



Title	末梢神経再生に至適なシュワン細胞の同定
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13424
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77138
Type	doctoral thesis
File Information	Takeshi_Endo.pdf



学 位 論 文

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)

2019年3月

北 海 道 大 学

遠 藤 健

Takeshi Endo

学 位 論 文

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)

2019年3月

北 海 道 大 学

遠 藤 健

Takeshi Endo

目 次

発表論文目録および学会発表目録		1 頁
要旨		4 頁
略語表		8 頁
緒言		10 頁
方法		13 頁
結果		22 頁
考察		49 頁
結論		52 頁
謝辞		53 頁
利益相反		54 頁
引用文献		55 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. Endo T., Suzuki Y., Kawamura D., Iwasaki N., Kadoya K.

A novel experimental model identifies Schwann cells promote axon regeneration by contact mediated mechanism after peripheral nerve injury

Journal of Neuroscience (2018 年 11 月 投稿済み)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 遠藤健、角家健、岩崎倫政

In situ freeze and thaw 法を用いた新しい末梢神経損傷モデル —軸索再生に至適な移植細胞同定のために—

第 27 回日本末梢神経学会 2016 年 8 月 27-28 日、口演

2. 遠藤健、角家健、岩崎倫政

In situ freeze and thaw 法を用いた新しい末梢神経損傷モデル —軸索再生に至適な移植細胞同定のために—

第 31 回日本整形外科基礎学会 2016 年 10 月 13-14 日、口演

3. Endo T., Kadoya K., Iwasaki N.

The efficacy of grafted cells on promoting axon regeneration in peripheral nervous system.

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2017

March 19-22, 2017, San Diego, CA, US, poster

4. 遠藤健、角家健、鈴木裕貴、岩崎倫政

新規末梢神経再建モデルが明らかにした軸索再生におけるシュワン細胞の重要性

第28回日本末梢神経学会 2017年8月25-26日、口演

5. 遠藤健、角家健、鈴木裕貴、岩崎倫政

新規末梢神経再建モデルが明らかにした軸索再生におけるシュワン細胞の重要性

第32回日本整形外科学会基礎学術集会 2017年10月26-27日、口演

6. Endo T., Kadoya K., Iwasaki N.

A new experimental model highlights the importance of Schwann cells for axon regeneration after peripheral nerve injury

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2018, March 10-13, 2018, New Orleans, LA, US, poster

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

International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2018, June 20-23, 2018, Melbourne, Australia, poster

8. 遠藤健、角家健、永野裕介、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29回日本末梢神経学会 2018年9月7-8日、口演

9. 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 2018年10月11-12日、口演

10. 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, Nov 3-7, 2018, San Diego, CA, USA, podium

要旨

【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ヶ所の圧挫損傷 (15 mm あるいは 25 mm 間隔) 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) 圧挫単一群、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 移植群が続く、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。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

β3tub	beta3 tubulin
ANOVA	Analysis of variance
ChAT	Choline acetyltransferase
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
DE gene	Differentially expressed gene
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRG	Dorsal root ganglion
E	Embryonic day
ECM	Extracellular matrix
ELISA	Enzyme-linked immune-sorbent assay
Fb	Fibroblast
FBS	Fetal bovine serum
FC	Fold change
FPKM	Fragments per million mapped reads
GO	Gene ontology
ICC	Immunocytochemistry
IHC	Immunohistochemistry
MSC	Mesenchymal stromal cell
NHS	Normal horse serum
N. S.	Not significant
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
PI	Propidium iodide
PLL	poly-L-lysine
PVC	Polyvinyl chloride
pNF	pan Neurofilament
RFP	Red fluorescent protein
RIN	Ribonucleic acid integrity number
RNA	Ribonucleic acid
RNA-seq	Ribonucleic acid sequencing

SC	Schwann cell
SD	Standard deviation
SEM	Standard error of the mean
Sox	SRY-related HMG-box
TBS	Tris buffered solution

緒言

再生能が乏しい中枢神経と異なり、末梢神経は損傷後に再生しうる(Ramon y Cajal, 1928)が、近位部での損傷例や、大きな欠損を伴う場合、その回復は不十分である(Lundborg, 2000; Seddon, 1963; Seddon, 1947)。欠損を伴う末梢神経損傷に対する再建法としては、20世紀前半から自家神経移植術がゴールドスタンダードである(Evans et al., 1994; Lundborg, 2000; Millesi, 1973; Seddon, 1947)が、健常神経を犠牲にする上に、再生効果が部分的であり、新たな再生医療の開発が求められている(Daly et al., 2012; Isaacs, 2010)。なかでも細胞治療は、多領域で注目を集めており、末梢神経損傷に対しても臨床への応用が期待される(Assinck et al., 2017; Behfar et al., 2014; Bitar and Zakhem, 2016; Bussolati and Camussi, 2015; Chichagova et al., 2018; Ellis et al., 2017; Grayson et al., 2015; Hundepool et al., 2014; Kadoya et al., 2016; Kotton and Morrissey, 2014; Sakai and Andersson, 2015)。

神経損傷に対する細胞治療として、グリア細胞を用いる手法がある。近年、中枢神経のグリア細胞は細かな分化度、局在の違いによってその形質、機能が大きく異なり、神経細胞と同様に多様であることがわかってきた(Ben Haim and Rowitch, 2017; Molofsky et al., 2014)。その多様性は複雑な神経回路の形成、維持に重要である。末梢神経の主たるグリア細胞であるシュワン細胞(Schwann cell: SC)も、分化度や局在による多様性があり、軸索再生を支持する役割、能力に違いがあることが予想されるが、詳細は未だ不明である。

シュワン細胞の分化に着目すると、同細胞は神経堤細胞を起源とし、前駆細胞、未熟細胞、成熟細胞に分化し、成熟細胞はまた、正常時に存在する非修復細胞と神経損傷後に出現する修復細胞に分類される(Jessen and Mirsky, 2016)。中枢神経では、グリア前駆細胞による細胞治療の有用性が報告されている(Assinck et al., 2017)が、シュワン細胞に関して、前駆細胞、未熟細胞等の未分化細胞がより優れた再生効果を持つかは明らかでない。

局在の点からは、シュワン細胞は感覚神経を支持する細胞と、運動神経を支持する細胞に大別される。各シュワン細胞が、それぞれの神経の再生を特異的に促進するか、過去に検討されてきたが、移植細胞の純度や再生軸索の分類評価が十分でなく、(Hoke et al., 2006; Jesuraj et al., 2012; Kawamura et al., 2010)、未だ結論はついていない。以上より、我々はシュワン細胞にも多様性があり、末梢神経再生に至適なシュワン細胞の亜型があるという仮説を持つに至った。

しかし、各種シュワン細胞の軸索再生効果を比較定量するにあたり、過去に使用されてきた実験モデルには改善の余地があった。従来、無細胞化処理神経片、あるいは人工材料で作成されたスカフォールドが細胞移植の場に応用されてきたが(Aszmann et al., 2008; Gordon and Borschel, 2017; Guenard et al., 1992; Jesuraj et al., 2014; Jesuraj et al., 2011; Levi

et al., 1994; Moore et al., 2011; Rodriguez et al., 2000)、縫合手技を必要とするため、神経束や神経上膜の不適合、縫合糸による直接的軸索再生阻害、手技の習熟度による結果のばらつきを生じる等の問題を伴っていた(図1)(Whitlock et al., 2010; Yan et al., 2017)。そこで、まずは移植細胞の軸索再生効果を画一的に定量するための、実験モデルの確立が必要と考えた。

本研究では、以下の3つの目的を達成することにより、シュワン細胞にも多様性があり、末梢神経再生に至適なシュワン細胞の亜型があるという仮説を検証した。

- 目的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
- 目的2 分化度の異なるシュワン細胞は、異なる軸索再生効果を持つか明らかにする
- 目的3 感覚/運動神経由来のシュワン細胞は、それぞれの軸索の再生効果に優れるか明らかにする

一連の研究によって、末梢神経の軸索再生に至適な移植細胞を同定するための実験モデルが確立され、各種シュワン細胞を同モデルに移植して検討した結果、末梢神経再生に至適なシュワン細胞の亜型があることが判明した。各種シュワン細胞の中でも、未分化細胞ではなく、成熟細胞、特に修復細胞が最も優れた軸索再生効果を有し、また感覚神経、運動神経を支持する細胞が特異的にそれぞれの軸索再生を促すことが明らかとなった。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働いてい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。ここに、これら本研究の詳細を報告する。

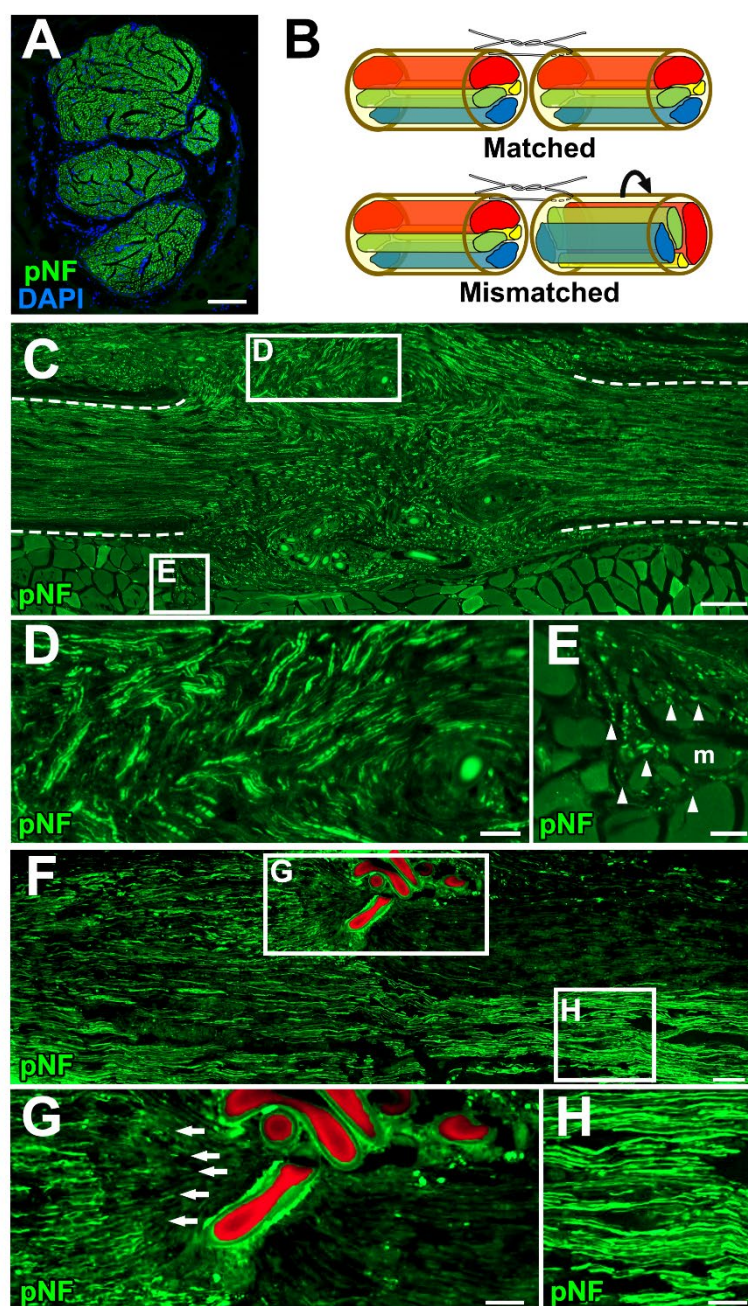


図1 縫合手技を用いた実験モデルの欠点

A 坐骨神経断端(大腿中央レベル):神経線維の分布は一様でなく、神経束を形成し局在している。B 縫合手技によって神経束の適合度に差が生じる。C-E 坐骨神経縫合部(術後8週):縫合部から逸脱し異所性に再生する軸索を認める。F 坐骨神経縫合部(術後2週):縫合糸によって軸索再生が直接的に阻害されている。Scale bars: 200 μm (A), 200 μm (C), 50 μm (D), 50 μm (E), 100 μm (F), 50 μm (G), 50 μm (H).

方法

1. 実験動物

本研究のために実施した動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。全ての移植実験で、宿主に成体野生型 LEWIS ラット (Charles River Laboratories Japan, Inc.) を使用した。移植細胞はすべて LEW-Tg(Gt(ROSA)26Sor-DsRed*)7Jmsk ラット (National BioResource Project-Rat, Kyoto, Japan) から採取した。研究を通して、実験動物は適切な食餌が与えられ、室温管理された specific-pathogen-free ルームで飼育された。

実験動物の麻酔には、ケタミン (75-100 mg/kg, ケタラール®, Daiichi Sankyo Propharma corporation, Japan) とメドミジン (0.5 mg/kg, ドミツール®, Orion Corporation, Finland) の混合液を用い、腹腔内投与した。

2. 細胞移植実験モデルの確立

2-1) 軸索損傷および無細胞野作成

成体野生型 LEWIS ラットを用い、全ての手技は腹臥位で行った。大腿側方から縦切開し、筋間に坐骨神経を同定した。坐骨切痕近傍、及び 15 mm あるいは 25 mm 位でモスキート鉗子 (Fine Science tools, Canada, No.13010-12) を用いて 2 か所圧挫し軸索損傷を加えた。無細胞野作成のため、鉗子で境界された 15 mm あるいは 25 mm の坐骨神経を、液体窒素を含有したスワブを用いて凍結融解処理を加えた (図 2)。凍結融解処理の有無に関わらず、モスキート鉗子による圧座は 5 分以上行った。周囲の凍結を防ぐため、鉗子の先端は PVC チューブ (TOP, Tokyo, Japan) で被覆した (図 2B, C)。鉗子を外した後、損傷部は 10-0 ナイロン糸でマーキングした。

本手法により、十分な軸索損傷、及び境界明瞭な無細胞野を作成していることを確認するため、1) 損傷単独群、2) 損傷及び凍結融解処理 1 サイクル、3) 同 5 サイクル、4) 同 10 サイクルの 4 群を作成し組織学的評価を行った (N=5/群)。また、凍結融解処理が軸索再生に与える影響を検討するため、1) 損傷単独群、2) 損傷及び凍結融解処理 5 サイクルの 2 群を作成し、処理後 2 週に組織学的評価を行った (N=5/群)。

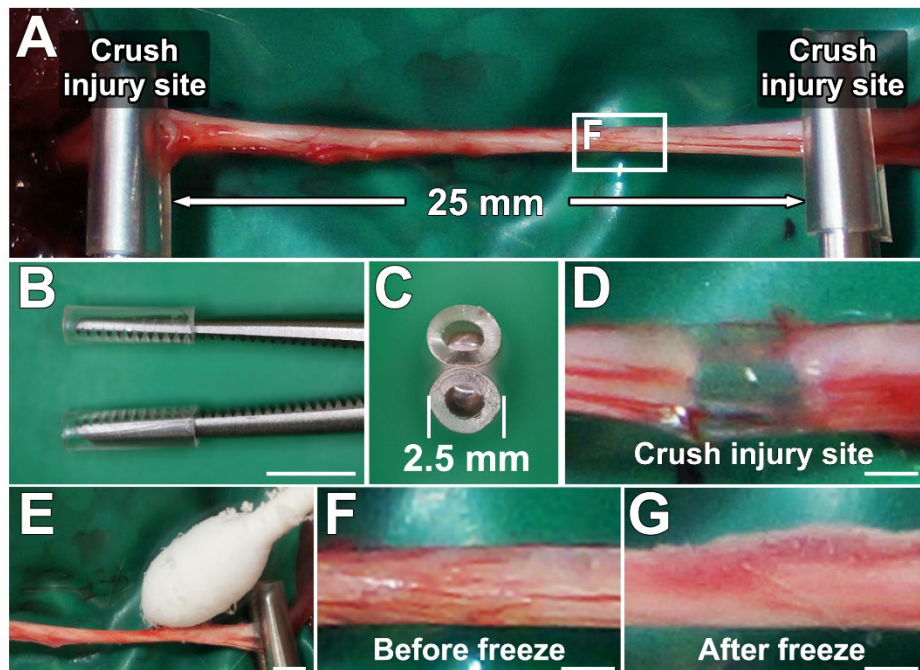


図2 圧挫および凍結融解手技を用いた新規細胞移植モデル

A モスキート鉗子による圧挫で軸索損傷を作成する。また、25 mm 遠位にも圧座を加え、境界を作成する。B-C モスキート鉗子先端は PVC チューブで被覆する。D 損傷部マクロ所見。E 液体窒素を含有したスワブで凍結処理を行う。F-G 凍結前後のマクロ所見。Scale bars: 5 mm (B), 500 μ m (D), 2 mm (E), 500 μ m (F), 500 μ m (G)

2-2) 細胞死の評価

凍結融解処理直後に坐骨神経を摘出し、さらに神経上膜を除去した。神経組織を PI 溶解液(1:1000 in PBS, Dojindo, Japan)に 1 分間浸し、その後 PBS で 3 回洗浄し 4% PFA (Nacalai tesque, Osaka, Japan) で固定した。翌日、組織を 30% Sucrose/PB 溶液に移動し、24 時間以上静置した。クライオスタット (Leica Biosystems CM 3050, Wetzlar, Germany) で 10 μ m 厚の矢状断切片を作成し、DAPI(1:1000, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 含有 Mowiol マウント液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) で封入した。近位、遠位の非凍結融解処理野、及び凍結融解処理野近位、中央、遠位の 5 点 (500 μ m 幅) を各サンプル 3 スライスずつ蛍光顕微鏡 (Olympus BX53, Tokyo, Japan) を用いて観察し、PI、DAPI 陽性細胞を計測し死細胞率を検討した (N=5/群)。

3. 移植細胞の作成

3-1) 実験モデルの有用性の検討のため、培養したシュワン細胞、骨髄間葉系間質細胞、線維芽細胞を採取、調整した (N=6/群)。

シュワン細胞

成体 RFP 発現 LEWIS ラットから坐骨神経を摘出し、神経上膜を除去した後に 1-2mm の神経片に細断した。1% collagenase type I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 0.125% trypsin (Wako, Japan) 含有 DMEM/Ham's F-12 (Wako, Japan) に 37°C で 1 時間静置し、その後 30 回、機械的に攪拌した。抽出した細胞を PLL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および laminin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) コーティングした 75cm² フラスコで 2 日間培養した。

骨髄間葉系間質細胞 (Mesenchymal stromal cell: MSC)

成体 RFP 発現 LEWIS ラットから両大腿骨および脛骨を摘出し、骨髄腔に 20% FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 (Wako, Japan) を通し洗浄液を回収した。18G 注射針を用いて洗浄液を機械的に攪拌し、その後 75 cm² フラスコで培養を行った。開始後 4 時間で一度培地を交換し、浮遊細胞及びデブリスを除去した。培養を行い、第 3 継代細胞を移植に用いた。

線維芽細胞 (Fibroblast: Fb)

成体 RFP 発現 LEWIS ラット背部から皮膚を採取し、0.25-0.30 cm² の小皮膚片を作成した。6 ウェルプレート中にカバーガラスを用いて固定し、10% FBS 含有 DMEM/Ham's F-12 (Wako, Japan) 中で培養を行った。第 3 継代細胞を移植に用いた。

3-2) 分化度の異なるシュワン細胞の比較検討のため、シュワン前駆細胞(SC precursor)、未熟細胞(Immature SC)、非修復細胞(Non repair SC)、修復細胞(Repair SC)を採取、調整した(N=6/群)。

前駆細胞

胎生 14 日の RFP 発現 LEWIS ラットを、ディッシュ上に腹臥位で固定し、神経の走行に合わせてマイクロ撮子(Fine Science tools, Canada, No.11252-20)を臀部に刺入して坐骨神経を引き抜いた(図 3A, B)。0.1% collagenase type I(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)および 0.125% trypsin(Wako, Japan)含有 DMEM/Ham's F-12(Wako, Japan)に 37°Cで 30 分間静置し、その後 30 回、機械的に攪拌し細胞を単離した。

未熟細胞

胎生 18 日の RFP 発現 LEWIS ラットを、ディッシュ上に腹臥位で固定し、マイクロ撮子(Fine Science tools, Canada, No.11252-20)を用い皮膚を除去し、筋間に坐骨神経を同定して採取した(図 3A, C)。0.1% collagenase type I(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)および 0.125% trypsin(Wako, Japan)含有 DMEM/Ham's F-12(Wako, Japan)に 37°Cで 30 分間静置し、その後 30 回、機械的に攪拌し細胞を単離した。

非修復細胞、修復細胞

前項 3-1)と同様に成体 RFP 発現 LEWIS ラットから採取、単離した。修復細胞は、前処理として採取の 1 週前に坐骨切痕部で神経を切断した。

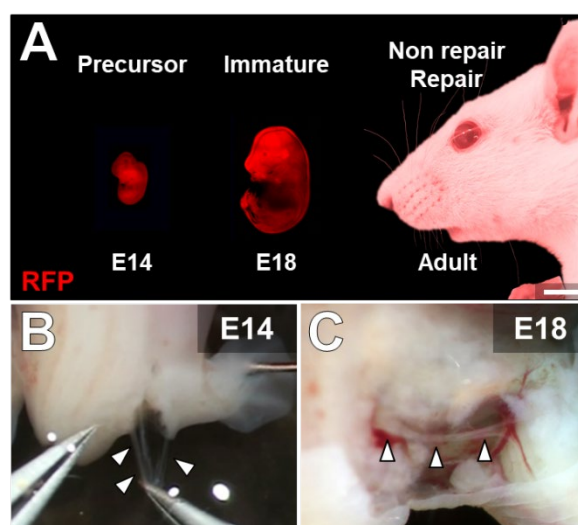


図 3 分化度の異なる SC の採取法

A 胎生 14 日、18 日、成体ラットからそれぞれ前駆細胞、未熟細胞、非修復細胞/修復細胞を採取した。B 前駆細胞は組織が脆弱で展開が困難であるが、神経の走行に合わせて撮子を刺入し引き抜くことで採取可能であった。C 未熟細胞以降は組織を展開し同定することが可能であった。矢頭:坐骨神経、Scale bar: 1cm (A).

3-3) 局在の異なるシュワン細胞を比較検討するため、運動神経、感覚神経由来のシュワン細胞を採取、調整した(N=3/群)。

成体 RFP 発現 LEWIS ラットを用い、伏臥位で坐骨神経を同定。仙腸関節を脱臼させ近位で腰神経叢を同定し、第 2 から第 6 神経根を愛護的に引き抜くことで前根、後根を採取した(図 4)。前根は分岐部より、後根は DRG より近位で切断し、1% collagenase (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 0.125% trypsin (WAKO, Japan) 含有 DMEM/Ham's F-12 (Wako, Japan) に 37°C で 1 時間静置し、その後 30 回、機械的に攪拌しそれぞれ運動神経、感覚神経を特異的に支持するシュワン細胞を単離した。

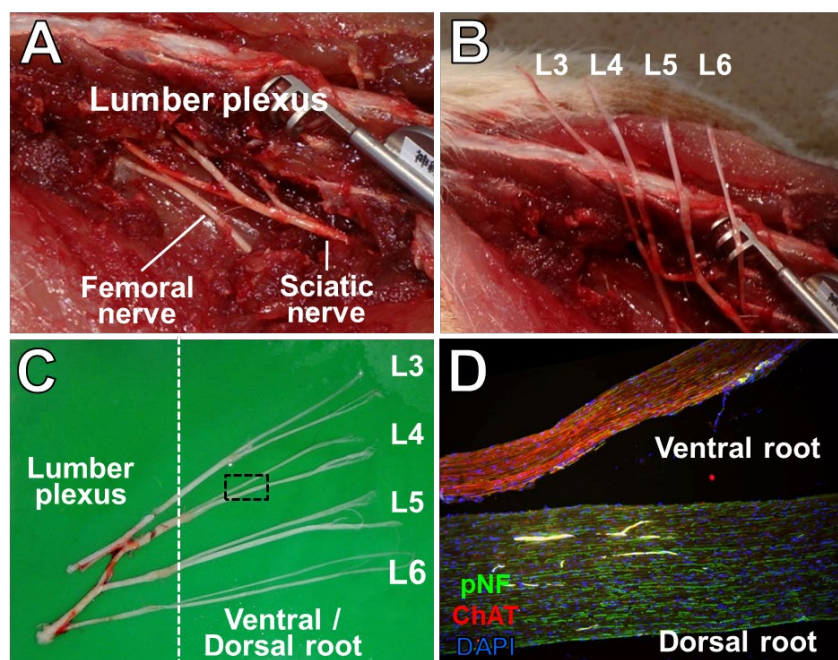


図 4 局在の異なる SC の採取法

A ラット背側から展開し腰神経叢を同定する。B 椎間孔近傍で神経を把持し、愛護的に牽引し引き抜く。C 各神経根をして一塊に採取可能である。D 前根は運動神経(ChAT 陽性)、後根は感覚神経(ChAT 陰性)で構成される。

4. 細胞移植

PBS 10 μ l に 1.0×10^6 個あるいは 2.0×10^6 個の細胞を溶解し、各坐骨神経に移植した。移植には NanoFil syringe (World Precision Instruments, Sarasota, FL) を用い、34G 針を通して移植した。無細胞野に広範に細胞を移植するため、近位、遠位 1/2 の中央内外測、計 4 か所に注射針の先端を刺入し移植した。

5. 免疫組織化学染色(IHC) / 免疫細胞化学染色(ICC)

IHC に際しては、4% PFA による還流固定の後、坐骨神経を採取し、4% PFA 中に 4°C で一晩固定した。翌日、30% Sucrose/PB 溶液に移動し、24 時間以上静置した。クライオスタットで 10 μ m 厚の矢状断、あるいは横断切片を作成した。ICC では、培養細胞を 4% PFA に 15 分浸して固定した。5% Normal horse serum (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) および 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を含有した TBS (pH8.4) で 1 時間ブロッキングした後、一次抗体含有 TBS に 4°C で一晩、さらに二次抗体含有 TBS に室温で 1 時間浸し染色を行った。

一次抗体は、RFP (goat from Sicgen at 1:200)、beta3 tubulin (β 3tub; rabbit from Covance at 1:1000, mouse from Promega at 1:1000)、pan neurofilament (pNF; mouse from Biolegend at 1:1000)、Choline acetyltransferase (ChAT; goat from Millipore at 1:200)、S100 β (rabbit from Abcam at 1:200, mouse from Invitrogen at 1:100)、Sox10 (goat from Santa Cruz at 1:100)、Thy1 (mouse from AbD Serotec, 1:10)、Ki67 (rabbit from Genetex, 1:500) に対して用いた。二次抗体は、それぞれの一次抗体に対応する Alexa 488, 594 or 647 conjugated donkey secondary antibodies (1:1000, Jackson immunoresearch, West 14 Grove, PA) を用いた。

6. 組織評価

蛍光顕微鏡 (Olympus BX53, Tokyo, Japan あるいは Keyence BX-710, Osaka, Japan) を用い組織の観察を行った。各サンプル、3 切片を用い、1 mm の無細胞処理を行った際は軸索損傷部を起点に 0 mm、10 mm、20 mm 遠位の計測点を、25 mm の無細胞処理を行った際は軸索損傷部から 0 mm、7.5 mm、15 mm、22.5 mm、30 mm、40 mm 遠位の計測点で定量を行った。軸索再生は矢状断切片では垂線と交差する pNF 陽性軸索数を計測し、その和を切片の幅の和で除した値を定量して非損傷部に対する割合を計測した。横断切片では pNF あるいは ChAT 陽性軸索数を測定し、非損傷部に対する割合を定量した。シュワン細胞の分布は S100 β 陽性面積を、計測面積 (100 μ m 幅) で除した割合で定量した。移植細胞の生着は RFP 染色を用いて評価した。細胞移植野の細胞増殖能は Ki67 陽性細胞数を全細胞数で除した割合を定量した。

7. シュワン細胞-DRG 神経細胞共培養

7-1) シュワン細胞と神経細胞の接触が神経突起伸長に与える影響の検討

培養シュワン細胞上に成体 DRG 神経細胞を培養した群(接触あり群)、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)、DRG 神経細胞のみ(単培養群)の3群(図3)で、神経突起を伸長させた細胞の割合(伸長細胞率)、および、最長伸長距離を定量した(N=6/群)。

シュワン細胞は前項の手技に順じて採取、調整し2日間培養した。

成体 DRG の採取に際しては、背部正中切開から傍脊柱筋を展開し、L1 から L6 高位までを一塊にして脊柱を摘出した。次に、正中で椎体、椎弓を切断して分割し、両側の椎間孔で DRG を同定し摘出した。DRG は 1 mm 程度に細断し、0.1% collagenase type IX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 含有 DMEM/Ham's F-12 (Wako, Japan) に 37°C で一時間静置し、その後 30 回、機械的に攪拌し細胞を単離した。

24well プレートあるいはポリカーボネートインサート(0.4 μm , pore size, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) にシュワン細胞を $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の密度で培養し、3 時間後に DRG 神経細胞を $5.0 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ の密度で加え共培養を開始した(図5)。培地には 2% B27 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 含有 DMEM/Ham's F-12 (Wako, Japan) を用い、シュワン細胞 1.0×10^5 個に対し 1.2 ml の量で 48 時間培養した。その後 4% PFA で固定し、NF200 染色で伸長細胞率、最長伸長距離を定量した。

続いて、低密度培養のシュワン細胞 ($1.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$) と DRG 神経細胞 ($5.0 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$) を 24 時間共培養し(図6)、神経突起がシュワン細胞と接触した場合としない場合において、同様に伸長細胞率と最長伸長距離を比較検討した。

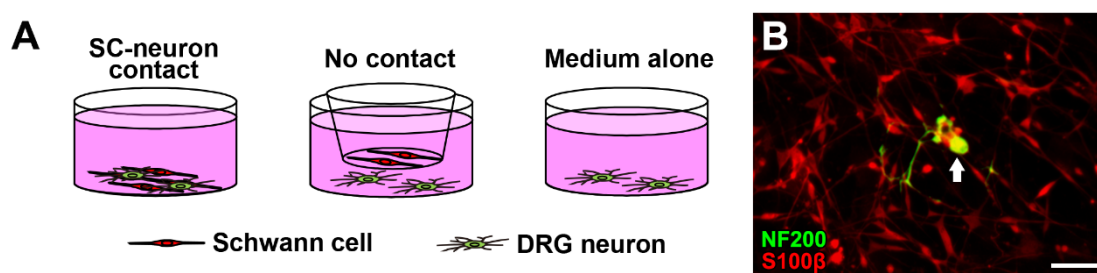


図5 SC-DRG 神経細胞共培養

A 両者を直接接触させて共培養した群(左)、インサートを用い接触させず共培養した群(中)、神経細胞単独で培養した群(右)を作成した。B 密に培養した SC(赤)と DRG 神経細胞(緑)を共培養した。矢印: DRG 神経細胞、Scale bar: 50 μm .

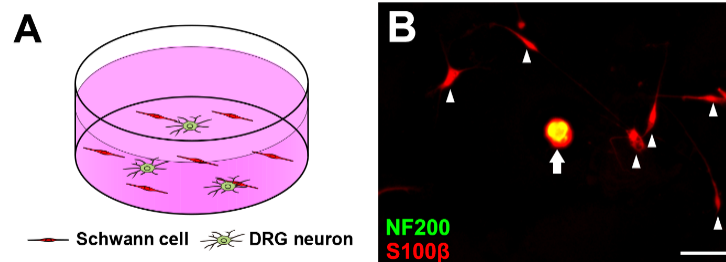


図 6 低密度での SC-DRG 神経細胞共培養

A-B 疎に培養した SC と DRG 神経細胞を共培養した。矢頭:SC、矢印:DRG 神経細胞、Scale bar: 50 μ m.

7-2) シュワン細胞、神経細胞の分化度が神経突起伸長に与える影響の検討

胎児 DRG (胎生 14 日)、及び成体 DRG 由来神経細胞を、それぞれシュワン前駆細胞、修復細胞と共培養した。対照群として培地のみ群 (神経細胞単独) を作成した (N=6/群)。

胎児 DRG 神経細胞の採取は、胎児腹側から展開し、マイクロ攝子 (Fine Science tools, Canada, No.11252-20) を用いて各臓器、椎体を順に摘出し、最後に脊髄、DRG を一塊にして摘出した。DRG を摘出した後、0.1% collagenase type IX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 含有 DMEM/Ham's F-12 (Wako, Japan) に 37°C で 30 分間静置し、その後 30 回、機械的に攪拌し細胞を単離した。成体 DRG 神経細胞、シュワン前駆細胞、修復細胞は前項と同様に採取、調整した。

48well プレートにシュワン細胞を 1.0×10^5 cells/cm² の密度で培養し、3 時間後に DRG 神経細胞を 5.0×10^3 cells/cm² の密度で加え共培養を開始した。培地には 2%B27 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) および Neuregulin (20ng/ml, Peprotech, Rocky Hill, NJ) 含有 DMEM/Ham's F-12 (Wako, Japan) を用い、シュワン細胞 1.0×10^5 個あたり 1.2ml の量で 24 時間培養した後に 4% PFA で固定した。 β 3tub 染色により、各神経細胞の最長神経突起伸長距離を定量した。

8. RNA-seq

前駆細胞、非修復細胞、修復細胞のトランスクリプトーム解析を行った (N=3/群)。RNA 抽出に際しては、前項と同様の手技で単離した各 SC を、培養を経ずに使用した。細胞ペレットに TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) 1ml を添加し、複数回攪拌して細胞を溶解した。5 分間静置した後、クロロホルム 200 μ l (Wako, Japan) を添加し、15 秒間徒手的に振盪した後、10 分間静置した。遠心分離後、無色透明の上層を採取し、等量の 70%エタノール (Wako, Japan) を加え、再度攪拌した。細胞溶解液は、RNeasy plus mini kit (Qiagen, Netherland) の通常プロトコールに沿って順次カラムに通し、RNA を抽出した。

作成した RNA 抽出液の品質評価は、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用い、RIN>7、かつ 1 μ g 以上のサンプルから TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA)を用いてライブラリーを調整した。次に、NovaSeq6000 (Illumina, Inc., San Diego, CA)を用い、100bp、paired end のシーケンス条件で解析した。

次に Tophat/Cufflinks を用いて Fragments per million mapped reads (FPKM) 値を得た。群間の比較には Cuffdiffを用いて解析した。非修復細胞を対照群とし、FPKM 値が $\log_2 FC > 2$ かつ $p < 0.01$ を満たす遺伝子を Differentially expressed gene (DE gene)と定義し抽出した。

さらに、前駆細胞、修復細胞の DE gene のうち、修復細胞で特異的に発現が亢進した遺伝子群を抽出し、Genomatix Gene Ranker を用いて Gene ontology (GO)解析を行った。

9. ELISA

前駆細胞、非修復細胞、修復細胞の神経栄養因子 (NGF, BDNF) 産生量を定量した (N=3/群)。各種細胞は 24 well plate に 2.0×10^5 個/well で播種し、37°Cで 48 時間培養した。培養上清を回収し、Rat NGF / BDNF ELISA Kit (Abcam)を用いて標準プロトコールで ELISA を行った。吸光度の測定には Benchmark-Plus Reader (BIO RAD)を用い、450 nm で計測した。

10. 統計学的解析

実験データは、平均値 $\pm$ 標準偏差 (Mean $\pm$ SD) もしくは平均値 $\pm$ 標準誤差 (Mean $\pm$ SEM) で示した。本研究では、2 群間の有意差検定には Student's t 検定 (two-tailed) を、3 群間以上の有意差検定に One-way ANOVA 解析を行い、Post-hoc test として Tukey-Kramer test、あるいは Kruskal-Wallis のノンパラメトリック検定を用いた。p 値は 0.05 未満を有意とした。全ての統計解析は統計解析ソフト JMP Pro 11.0 (SAS Institute, Cary, NC)を用いて行なった。

結果

実験モデルの確立

1. 圧挫損傷と凍結融解処理により新規神経再建・細胞移植モデルを確立した

細胞移植による軸索再生効果を比較する実験モデルに必要な条件として、①縫合手技を必要とせず、②細胞の足場として境界明瞭な無細胞野を有し、③全軸索が断裂し、④自家神経移植に相当する陽性対照群を含み、⑤移植細胞以外の条件が均一で、⑥移植細胞の効果を明確にするために陽性・陰性対照群の差が十分にあることとした。

免疫組織評価の結果、圧挫損傷により全群で全軸索が断裂していた(図7)。死細胞の割合は、非凍結野では全群とも1%前後であり、群間に有意差はなかった。一方、凍結融解野では凍結処理を1回行くと28%~44%、5回以上の処理により全例で100%となり、群間に有意差を認めた(図8)。

以上より、圧挫と5回の凍結融解処理により、必要条件①~③を満たす実験モデルが作成可能であった。

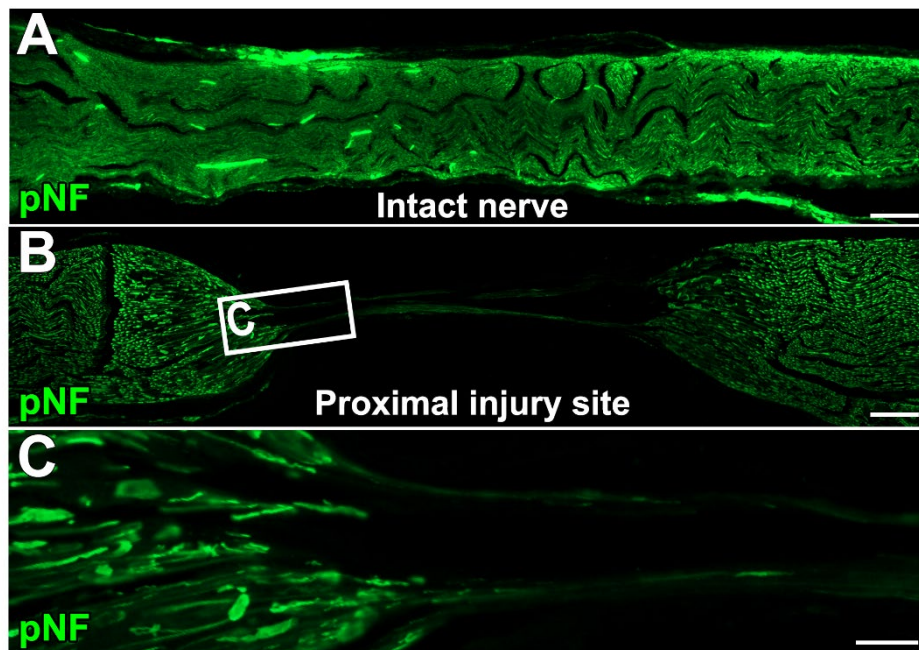


図7 圧挫による軸索損傷部

A 正常坐骨神経矢状断。B 近位圧挫部。C 損傷部強拡大像。全軸索が損傷されている。

Scale bars: 200 μ m (A), 200 μ m (B), 50 μ m (C).

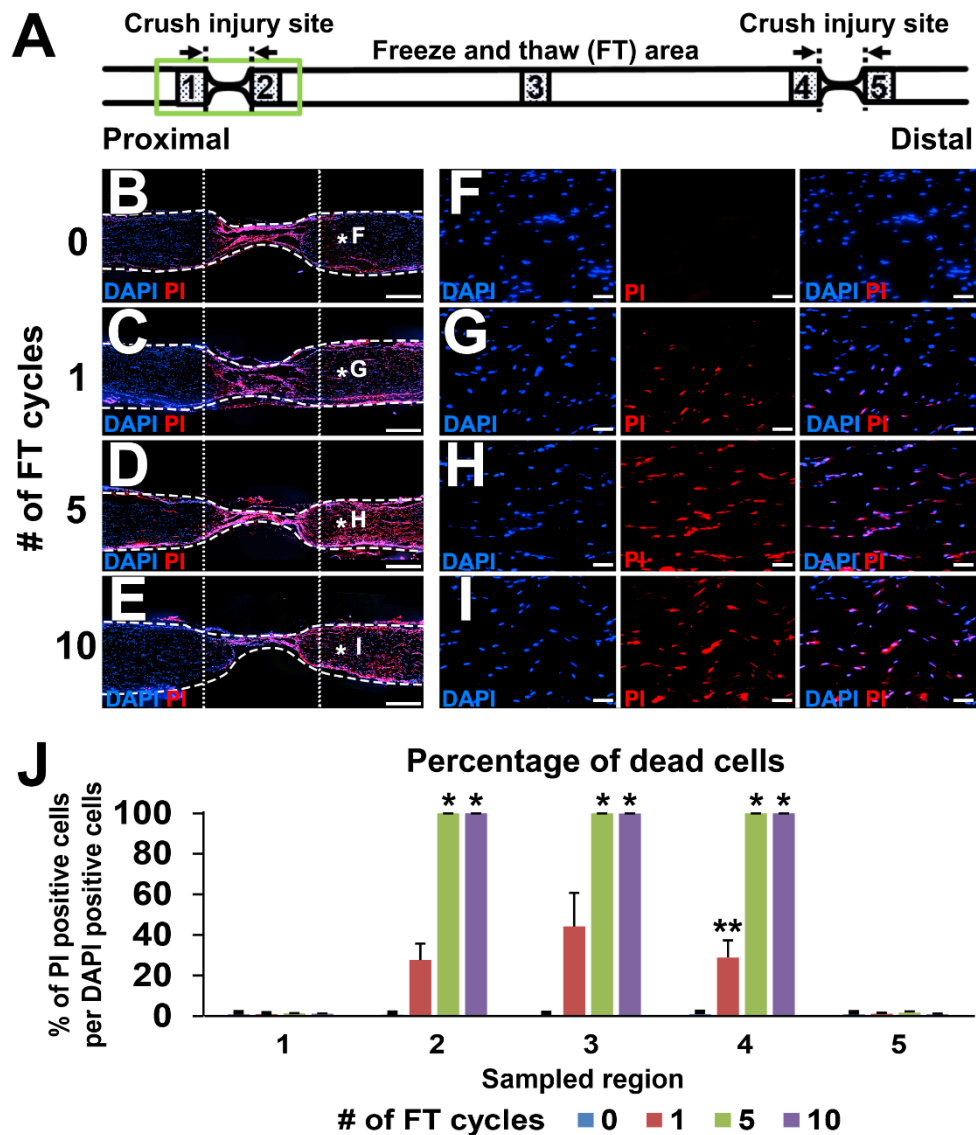


図8 凍結融解処理を用いた無細胞野作成

A 評価範囲シエマ。計測点 1~5 (各 500 μ m 幅) で死細胞率を定量した。B-E 近位圧挫部組織像(図 5A 四角部)、凍結融解サイクルの増加に伴い死細胞数が増加する。F-I 凍結融解処理部強拡大像。J 死細胞率定量結果。5 あるいは 10 サイクルの凍結融解処理で全細胞が死滅する。* $P < 0.05$ to 0 and 1 cycle, ** $P < 0.05$ to other groups. Kruskal-Wallis ANOVA with Steel-Dwass test. Error bars represent s.e.m. Scale bars: 500 μ m (B-E), 50 μ m (F-I).

2. 広範囲の無細胞処理が軸索再生をより遅延させる

次に、無細胞処理が軸索再生に与える影響を検討した。無細胞処理範囲を 15 mm とし、圧挫単独群(陽性対照群)と無細胞処理群(陰性対照群)の軸索再生を比較した結果、損傷部から 7.5 mm 遠位では軸索再生率に有意差を認めなかったが、15 mm 遠位で有意に低下を認めた(図 9)。さらに、無細胞処理範囲を 25 mm としたところ、7.5 mm から 30 mm 遠位の範囲で無細胞処理群の軸索再生は有意に低下し、特に 30 mm 遠位では圧挫単独群が 60%の軸索再生を認めるのに対し、無細胞処理群ではほぼ再生を認めず、大きな差を認めた(図 10)。

以上より、無細胞処理は前項で示した必要条件の④～⑥を満たし、さらに無細胞処理範囲が広いほうがその影響は大きいことが示された。

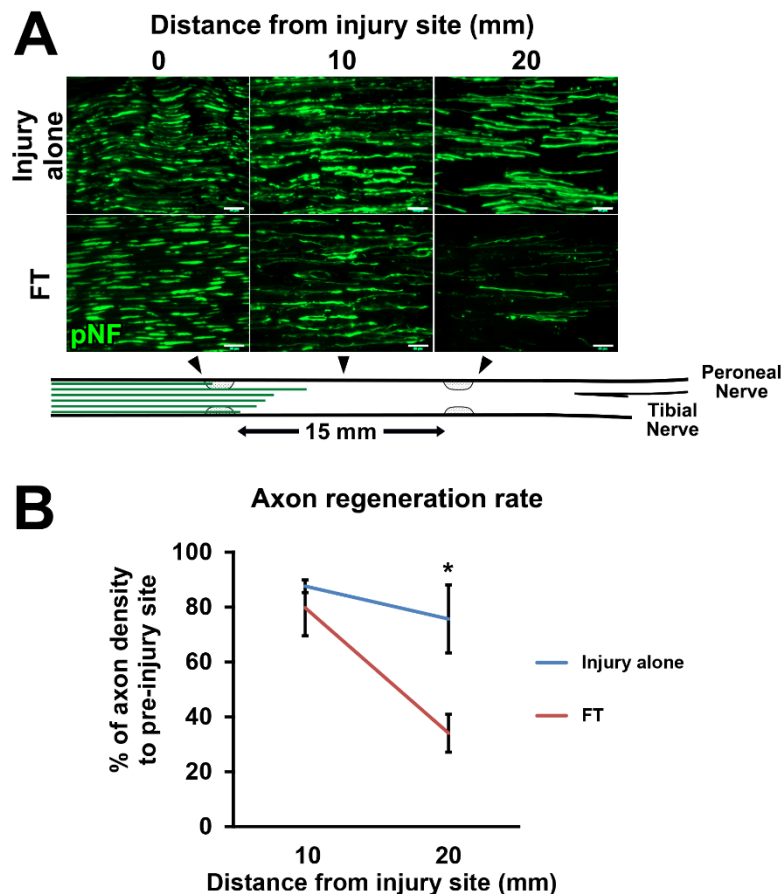


図 9 無細胞処理による軸索再生抑制効果

A 代表的組織像。無細胞処理により軸索再生は抑制されている。B 軸索再生率、損傷部遠位 20 mm で軸索再生は抑制された。* $P < 0.05$: student's t test. Error bars represent s.e.m. Scale bar: 50 μ m (A).

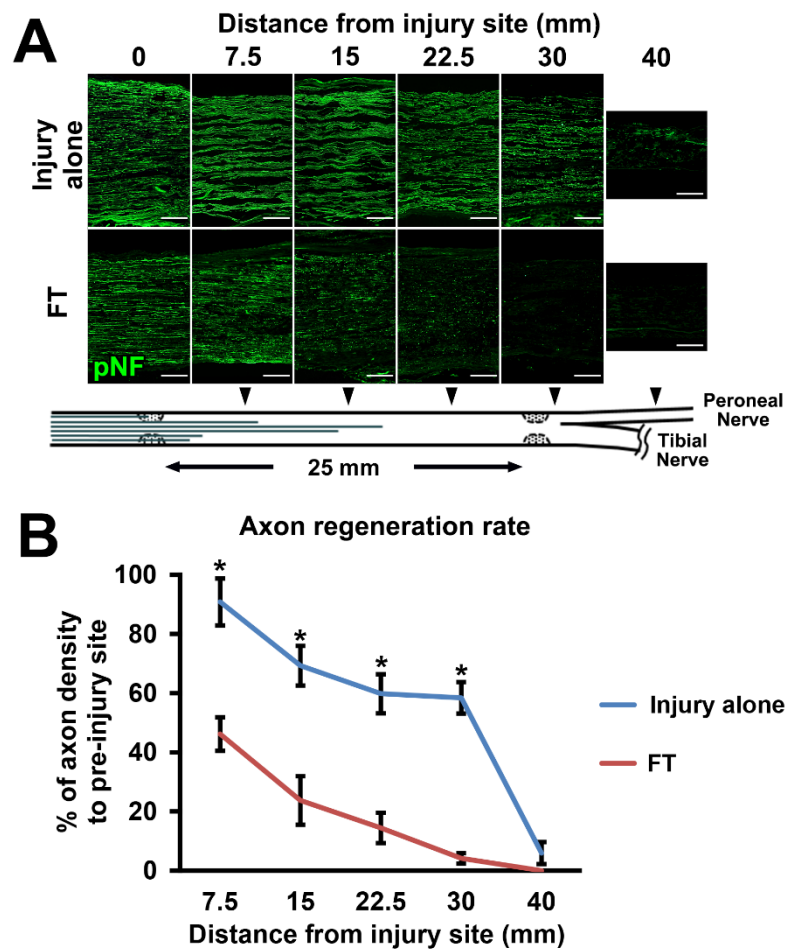


図 10 広範囲の無細胞野処理による軸索再生抑制効果

A 代表的組織像。無細胞処理により軸索再生はさらに抑制された。B 軸索再生率。損傷部遠位 7.5 mm から 30 mm まで、軸索再生は抑制されている。* $P < 0.05$: student's t test. Error bars represent s.e.m. Scale bar: 200 μ m(A).

3. シュワン細胞移植は軸索再生を促進するが、MSC 移植は無効である

次に、本実験モデルの有用性を実際に複数種の細胞を移植することで検討した。移植細胞には、過去に軸索再生効果が報告されているシュワン細胞(SC) (Aszmann et al., 2008; Jesuraj et al., 2014)、MSC (Chen et al., 2007; Dezawa et al., 2001; Hundepool et al., 2014; Karaoz et al., 2009; Ladak et al., 2011; Pan and Cai, 2012; Tohill et al., 2004; Wakao et al., 2014; Wang et al., 2008)の 2 種を用いた。対照群として、線維芽細胞(Fb)移植群、及び圧挫単独群、移植なし群(無細胞処理群)に PBS 投与を行った群を作成した(図 11A-C)。

無細胞野に 2.0×10^6 個の細胞を移植し(図 11D-E)、2 週後に組織学的評価を行った。

マクロ所見、また組織学的に移植細胞は良好に生着し、周囲への遊走はほとんど認めなかった(図 11F-I)。軸索再生に関しては、圧挫単独群が最も良好な再生を認めた。移植細胞の中では SC 移植群が最も良好に再生し、MSC、Fb、移植なし群より有意に優れていた。一方、MSC 移植群は対照群と同等の再生を認めるのみであった(図 12)。

以上より、新規モデルは移植細胞の軸索再生効果の比較検討に有用であり、また SC は MSC よりも再生効果が優れていることが示された。

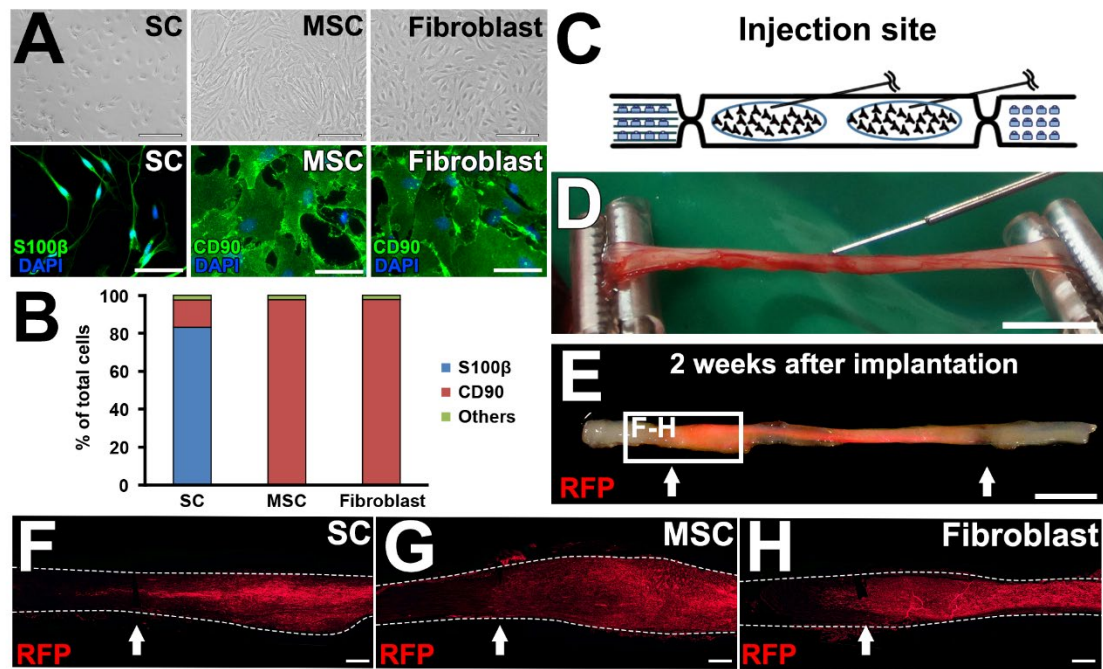


図 11 各移植細胞の生着

A 移植細胞の位相差観察像。B 移植細胞の免疫染色像。C 移植細胞のマーカー定量結果。D 細胞移植部シェーマ。近位、遠位 1/2 の中央に注射針先端を置き、細胞液を注入した。E 細胞移植手技画像。F 移植後 2 週マクロ所見。RFP 陽性細胞の生着を移植野に認める。G-I 矢状断組織像、表層、および中心部に良好な移植細胞の生着を認める。Scale bar: 100 μ m(A), 50 μ m(B), 5 mm(E), 5 mm(F), 500 μ m(G-I).

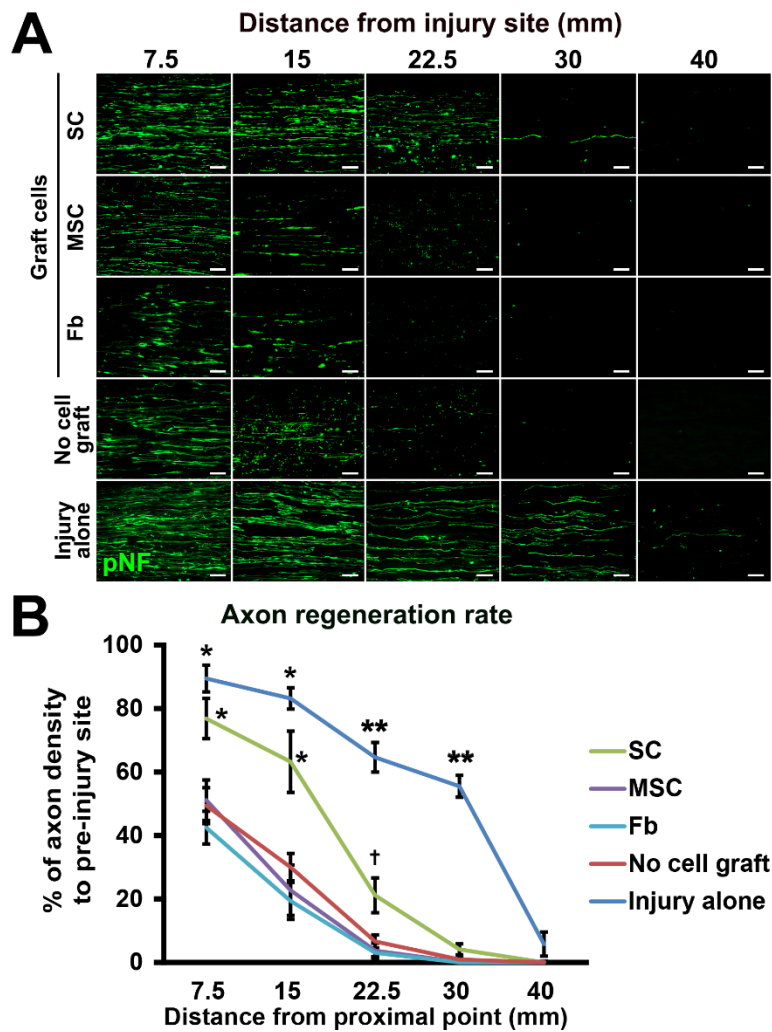


図 12 移植細胞による軸索再生効果.

A 代表的組織画像。B 軸索再生率定量結果。* $P < 0.05$ to MSC and Fb, no cell graft, ** $P < 0.05$ to SC, MSC, Fb, and no cell graft, † $P < 0.05$ to MSC and Fb. One-way ANOVA with Tukey-Kramer test. Error bars represent s.e.m. scale bar: 50 μm (A).

4. 軸索再生量はシュワン細胞の分布量と強く相関する

移植細胞が再生軸索を支持する機序を検討するため、組織学的検討を行った。

蛍光顕微鏡での観察で、移植シュワン細胞は再生軸索と近接し、過去に報告されている”SC-axon partnership” (Chen et al., 2005; McDonald et al., 2006)と同様の所見を認めた。一方、MSC や Fb は再生軸索との直接的な接触は認めなかった(図 13)。

無細胞野には宿主 SC が遊走し増殖することが知られており(Hall, 1986b; Ide et al., 1990)、S100 β 染色により全 SC の分布を観察、定量したところ、圧挫単独群で SC が最も多く分布し、次に SC 移植群が続いた。MSC、Fb 移植群は移植なし群と同等の SC 分布を認めるのみであり、したがって、両者には SC 遊走、増殖の促進効果や、SC への分化能は認めなかった(図 14)。

次に、SC の分布量と軸索再生量の相関を検討した結果、損傷部から 7.5 mm 遠位で 0.76、15 mm 遠位で 0.9 と両者には強い正の相関を認めた(図 15)。さらに、共焦点顕微鏡を用いて詳細に検討した結果、全群で再生軸索は SC 細胞と密接しており、また再生軸索先端では SC が先行し密接していることが確認された(図 16、17)。

以上より、SC が末梢神経軸索再生に重要な役割を果たし、その効果は軸索-SC の直接的接触を介した機序が関与していると考えられた。

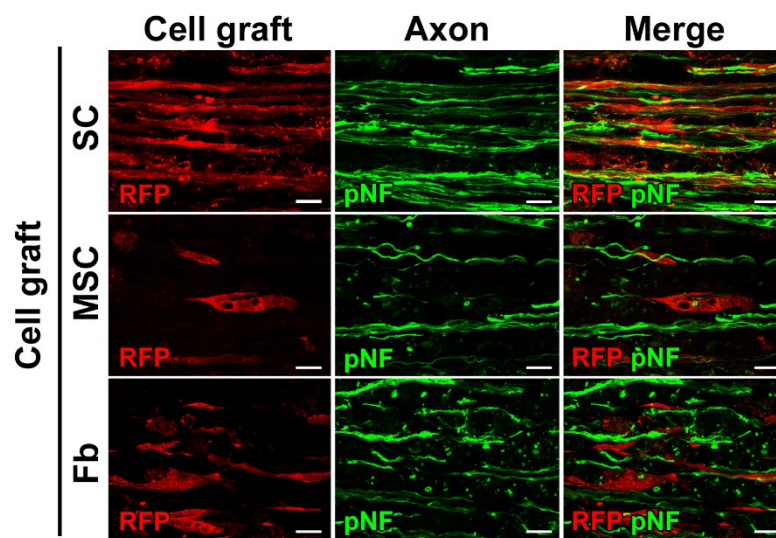


図 13 移植細胞と再生軸索の位置関係

移植 SC は再生軸索と近接する一方、MSC、Fb は再生軸索と異なる分布を示す。scale bar: 10 μ m.

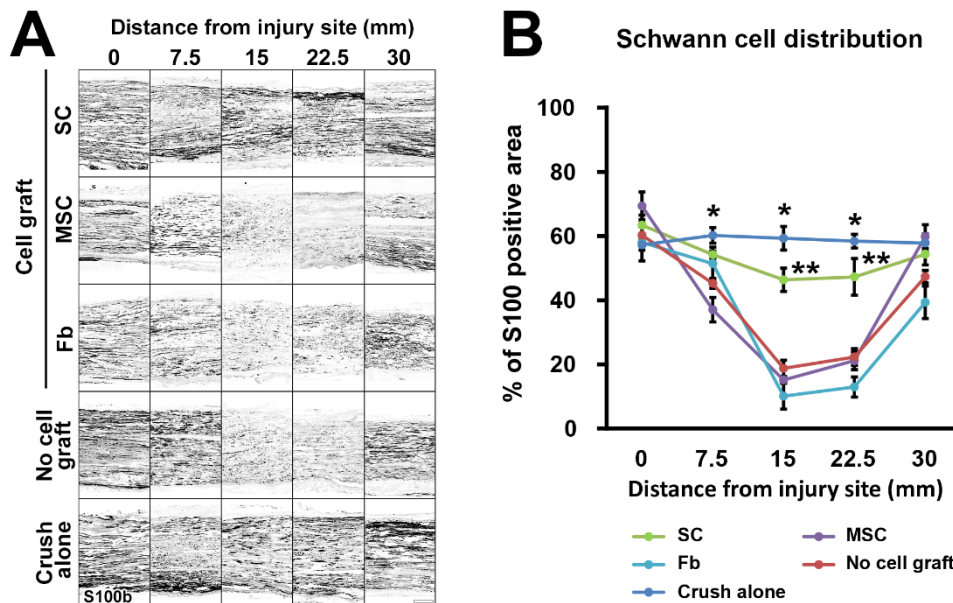


図 14 シュワン細胞の分布

A 代表的組織像。B SC 分布定量結果。SC 移植群、圧挫単独群は一樣に SC の分布を示すのに対し、MSC / Fb 移植群、移植なし群は無細胞処理野中央から遠位で SC の分布が乏しい。 $*P < 0.05$ to MSC, Fb, and no cell graft, $**P < 0.05$ to MSC and Fb; one-way ANOVA with Tukey-Kramer test. Error bars represent s.e.m., Scale bar: 200 μ m (A).

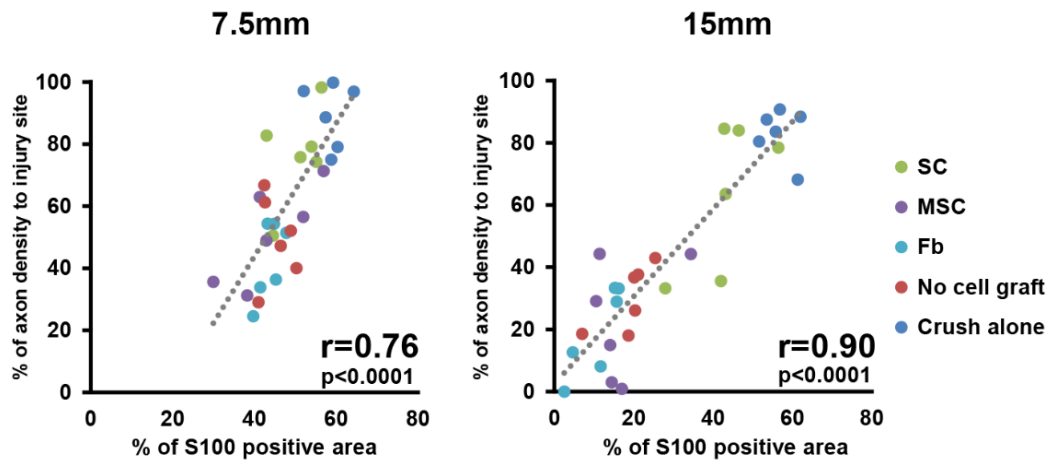


図 15 シュワン細胞分布量と軸索再生の相関
両者は強い正の相関を示す。点線: 回帰直線。

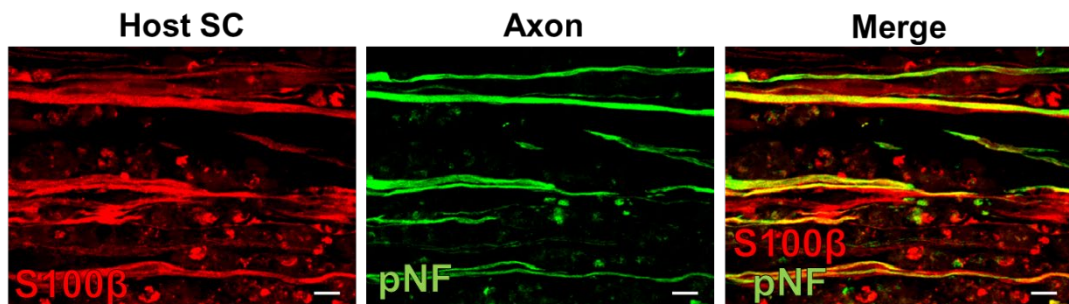


図 16 宿主シュワン細胞と再生軸索の位置関係
宿主 SC も再生軸索と密接する。 Scale bar: 2 μm .

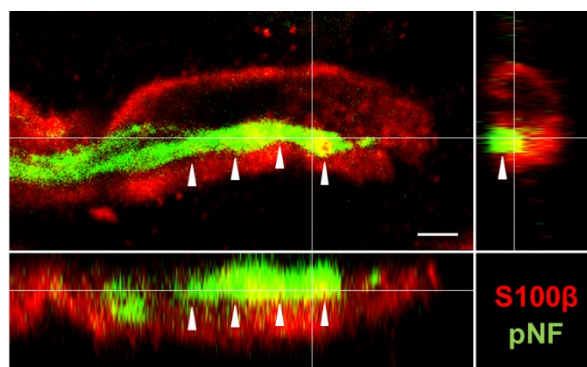


図 17 シュワン細胞と再生軸索先端の位置関係
SC が再生軸索に密接し、先導している。矢頭: 再生軸索と SC の接触面, Scale bar: 2 μm .

シュワン細胞-神経細胞接触を介した機序の検討

5. シュワン細胞の神経突起伸長効果は、液性因子のみでなく接着因子を介した機序によって生じる

軸索-SC の接触を介した軸索再生効果を検討するため、培養 SC、成体 DRG 神経細胞の共培養を行い、神経突起伸長を $\beta 3\text{tub}$ 染色で 48 時間後に定量した。DRG 神経細胞単独で培養した場合、35%に神経突起伸長を認めたのに対し、インサートを使用し接触なしで SC と共培養した場合には 56%、直接接触させ共培養した場合には 82%で伸長を認めた。最長伸長距離を定量した結果、接触あり群で $457\ \mu\text{m}$ 、なし群で $274\ \mu\text{m}$ 、単独群が $125\ \mu\text{m}$ で、各群間に有意差を認めた(図 18)。このことから、神経突起伸長が SC からの液性因子のみでなく接触を介したメカニズムが重要であることが示唆された。続いて、疎に培養した SC と DRG 神経細胞を 24 時間共培養し、神経細胞体との接触例を除外して神経突起伸長距離を定量した。神経突起と SC の接触例の伸長細胞率および最長伸長距離は 21%、 $133\ \mu\text{m}$ であったのに対し、非接触例では、8%、 $68\ \mu\text{m}$ で有意に接触した場合が優れていた(図 18A-E)。神経突起が伸長した結果として SC と接触した可能性を除外するため、SC と神経突起の接触点を細胞体から $50\ \mu\text{m}$ 未満に限定しても、伸長細胞率は 18%、最長伸長距離は $148\ \mu\text{m}$ で有意に優れていた(図 18F-H)。これらの結果から、SC は神経突起との接触を介しその伸長を促進することと考えられ、*in vivo* での実験結果を支持する結果であった。

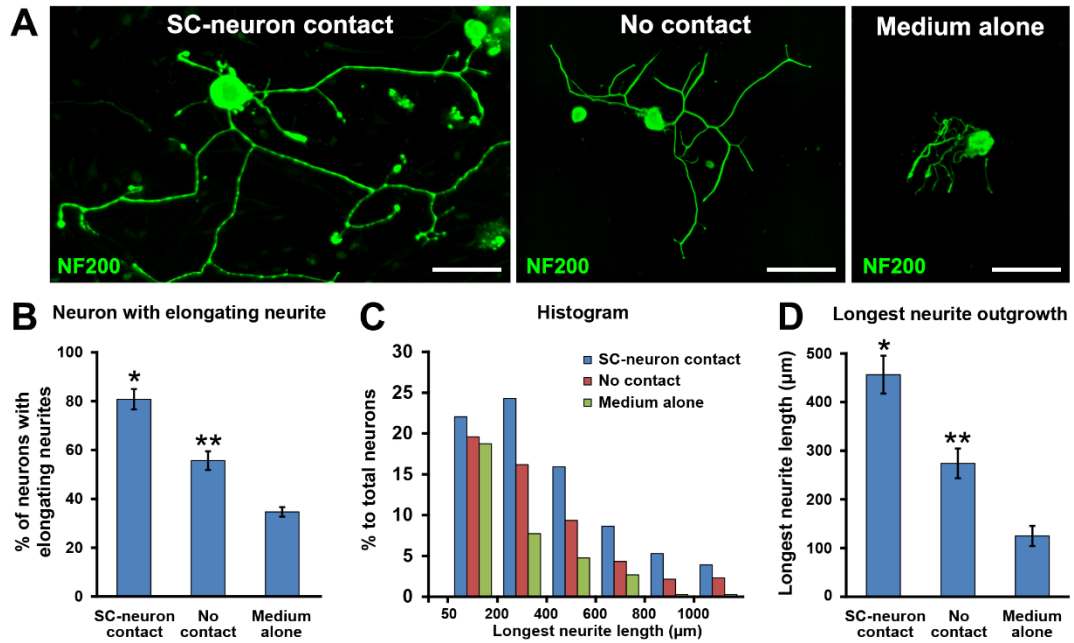


図 18 接触を介した SC の神経突起伸長効果

A 培養 48 時間後の DRG 神経細胞代表的画像。B 伸長細胞率。接触あり群で最も多くの神経突起伸長細胞を認めた。C 最長伸長距離のヒストグラム。D 最長伸長距離定量結果。接触あり群が最も長い神経突起伸長を認めた。*, ** $P < 0.05$ to others. One-way ANOVA with Tukey-Kramer test, Scale bar: 100μm(A).

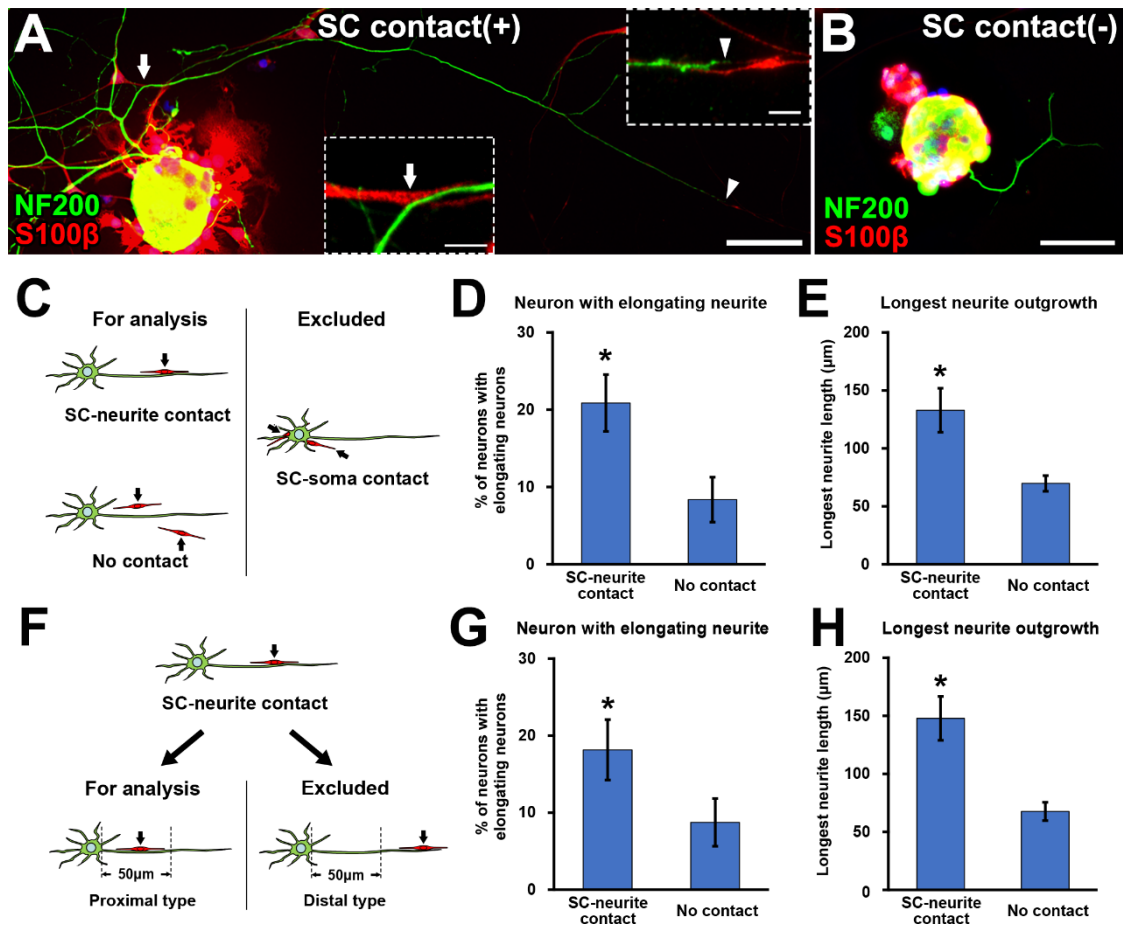


図 19 神経突起への接触を介した SC の神経突起伸長効果

A SC 接触例代表的画像。矢頭、矢印:神経突起と SC の接触点。B SC 非接触例代表的画像。C 解析対象。SC と細胞体が接触した例は除外した。D-E 同条件での伸長細胞率 (D)、および最長伸長距離 (E)。F 解析対象。50μm より遠位で SC と細胞体が接触した例は除外した。G-H 同条件での伸長細胞率 (G)、および最長伸長距 (H)。* $P < 0.05$. student's t-test., Scale bar: 50 μm (A, B), 5μm(A, boxed area).

分化度の異なるシュワン細胞の検討

1. 未分化シュワン細胞でなく、成熟細胞、特に修復細胞が最も良好な軸索再生効果を示す

分化度の異なる SC の軸索再生効果を比較検討するため、RFP 発現 LEWIS ラットを用いシュワン前駆細胞(胎生 14 日)、未熟細胞(胎生 18 日)、非修復細胞(成体)、修復細胞(成体、神経切断後 1 週)を採取、調整して 1.0×10^6 個ずつ移植した。

移植細胞中に SC が占める割合を ICC で評価した(図 20)。S100 β 蛋白は未熟細胞以降に発現するため(Jessen et al., 1994)、陽性率は前駆細胞から順に 0%、89%、90%、93%であった。Sox10 は全種で発現し、順に 87%、84%、90%、90%であった。

次に移植後 2 週の組織学的評価を行った。移植細胞の生着を RFP 染色で評価し、全種の SC が良好に生着していることを確認した(図 21)。

Ki67 陽性細胞を定量し各群の細胞増殖能を検討した結果、前駆細胞は移植野近位で。未熟細胞は移植野全域で有意に増殖能が優れていた(図 22)。

軸索再生を定量した結果、損傷部から 7.5 mm 遠位で修復細胞群が最も良好で、次に非修復細胞群が続いた。15 mm 遠位では修復細胞群が他群より有意に再生率が高かった。2 つの未分化細胞群(前駆細胞・未熟細胞)は移植なし群と同等の再生を認めるのみであった(図 23)。

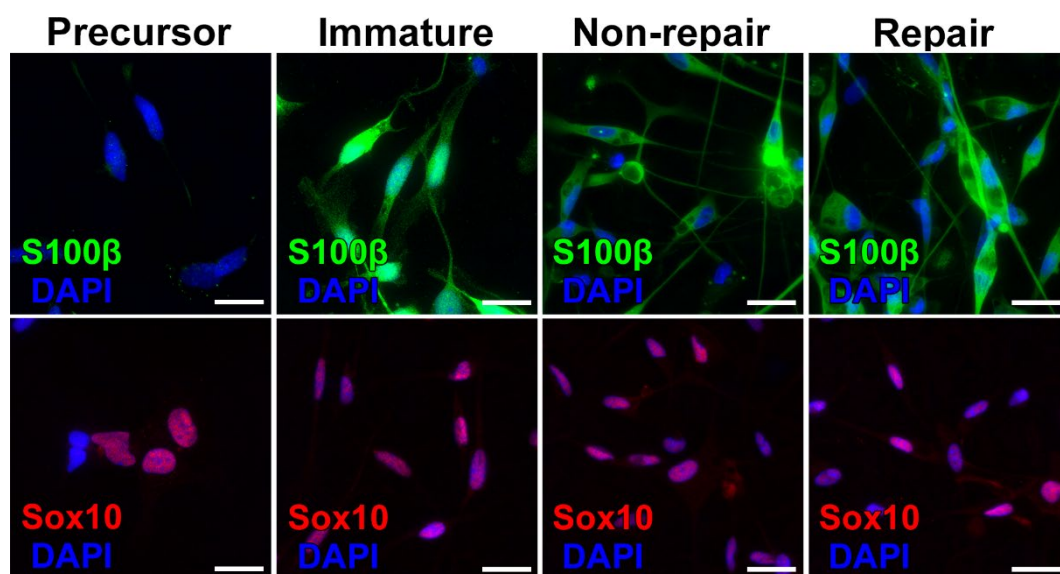


図 20 各 SC のマーカー発現

S100β は未熟細胞以降で発現するが、Sox10 は全分化度で発現する。 Scale bar: 20 μm.

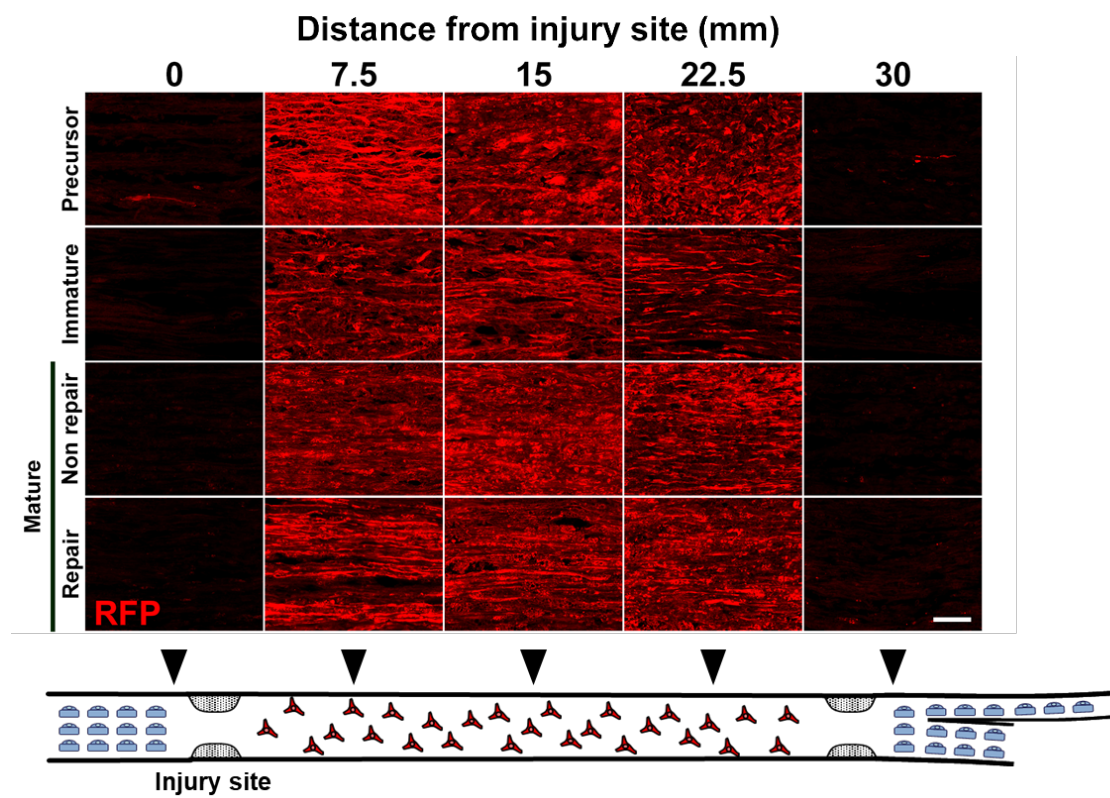


図 21 移植細胞の生着

全種の SC は良好に生着した。Scale bar: 100 μm.

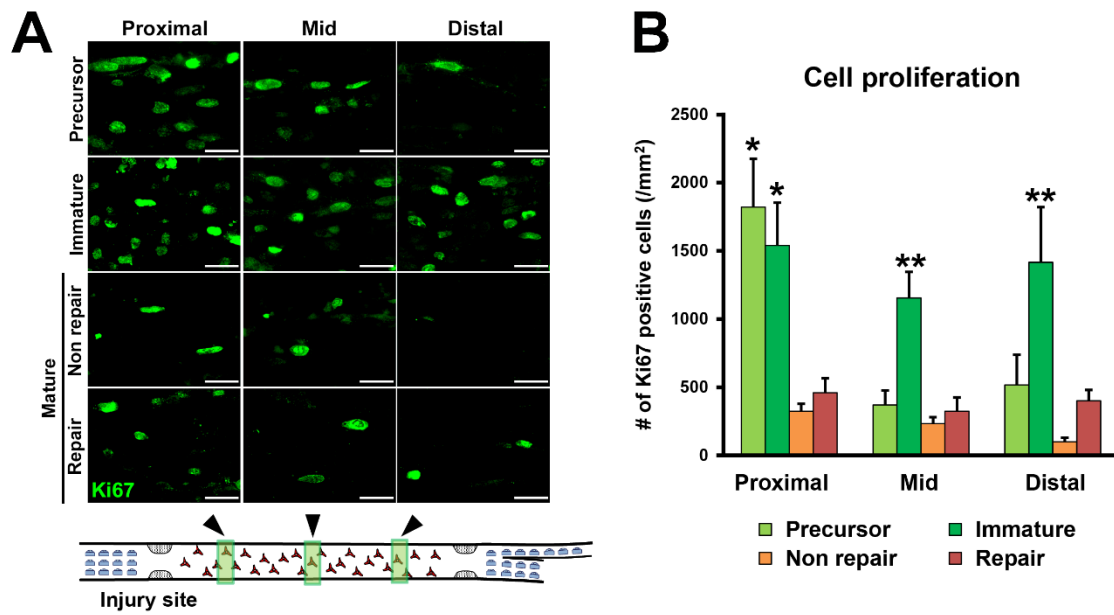


図 22 移植野の細胞増殖能

A 代表的組織像。B Ki67 陽性細胞数。* $P < 0.05$ to Non repair, Repair, ** $P < 0.05$ to others; one-way ANOVA with Tukey-Kramer test. Error bars represent s.e.m. Scale bar: 20 μm (A).

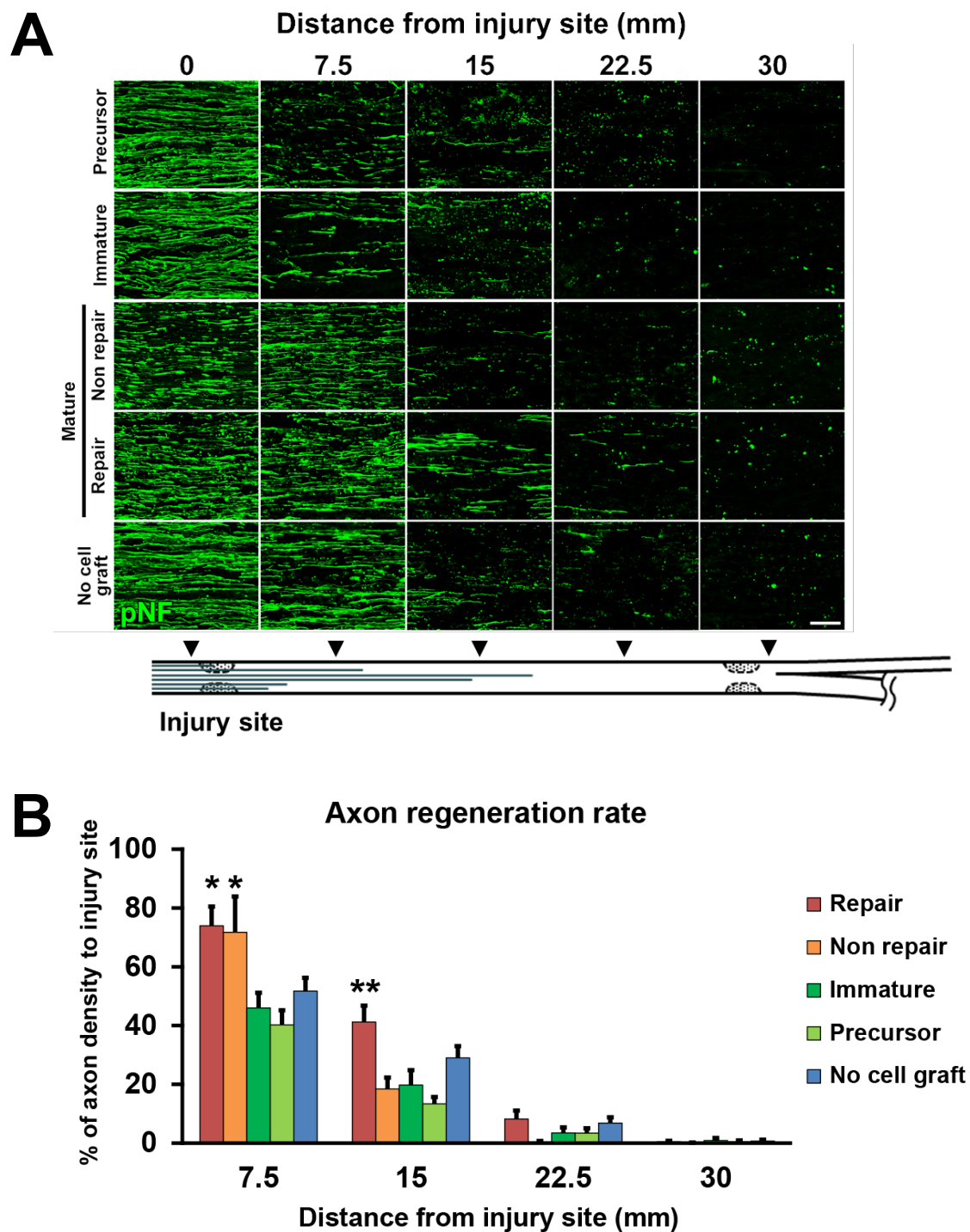


図 23 分化度の異なる SC の軸索再生効果

A 代表的組織像。B 再生軸索数。修復細胞群が最も良好な再生を認めた。* $P < 0.05$ to Non repair, Repair, No cell graft, ** $P < 0.05$ to others; one-way ANOVA with Tukey-Kramer test. Error bars represent s.e.m. Scale bar: 100 μm (A).

2. 胎児神経細胞の神経突起伸長はシュワン細胞の有無、種類に影響されないが、成体神経細胞には修復細胞が最も有効である

胎児(E14)由来、及び成体由来 DRG 神経細胞を用い、それぞれ2種の SC(前駆細胞、修復細胞)と24時間の共培養を行った。対照群として、培地のみ群(DRG 神経細胞単独)を作成した。

胎児 DRG 神経細胞では、今回検討した条件では神経突起の最長伸長距離に群間差を認めなかった(図 24)。

一方、成体 DRG 神経細胞に対しては、修復細胞が最も優れた神経突起伸長効果を示した(図 25)。

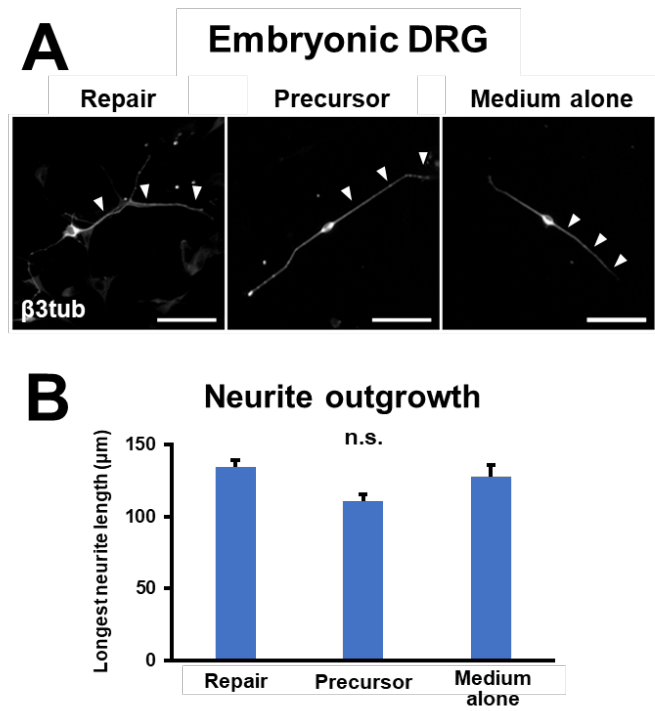


図 24 SC による胎児神経細胞の神経突起伸長効果

A 代表的組織像。B 神経突起最長伸長距離。 one-way ANOVA with Tukey-Kramer test. Error bars represent s.e.m. Scale bar: 50 μm.

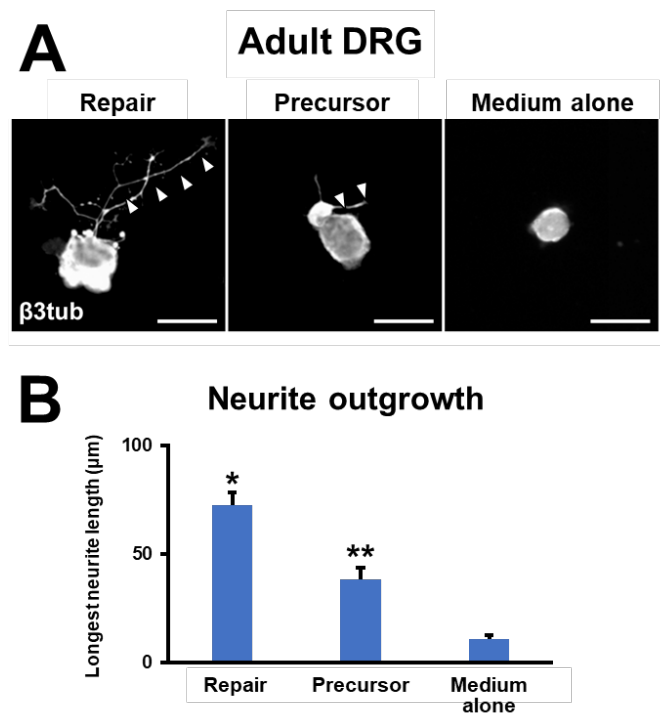


図 25 SC による成体神経細胞の神経突起伸長

A 代表的組織像。B 神経突起最長伸長距離。*, ** $P < 0.05$ to others; one-way ANOVA with Tukey-Kramer test. Error bars represent s.e.m., Scale bar: 50 μm .

3. シュワン前駆細胞と修復細胞の遺伝子発現プロファイルは大きく異なる

前駆細胞、修復細胞を用い、Tophat/Cuffdiff ソフトウェアでトランスクリプトームの解析を行った。転写因子、神経栄養因子、接着因子、ECM 関連遺伝子に注目すると、両者の遺伝子発現は大きく異なることが明らかであった(図 26A、B)。正常時に存在する非修復細胞を対照群とし、DE gene ($p < 0.01$, $\log_2 FC > 2$ と定義)を解析すると、前駆細胞では 742、修復細胞では 392 の遺伝子発現が亢進していた。そのうち、151 遺伝子は両細胞で発現が亢進しており、修復細胞で特異的に発現が亢進している遺伝子は 241 遺伝子であった(図 26C)。同 241 遺伝子の GO 解析を行った結果、Biological processes では炎症、外的刺激への反応に加え、細胞間接着に関わる遺伝子群の発現が上昇しており、Cellular components では細胞膜実質、表面に関連する遺伝子群の発現が有意に上昇していることが示された(図 26D)。

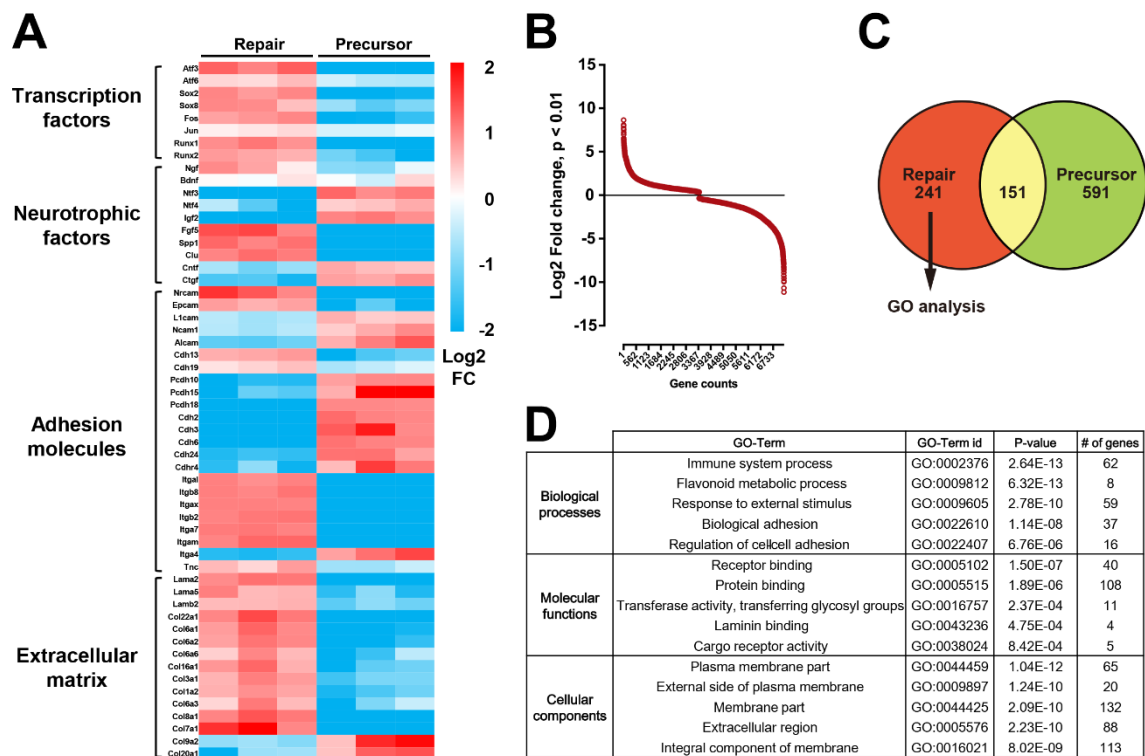


図 26 トランスクリプトーム解析結果

A ヒートマップ。修復細胞、前駆細胞で発現が有意に異なる遺伝子群を示す。p < 0.01. B 散布図解析。前駆細胞に対し修復細胞で発現が有意に亢進あるいは抑制された遺伝子数の分布を示す。p < 0.01. C ベン図。非修復細胞群を対照とし、修復細胞あるいは前駆細胞で発現が亢進した遺伝子数を示す。log2 FC > 2, p < 0.01. D Gene ontology エンリッチメント解析。各項目上位 5 項目を示す。

4. 修復細胞はより多くの神経栄養因子を産生する

ELISA 法を用い、前駆細胞、修復細胞の培養上清(48 時間培養)中の神経栄養因子 (NGF、BDNF)を定量した。対照群として、前項と同様に非修復細胞を用いた。修復細胞は非修復細胞より NGF 産生量が 1.6 倍、BDNF 産生量が 1.8 倍だったのに対し、前駆細胞は順に 0.62 倍、0.25 倍と有意に劣っていた(図 27)。

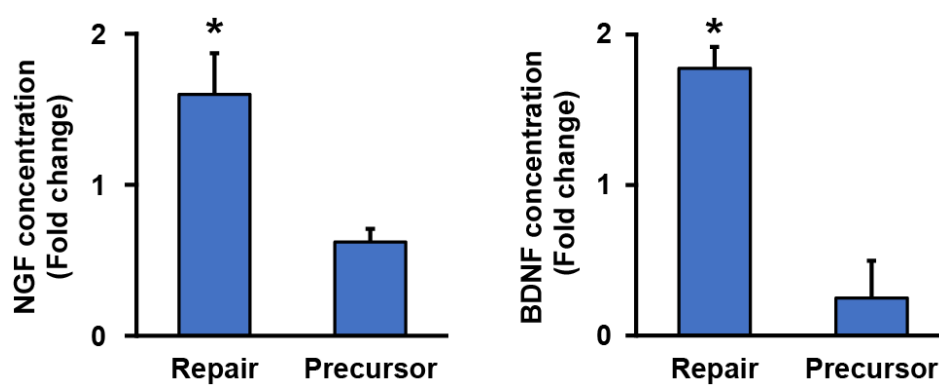


図 27 各 SC の神経栄養因子発現

非修復細胞を対照群とし、Fold change を示す。 * $p < 0.05$ to precursor. student's t-test.

局在の異なるシュワン細胞の検討

1. 運動神経/感覚神経由来シュワン細胞は各々の軸索再生を特異的に促進する

局在の異なる SC の軸索再生効果を比較検討するため、RFP 発現 LEWIS ラットを用い運動神経由来 SC (前根から採取)、感覚神経由来 SC (後根から採取) を採取、調整して 1.0×10^6 個ずつ移植した。

ChAT 染色を用いて運動神経再生を評価した結果、運動神経由来 SC は感覚神経由来 SC に比べ有意に再生を促進することが明らかであった(図 28A、B)。一方、全軸索の再生に関しては、両 SC は移植なし群に比べ再生を促進し、その効果は同等であった(図 28C)。

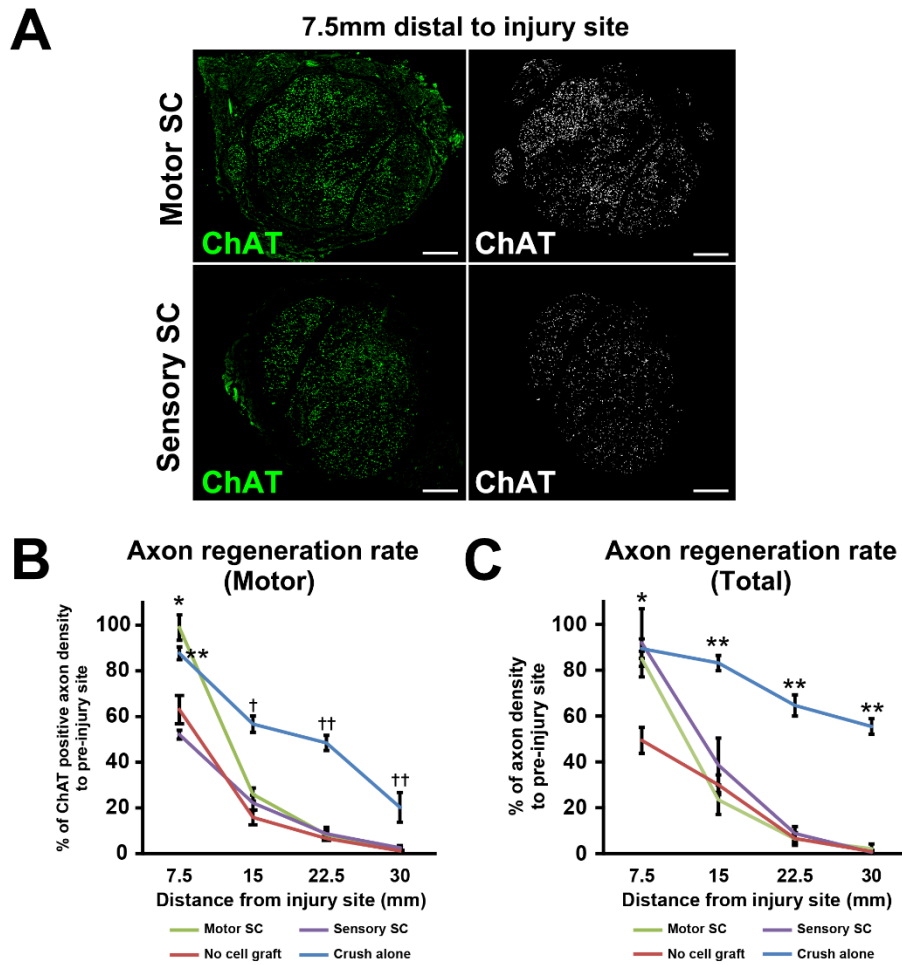


図 28 局在の異なる SC による軸索再生効果

A 代表的組織像(左)と解析範囲(右)。B 運動神経軸索再生率。運動神経由来 SC がより運動神経軸索再生を促進した。one-way ANOVA with Tukey-Kramer test. * $p < 0.05$ to SensorySC, No cell graft, ** $p < 0.05$ to Sensory SC, † $p < 0.05$ to Sensory SC, No cell graft, †† $p > 0.05$ to others. C 全軸索再生率。両 SC の軸索再生効果は同等であった。one-way ANOVA with Tukey-Kramer test. * $p < 0.05$ to No cell graft, ** $p < 0.05$ to others, Scale bar: 200 μm (A).

考察

本研究では、細胞治療に適した細胞種を同定する目的に特化した実験モデルを作成した。本モデルは、縫合手技を必要としないため、手技に依存せず、神経損傷部を挟んだ近位部と遠位部の軸索のトポグラフィーは常に一致しており、軸索の異所性伸長も生じさせず、簡便かつ高い再現性を実現するモデルであると考え。25 mm 長の広い範囲の無細胞野を作成することで、陽性・陰性対照群の軸索再生が大きく異なり、移植細胞の軸索再生効果の検出域を幅広くすることを可能とした。実際、MSC や Fb でなく、SC が良好な軸索再生効果を有することが、明瞭に示された。

今回、異なる 3 種類の細胞移植を行うことで、3 つの知見が得られた。1 点目は、軸索再生数とシュワン細胞量に強い相関を認めることである。この相関は、移植細胞の有無や種類、あるいは宿主由来 SC か移植 SC かに関係なく認めた。先行研究で末梢神経再生における SC の重要性は知られているが(Gulati, 1988; HALL, 1986a)、両者の相関を明らかにしたのは本研究が初めてである。SC 量の増加が軸索再生の促進に直結することを示唆している。

2 点目に、軸索と SC が密接した関係にあるということである。再生の過程で両者が近接していることは、“axon-SC partnership”として報告されている(Chen et al., 2005; McDonald et al., 2006)が、さらに共焦点顕微鏡を用い詳細に観察することで、SC が先行し、再生軸索先端に密接していることを示した。過去の報告では、SC との接触なしに再生する“naked axon”の存在が報告されており(Ide et al., 1990; Ramon y Cajal, 1928)、本報告と矛盾するが、このことは観察の時期、場所による影響が考えられる。つまり、“naked axon”が観察されるのは軸索損傷部の近傍、かつ損傷後数日であり(Chen et al., 2005; Ide et al., 1983)、一方、損傷後 2 週の段階で、7.5 mm～30 mm 遠位という長い距離を再生するためには SC の存在が不可欠と考えられた。SC の役割は、時間・場所によって異なり(Jessen and Mirsky, 2016; Scheib and Hoke, 2013)、この矛盾を説明しうる。さらに、損傷部からの距離によって軸索再生のメカニズムが異なる可能性も考慮する必要がある(Fernandes et al., 1999)。

3 点目に、SC は軸索との接触を介したメカニズムで軸索再生を促進する点である。神経栄養因子等、SC からの液性因子が軸索再生を促進することはよく知られているが(Jessen and Mirsky, 2016; Reynolds and Woolf, 1993)、接触を介したメカニズムに着目した報告は少ない(Chang et al., 2018)。発生の過程で、SC は L1 や NCAM、N-cadherin 等の接着因子を発現し(Hatta et al., 1987; Martini and Schachner, 1986)、また L1 が in vitro で胎児あるいは新生児神経細胞の神経突起伸長を促進した報告はあるが、後述するように発生と再生過程での軸索伸長メカニズムは異なると考えられ、成体の末梢神経損傷後の接触を介したメカニズムの詳細は明らかになっていない。重要なことに、in vitro の検討から、接着を介したメカニズムの軸索再生効果は液性因子に匹敵することが示唆された。末梢神経損傷に対す

る効果的治療法の開発に際し、重要なターゲットとなることが期待され、その分子生物学的メカニズムの解明が必要と考える。

末梢神経軸索再生に至適な SC の分化度を同定するため、今回、2 種の未分化細胞、2 種の成熟細胞の軸索再生効果を比較検討した結果、修復細胞が最も良好な軸索再生効果を有することが明らかとなった。一方、中枢神経とは異なり、未分化細胞には軸索再生効果がなかった。興味深いことに、未分化細胞の中でも前駆細胞は、発生期に伸長する軸索に密接して軸索を支持する細胞であり(Wanner et al., 2006)、軸索伸長促進効果も期待されたが、無効であった。一因として、発生期と再生期での軸索伸長に対して SC が果たす役割の違いが考えられる。発生期の軸索伸長は神経細胞自体の軸索伸長能(内的要素)が旺盛であり(Mar et al., 2014)、SC が無くても軸索伸長は可能であることが報告されている(Grim et al., 1992; Riethmacher et al., 1997)。共培養結果も、SC 等の外的要素が果たす役割が小さいことを示唆している。一方、再生期では、成熟した神経細胞の軸索伸長能は相対的に劣り(Mar et al., 2014)、SC が無ければ軸索再生は著しく障害されることから(HALL, 1986a)、外的要素がより重要な役割を果たすと考えられる。以上のことは、未分化細胞でなく、成熟細胞、特に修復細胞が良好な軸索再生効果をもつという、今回の結果を支持する報告である。また、トランスクリプトーム解析結果からは、両者のプロファイルは大きく異なることが明らかであり、さらに修復細胞特異的に発現する遺伝子群の GO 解析からは、細胞膜実質及び表面に関連する遺伝子群の発現亢進が明らかであることから、それら細胞表面分子関連遺伝子が新規治療ターゲットとして重要と考える。

さらに、末梢神経損傷後、直接縫合可能で細胞移植を併用する再建術を必要としない場合もあるが、SC の非修復細胞から修復細胞への分化を促進することがより良好な回復につながることを期待される。特に、老化に伴いその分化が遅延することが知られており(Painter et al., 2014)、効率的な分化誘導法の重要性が示唆された。

運動神経、感覚神経由来の局在の異なる SC による特異的軸索再生効果は過去にいくつかの報告がある(Hoke et al., 2006; Jesuraj et al., 2012; Kawamura et al., 2010; Marquardt and Sakiyama-Elbert, 2015; Neubauer et al., 2010)が、その手法は議論の余地があり、結論は出ていなかった。過去の報告の問題点として、運動神経特異的 SC の採取源として大腿神経筋枝を用いている(Kawamura et al., 2010)が、同神経には感覚神経線維を多く含んでいること(Brushart, 1988)、径の異なる神経をグラフトに用い、結果として移植細胞数に違いを生じていたこと(Hoke et al., 2006)等が挙げられる。本研究で特筆すべきは、SC 採取源として前根・後根を用いたため、運動神経、感覚神経のみで構成される神経線維から、特異性の高い SC を使用したこと、また新規実験モデルを用い、全く同じ条件で比較検討したことである。坐骨神経は主に運動神経、感覚神経線維で構成され、したがって感覚神経再生数を全軸索数-運動神経軸索数と考えると、両者はもともと支持していた神経線維の回復を

より促進することが示され、局在の異なる SC による特異的軸索再生効果の議論に、一つの区切りをつける結果と考える。

結論

- ・ 移植細胞が持つ軸索再生効果を比較検討するための、簡便かつ画一的に作成可能な新規実験モデルを作成した。
- ・ 移植細胞の有無、種類に関わらず、再生軸索には SC が先行、密接し、軸索再生量と SC 分布量には強い相関を認めた。
- ・ SC の神経突起への直接の接触により、神経突起の伸長は促進することが明らかとなり、液性因子のみでなく、細胞間接触を介したメカニズムが軸索再生促進に重要であることが示唆された。
- ・ 前駆細胞、未熟細胞、修復細胞、非修復細胞と、分化度の異なる4種類の SC を検討した結果、修復細胞が最も良好な軸索再生効果を示し、未分化細胞である前駆細胞と未熟細胞は軸索再生促進効果を有していなかった。
- ・ 局在の異なる SC は、もともと支持していた、運動神経軸索、感覚神経軸索の再生を特異的に促進した。

一連の研究結果から、末梢神経軸索再生に至適な SC は修復細胞であり、また運動神経・感覚神経の再生にそれぞれ至適な表現型があることが示された。特に、SC と軸索の細胞間接触を介したメカニズムが新規治療ターゲットとして重要と考える。今回検討したトランスクリプトーム解析により、細胞表面の候補遺伝子がいくつか同定されたが、実際にそれらの遺伝子群の発現制御により、軸索再生効果が影響を受けるか、検討を進めていきたい。また、非修復細胞から修復細胞への効率的分化誘導法の確立も、末梢神経再生のための、新規細胞治療方法確立のための課題と考える。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。研究の機会を与えていただいた、北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室・岩崎倫政教授に心より感謝いたします。また、本研究全般にわたり、直接ご指導ご鞭撻を賜りました同先端的運動器機能解析・制御学分野・角家健特任講師に心より感謝いたします。

本研究の一部は、公益財団法人・整形災害外科学研究助成財団および一般社団法人・日本損害保険協会の助成のもと行われました。また、本研究で用いた遺伝子組み換え動物(LEW-Tg(Gt(ROSA)26Sor-DsRed*)7Jmsk ラット)はナショナルバイオリソースプロジェクト「ラット」に提供いただき、作成した凍結組織標本は、北海道大学創成科学研究棟オープンファンリティのクライオスタットを使用し作成したものです。関係各所の皆様にお礼申し上げます。

最後に、研究課程において数々のご助言、ご協力を賜りました北海道大学大学院医学研究院専門医学系部門機能再生医学分野整形外科学教室の教官各位、教室員の皆様に、心よりの感謝を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- Assinck, P., Duncan, G.J., Hilton, B.J., Plemel, J.R., and Tetzlaff, W. (2017). Cell transplantation therapy for spinal cord injury. *Nature Neuroscience* 20, 637.
- Aszmann, O.C., Korak, K.J., Luegmair, M., and Frey, M. (2008). Bridging critical nerve defects through an acellular homograft seeded with autologous schwann cells obtained from a regeneration neuroma of the proximal stump. *J Reconstr Microsurg* 24, 151-158.
- Behfar, A., Crespo-Diaz, R., Terzic, A., and Gersh, B.J. (2014). Cell therapy for cardiac repair—lessons from clinical trials. *Nature Reviews Cardiology* 11, 232.
- Ben Haim, L., and Rowitch, D.H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 18, 31-41.
- Bitar, K.N., and Zakhem, E. (2016). Bioengineering the gut: future prospects of regenerative medicine. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 13, 543.
- Brushart, T. (1988). Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *Journal of Neuroscience* 8, 1026-1031.
- Bussolati, B., and Camussi, G. (2015). Therapeutic use of human renal progenitor cells for kidney regeneration. *Nature Reviews Nephrology* 11, 695.
- Chang, I.A., Kim, K.J., and Namgung, U. (2018). Alpha6 and beta1 Integrin Heterodimer Mediates Schwann Cell Interactions with Axons and Facilitates Axonal Regeneration after Peripheral Nerve Injury. *Neuroscience* 371, 49-59.
- Chen, C.J., Ou, Y.C., Liao, S.L., Chen, W.Y., Chen, S.Y., Wu, C.W., Wang, C.C., Wang, W.Y., Huang, Y.S., and Hsu, S.H. (2007). Transplantation of bone marrow stromal cells for peripheral nerve repair. *Exp Neurol* 204, 443-453.
- Chen, Y.Y., McDonald, D., Cheng, C., Magnowski, B., Durand, J., and Zochodne, D.W. (2005). Axon and Schwann cell partnership during nerve regrowth. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 613-622.
- Chichagova, V., Hallam, D., Collin, J., Zerti, D., Dorgau, B., Felemban, M., Lako, M., and Steel, D.H. (2018). Cellular regeneration strategies for macular degeneration: past, present and future. *Eye*.
- Daly, W., Yao, L., Zeugolis, D., Windebank, A., and Pandit, A. (2012). A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *Journal of the Royal Society Interface* 9, 202-221.
- Dezawa, M., Takahashi, I., Esaki, M., Takano, M., and Sawada, H. (2001). Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal

cells. *Eur J Neurosci* 14, 1771-1776.

Ellis, C., Ramzy, A., and Kieffer, T.J. (2017). Regenerative medicine and cell-based approaches to restore pancreatic function. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 14, 612.

Evans, P.J., Midha, R., and Mackinnon, S.E. (1994). The peripheral nerve allograft: a comprehensive review of regeneration and neuroimmunology. *Prog Neurobiol* 43, 187-233.

Fernandes, K.J., Fan, D.P., Tsui, B.J., Cassar, S.L., and Tetzlaff, W. (1999). Influence of the axotomy to cell body distance in rat rubrospinal and spinal motoneurons: differential regulation of GAP-43, tubulins, and neurofilament-M. *J Comp Neurol* 414, 495-510.

Gordon, T., and Borschel, G.H. (2017). The use of the rat as a model for studying peripheral nerve regeneration and sprouting after complete and partial nerve injuries. *Exp Neurol* 287, 331-347.

Grayson, W.L., Bunnell, B.A., Martin, E., Frazier, T., Hung, B.P., and Gimble, J.M. (2015). Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature Reviews Endocrinology* 11, 140.

Grim, M., Halata, Z., and Franz, T. (1992). Schwann cells are not required for guidance of motor nerves in the hindlimb in *Spotch* mutant mouse embryos. *Anatomy and embryology* 186, 311-318.

Guenard, V., Kleitman, N., Morrissey, T., Bunge, R., and Aebischer, P. (1992). Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *The Journal of Neuroscience* 12, 3310-3320.

Gulati, A.K. (1988). Evaluation of acellular and cellular nerve grafts in repair of rat peripheral nerve. *J Neurosurg* 68, 117-123.

HALL, S.M. (1986a). The effect of inhibiting Schwann cell mitosis on the re - innervation of acellular autografts in the peripheral nervous system of the mouse. *Neuropathology and applied neurobiology* 12, 401-414.

Hall, S.M. (1986b). Regeneration in cellular and acellular autografts in the peripheral nervous system. *Neuropathol Appl Neurobiol* 12, 27-46.

Hatta, K., Takagi, S., Fujisawa, H., and Takeichi, M. (1987). Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Developmental biology* 120, 215-227.

Hoke, A., Redett, R., Hameed, H., Jari, R., Zhou, C., Li, Z.B., Griffin, J.W., and Brushart, T.M. (2006). Schwann cells express motor and sensory phenotypes that regulate axon regeneration. *J Neurosci* 26, 9646-9655.

Hundepool, C.A., Nijhuis, T.H., Mohseny, B., Selles, R.W., and Hovius, S.E. (2014). The effect of stem cells in bridging peripheral nerve defects: a meta-analysis. *J Neurosurg* 121, 195-209.

Ide, C., Osawa, T., and Tohyama, K. (1990). Nerve Regeneration through Allogeneic Nerve Grafts, with Special Reference to the Role of the Schwann-Cell Basal Lamina. *Progress in Neurobiology* 34, 1-&.

Ide, C., Tohyama, K., Yokota, R., Nitatori, T., and Onodera, S. (1983). Schwann cell basal lamina and nerve regeneration. *Brain research* 288, 61-75.

Isaacs, J. (2010). Treatment of acute peripheral nerve injuries: current concepts. *J Hand Surg Am* 35, 491-497; quiz 498.

Jessen, K.R., Brennan, A., Morgan, L., Mirsky, R., Kent, A., Hashimoto, Y., and Gavrilovic, J. (1994). The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. *Neuron* 12, 509-527.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol* 594, 3521-3531.

Jesuraj, N.J., Nguyen, P.K., Wood, M.D., Moore, A.M., Borschel, G.H., Mackinnon, S.E., and Sakiyama-Elbert, S.E. (2012). Differential gene expression in motor and sensory Schwann cells in the rat femoral nerve. *J Neurosci Res* 90, 96-104.

Jesuraj, N.J., Santosa, K.B., Macewan, M.R., Moore, A.M., Kasukurthi, R., Ray, W.Z., Flagg, E.R., Hunter, D.A., Borschel, G.H., Johnson, P.J., *et al.* (2014). Schwann cells seeded in acellular nerve grafts improve functional recovery. *Muscle Nerve* 49, 267-276.

Jesuraj, N.J., Santosa, K.B., Newton, P., Liu, Z., Hunter, D.A., Mackinnon, S.E., Sakiyama-Elbert, S.E., and Johnson, P.J. (2011). A systematic evaluation of Schwann cell injection into acellular cold-preserved nerve grafts. *J Neurosci Methods* 197, 209-215.

Kadoya, K., Lu, P., Nguyen, K., Lee-Kubli, C., Kumamaru, H., Yao, L., Knackert, J., Poplawski, G., Dulin, J.N., Strobl, H., *et al.* (2016). Spinal cord reconstitution with homologous neural grafts enables robust corticospinal regeneration. *Nat Med* 22, 479-487.

Karaoz, E., Aksoy, A., Ayhan, S., Sariboyaci, A.E., Kaymaz, F., and Kasap, M. (2009). Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem Cell Biol* 132, 533-546.

Kawamura, D.H., Johnson, P.J., Moore, A.M., Magill, C.K., Hunter, D.A., Ray, W.Z., Tung, T.H., and Mackinnon, S.E. (2010). Matching of motor-sensory modality in the rodent femoral nerve model shows no enhanced effect on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol* 223, 496-504.

Kotton, D.N., and Morrissey, E.E. (2014). Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nature Medicine* 20, 822.

Ladak, A., Olson, J., Tredget, E.E., and Gordon, T. (2011). Differentiation of mesenchymal stem cells to support peripheral nerve regeneration in a rat model. *Exp Neurol* 228, 242-252.

Levi, A.D.O., Guenard, L.V., Aebischer, P., and Bunge, R.P. (1994). The Functional-Characteristics of Schwann-Cells Cultured from Human Peripheral-Nerve after Transplantation into a Gap within the Rat Sciatic-Nerve. *Journal of Neuroscience* 14, 1309-1319.

Lundborg, G. (2000). A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am* 25, 391-414.

Mar, F.M., Bonni, A., and Sousa, M.M. (2014). Cell intrinsic control of axon regeneration. *EMBO reports* 15, 254.

Marquardt, L.M., and Sakiyama-Elbert, S.E. (2015). GDNF preconditioning can overcome Schwann cell phenotypic memory. *Exp Neurol* 265, 1-7.

Martini, R., and Schachner, M. (1986). Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM, and MAG) and their shared carbohydrate epitope and myelin basic protein in developing sciatic nerve. *The Journal of cell biology* 103, 2439-2448.

McDonald, D., Cheng, C., Chen, Y., and Zochodne, D. (2006). Early events of peripheral nerve regeneration. *Neuron Glia Biol* 2, 139-147.

Millesi, H. (1973). Microsurgery of peripheral nerves. *Hand* 5, 157-160.

Molofsky, A.V., Kelley, K.W., Tsai, H.H., Redmond, S.A., Chang, S.M., Madireddy, L., Chan, J.R., Baranzini, S.E., Ullian, E.M., and Rowitch, D.H. (2014). Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity. *Nature* 509, 189-194.

Moore, A.M., MacEwan, M., Santosa, K.B., Chenard, K.E., Ray, W.Z., Hunter, D.A., Mackinnon, S.E., and Johnson, P.J. (2011). Acellular nerve allografts in peripheral nerve regeneration: a comparative study. *Muscle Nerve* 44, 221-234.

Neubauer, D., Graham, J.B., and Muir, D. (2010). Nerve grafts with various sensory and motor fiber compositions are equally effective for the repair of a mixed nerve defect. *Exp Neurol* 223, 203-206.

Painter, M.W., Brosius Lutz, A., Cheng, Y.C., Latremoliere, A., Duong, K., Miller, C.M., Posada, S., Cobos, E.J., Zhang, A.X., Wagers, A.J., *et al.* (2014). Diminished Schwann cell repair responses underlie age-associated impaired axonal regeneration. *Neuron* 83, 331-343.

Pan, Y., and Cai, S. (2012). Current state of the development of mesenchymal stem cells into clinically applicable Schwann cell transplants. *Mol Cell Biochem* 368, 127-135.

Ramon y Cajal, S. (1928). Degeneration and regeneration of the nervous system.

Reynolds, M.L., and Woolf, C.J. (1993). Reciprocal Schwann cell-axon interactions. *Curr Opin Neurobiol* 3, 683-693.

Riethmacher, D., Sonnenberg-Riethmacher, E., Brinkmann, V., Yamaai, T., Lewin, G.R., and Birchmeier, C. (1997). Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* 389, 725.

Rodriguez, F.J., Verdu, E., Ceballos, D., and Navarro, X. (2000). Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol* 161, 571-584.

Sakai, D., and Andersson, G.B.J. (2015). Stem cell therapy for intervertebral disc regeneration: obstacles and solutions. *Nature Reviews Rheumatology* 11, 243.

Scheib, J., and Hoke, A. (2013). Advances in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol* 9, 668-676.

Seddon, H.J. (1963). Nerve grafting. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 32.

Seddon, R.J. (1947). Surgical experiences with peripheral nerve injuries. *Q Bull Northwest Univ Med Sch* 21, 201-210.

Tohill, M., Mantovani, C., Wiberg, M., and Terenghi, G. (2004). Rat bone marrow mesenchymal stem cells express glial markers and stimulate nerve regeneration. *Neurosci Lett* 362, 200-203.

Wakao, S., Matsuse, D., and Dezawa, M. (2014). Mesenchymal stem cells as a source of Schwann cells: their anticipated use in peripheral nerve regeneration. *Cells Tissues Organs* 200, 31-41.

Wang, D., Liu, X.L., Zhu, J.K., Jiang, L., Hu, J., Zhang, Y., Yang, L.M., Wang, H.G., and Yi, J.H. (2008). Bridging small-gap peripheral nerve defects using acellular nerve allograft implanted with autologous bone marrow stromal cells in primates. *Brain Res* 1188, 44-53.

Wanner, I.B., Mahoney, J., Jessen, K.R., Wood, P.M., Bates, M., and Bunge, M.B. (2006). Invariant mantling of growth cones by Schwann cell precursors characterize growing peripheral nerve fronts. *Glia* 54, 424-438.

Whitlock, E.L., Kasukurthi, R., Yan, Y., Tung, T.H., Hunter, D.A., and Mackinnon, S.E. (2010). Fibrin glue mitigates the learning curve of microneurosurgical repair. *Microsurgery* 30, 218-222.

Yan, L., Yao, Z., Lin, T., Zhu, Q., Qi, J., Gu, L., Fang, J., Zhou, X., and Liu, X. (2017). The role of precisely matching fascicles in the quick recovery of nerve function in long peripheral nerve defects. *Neuroreport* 28, 1008-1015.