

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16758

研究課題名（和文）末梢神経損傷後に出現するMRC1発現マクロファージの機能解明研究

研究課題名（英文）Elucidation of the role of MRC1 macrophages after peripheral nerve injury

研究代表者

松居 祐樹（Matsui, Yuki）

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：60908193

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ラット坐骨神経圧坐、切断モデルを使用して、MRC1発現マクロファージが再生軸索の先端に関連した位置に存在することを同定した。また、MRC1マクロファージ特異的死滅薬を使用して、MRC1発現マクロファージを死滅させたところ、ラット坐骨神経圧坐損傷後の軸索再生が遅延したことを同定した。さらに、IL4を使用した作成したMRC1類似マクロファージが分泌するuPAが軸索再生効果を持ち、uPAの遺伝子を欠損させると軸索再生効果が消失することを確認した。また、同系由来のMrc1類似マクロファージは軸索再生効果を持つが、同種由来のものは軸索再生効果が有意に減弱することも同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージが末梢神経損傷の修復機転の主たる細胞の一つであることは判明していたが、その亜種の一つが、軸索再生に直接関わっていることが判明した。特に、軸索の先端部位に集積し、その再生を支持していたことから、末梢神経の修復機転における高度な細胞相互作用が具体的に解明された。さらに、今回、マクロファージが発現するuPAが軸索再生効果を持ち、分子治療に応用できる可能性を示した。さらに、MRC1マクロファージ移植を臨床応用する際には、自家移植でなくては効果を発揮できないことを同定し、MRC1マクロファージ移植の現実的な応用には限界があることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Using a rat sciatic nerve crush injury and transection injury models, the current study identified that the locations of MRC1 macrophages were associated with the tips of regenerating axons. Furthermore, when MRC1 macrophages were depleted using mannose 6-phosphate (M6P)-targeted clodronate liposomes, axon regeneration after rat sciatic nerve crush injury was impaired. Moreover, when MRC1-like macrophages were created by the stimulation with IL4, uPA secreted by them has an axon regeneration effect, and the axon regeneration effect of MRC1-like macrophages disappears when the uPA gene is deleted. Lastly, syngeneic Mrc1-like macrophages have an axon regeneration effect, whereas the axon regeneration effect is significantly attenuated in allogeneic Mrc1-like macrophages, suggesting that Mrc1-like macrophages need to be autograft rather than allograft for clinical application.

研究分野：整形外科学

キーワード：末梢神経損傷 マクロファージ 軸索再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢神経の再生には、免疫細胞の高度な連携が必要であるが、近年、損傷神経に集積するマクロファージ(MΦ)が発現遺伝子の特徴によって、いくつかの亜群に分類できることが明らかになっている。マウス坐骨神経損傷後のMΦに、single cell RNA sequence (scRNAseq)を実施したデータ(Nat Neurosci. 2020, PMID: 32284604)を独自に再解析すると、MΦは8つの亜群に分けられ、その1つがMrc1を強発現していた(図1)。

Mrc1はCD206の遺伝子名であり、in vitroではM2 MΦのマーカーとして知られているが、このMrc1発現MΦ(MRC1MΦ)の発現遺伝子には、Arg1、Relmα、Ym1などの、他のM2 MΦ特有の遺伝子発現は乏しく、MRC1MΦは、一般的なM2 MΦと異なっていた。

MRC1MΦは組織修復作用を持つIGF1などの液性因子の発現が高い一方、他の9つの細胞群は抗原提示機能のMHCIIや、炎症機能のIFN系シグナルの発現が高かった。そこで、MRC1MΦは軸索再生を促進するMΦの一群であるという仮説を立てるに至った。そこで、本研究は、本仮説を検証し、末梢神経損傷の修復機構の一部解明を試みる。

末梢神経損傷後5日のマクロファージ

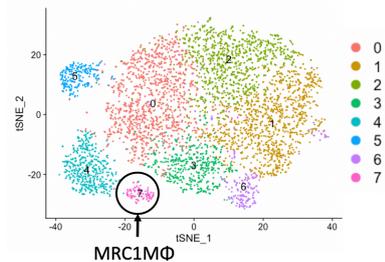


図1: 損傷神経に集積するMΦのscRNAseq

2. 研究の目的

目的1: MRC1MΦの末梢神経損傷後の時空間的分布を明らかにする

圧坐損傷だけでなく、切断損傷など、他の損傷モデルでの検討も加えて、MRC1MΦの時空間的分布の実際を確定する。

目的2: MRC1MΦの軸索再生に関する役割を明らかにする

MRC1MΦ特異的死滅薬を損傷神経に局所投与して、MRC1MΦが軸索再生に及ぼす影響を明らかにする。

目的3: 軸索効果を持つMRC1MΦ由来液性因子を同定する

前述のscRNAseqのデータと損傷神経のRNAseqデータから、MRC1MΦが分泌する軸索再生効果を持つ液性因子の候補因子を絞り込み、培養神経細胞、末梢神経損傷モデルを使用して確定する。

目的4: MRC1MΦの同種移植の軸索再生効果を検討する

LewisラットからIL4を使用して、MRC1MΦ類似のMΦを作成し、SDラットの坐骨神経に移植して、MRC1MΦの同種移植の軸索再生効果を検討した。

3. 研究の方法

目的1: MRC1MΦの末梢神経損傷後の時空間的分布を明らかにする

ラット坐骨神経に、圧坐損傷、切断損傷、自家神経移植による再建を実施し、MRC1MΦと再生軸索の経時的な関係を、免疫蛍光染色によって検討した。

目的2: MRC1MΦの軸索再生に関する役割を明らかにする

MRC1MΦ特異的死滅薬である、mannosylated clodronate liposome (MCL) (Encapsula Nanosciences, USA) (Miron et al., 2013)を、損傷したラット坐骨神経に10μLを2回に分けて局所投与し、MRC1MΦの細胞数を減少させた場合の、軸索再生に及ぼす影響を明らかにした。対照群として、Mannocylated Liposome (ML)を10μL使用した(N=5/群)。

目的3: 神経突起伸長効果を持つ、MRC1MΦ由来液性因子を同定する

マウス坐骨神経に圧坐損傷を作成後、1週間後のワーラー変性部を取り出し、コラゲナーゼで処理した細胞浮遊液をCD206に対する抗体処理後FACSで採取し、RNAseqを実施した。また、坐骨神経損傷後の後根神経節神経細胞(Dorsal root ganglion: DRG)のRNAseqデータから、リガンドと受容体の関係を持つ分子群を絞り込み、培養DRG神経細胞に候補因子を添加して、神経突起伸長効果の有無を検討した。さらに、IL4を使用して、MRC1MΦ類似のMΦを作成後、同因子をKnock outし、MRC1MΦの軸索再生効果が減弱するか検討した。

目的4: MRC1MΦの同種移植の軸索再生効果を検討する

LewisラットからIL4を使用して、MRC1MΦ類似のMΦを作成し、SDラットの坐骨神経に50万個を移植して、2週間後にMRC1MΦの同種移植の軸索再生効果を免疫染色で検討した。

4. 研究成果

(1) MRC1MΦの末梢神経損傷後の時空間的分布

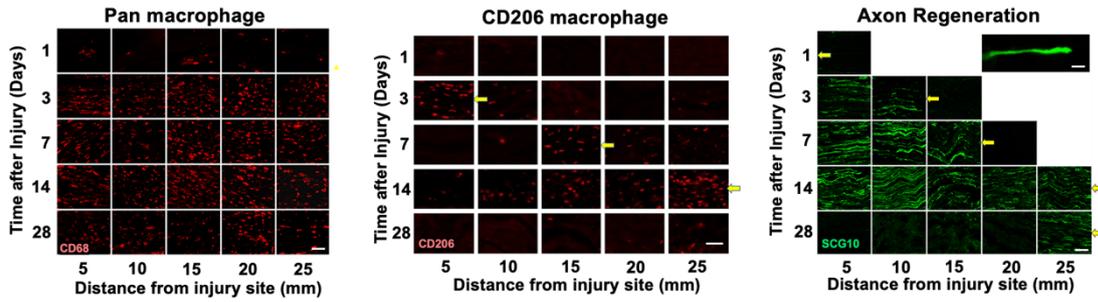


図2：損傷神経に集積するMΦと再生軸索

pan MΦは偏りなく集積するが、MRC1MΦは再生軸索の先端部位に類似した位置に集積している

総MΦのマーカであるCD68陽性細胞は、損傷後3日目から多く出現し、1週から4週にかけて、ワラー変性部に、偏りなく存在していた(図2)。一方、M2MΦのマーカであるMRC1MΦは、損傷後3日目から出現し、その出現部位は、経時的に近位から遠位へと移動し、3日、1週、2週において、それぞれのピーク部位が5mm、15mm、25mmと再生軸索のピーク部位と類似していた(図2)。さらに、異なる損傷モデルである、切断モデルで検討を行った場合も、同様の現象が観察された。これらの結果は、末梢神経損傷後の再生軸索とMRC1MΦの出現部位が相関しており、MRC1MΦが軸索再生機序に関与している可能性を示唆している。

(2) MRC1MΦ特異的滅殺薬投与の効果

MCL投与によって、MRC1MΦは有意に減少し、軸索再生も有意に減少していた(図3)。

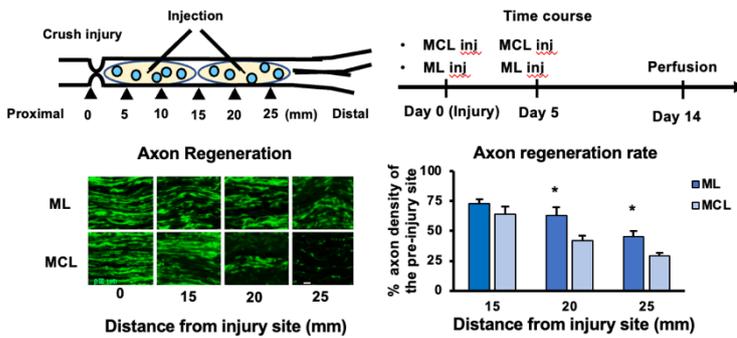


図3：MCL投与によるMRC1MΦ減少が軸索再生に与える結果
実験方法のシェーマ(上段)と軸索再生(下段)。MCL投与により、軸索再生が有意に減弱した。

(3) 神経突起伸長効果を持つ、MRC1MΦ由来液性因子

urokinase plasminogen activator (uPA)がMRC1MΦ由来の候補因子として同定された。uPAを培養DRG神経細胞に投与すると、神経突起は伸長した。さらに、IL4を使用して、MRC1類似MΦを作成し、軸索再生効果を確認した。続いて、uPA遺伝子欠損マウス由来のMΦから、MRC1類似MΦを作成し、免疫不全ラットの坐骨神経に移植したところ、MRC1類似MΦの軸索再生が有意に減弱した(図4)。

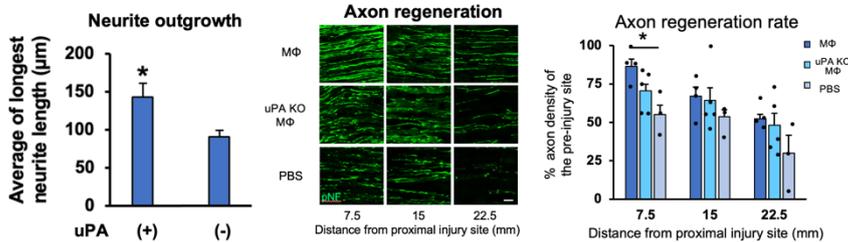


図4：uPAの神経突起伸長効果(左)とMRC1類似MΦの軸索再生効果(中)とuPA knock outによる軸索再生効果の減弱(右)

(4) MRC1類似MΦの同種移植の軸索再生効果

同系ラット由来のMRC1類似MΦは軸索再生効果を示したが、同種由来のものは、軸索再生効果を示さなかった(図5)。このことは、MRC1類似MΦ移植の臨床応用を考慮する場合、患者由来のMΦを使用する必要性を示唆している。

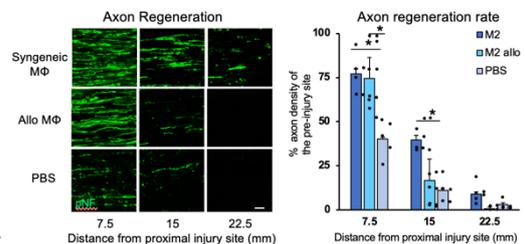


図5：MRC1類似MΦの同種移植の軸索再生効果

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 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 -
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、遠藤健、永野裕介、本宮真、河村太介、近藤真、平地一彦、岩崎倫政
2. 発表標題 有痛性断端神経腫の疼痛機序に関する組織学的検討：臨床検体と動物モデルを用いて
3. 学会等名 第65回日本手外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、遠藤健、永野裕介、本宮真、河村太介、近藤真、平地一彦、岩崎倫政
2. 発表標題 有痛性断端神経腫の疼痛機序に関する組織学的検討：臨床検体と動物モデルを用いて
3. 学会等名 第95回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松居祐樹、角家健、遠藤健、永野裕介、本宮真、河村太介、近藤真、平地一彦、岩崎倫政
2. 発表標題 有痛性断端神経腫の疼痛機序に関する組織学的検討：臨床検体と動物モデルを用いて
3. 学会等名 第141回北海道整形災害外科学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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