神経障害の Key となるサイトカインである TNF α に及ぼす影響、そのメカニズムの探求を行うことをまず目的として本研究を進めた。

3. 研究の方法

(1) Primary Schwann 細胞培養の確立

生後 1 日のラットより、両側の坐骨神経を採取。コラゲナーゼ処理を行い、坐骨神経内に存在する繊維芽細胞を可能な範囲で除去し Pure な未分化 Schwann 細胞を採取する。Schwann 細胞の純度は P75NTR による免疫組織染色を行い、陽性細胞数の割合を見ることで、最終的に得られた細胞の Schwann 細胞純度を評価する。

(2) Schwann 細胞が分泌する細胞外小胞体エクソソームの抽出方法の確立

これまでに未分化ラット Schwann 細胞由来の抽出方法が報告されてきた。しかし、その方法は Schwann 細胞以外に培地内に外在性エクソソームが存在していることが見逃されており、同様の手法では、純度の低い Schwann 細胞由来エクソソームしか抽出できなかった。その為、今回新たに外在性のエクソソームを除去し純度の高い Schwann 細胞由来エクソソームの抽出方法の確率を試みた。Schwann 細胞由来のエクソソーム採取に向け、まずは通常の Schwann 細胞培地で細胞数を約 20M まで増殖させた。その間、極力細胞にストレスを与えないよう Medium の交換など行った。顕微鏡で Schwann 細胞形態を確認し細胞の状態を確認した。その後、エクソソーム抽出の為の外在性エクソソーム除去を行った培地に切り替えた。エクソソーム抽出用培地では、通常の Schwann 細胞培地で用いられる、Forskolin や BPE は用いず、また通常用いる FBS は、使用前に 18 時間 100,000G 18 時間の超遠心機で遠心をかけ上清のみ使用するエクソソーム除去 FBS をエクソソーム用培地として用いた。このエクソソーム除去 FBS 内にエクソソームが存在しないことは後述するエクソソームマーカーを用い Immunoblotting で確認を行った。エクソソーム用培地では、通常より Schwann 細胞への負担がかかりやすい状況であり、細胞死を 1% 以下に防ぐため、エクソソーム培地切り替え後 12 時間で培地のみを採取し、Schwann 細胞が分泌するエクソソームの抽出を試みた。細胞死の確認は Trypan blue 染色を行い確認を行った。採取した培地をまずは 500g10 分の遠心をかけ、浮遊する細胞を除去した。次いで、2000g25 分の遠心をかけ、細胞の Debris を除去、10,000g35 分の超遠心機をかけ、エクソソームより径の大きい Microvesicles を除去した。そして最後に 100,000g18 時間を 2 回かけ、エクソソームの採取、洗浄を行い、得られた沈殿物をエクソソームとして扱った。

(3) Schwann 細胞由来エクソソームの確認

(2) で得られた沈殿物がエクソソームであることの確認の為に以下に述べる方法・検査を行った、まずは電子顕微鏡を用い、得られた沈殿物の形態、Size を確認した、また、Nanosight と呼ばれる粒子のブラウン運動をとらえる測定器を用い、検体内の粒子径の平均値、粒子数の確認を行った。次いで、Immunoblotting を行い、エクソソームマーカーとされる、Flotillin-1, TSG101, CD9, Alix, CD81 の存在の確認を Schwann 細胞 Lysate と比較しながら検出を行った。と同時にエクソソーム Negative マーカーとされる GM130 の有無の確認を行った。エクソソームは分泌する細胞の特異的マーカーを反映することが知られており、今回 p75NTR, P0, GFAP など神経系のマーカーに関しても Immunoblotting で評価を行った。以上、電子顕微鏡、Nanosight, Immunoblotting を用いエクソソームの確定、純度の評価を行った。

(4) TNF α 神経内注入モデルによる末梢神経障害モデルの作製

本研究では、将来的な重度末梢神経障害モデルに対する、Schwann 細胞由来エクソソームの効果を確認する前段階として、末梢神経障害の Key となるサイトカイン TNF α に焦点をあて研究を進めた。留学先で学んだ神経障害性モデルであり、8 週齢 SD ラット雄を用い、坐骨神経展開後、500pg の TNF α をハミルトン針を用い、ラット坐骨神経内に注入することでモデルを作成した。注入した部位に関しては 6-0nylon を神経近くの Fascia に縫合しメルクマールとした。ラット坐骨神経の障害を確認するために Allodynia を確認できる von FREY test を行った。それにより確実に末梢神経障害が来されたことを確認した。

(5) Schwann 細胞由来エクソソームの生体内における効果の確認

(4) で作成したモデルをコントロール群とし、エクソソーム + TNF α 500pg 群、生食注入群の 3 群 (n=8) を設定した。それら 3 群のモデルラットを用い、前述した von Frey test、神経内注入部より 5mm 程遠位から採取した坐骨神経の免疫組織染色を行った。免疫組織染色では、HE/P0/PGP9.5 の染色を行い、髄鞘・軸索の評価を行った。また、神経注入部より 5mm 遠位から神経のみを採取し生体内における炎症性タンパク質の発現状態をリン酸化 p38 を用い評価した。

(6) In vitro 研究: TNF α Binding assay, TNF α 受容体の確認、TNF α ライガンドプロット

(5) の結果を受け、神経内に注入した TNF α がどこに結合したかを確認する目的で Biotin TNF α を用いることで、投与した TNF α がどこに局在するかを検討した。検討方法としては、組織の免疫組織学的染色、Biotin TNF α を用いた TNF α Binding Assay、TNF α 蛍光染色、TNF α の主要な受容体である TNFR1 の有無を Immunoblotting で確認、そして TNF α とエクソソームの直接的 Binding を確認する為に TNF α Ligand Blotting を行った。

(6) 1 TNF α Binding Assay、TNF α の傾向染色

(1) で採取した Schwann 細胞を PDL にて Coating を行った 6 well plate に 2.5×10^5 cells/well で投与し、85% Confluent になるまで培養を行った。その後、Biotin-labeled recombinant TNF α (100ng/ml) と (2) で得られた Schwann 細胞由来エクソソームを混和し投与した。その後 1 時間後に、RIPA buffer を用いて Cell Lysate、培養液を採取した。タンパク量を均一にし、Immunoblotting を行い、Biotin-labeled TNF α の定量評価を行い、外在性 TNF α の局在の評価を行った。また、同様に 6 well plate で培養を行った Schwann 細胞に対し、培養液のみ投与した群、Biotin-labeled TNF α 投与群、Biotin-labeled TNF α +Schwann 細胞由来エクソソーム投与群の 3 群に分け、抗 TNF α 抗体を用いた蛍光染色を行い、Schwann 細胞そのものへの TNF α の結合の有無を確認した。

(6) 2 TNF α 受容体の有無の確認

(2) で得られた Schwann 細胞由来エクソソーム及び、その際に得られる Schwann 細胞 Cell lysate を対象とし TNF α 受容体として知られる TNFR1, TNFR2 の発現を Immunoblotting で評価した。

(6) 3 TNF α Ligand Blotting

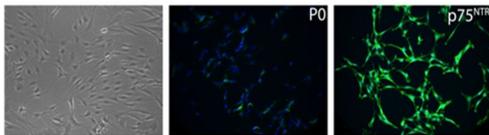
(6)-1 で得られた結果を元に、Schwann 細胞由来エクソソームと TNF α の直接的結合の可能性を探求するため、Ligand blotting を行った。本方法は、基本は Immunoblotting と同様であるが、Non-reducing condition にすることで検体のタンパク質構造を保持したまま、メンブレン上に検体を電気泳動させることが可能である。1 次抗体として recombinant TNF α を用い、2 次抗体として抗 TNF α 抗体を用い、TNFR1 の Trimer 構造を保持し、Schwann 細胞由来エクソソーム内に存在する TNFR1 と TNF α の直接的結合を確認した。

4. 研究成果

(1) Primary rat Schwann 細胞培養

上記手順にて未分化 Schwann 細胞培養を行った。

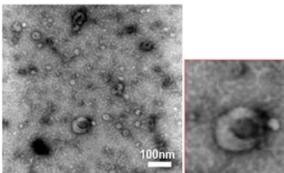
下記のような P0、P75NTR を用いた蛍光染色を行い、Schwann 細胞の純度が 95% 以上であることが確認された。



(2・3) Schwann 細胞由来エクソソームの証明

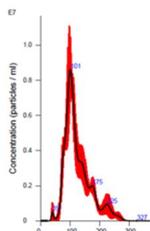
・電子顕微鏡

前述の方法で得られた検体に対し電子顕微鏡に Size、形態の確認を行った。下記写真にあるよう粒子径は約 100 μ m 以下、形態もエクソソームの特徴として知られる Cup-Shaped でありエクソソームとして矛盾しない所見を得られた。



・NanoSight

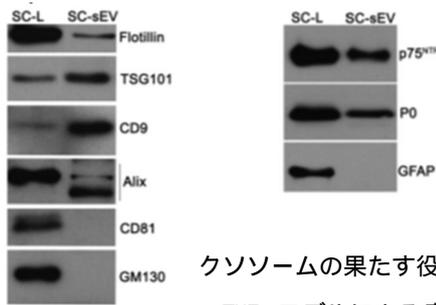
電子顕微鏡に加え、さらなる検体の粒子径・粒子数を確認するため、Nanosight を用い検討を行った。粒子径の平均は 105nm でありエクソソームの Size として知られる 50-150nm の径であった。また粒子数は 1ng protein あたり、0.1Mparticles であった。



・Immunoblotting

SC-L は Schwann 細胞の Cell Lysate, SC-sEV は Schwann 細胞由来エクソソームを指す。Figure にあるように、各エクソソームマーカーは陽性であり、中でも TSG101・CD9 は Cell Lysate より多く存在が確認され

ており、Schwann 細胞由来エクソソームではより発現が強く出るエクソソームマーカーであることが判明した。一方、他の細胞由来エクソソームで確認された CD81 は Schwann 細胞由来エクソソームでは発現されないことも新たに判明した、陰性マーカーである GM130 はエクソソーム検体内に確認されなかった。また、Schwann 細胞由来のエクソソームであることを裏付ける、p75^{NTR}、P0 が陽性、GFAP は陰性であった。以上より Immunoblotting においてもより純度の高いエクソソームが採取できたことが示唆された。

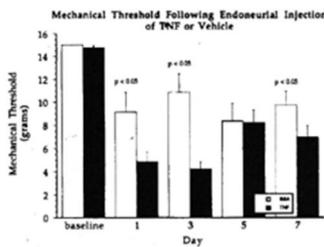


(4・5) TNFα 坐骨神経注入モデルによる Schwann 細胞由来エ

クソソームの果たす役割

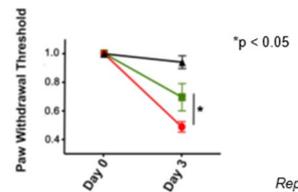
・ TNFα モデルによる疼痛過敏の惹起

Hamilton Syringe を用い、ラット坐骨神経内に 500pgTNFα (in 3ul PBS) を注入することで末梢神経障害性モデルを作成した。



上記にあるよう縦軸が von Frey test における Mechanical Threshold を示しており、値が小さいほど疼痛過敏を惹起していることが示唆される。白バーが PBS のみ、黒バーが TNFα 注入群であり、day3 にて最も有意に疼痛過敏が惹起されていることが判明した。その結果を受け、今回、3 群に分け、Schwann 細胞由来エクソソームが果たす役割を検討した。①Vehicle 群 (PBS 注入のみ) TNFα 群 (TNFα500pg のみ) TNFα + エクソソーム群 (TNFα500pg + Schwann 細胞エクソソーム 1800ng) の 3 群で評価を行った。

・ von Frey test

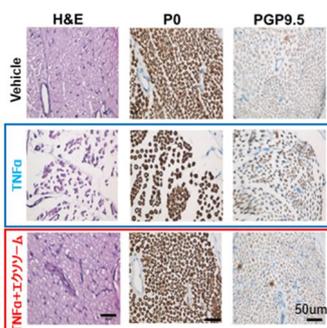


→ vehicle → TNFα → TNFα+エクソソーム 先行研究で最も有意差のある day3 に注目して検査を行った。御覧のように

エクソソーム投与群では有意に TNFα 単独投与群に比し疼痛過敏が抑制、すなわち TNFα による神経障害性疼痛の惹起が抑制されたことが示唆された。

・ 免疫組織学的染色

神経内注入後 3 日目に注入部位の遠位部よりラット坐骨神経を採取し H E 染色、P0 染色、PGP9.5 染色を行った。P0 染色は髄鞘の評価、PGP9.5 は軸索の評価として用いられるマーカーである。

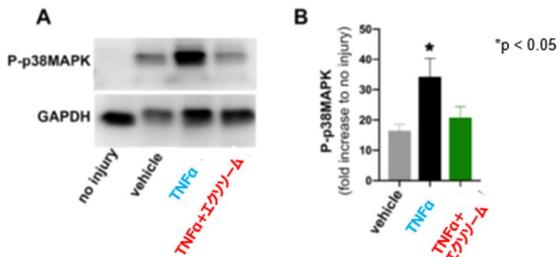


TNFα + エクソソーム群では、ほぼ Vehicle 群と同様な所見が得られたが、

TNF α 群では、髄鞘の浮腫・崩壊、また軸索の変性を認めた。すなわち、本来 TNF α で生じる神経の変性が完全にエクソソームにより抑制されたことが示された。

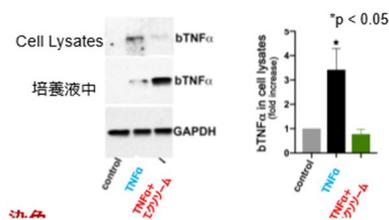
・ラット坐骨神経内における炎症カスケードの評価

注入モデル作成後 3 日目に、注入部より遠位 5mm の部位を採取し、炎症性カスケードの Key となるリン酸化 p38 の発現評価を Immunoblotting で行った。

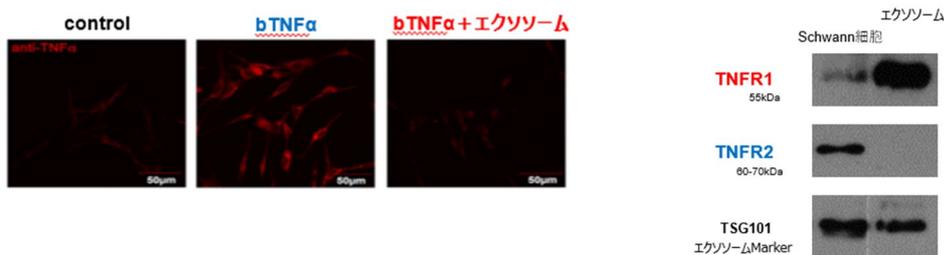


御覧の様に評価を行い、エクソソームを TNF α に混注することで TNF α により惹起されるリン酸化 p38 の発現が抑制されたことが示された。

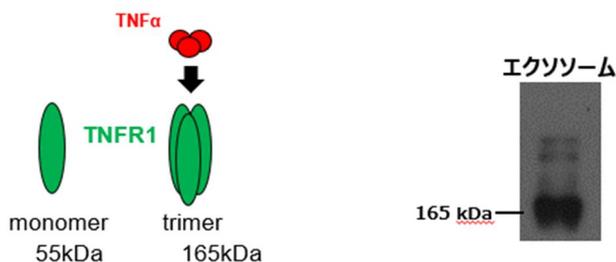
(6) In Vitro 結果



エクソソームを混注した群では外因性 TNF α である Biotin TNF α は培養液中に存在することが示された。また蛍光染色では、エクソソームは Control 群と同様に Schwann 細胞内への TNF α 取り込みが行われていないことが示された。



また、上記 Immunoblotting の結果より、Schwann 細胞由来エクソソーム内には Schwann より TNF α 受容体のメインであり TNFR1 がより豊富に存在することが示唆された。TNFR2 は存在していなかった。



また、TNF α ライガンドブロックを行い、Schwann 細胞由来エクソソーム内に Trimer として存在する TNFR1 受容体に TNF α が Binding することが Immunoblotting で示された。

以上より、本研究から、Schwann 細胞由来エクソソームは、TNF α に対し Decoy (おとり) としては作用し、末梢神経障害の Triggar を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------