

細胞接着を介した軸索再生メカニズムの解明

所属： 北海道大学 医学研究院

助成対象者：角家 健

概要

本研究の目的は、シュワン細胞の末梢神経軸索再生効果のメカニズムの解明である。そこで、1、移植細胞の軸索再生促進効果を定量するモデルを開発し、2、このモデルを利用して、シュワン細胞の中でもシュワン前駆細胞や未熟シュワン細胞には軸索再生効果はなく、修復型シュワン細胞が最も軸索再生効果に優れることを明らかにし、3、シュワン細胞の軸索再生効果は、液性因子だけでなく、細胞接着因子によるものが半分程度あること、4、修復型シュワン細胞は、非修復型シュワン細胞と比較して、接着能に優れ、細胞突起が多く、RNA seqによる解析では、神経栄養因子、接着、炎症、修復に関わる遺伝子群の発現が優位であることを明らかにした。

Abstract

The purpose of the current study is to elucidate the mechanism how Schwann cells support axon regeneration in peripheral nervous system. The current study accomplished the followings. 1, development of the animal model to investigate the effect of grafted cells to promote axon regeneration. 2, Clarification that Repair Schwann cells but not developing Schwann cells have axon promoting effect. 3, Identification that cell surface factor contributes to axon promoting effect of Schwann cells. 4, To unveil that repair Schwann cells have more adhesive property with more processes and express genes related with neurotrophic factors, cell adhesion, inflammation, and repair compared to non-repair Schwann cells.

研究内容

【背景】

各種外傷、疾患により、末梢神経が損傷されると、障害範囲の麻痺、疼痛が発症し、日常生活は著しく障害される。しかし、未だに新規治療方法は開発されておらず、現在も半世紀以上前と変わらない、神経縫合と自家神経移植が主たる治療になっている。末梢神経の新規再生方法開発の社会的要請は大きい。

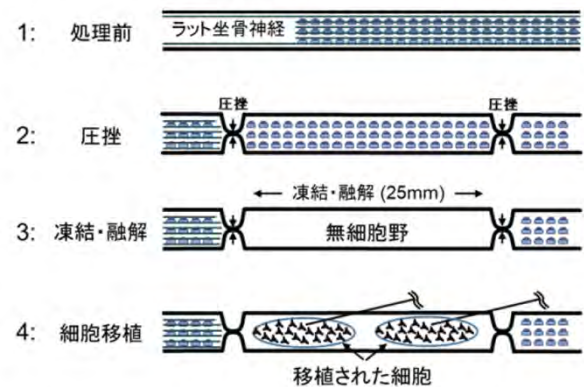
末梢神経損傷の成績が不良である理由は、大まかに2つある。1つは、損傷の程度が著しい場合や、再建を要する場合、軸索の再生が乏しくなること、もう一つは、最終的に軸索が標的器官（筋肉、皮膚）に到達しても、近位部損傷などで到達に長時間を要した場合、標的器官がすでに変性して、回復能を消失してしまうからである。つまり、末梢神経の機能回復を実現するためには、1) 軸索再生の速度を上げる、2) 再建を要する例でも旺盛な軸索再生を実現する、3) 標的器官の変性を予防する、の3つのアプローチが考えられる。本研究では、主に1と2に関する、軸索再生促進方法の研究を行なった。

【結果】

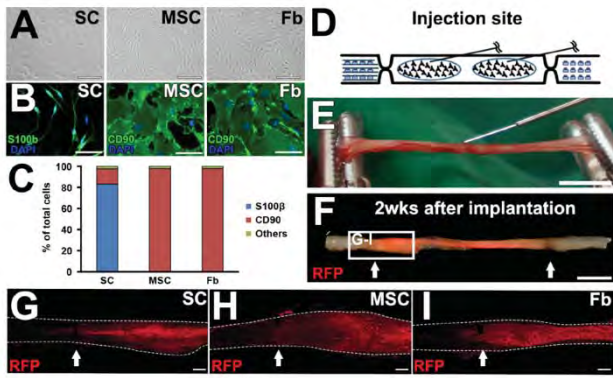
1：移植細胞の軸索再生効果を検討するモデルの開発

細胞が持つ軸索再生効果を定量するモデルがないことから、凍結融解法を使用した独自のモデルを開発した（図1）。このモデルは、縫合手技を要せず簡便で、軸索再生量を定量可能である。

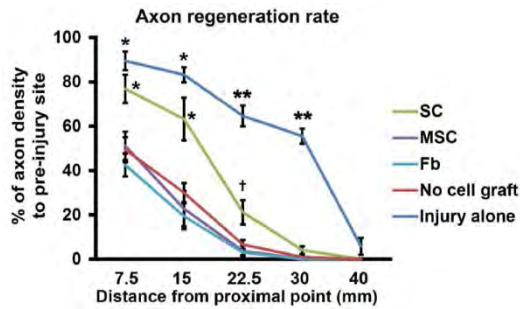
図1：凍結融解モデルのシエーマ



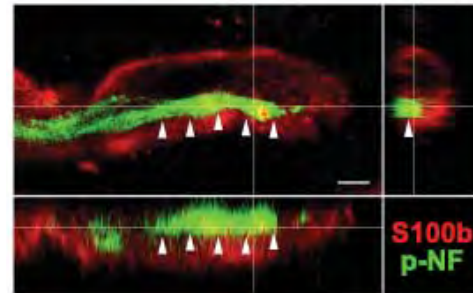
次にシュワン細胞、骨髄間質細胞、線維芽細胞を移植したところ（図2）、シュワン細胞のみが軸索再生効果を有することが明瞭に明らかになった（図3）。また、シュワン細胞数と軸索再生量が比例すること、すべての再生軸索はシュワン細胞と密接することも明らかになった（図4）。



(図2) 凍結融解モデルへのシュワン細胞、骨髄間質細胞、線維芽細胞移植の実際 (A—C) 各細胞の特徴 (D) シェーマ (E) 移植の様子 (F) RFP陽性細胞移植後2週の肉眼所見 (G-I) 移植の組織所見



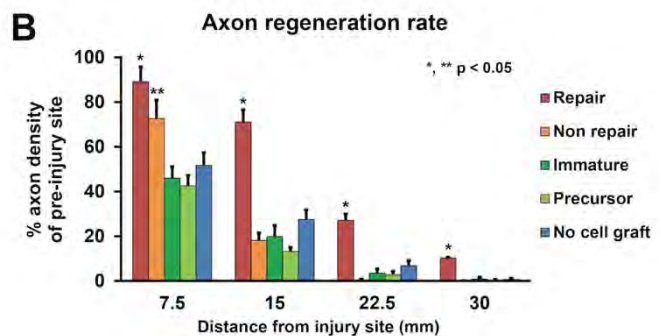
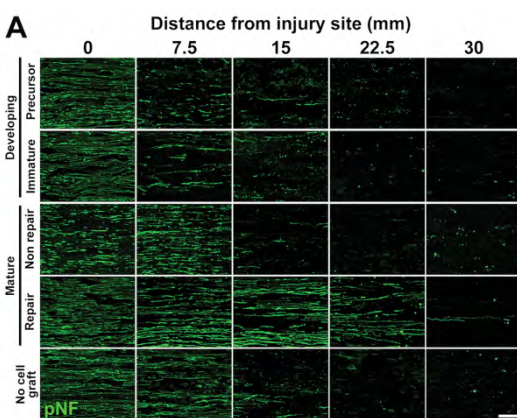
(図3) 軸索再生量
シュワン細胞のみが軸索再生効果を有していた。



(図4) 再生軸索とシュワン細胞の関係
すべての再生軸索はシュワン細胞と密接している。

2: 各種シュワン細胞の軸索再生効果

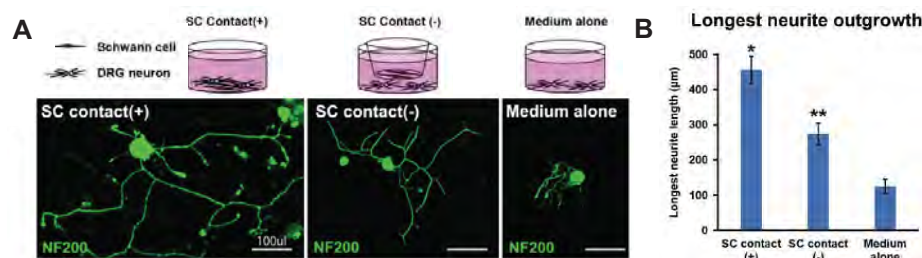
上記モデルに、シュワン前駆細胞、未熟シュワン細胞、修復型シュワン細胞、非修復型シュワン細胞を移植し、軸索再生効果を検討した。その結果、シュワン前駆細胞、未熟シュワン細胞には軸索再生効果はなく、修復型シュワン細胞が最も軸索再生効果に優れることが明らかになった (図5)。



(図5) 各シュワン細胞の軸索再生効果
修復シュワン細胞が一番優れた軸索再生効果を有していた。前駆細胞、未熟細胞は軸索再生効果を示さなかった。

3 : シュワン細胞の軸索再生効果の機序

シュワン細胞による軸索再生効果の液性因子と接着因子による寄与の割合を、DRG 神経細胞とシュワン細胞の共培養によって検討した。その結果、ほぼ同等であることが判明した (図 6)。



(図 6) シュワン細胞と DRG 神経細胞の共培養による神経突起伸長効果

修復シュワン細胞が一番優れた軸索再生効果を有していた。前駆細胞、未熟細胞は軸索再生効果を示さなかった。

4: 修復型シュワン細胞の特徴づけ

修復型シュワン細胞は、非修復型シュワン細胞と比較して、接着能に優れ、細胞突起が多く、RNA seq による解析では、神経栄養因子、接着、炎症、修復に関わる遺伝子群の発現が優位であることを明らかになった。

本助成に関わる成果物

[論文発表]

1. Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Kawamura D, Iwasaki N. A novel experimental model to determine the axon-promoting effects of grafted cells after peripheral nerve injury. *Front. Cell. Neurosci.* 2019 Jun 28;13:280.
2. Endo T, Kadoya K, Kawamura D, Iwasaki N. Evidence for cell-contact factor involvement in neurite outgrowth of DRG neurons stimulated by Schwann cells. *Exp Physiol.* 2019 Oct;104(10):1447-1454

[口頭発表]

1. 遠藤健、角家健、鈴木裕貴、松居祐樹、袁儒非、永野裕介、河村太介、岩崎倫政：分化度の異なる各種シュワン細胞の末梢神経軸索再生効果、第 33 回日本整形外科学会基礎

学術集会、奈良市、2018年10月11日-12日、東大寺総合文化センター。

2. 遠藤健、角家健、鈴木裕貴、松居祐樹、袁儒非、鈴木智亮、福井隆史、山本康弘、河村太介、岩崎倫政：シュワン細胞の接着因子による神経突起伸長効果の検討、第136回北海道整形災害外科学会、札幌市、2019年1月26日-27日、札幌医科大学。
3. 遠藤健、角家健、鈴木智亮、鈴木裕貴、松居祐樹、河村太介、岩崎倫政：分化度の異なる各種シュワン細胞の末梢神経軸索再生効果の検討、第18回日本再生医療学会総会、神戸市、2019年3月21日-23日、神戸国際会議場。
4. 遠藤健、角家健、鈴木智亮、松居祐樹、袁儒非、永野裕介、河村太介、岩崎倫政：軸索再生に至適なシュワン細胞の分化度に関する検討 第62回日本手外科学会学術集会、札幌、2019年4月18-19日、札幌コンベンションセンター。
5. 遠藤健、角家健、松居祐樹、袁儒非、鈴木智亮、永野裕介、河村太介、岩崎倫政：シュワン細胞の接着因子を介した神経突起伸長効果の検討、第62回日本手外科学会学術集会、札幌市、2019年4月18-19日、札幌コンベンションセンター。
6. 遠藤健、角家健、鈴木智亮、松居祐樹、袁儒非、山本康弘、河村太介、岩崎倫政：修復シュワン細胞の末梢神経軸索再生効果は未分化シュワン細胞に優る、第30回日本末梢神経学会、金沢、2019年8月23-24日、金沢市文化ホール。
7. Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Matsui Y, Yuan R, Nagano Y, Kawamura D, Iwasaki N. Mature Schwann cells but not developing Schwann cells support axon regeneration after peripheral nerve injury. Neuroscience 2018, November 3-7, 2018, San Diego, CA, USA.
8. Endo T, Kadoya K, Suzuki T, Suzuki Y, Matsui Y, Yuan R, Kawamura D, Iwasaki N. Repair Schwann cells but not Schwann cell precursors have axon regeneration effects after peripheral nerve injury 5th International symposium on peripheral nerve regeneration, July 8-9, 2019, Porto, Portugal.

[ポスター発表]

1. Endo T, Kadoya K, Suzuki T, Matsui Y, Kawamura D, Iwasaki N. Repair Schwann Cells but Not Schwann Cell Precursors Have Axon Regeneration Effects After Peripheral Nerve Injury The 74th Annual Meeting of the ASSH, September 5-7, 2019, Las Vegas, Nevada, USA.

2. Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Kawamura D, Iwasaki N. A novel experimental model to determine the axon-promoting effects of grafted cells after peripheral nerve injury 5th International symposium on peripheral nerve regeneration, July 8-9, 2019, Porto, Portugal.
3. Endo T, Kadoya K, Suzuki T, Suzuki Y, Matsui Y, Yuan R, Kawamura D, Iwasaki N. Repair Schwann cells but not Schwann cell precursors have axon regeneration effects after peripheral nerve injury The XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 10-13, 2019, Porto, Portugal.