

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09513

研究課題名(和文) IL-4誘導のM2ミクログリアは、中枢神経の直接縫合法で神経再生を促進する

研究課題名(英文) M2 microglia induced by IL-4 promotes neural regeneration of direct suturing central nerve

研究代表者

末永 潤 (SUENAGA, Jun)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：30610365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：開頭による嗅神経損傷モデルを作成。1) 両側嗅球破壊は、嗅覚は永続して消失、2) 両側嗅球線維離断は、一過性で自然回復。3) 一側外側嗅条(LOT)切断+対側嗅球破壊は、切断部位が嗅球からの距離に依存し、嗅球から遠位端では嗅覚障害なし、近位端では一過性障害。4) 両側LOT切断は、嗅球近位側の切断で、一過性中等度の嗅覚障害モデルを作成(n=10, 死亡率30%)。嗅覚再生実験として1)にcollagen matrix充填では再生なし。2), 3)にIL-4誘導のメラトニンを腹腔投与したが、有意差を持った改善なし。切断部近傍にIba-1陽性のmicrogliaを認め、BDAで線維切断を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

COVID-19感染症では、後遺症として嗅覚障害を認める。なぜ中枢神経の中で嗅覚なのか、感染者の中でも障害を遺すかどうかの機序も不明である。今回は嗅神経障害モデルの作成に注力し、一過性モデル作成に成功した。過去にもモデル作成の報告はあるが、ここ数十年変わりなく、また経鼻的に嗅糸の損傷モデルが多い。今回のモデルは頭蓋内脳神経損傷のモデルにも汎用でき、今後ミクログリアの働きをM2に制御・誘導して再生実験をすすめていく上でも、大きな進展と考えられた。科研の3年間は終了したが、現在はin vitroでneural stem cellを単離、継代し、これによる神経再生も引き続き目指している。

研究成果の概要(英文)：Olfactory nerve dysfunction model was established by open craniotomy. Bilateral olfactory bulb(OB) destroying model(1) showed permanent olfactory dysfunction. Simple transection of bilateral OB(2) showed transient dysfunction. Lateral olfactory tract(LOT) transection plus contralateral bulbectomy(3) and bilateral LOT transection model(4) showed transient olfactory dysfunction and distance from the olfactory bulb was correlated to the severity of dysfunction, n=10, mortality 30%. As regeneration of olfactory function, placement of collagen matrix to (1) showed no recovery. Melatonin, which induces systemic IL-4 and M2 microglia, was administered intraperitoneally to (2) and (3), but not significantly changed. Close to the transection site of LOT, accumulation of Iba-1 positive microglia were seen. BDA injection showed congestion at the transection site.

研究分野：神経再生、虚血、ミクログリア

キーワード：神経再生 虚血 ミクログリア 嗅覚障害モデル IL-4

## 1. 研究開始当初の背景

中枢・末梢の神経機能の再生は、脳卒中や術後合併症などで失われた機能予後を改善するのみに留まらず、神経を巻き込んだ腫瘍で従来は摘出困難とされていたものでも、合併切除し再生にかけることで生命予後の改善をも期待できる希望である。過去余多の研究者が挑みつつ成しえなかったのは、神経末端同士を吻合しても神経再生を妨げるグリア形成がすすむこと、研究者と臨床家の技法、目標に解離があり、in vitro の神経細胞レベルの再生、軸索伸長と、実臨床への移行がなされておらず、理論上の神経突起の再生や進展をみても実際の機能再生までは到達しえなかった。脳神経外科医が自ら研究する意義はそこであり、in vitro の知見を vivo の実験動物での神経再生に移行できれば、より実臨床応用に近づく。

神経機能障害には、a) 機械的な切断、b) 虚血、脱髄など中長期的な変性の2パターンがある。本研究内では a) において、神経再生の実際、メカニズムを探ることを考えた。脊髄損傷後の細胞移植や、顔面神経麻痺の吻合による再生など、神経再生は実臨床でも適応され行われている。しかし、従来中枢神経は再生しないと言われていたように、再生の阻害因子が癒痕組織形成をし、軸索伸長を妨げる要因となっている。

ミクログリアは脳内におけるマクロファージであり、損傷後の組織修復、貪食など環境浄化に働く。反面その作用が強いと正常組織へも攻撃、破壊性となる。この組織破壊性の働き M1 と組織修復の働き M2 の2面性の排他的な作用が報告されている(Hu et al. Stroke 2011)。ミクログリアの働きを M2 に誘導することで、脳梗塞後は虚血体積の減少、保護作用があり、また高齢ラットにおいても M2 の働きが減少していることが実験的に示された(Suenaga et al. Exp Neurology 2015)。虚血などのイベントが起きたあとの経時的な変化で、M2→M1 とシフトが起こるものであるが、この M2 の時期をより長く保つことができれば神経保護となる。

メラトニンは松果体ホルモンとして知られ、睡眠・覚醒のサーカディアンリズムに関わるだけでなく、抗炎症ホルモンとして炎症性サイトカインの抑制に働くことを明らかにしてきた(Suenaga 科研 基盤 C 2015-17)。この作用はミクログリアを M2 に誘導する IL-4 を介することは、IL-4 knockout mouse やメラトニン KO mouse で確かめられた。

神経再生において、軸索伸展を妨げる因子として Nogo 蛋白質がある。当教室と共同研究のグループにより、横浜市立大学では神経回路促進因子の LOTUS を同定。当教室では LOTUS 高発現ラットを作成。LOTUS 高発現下では、軸索伸長が、正常に比べて亢進していることが明らかになった (Takase. PLoS One, 2017)。

軸索伸長を妨げる微細環境としては、研究、実臨床の場面で癒痕形成が大きな役割を果たしている。癒痕は GFAP 陽性の glia 組織であるが、癒痕形成を押さえるには、上記ミクログリアの働きが重要と考えられる。神経再生を成し遂げる上で、ミクログリアの環境を整えることは、機能予後改善につながる可能性が高い。実験的に若年・老年でも、脳虚血後に、M2 環境下に長く置かれると良好な予後となり、圧倒的な違いが生まれる。

ミクログリアのサイトカインマーカーとして、M1 ; iNOS、TNF- $\alpha$ 、IL-6 など、M2 ; CD206、IL-4、IL-10 などがある。IL-4 は M2 誘導の有用なサイトカインとして知られる。先のメラ

トニン、IL-4 誘導の強力なホルモンであり、メラトニンにより、脳虚血耐性を示し、脳梗塞モデルでも脳梗塞が体積で 30%減少することを示した(Suenaga 科研 基盤 C 2015-17)。このメラトニンの虚血耐性効果は IL-4 依存性であり、IL-4 knockout mouse では、この効果はみられず、メラトニンの効果は IL-4 依存性であることを同定した。またその先には、M2 マーカーである CD206 の上昇を確認し、これらの効果が M2 ミクログリアの働きであることを示した。

神経再生にとってこの M1/M2 の関与、誘導がどの程度関与しているのか、を引き続き研究していくこととなった。

## 2 . 研究の目的

これらの背景を踏まえて、神経再生においても癒痕形成抑制にはミクログリアの貪食作用が重要と考え、これを M2 に誘導することで有効な神経再生を成しえようとするのが本研究の目的である。上記概要に述べたように、嗅神経切断モデルを開頭、外科的に作成。神経自体の切断端同士を、直接再縫合する(10-0 nylon で縫合)、切断神経間に、腓骨神経を介在させこれと端々吻合、IL-4 を散布したコラーゲンシートを周囲に巻き、神経再生の足場となるようにする、といったことを検討した。

実臨床においては、聴神経腫瘍術後などで顔面神経機能を喪失した場合は、直接吻合、舌下神経との縫合、あるいは腓腹神経を介在させて吻合を行っている。機能改善が多少みられるが、有効な改善にはつながらないのが現状である。

## 3 . 研究の方法

嗅神経障害モデルは、両側嗅球除去モデルや嗅索切断モデルなどが古くは報告されている(1992 Carr VM, 1993 Ezeh PI)が、嗅覚障害モデルとしては最近報告されておらず、専らうつ病モデルとして用いられている。経鼻的に嗅球に硫酸亜鉛点鼻(2000 寺西)や、Caspase 3 活性化のメチマゾール局注(2007 坂本)で嗅覚障害モデルは作成されている。

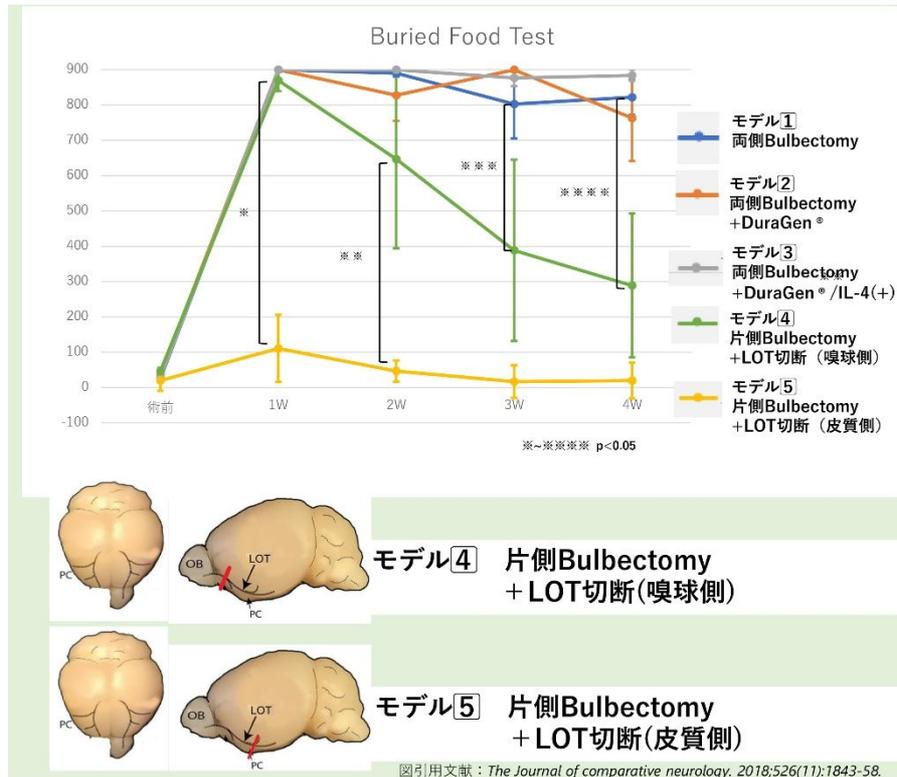
本研究では、開頭での嗅球露出、破壊術、また神経線維の切断、外側嗅条の切断によるモデルなどで、嗅球損傷モデルを作成した。また嗅覚評価に関しては、Buried food test で行った。

In vitro では、neural stem cell の単離、培養、継代を行った。これらを collagen matrix 上で行い、直接損傷部位へ移植を行った。

## 4 . 研究成果

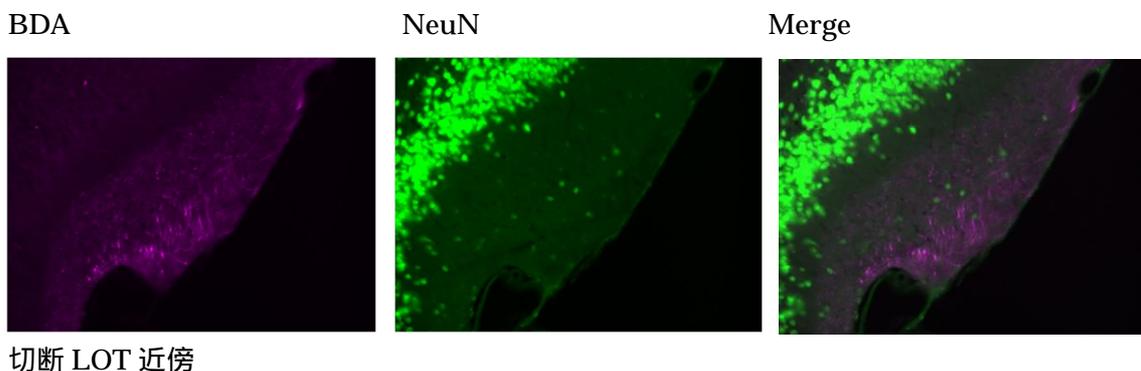
- (1) 嗅覚障害モデル樹立：C57BL/6J 雄 8 週齢を開頭手術。A) 両側嗅球破壊モデル (bulbectomy)は、永続モデル作成(n=5, 死亡率=0/5)。嗅球線維の離断(メスで切開)のみでは、軽微な障害が数週で自然回復(n=4, 死亡率=0/4)。B) 一側外側嗅条 (LOT: lateral olfactory tract) 切断+対側 bulbectomy モデルは、嗅球から離れた遠位端では嗅覚障害は起きず(n=13, 死亡率=4/13)、嗅球に近い近位側では一過

性の嗅覚障害が時系列で改善(n=35, 死亡率=5/35)。C) 両側 LOT 切断モデルは、手術時間はかかるが適切な切断位置(嗅球近位側)で、一過性中等度の嗅覚障害モデルを作成(n=10, 死亡率=3/10)。嗅覚評価には、buried food test を用いた。(Figure 1)

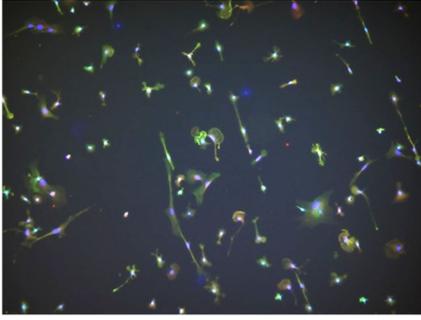


(2) 嗅覚再生: DuraGen を基質とし、A)に充填した(microglia の M2 分化誘導の IL-4 含有 +/- も併用)が、再生なし(n=5 each)。B)や C)に、IL-4 誘導のメラトニンを腹腔投与(10mg/kg)したが改善なし(n=8 each,  $p > 0.05$ )。凍結切片で LOT 切断部位近傍に Iba-1 陽性の microglia 集簇を確認。また嗅球への BDA 投与後 5 日で、切断モデルでは嗅皮質に集積しないことを確認した。

(Figure 2)



(3) 培養系細胞: 胎児および生後 2 日、また 8 週齢大脳皮質から、脳室周囲の神経(neural stem cell)および microglia を単離、培養。初代培養は成功したが、継代では死細胞率が多く共培養系を構築中である。DuraGen との 3 次元培養が確立次第、LOT model へ投与し、神経再生効果を確認していく。



単離・培養した microglia 緑 Iba-1, 赤 Arg-1(M2), 青 DAPI

本科研費研究期間内では嗅神経再生までいかず、嗅神経切断モデル樹立にとどまった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 末永 潤, 長尾 景充, 提箸 祐貴, 佐藤 来紗, 岡本 楓, 益子 悠, 鈴木 良介, 三宅 勇平, 池谷 直樹, 佐藤 充, 立石 健祐, 清水 信行, 村田 英俊, 山本 哲哉.
2. 発表標題 吸収性人工硬膜DuraGenの臨床適応および問題点. 様々な術式に対するNew Device活用の検討 課題と可能性
3. 学会等名 Integra Japan 神奈川セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末永 潤, 村田 英俊, 岡 千紘, 鴨川 美咲, 長嶋 薫, 大垣 福太郎, 長尾 景充, 鈴木 良介, 三宅 勇平, 池谷 直樹, 佐藤 充, 立石 健祐, 清水 信行, 山本 哲哉
2. 発表標題 眼窩内血管腫手術における注意点. 3Dで学ぶ脳神経外科手術:腫瘍(2) 内視鏡, 外視鏡, 脊髄
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第79回学術総会, (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末永 潤, 長尾 景充, 藤井 啓太, 本郷 剛, 松本 修太郎, 大島 聡人, 大友 優太, 岡野 将之, 池谷 直樹, 佐藤 充, 立石 健祐, 清水 信行, 村田 英俊, 山本 哲哉.
2. 発表標題 吸収性人工硬膜DuraGenの臨床使用経験および皮下髄液貯留の対処法.
3. 学会等名 第29回 脳神経外科手術と機器学会, シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末永 潤, 村田 英俊, 岡 千紘, 鴨川 美咲, 長嶋 薫, 大垣 福太郎, 長尾 景充, 鈴木 良介, 三宅 勇平, 池谷 直樹, 佐藤 充, 立石 健祐, 清水 信行, 山本 哲哉.
2. 発表標題 血管解剖から考える眼窩内腫瘍手術における注意点.
3. 学会等名 第32回 日本頭蓋底外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 末永 潤, 清水 信行, 岡 千紘, 鴨川 美咲, 長嶋 薫, 大垣 福太郎, 長尾 景充, 鈴木 良介, 三宅 勇平, 池谷 直樹, 佐藤 充, 山本 哲哉.
2. 発表標題 眼窩内腫瘍・血管奇形に対する塞栓術5例の経験.
3. 学会等名 第36回日本脳神経血管内治療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松澤良, 末永潤, 林貴啓, 横井育宝, 笹目丈, 大島聡人, 本間博邦, 佐藤充, 立石健祐, 山本哲哉
2. 発表標題 嗅神経障害モデルを用いた神経再生への取り組み
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Matsuzawa, Jun Suenaga, Takahiro Hayashi, Ikuhou Yokoi, Akito Oshima, Hirokuni Honma, Mitsuru Sato, Hajime Takase, Kensuke Tateishi, Tetsuya Yamamoto
2. 発表標題 Endeavor for neural regeneration using olfactory nerve dysfunction model.
3. 学会等名 Brain & Brain PET 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022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
研究協力者	松澤 良  (Matsuzawa Ryo)	横浜市立大学・脳神経外科・大学院生  (22701)	

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
---------	---------