HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	末梢神経再生に至適なシュワン細胞の同定［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	遠藤, 健
Description	配架番号：2438
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13424号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74306
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Endo_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　遠藤　健

学 位 論 文 題 名

末梢神経再生に至適なシュワン細胞の同定
(Identification of optimum Schwann cell for peripheral nerve regeneration)

【背景と目的】中枢神経と比較すると、末梢神経の再生能力は旺盛であるが、近位部損傷や重度損傷例では、軸索再生の量および速度が十分でないため、臨床成績は不良である。また、医療の発展にも関わらず、半世紀以上、自家神経移植に優る末梢神経再建方法はなく、自家組織を犠牲にせずに、軸索再生を促進する新規治療法の開発が望まれている。なかでも、近年の幹細胞研究の発展から、細胞治療に対する期待は大きい。

軸索再生に対する細胞治療法の一つに、グリア細胞を移植する手法がある。近年、中枢神経のグリア細胞は分化度や局在によって多くの亜型があり、機能が異なること、また、中枢神経の軸索再生に至適な亜型があることも判明ししてきた。しかし、末梢神経のグリア細胞であるシュワン細胞 (Schwann cell: SC) の、分化度や局在による機能の違いは未だ不明なままであり、軸索再生に至適な亜型も確定していない。

以上より、我々は SC にも多様性があり、末梢神経の軸索再生に至適な SC の亜型があるという仮説を立て、一連の研究を行った。本研究の目的は、1) 各種細胞の軸索再生効果の比較に有用な実験モデルを作成すること、2) 分化度の異なる SC は、異なる軸索再生効果を持つか明らかにすること、さらに 3) 感覚/運動神経由来の SC は、それぞれの軸索の再生効果に優れるか明らかにすることである。

【対象と方法】1)　移植細胞の軸索再生効果を定量する実験モデル作成のため、野生型 LEWIS ラットの坐骨神経に 2 ヶ所(15mm あるいは 25mm 間隔)の圧挫損傷を作成した。続いて、液体窒素を用いた凍結融解処理で圧挫に挟まれた範囲を無細胞化した。a)圧挫単独群、b)圧挫＋凍結融解処理 1 回群、c)5 回群、d)10 回群の 4 群を検討し (N=5/群)、軸索断裂、死細胞の割合を組織学的に定量した。また、処置後 2 週の軸索再生を定量した。

2)　作成したモデルの妥当性を検討するため、a)SC または b)骨髄間葉系間質細胞 (Mesenchymal stromal cell: MSC)を移植した。対照群として c)線維芽細胞 (Fibroblast: Fb)移植、d)細胞移植なし、e)無細胞処置なし(圧挫単独)の 3 群を作成した。移植細胞は全て同系 RFP 発現ラットから採取した。処置後 2 週の軸索再生、移植細胞、SC の分布を、矢状断切片の pNF、RFP、S100b に対する免疫染色で組織学的評価を行った(N=6/群)。

3)　SC と神経細胞の接触を介した軸索再生効果を検討するため、野生型 LEWIS ラットの SC、DRG 神経細胞を単離し、共培養した。まず、a）SC 上に DRG 神経細胞を培養した群（接触あり群）、b）インサートを使用し、両細胞の接触を無くした群 (接触なし群)、c）DRG 神経細胞のみ （単培養群）の 3 群 (N=6/群)で、神経突起を伸長させた細胞の割合（伸長細胞率）、最長伸長距離を定量した。 続いて、低密度培養の SC と DRG 神経細胞を共培養し、神経突起との接触の有無による、伸長細胞率と最長伸長距離の差を比較検討した。

4)　SC の分化度による軸索再生効果の違いを検討するため、胎児あるいは成体 RFP 発現 LEWIS ラットの坐骨神経を用い、SC の未分化細胞 2 種類(前駆・未熟)と成熟細胞 2 種類(修復・非修復)を作成した。上述のモデルに各細胞を移植した(N=6/群)。次に、胎児・成体由来の DRG 神経細胞を前駆細胞・修復細胞と共培養し神経突起伸長効果を比較検討した(N=6/群)。さらに前駆細胞・修復細胞のトランスクリプトーム解析と、ELISA 法での神経栄養因子分泌量(NGF, BDNF)を定量した(N=3/群)。

5)　SC の局在による軸索再生効果の違いを検討するため、成体 RFP 発現 LEWIS ラットの

前根、後根を用い、運動神経、感覚神経を支持する SC を採取した。前項と同様に各細胞を実験モデルに移植し、 2 週後に免疫組織学的評価を行い pNF、ChAT 陽性線維を定量した(N=3/群)。
【結果】1)　圧挫により全群で全軸索が断裂した。死細胞率は、非凍結野では全群とも 1%前後であった。一方、凍結融解野では凍結処理 1 回で 60%程度、5 回以上で 100%で、群間に有意差を認めた。また、無細胞処理を行った場合の軸索再生は圧挫単独群より有意に劣り、また処理範囲を広げると再生はさらに抑制された。
2)　移植細胞は全群で良好に生着し、無細胞野を充たしていた。自家神経移植に相当する圧挫単独群の軸索再生が最も良好で、次に SC 移植群が続き、MSC 移植、Fb 移植、移植なし群は同程度であった。移植細胞の有無、種類に関わらず、全群で再生軸索には SC が密接し、先端まで密接していた。また、再建近位部と中央部では、SC の分布量と軸索再生に強い正の相関を認めた(r=0.76, 0.9)。
3)　DRG 神経細胞の伸長細胞率、および、最長伸長距離は、SC との接触あり群、なし群、単培養群の順に良好であった。続いて、神経突起とシュワン細胞の接触により、伸長細胞率および最長伸長距離は有意に優れていた。
4)　分化度の異なる SC の生着に群間差はなかったが、増殖能は 2 種の未分化細胞が優れていた。しかし、軸索再生効果は修復細胞群が最も良好で 、次に非修復細胞群が続き、前駆・未熟細胞群は移植なし群と変わらなかった。DRG 神経との共培養では、修復細胞が最も優れた神経突起伸長効果を示した。また、修復細胞と前駆細胞では、遺伝子発現様式が全く異なり、NGF、BDNF の分泌量も、修復細胞が有意に多かった。
5)　局在の異なる SC を移植した結果、pNF 陽性軸索再生数に有意差は認めなかったが、ChAT 陽性線維は前根由来細胞が有意に再生を促進していた。
【考察】 本研究では、まず軸索再生に至適な移植細胞を簡便に同定するための実験モデルを作成した。本モデルは、1) 縫合手技によるバラツキが無い点、2) 過誤支配の可能性が最小限になる点、3) 再建部位に相当する部位のみを無細胞にできる点、4) 簡便で再現性のある手技で構成されるなどの点で、種々の細胞移植による軸索再生効果の比較研究に有用である。
　移植細胞の有無、種類に関わらず、軸索再生量は SC の分布量に相関し、SC の分布量増加が、良好な軸索再生に重要と考える。また、再生軸索の先端には必ず SC が密接し、共培養実験では、神経細胞神経突起への SC の接触単独で伸長効果を認め、しかも、その効果は液性因子と同等であったことから、今後、接着因子に着目した検討が必要である。
　分化度の異なる SC を比較検討した結果、未分化細胞よりも、成熟細胞、特に修復細胞の軸索再生効果が優れていた。発生期の軸索伸長は神経細胞の内的要因の影響が大きく、SC の制御を受けない一方、損傷後の軸索再生では、SC 等の外的要因による制御が重要であることが一因と考える。実際、発生期と再生期では SC の遺伝子プロファイルも、神経栄養因子の分泌量も大きく異なっていた。修復細胞特異的に発現する接着因子が新規軸索再生方法開発に重要であると考える。
　局在の異なる SC はもともと支持していた軸索の再生を促進し、特に運動神経の軸索を支持していた SC は、運動神経軸索の再生に優れていた。このことから、損傷神経軸索の種類に合わせた表現型の SC を移植に用いることが、より優れた細胞治療の開発に重要であることが示唆された。
【結論】　一連の研究により、SC の分化度・局在によって軸索再生効果が異なることが明らかとなった。未分化型より、成熟型が優れており、なかでも修復型が一番優れていた。また、損傷神経軸索の種類に合わせた表現型の SC が望ましい。さらに、シュワン細胞の軸索再生促進作用は、接着因子を介した作用が液性因子を介した作用と同等に重要であることが明らかになり、これは、末梢神経損傷に対する、新規治療標的となりうると考える。