



Title	M2 マクロファージによる末梢神経軸索再生の制御とその分子機構に関する研究
Author(s)	松居, 祐樹
Description	配架番号 : 2626
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14505号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14505
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85431
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Matsui.pdf



学 位 論 文

M2 マクロファージによる末梢神経軸索再生の制御とその
分子機構に関する研究

(Elucidation of the role of M2 macrophages in the regulation
of axon regeneration in peripheral nervous system and its
molecular mechanism)

2 0 2 1 年 3 月

北 海 道 大 学

松居 祐樹

Yuki Matsui

学 位 論 文

M2 マクロファージによる末梢神経軸索再生の制御とその
分子機構に関する研究

(Elucidation of the role of M2 macrophages in the regulation
of axon regeneration in peripheral nervous system and its
molecular mechanism)

2021年3月

北 海 道 大 学

松居 祐樹

Yuki Matsui

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	3 頁
略語表	7 頁
緒言	8 頁
方法	10 頁
結果	17 頁
考察	38 頁
総括および結論	41 頁
謝辞	43 頁
利益相反	44 頁
引用文献	45 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学術雑誌に現在投稿中である。

Yuki Matsui, Ken Kadoya, Yusuke Nagano, Takeshi Endo, Masato Hara, Gen Matsumae, Alaa Terkawi, Norimasa Iwasaki

M2 macrophages regulate axon regeneration after peripheral nerve injury by locating around axons to stimulate uPA-uPAR axis.

Nature Medicine (2020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. Matsui Y, Kadoya K, Nagano Y, Endo T, Alaa T, Iwasaki N.
Spatiotemporal investigation and transplantation analysis show an association of M2 macrophage with regenerating axons after peripheral nerve injury.
XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, July 11-13, 2019, Porto, Portugal
2. 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、Alaa Terkawi、岩崎倫政
M2 マクロファージの末梢神経損傷後の時空間的推移と軸索再生効果
第30回日本末梢神経学会学術集会、2019年8月23日-24日、石川県金沢市
3. Matsui Y, Kadoya K, Nagano Y, Endo T, Alaa T, Iwasaki N.
Spatiotemporal investigation and transplantation analysis show an association of M2 macrophage with regenerating axons after peripheral nerve injury.
74th Annual meeting of the American Society for Surgery of the Hand, September 5-7, Las Vegas, USA
4. 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、Alaa Terkawi、岩崎倫政
M2 マクロファージの末梢神経損傷後の時空間的推移と軸索再生効果
第38回日本運動器移植・再生医学研究会、2019年9月28日、東京都

5. 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、Alaa Terkawi、岩崎倫政
M2 マクロファージの末梢神経損傷後の時空間的推移と軸索再生効果
第34回日本整形外科学会基礎学術集会、2019年10月17-18日、横浜市
6. 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、原 健人、松前 元、Alaa Terkawi、岩崎倫政
M2 マクロファージによる末梢神経軸索再生の制御
第31回日本末梢神経学会学術集会、Web開催
7. 松居祐樹、角家健、永野裕介、遠藤健、原 健人、松前 元、Alaa Terkawi、岩崎倫政
M2 マクロファージによる末梢神経軸索再生の制御
第35回日本整形外科学会基礎学術総会、2020年10月15-16日、Web開催

要旨

【緒言】

末梢神経は中枢神経と異なり再生能を有するが、末梢神経損傷の臨床成績は必ずしも満足いくものではない。特に近位部損傷や欠損が大きい場合、成績不良であることは良く知られている。しかし、人工神経の開発など一部の進展を除けば、末梢神経損傷に対する治療方法は、60年以上変わっておらず、末梢神経再生を促進する新規治療方法の開発が求められている。

組織再生に炎症反応が重要であることは良く知られているが、近年、マクロファージがM1マクロファージ(以下M1)とM2マクロファージ(以下M2)に分類可能で、中でもM2の組織再生能力に注目が集まっている。末梢神経の再生過程においても、M2の軸索再生効果を示唆する報告があるが、その詳細については未だ不明である。そこで、本研究はM2が末梢神経軸索再生を制御しているという仮説を元に、一連の研究を行った。

本研究の目的は以下の5つである。1) M2の末梢神経損傷後の再生軸索との時空間的關係を明らかにすること、2) M2の軸索再生効果の有無を明らかにすること、3) 末梢神経損傷後のM2制御による軸索再生効果への影響を明らかにすること、4) M2移植の機能再生効果を明らかにすること、5) M2の軸索再生効果の分子学的機序を明らかにすること。

【方法】

(1) 再生軸索とM2の時空間的關係

野生型LEWISラットの坐骨神経の近位部に圧挫損傷を加えて、受傷後1日、3日、1週、2週、4週の坐骨神経矢状断切片を作成し、SCG10, CD68, CD163, CD206に対する免疫染色を行った(n=3/群)。再生軸索、総マクロファージ、M2マクロファージの分布を定量した。

(2) M2の軸索再生効果

ラット腹腔内マクロファージをIFN- γ +LPS、IL-4存在下に培養して、M1、M2を作成し、ラット坐骨神経無細胞モデルに移植した。移植2週後の軸索再生量、総マクロファージ数、M2マクロファージ数を免疫染色で定量した(N=5/群)。

(3) M2制御実験

末梢神経損傷後のM2数を増加させるために、ラット坐骨神経圧挫モデルにM2を移植した。M2の2回移植、M2の1回移植、PBS注入の3群を検討し(N=6/群)、移植後2週の軸索再生、M2マクロファージ数を免疫染色で評価した。次に、M2数を減少させるために、M2特異的阻害薬であるMannosylated Clodronate Liposome (MCL)を注入した。コントロールには、Clodronate Liposome (CL)を使用した。MCL2回注入、CL注入の2群(N=5/群)を同様に評価した。

(4) M2移植の機能再生効果

ラット坐骨神経圧挫モデルを使用して、損傷日、損傷後3日、7日にM2を移植した。同様にPBSを注入した群をコントロールとした(N=10/群)。損傷後4週目と最終観察時の8週目に、歩行解析(DigiGait)と感覚機能検査(Von Frey test、Hargreaves test)を実施し、術前と比較した。また、最終観察時に電気生理学機能(CMAP、終末潜時)、髄鞘化軸索密度、筋湿重量(前脛骨筋、腓腹筋)を定量した。

(5) 他家 M2 移植の軸索再生効果

SD-GFP ラットから M2 を作成し、(2) と同様の LEWIS ラット坐骨神経無細胞モデルに移植し、PBS 注入群と比較した(N=3/群)。移植後 2 週時の軸索再生、M2 マクロファージ数、CD3 陽性細胞を免疫染色で評価した。

(6) M2 の軸索再生効果の分子学的機序

M1、M2 培養液 (conditioning medium(CM)) を、正常 DRG 神経細胞、損傷 DRG 神経細胞の培養液に添加して、24 時間後の平均最長神経突起伸長を評価した。M1、M2 と正常 DRG、損傷 DRG のトランスクリプトーム解析を行い、M2 でのみ発現上昇している液性因子、損傷 DRG でのみ発現上昇している受容体を探索した。その結果、uPA-uPAR シグナルが候補因子として同定された。

M2CM における uPA の有無を Western blotting で確認し、M2 での uPA の発現、DRG 神経細胞での uPAR の発現を免疫染色で評価した。

また、uPA の神経突起伸長効果、uPA 特異的阻害薬である BC11 の M2CM の神経突起伸長効果に対する阻害効果を、損傷 DRG 神経の培養で評価した。

【結果】

(1) 再生軸索と M2 の時空間的關係

圧挫損傷後、総マクロファージマーカーである CD68 陽性細胞は損傷後 3 日目から有意に出現し、1 週から 4 週にかけて、ワーラー変性部に偏りなく存在していたが、一方、M2 マーカーである CD163 陽性細胞、CD206 陽性細胞の出現は再生軸索のピークの場合と類似し、時間と共に、近位から遠位へと移動していた。この現象は、別の損傷モデル (切断) においても観察された。

(2) M2 の軸索再生効果

M2 の無細胞野への移植は、M2 数を増加させ、軸索再生量も有意に促進させた。一方、M1 移植はマクロファージ数も、軸索再生量も変化させなかった。

(3) M2 制御実験

ラット坐骨神経圧挫モデルにおいて、M2 移植によって、M2 数を増加させると軸索再生が有意に促進され、MCL 投与によって、M2 数を減少させると軸索再生が有意に減少した。

(4) M2 移植の機能再生効果

M2 移植群がコントロール群と比べて、坐骨神経遠位端の髄鞘化軸索数が有意に増加していた。また、腓腹筋の CMAP は有意に高くなり、末梢神経終末潜時は有意に短くなった。詳細な歩行機能解析では、粗大運動に対するパラメーターは両群で有意差はなかったが、M2 移植によって、paw drag の項目で、有意に損傷前近くまで回復していた。しかし、筋湿重量、感覚機能に関しては、2 群間で有意な差はなかった。

(5) 他家 M2 移植の軸索再生効果

他家 M2 移植では、自家移植のように M2 細胞数を増加させず、軸索再生効果も非常に限定的なものであった。また、CD3 陽性細胞の出現を認め、拒絶反応が起きていることを示唆していた。

(6) M2の軸索再生効果の分子学的機序

M2CMは正常DRG神経細胞の神経突起を伸長しなかったが、損傷DRG神経細胞の神経突起は有意に伸長させた。マクロファージとDRG神経細胞のトランスクリプトーム解析から、uPA-uPARが候補シグナルとして同定されたが、M1CMではなく、M2CMで有意にuPAが存在していた。また、再生軸索近傍のM2はuPAを発現していたが、再生軸索が存在しない場所のマクロファージはuPAを発現していなかった。さらに損傷DRGの神経突起はuPARを発現していたが、正常DRGはuPARを発現していなかった。次に損傷DRGをuPAで刺激したところ、有意に神経突起が伸長した。またM2CMのuPAを阻害したところ、M2CMの神経突起伸長効果が消失した。

【考察】

本研究により、M2は再生軸索に沿って存在し、直接的に末梢神経の軸索再生を制御していることが明らかになった。M2が再生軸索に沿って存在する機序には、3つの可能性がある。1つは、再生軸索が分泌する因子が、直接的にM2の分化誘導を促進する可能性、もう1つは修復型シュワン細胞が、再生軸索を感知して、M2の分化誘導を促進する可能性、最後は、ワーラー変性のデブリス除去の過程で、M2が集積するタイミングと軸索再生のタイミングがちょうど重なった可能性である。末梢神経の再生機構解明のためには、本現象の機序解明は重要と考える。

今回、M2の軸索再生における重要性が明らかになったが、M2を死滅させても軸索は再生すること、培養DRG神経もM2のCMがなくても、神経突起を伸長することなどより、M2は末梢神経の軸索再生機構を構成する1つの免疫細胞であって、軸索再生に必須の細胞ではない。その理由として、末梢神経細胞自体が内因性に旺盛な再生能があること、外因性に、シュワン細胞による細胞外基質、液性因子の強力なサポートがあるからだと考える。

今回、M2の軸索再生機序としてuPA-uPARシグナルが同定されたが、このシグナルはLRP1や $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介して、中枢神経軸索の発達、軸索再生に関与していることがわかっている。末梢神経でもこのシグナルの軸索再生への関与が報告されているが、uPAを分泌する細胞の詳細は不明で、ワーラー変性部での検討もなかった。今回、uPA-uPARのシグナルが、M2を介して、軸索再生に関与する新しい機序が明らかになった。

中枢神経でのM2の軸索再生効果に関する研究はいくつかあるが、その効果を担う液性因子は同定されていなかった。その理由として、*in vitro*実験で正常由来の神経細胞しか使用していないことが挙げられる。本研究では、より*in vivo*の状況を反映した損傷神経細胞を使用することで、uPA-uPARシグナルを同定することができた。これは、軸索再生の*in vitro*研究では、正常細胞だけではなく、損傷を受けた神経細胞を使用する事の重要性を示唆している。

本研究では、M2を増加させるために、M2移植を行ったが、その再生効果を得るためには自家細胞移植をする必要があった。臨床応用を考慮した場合、自家M2を必要時に一定量用意するのは容易ではないので、自家M2移植の代替として、M2の誘導因子である、IL-4、IL-10、コラーゲンVI、トロンボモジュリンなどの応用が実際的である可能性がある。また、uPA補充療法も有用な可能性がある。

【結論】

本研究により、末梢神経損傷後にM2が再生軸索の近傍でuPAを分泌することにより、uPARを発現する軸索再生を直接的に制御していることが明らかになり、末梢神経再生機構の一端が解明された。再生軸索近傍のM2数を増やすことで、軸索再生の

促進を介した、機能再生を実現できるが、今後、M2集積の制御機構や、uPAとuPARを介した軸索再生機構の詳細を明らかにすることが、さらに末梢神経の新規治療方法開発につながると考える。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ANOVA	Analysis of variance
BC11	Carbamimidothiotic acid 4-Boronophenyl methyl ester hydromromide
CD	Cluster of differentiation
CM	Conditioning medium
CMAP	Compound muscle action
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRG	Dorsal root ganglion
FBS	Fettal bovine serum
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
LRP1	Low density lipoprotein receptor related protein1
MCL	Mannocylated clodronate liposome
MGI	Mouse genome informatics
ML	Mannocylated liposome
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
pNF	pan Neuro Filament
PS	Penicillin streptomycin
RPMI	Roswell Park memorial institute media
SE	Standard error
TBS	Tris buffer saline
TL	Terminal latency
uPA	urokinase Plasminogen Activator
uPAR	urokinase Plasminogen Activator Receptor

緒言

末梢神経は中枢からの神経活動を末梢組織に伝え、末梢組織の情報を中枢に伝達することで支配領域の感覚、運動機能を司っている。外傷、占拠性病変、医原性疾患などで末梢神経が損傷されると、感覚低下、疼痛、運動麻痺などが生じる。末梢神経損傷の発生率は、先進国で10万人当たり、13人から23人であり、全外傷中の2.0%から2.8%を占めると報告されている(Eser et al., 2009; Li et al., 2014; Noble et al., 1998)。末梢神経は中枢神経と異なり、再生能力を有するため、末梢神経損傷の治療は、損傷部の断裂を認めない場合は経過観察、断裂を認める場合は顕微鏡下での縫合を行い、縫合不能の場合は、自家神経移植を行う。しかし、これらの治療内容は、近年の医学の発展にも関わらず、60年前と変わらないままである。また、近位部損傷や大欠損の再建例では、軸索再生の量や速度が不十分となり、機能回復は不良となる(Evans et al., 1994; Lundborg, 2000; Scheib and Hoke, 2013; Seddon, 1947, 1963)。以上より、末梢神経再生を促進する新規治療方法の開発が求められているが、末梢神経再生の詳細な機序はまだ不明な点が多い。

組織再生に炎症反応が重要であることはよく知られている。例えば、筋、肝臓、腎臓が損傷した際に集積するマクロファージや好中球などが、それらの組織再生に重要な役割を果たしていることが報告されている(Chazaud, 2014; Thomas et al., 2016; Tidball, 2017; Vannella and Wynn, 2017)。同様に、損傷した末梢神経の再生過程にも炎症反応が重要であることが、近年判明してきた(Benowitz and Popovich, 2011; Oishi and Manabe, 2018)。例えば、マクロファージは末梢神経損傷後のワーラー変性部に集積し、再生過程に必須の軸索やミエリン由来のデブリスを除去する重要な役割を担っている(Chen et al., 2015a; Perrin et al., 2005)。

近年の免疫学の進歩により、マクロファージには機能的亜群があり、炎症、抗感染に関わり、CD80、CD86、iNOSなどを発現するM1マクロファージと、抗炎症、血管新生に関わり、CD163、CD206、arginase-1などを発現するM2マクロファージに大別できることがわかってきた(Sica and Mantovani, 2012)。脊髄損傷後の軸索再生にM2マクロファージは促進効果を持ち、M1マクロファージは抑制効果を持つことが報告されているが、M2マクロファージが持つ軸索再生効果の詳細な分子機序は、未だ明らかになっていない(Ma et al., 2015; Miron et al., 2013; Zhang et al., 2020)。一方、末梢神経損傷では、M2マクロファージ誘導因子であるIL-4を添加したScaffoldで、欠損部を再建すると、M2マクロファージの増加と軸索再生の促進可能であった報告があるが(Mokarram et al., 2012)、M2マクロファージが末梢神経の軸索再生に果たす役割の詳細は未だ不明なままである。そこで、末梢神経損傷後の軸索再生におけるM2マクロファージの役割を明らかにすれば、末梢神経の修復・再生機構の一端を解

明することになり、末梢神経損傷の新規治療方法開発の一助となると考えた。そこで、M2 マクロファージは末梢神経損傷後の軸索再生を制御しているという仮説を立て、以下の5つ事項を実施した。

1. M2 マクロファージの末梢神経損傷後の再生軸索との時空間的關係を明らかにする
2. M2 マクロファージの軸索再生効果の有無を明らかにする
3. 末梢神経損傷後の M2 マクロファージ制御による軸索再生効果への影響を明らかにする
4. M2 マクロファージ移植の機能再生効果を明らかにする
5. M2 マクロファージの軸索再生効果の分子学的機序を明らかにする

その結果、本研究はM2 マクロファージが軸索再生効果を持ち、再生軸索の先端近傍に存在することで、末梢神経の再生を制御していることを明らかにした。また、その機序として、損傷軸索が uPAR の発現を上昇させ、そのリガンドである uPA を M2 マクロファージが分泌することで、軸索再生を刺激していることが示唆された。また、損傷神経内の M2 マクロファージ数を増加されることで、機能再生を促進できることも明らかになった。

これらの知見は、末梢神経軸索再生に関する新しい機序を解明するものであり、末梢神経損傷に対する新規治療法方法開発につながる。

方法

1. 再生軸索と M2 マクロファージの時空間的關係

1-1) ラット坐骨神経圧挫モデル

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。8-14 週齢の野生型 LEWIS ラット(Charles River Laboratories Japan, Inc. Japan)を使用し、坐骨神経の坐骨切痕やや遠位部に、マイクロ鉗子(Fine Science Tools, No13010-12)で 60 秒圧挫損傷を加えて坐骨神経圧挫モデルとした。なお、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 室で飼育された。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)とメドトミジン(0.5 mg/kg, ドミトール, Orion Corporation, Finland) の混合液を用い、腹腔内投与した。手術後、ラットは電子保温パッド(37°C) 上で保温し、antisedan (200 µg / kg; Zenoaq, Japan) を腹腔内投与して麻酔からの覚醒を行った。

ラットは術後、1 日、3 日、7 日、1 週、2 週、4 週時に坐骨神経を採取した (N=3/群)。全身麻酔下に PBS による瀉血の後、4% Paraformaldehyde (PFA) (ナカライテスク, Japan) にて灌流固定を行い、坐骨神経を採取。4°Cで 1 晩 4%PFA に浸漬させて翌日に 30%スクロース/phosphate buffer (PB)に移動し、薄切まで 1 晩以上保存した。その後、クライオスタットで薄切を行い 14µm 厚の矢状断切片を作成した。

1-2) 蛍光免疫染色

5% Normal horse serum (Thermo Fisher Scientific, USA)および 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)を含有した Tris buffer saline (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、軸索マーカーとして β III tubulin (rabbit antibody, Covance, USA; dilution 1:1000)、再生軸索マーカーとして SCG10 (rabbit antibody, Novus bio, USA; dilution 1:1000)、総マクロファージマーカーとして CD68 (mouse antibody, Bio-Rad, USA; dilution 1:500)、M2 マクロファージマーカーとして CD163 (mouse antibody, Santa Cruz, USA; dilution 1:200)、CD206 (mouse antibody, proteintech, USA; dilution 1:10000)、を用いた。二次抗体は、それぞれの一次抗体に対応する Alexa 488, 594 conjugated donkey secondary antibodies (Jackson immunoresearch, USA; dilution 1:1000)を用いた。切片はスライドガラス (Platinum Pro, Matsunami Glass Ind., Japan)に乗せて乾燥させた後、Mowiol (Sigma-Aldrich, USA)の上にカバーガラス(NEO cover glass, Matsunami Glass Ind., Japan)をして観察した。

1-3) 軸索再生、マクロファージ定量評価

染色結果の評価にはKeyence顕微鏡 (BZ-X800)を使用した。再生軸索の評価には β III tubulin、SCG10を用いた。同スライドから3つの神経を選択し、評価を行った。評価ポイントは損傷部から5、10、15、20、25 mmの5点の評価を行った。総マクロファージ数の評価として、CD68陽性細胞数を、M2マクロファージ数の評価としてCD163、もしくはCD206陽性細胞数を、再生軸索に関しては、軸索円錐部の数を、200 μ m幅で計測し、1 mm²あたりの数を計算した。

2. M2細胞の軸索再生効果

2-1) ラット坐骨神経無細胞モデル

8-14週齢の野生型LEWISラットを使用し、坐骨神経近位部と、同部位から25 mm遠位の部位にマイクロ鉗子で圧挫損傷を加え、挟まれた部位に液体窒素を用いた凍結融解処理で無細胞化を行い、坐骨神経無細胞モデルとした (Endo et al., 2019b)。

2-2)M1、 M2マクロファージ作成

GFP陽性同系LEWISラットを使用した。麻酔下に4% Thyoglicollate medium (BD Bioscience, USA)を10 mL腹腔内注射し (Day 1)、翌日にも同様に4% Thyoglicollate mediumを10mL腹腔内注射した (Day 2)。5日待機し、Day 7にペントバルビタール (200mg/kg)の投与で安楽死させ、腹腔内にPBSを注入し、腹腔内マクロファージを採取した。マクロファージは4°C、500gで5分遠心分離を行い、RPMI1640 (ナカライテスク, Japan)、10% Fetal Bovine Serum (FBS)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (PS) にて、T75 フラスコにて37°C、5%CO₂の環境下に3時間培養。その後非接着細胞を除去して、RPMI1640にIFN- γ (Peprotech, USA; 100ng/mL)とLPS (SIGMA, USA; 100ng/mL) にてM1マクロファージに分化、IL-4 (Peprotech, USA; 100ng/mL) にてM2マクロファージへと分化誘導した。また、翌日 (Day 8) に再度同培養液に交換し、Day 9に培養細胞を採取した。(動物実験計画承認番号 17-0071)

2-3)マクロファージ蛍光免疫染色による評価

採取した腹腔内マクロファージ、M1、M2マクロファージを、蛍光免疫染色で評価した。評価は上記1-2)の方法で、CD68、CD163、CD206、iNOS (M1マクロファージマーカー) (rabbit antibody, Abcam, USA; dilution 1:200)抗体を染色し、染色性を評価した。

2-4) マクロファージ移植

ラット坐骨神経無細胞モデルにM1、M2マクロファージをそれぞれ移植した。

損傷作成日に、NanoFil シリンジと 34G 針を用いて、50 万個/10 μ L の移植を行い、移植後 2 週後に坐骨神経を採取し、軸索再生量 (β III tubulin)、総マクロファージ数 (CD68)、M2 マクロファージ数 (CD163) を定量して評価した。

(1) M2 マクロファージ移植群、(2) M1 マクロファージ移植群、(3) PBS 移植群の 3 群を検討した(N=5/群)。

2-5) 軸索再生、マクロファージ数評価

軸索再生は pNF (mouse antibody, BioLegend, USA; dilution 1:1000) にて評価した。損傷部から 5、10、15、20、25 mm の部位で評価を行った。各部位を通過する軸索数を短軸長で除した値を計測した。損傷部近位部を基準とし、再生割合を計測した。

CD68 陽性細胞数、CD163 陽性細胞数は、上記 1-3)の方法で評価した。

3. M2 マクロファージ制御実験

3-1) M2 マクロファージ増加実験

末梢神経損傷後の M2 マクロファージ数を増加させるためラット坐骨神経圧挫モデルに、上記 2-2) で作成した M2 マクロファージを移植した。移植は、近位部から 7.5 mm、22.5 mm の部位に 1 回に計 50 万個/10 μ L を移植した。1) M2 マクロファージ 2 回移植群、2) M2 マクロファージ 1 回移植群、3) PBS 移植群の 3 群を検討し(N=6/群)、移植後 2 週の軸索再生を β III tubulin で、M2 マクロファージ数を CD163 で蛍光免疫染色にて評価した。

3-2) M2 マクロファージ減少実験

M2 マクロファージを減少させるために、M2 マクロファージ特異的阻害薬である Mannocylated Clodronate Liposome (MCL) (Encapsula Nanosciences, USA) を 10 μ L 注入した。コントロールには Mannocylated Liposome (ML) を 10 μ L 使用した。MCL 群、ML 群の 2 群 (N=5/群) を 3-1) と同様に評価した (Miron et al., 2013)。

4. M2 マクロファージ移植の機能再生効果

ラット坐骨神経圧挫モデルを使用。損傷日、損傷後 3 日目、7 日目に M2 マクロファージを 50 万個/10 μ L ずつ移植した。移植部位は、それぞれ、再生軸索の存在部、そのやや遠位に位置する損傷部から 5mm、15mm、25mm の部位に移植した。

同様に PBS を 3 回移植した群をコントロール群とした (N=10/群)。損傷後 4 週目と最終観察時の 8 週目に、歩行解析と感覚機能検査を実施し、術前と比較した。また、最終経過観察時に電気生理学機能、髄鞘化軸索密度、筋湿重量を定量した。

4-1) 歩行解析

損傷前、損傷後4週、損傷後8週時にDigiGait歩行解析システム (Mouse Specifics, Inc., Quincy, USA)を使用したトレッドミル歩行解析を行った。実際の歩行試験前に、数日間のhabituationを行った。まず5分間、ラットをトレッドミル上に静置した後、10 cm/sより歩行を開始し、歩行速度が20 cm/sに到達するか、または歩行不能となるまで、徐々に歩行速度を上げ、DigiGait Imaging and Analysis software 12.2 (Mouse Specifics, Inc., Quincy, USA)を用いて動画を撮影、解析した。各データを損傷前と比較して評価した。

4-2) 感覚機能検査

損傷前、損傷後4週、損傷後8週時に、感覚機能を圧刺激であるElectric Von Frey testと、熱刺激であるHargreaves testで評価した (Anderson et al., 2005; Deuis et al., 2017; Hargreaves et al., 1988; Hirose et al., 2010; Nirogi et al., 2012)。Dynamic プランターエステシオメーター (Ugo Basile, Italy) を用いて、Von Frey testを行った。フィラメントを右後肢の足底部に0 gから50 gまでの圧力で20秒かけて2.5 g/sのスピードで圧を大きくし、足が離れるまでの時間を計測した。3回計測を行い、その平均を求めた。熱刺激検査は、Hargreaves 装置 (Ugo Basile, Italy) を使用した。右後肢の足底に35°Cから70°Cまで10秒かけて温度をあげて熱刺激を与えて、足が離れるまでの時間を計測した。同様に3回計測を行い、その平均を求めた。各数値を損傷前と比較して評価した。

4-3) 電気生理学的検査

損傷後8週目の最終経過観察時に評価を行った。評価は全身麻酔下に行い、損傷部近位に電気刺激を与え、腓腹筋に計測電極を挿入して、Compound muscle action potential (CMAP)、terminal latency (TL)を計測した (neuropack MEB-9102, 日本光電, Japan) (Sayanagi et al., 2020)。

4-4) 髄鞘化軸索密度評価

損傷後8週目にPFAで灌流固定を行い、坐骨神経を採取した。坐骨神経最遠位部にエポキシレジン包埋を行い、トルイジンブルー染色を行った。評価は断面像で評価し、長軸を、脛骨神経と腓骨神経が両方最大に入る位置とし、短軸は20 μm として1 mm^2 当たりの髄鞘化軸索数を計測し、各群を比較した。

4-5) 筋湿重量評価

損傷後 8 週時に PFA で灌流固定後に前脛骨筋、腓腹筋を採取し、それぞれの重量を計測した。

5. 他家 M2 マクロファージ移植の軸索再生効果

GFP 陽性の SD ラットの腹腔内マクロファージを上記 2-2)の方法で採取して M2 マクロファージへ分化誘導した。その M2 マクロファージを 2-1)と同様に LEWIS ラット坐骨神経無細胞モデルに 50 万個/10 μ L ずつ移植し、移植後 2 週目に採取して評価した。評価は pNF による軸索再生、CD68 による総マクロファージ数、CD163 による M2 マクロファージ数、そして CD3 (rabbit antibody, Abcam, USA; dilution 1:100)の有無を評価した。

6. M2 マクロファージの軸索再生効果の分子学的機序

6-1) マクロファージ conditioning medium(CM)作成

上記 2-2)の方法で T75 フラスコに M1, M2 マクロファージを最大濃度で分化誘導し、培養液を除去後に DRG medium (DMEM HAM's F12 +2% B27 (Thermo Fisher Scientific, USA) + 1% PS) に置換した。その後 12 時間後に培養液を採取し遠心分離 (500g、5 分、4°C) をかけてその上澄み液を M1、M2 CM とした。

6-2) 正常 DRG、損傷 DRG 培養実験

野生型 LEWIS ラットを使用。正常 DRG に加えて、損傷 DRG は、採取 1 週前に両側の坐骨神経を切断した DRG を採取した。

DRG は過去の報告に準じて採取を行った (Kadoya et al., 2009)。両側の腰椎レベル DRG を採取し、1 から 2 mm のサイズにマイクロ剪刀を用いて断片化した。

DMEM/Han's F-12 に 1% コラゲナーゼ XI (Sigma-Aldrich, USA) を添加し、37°C で 1 時間反応させた。その後 1 mL の DRG medium に置換した。DRG 切片は 1mL ピペットで 30 回粉碎させた。その後 48 well plate に 10,000 個/well 移動した。48 well plate は PLL を 3 時間、37°C でコーティングし、その後 TBS で 3 回洗浄し、ラミニンを 37°C で一晩コーティングしたものをを用いた。DRG medium で 3 時間時間培養後に 1) M2 CM、2) M1 CM、3) DRG medium へと培養液を半分交換し、21 時間培養を追加、その後に PFA 固定を行った。

6-3) トランスクリプトーム解析

過去のデータベース (Gerrick et al., 2018; Motti et al., 2017) の中から、M1 マクロファージと M2 マクロファージを比較し、M2 マクロファージで発現が上昇している遺伝

子を同定(Gerrick et al., 2018)。Gene ontology を用いて、その中から液性因子を同定した。また、正常 DRG と損傷 DRG を比較し、損傷 DRG で発現が上昇している遺伝子を同定。その中で受容体となるものを選択し M2 マクロファージ由来液性因子と損傷 DRG 由来受容体で、リガンド・受容体関係にあるものを検索。その結果リガンドとして urokinase plasminogen activator (uPA) と、受容体として urokinase plasminogen activation receptor (uPAR) を同定した。

6-4) Westen Blotting Analysis

M1CM、M2CM に対して Westen blotting 法を行って、uPA タンパクの発現を評価した。サンプルは RIPA lysis buffer (ATTO corporation, Japan) に溶かし、氷の上で保存した。SDS-PAGE ゲルを用いて、電気泳動を行った。その後 membrane へと転写を行い、5% スキムミルクで 1 時間室温にてブロッキングを行い、一次抗体を一晩反応させた。一次抗体は、anti-uPA (rabbit antibody, Cloud Clone Corp, China; dilution 1:125)、anti-IL-10 (mouse antibody, R&D systems, USA; dilution 1:2000)、anti-IL-6 (goat antibody, Novus bio, USA; 1:200) を用いた。翌日に PBST で 5 分洗浄し、Horseshardish peroxidase (HRP)-IgG 二次抗体 (rabbit, mouse, goat antibody, Novus Biologicals, USA; dilution 1:1000) にて 1 時間室温で反応させた。バンドは Quantity One v 4. 6. 9 (Bio-rad) ソフトウェアを用いて、発現を評価した。

6-5) uPA の損傷神経内 M2 マクロファージでの発現評価

3-1) の坐骨神経圧挫損傷モデルを使用し、蛍光免疫染色にて評価を行った。一次抗体として、anti- uPA (rabbit antibody, abcam, USA; dilution 1:150)、anti-CD163、anti-CD68 を使用した。神経再生部の uPA、CD163、DAPI を、また再生神経がない部位、正常神経の uPA、CD68、DAPI を評価した。

6-6) uPAR の DRG 神経突起での評価

6-2) の正常 DRG、損傷 DRG を蛍光免疫染色で評価した。一次抗体として uPAR (rabbit antibody, abcam, USA; dilution 1:500)、 β III tubulin (mouse antibody, BioLegend, USA; dilution 1:1000) を使用した。正常 DRG と損傷 DRG を比較した。

6-7) uPA の神経突起伸長効果

損傷 DRG を、6-2) の方法で培養後 3 時間後に培養液を半分、下記培養液に交換し、21 時間後に PFA 固定した。1) DRG medium+uPA (0.75 μ g/mL) 、2) DRG medium + uPA + BC11 hydrobromide (BC11, biotech, USA)、3) DRG medium のみ、の 3 群に分けて評価を行った。

6-8) マクロファージ conditioning medium の uPA 阻害効果

損傷 DRG を、6-2) の方法で 3 時間培養後に、培養液を半分、下記培養液に交換し、21 時間後に PFA 固定した。1-1) M2CM、1-2) M2CM+BC11、2-1) M1CM、2-2) M1CM+BC11、3-1) DRG medium、3-2) DRG medium+BC11 の 2 群×3 組に分けて評価を行った。

6-9) DRG 神経突起伸長の計測

PFA 固定した DRG を、蛍光免疫染色にて β III tubulin にて染色した。過去の報告と同様に(Endo et al., 2019a; Kadoya et al., 2009; Meijering et al., 2004)、Image J と、そのプラグインソフトウェアである Neuron J を用いてトレースし、各 DRG の最大神経突起伸長を計測した。それを総 DRG 数で除して平均最大神経突起伸長を評価して、各群で比較を行った。1 群当たり 3 well 評価を行い、その平均値を比較した。

7. 統計学的解析

実験データは、平均値 \pm 標準誤差 (Mean \pm SE) 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 群間の有意差検定には One-way ANOVA 解析を行い、Post-hoc test として Tukey-Kramer test または Dunnett's test を用いた。p 値は 0.05 未満を有意とした。すべての統計解析は統計解析ソフト JMP Pro 13 (SAS Institute, USA)を用いて行った。

結果

1. 末梢神経軸索損傷後の M2 マクロファージの時空間的分布

はじめに、末梢神経軸索損傷後の再生軸索と M2 マクロファージの時空間的分布の詳細を検討した。成熟ラット坐骨神経に圧挫損傷を加えて、経時的に蛍光免疫染色を使用してマクロファージの分布と再生軸索との位置関係を検討した。

再生軸索を抗 $\beta 3$ tubulin 抗体を用いると、損傷後 1 日目、3 日目では、断片化した軸索と再生軸索がともに染色されてしまうため、鑑別が困難であった。しかし、抗 SCG10 抗体を用いると、断片化した軸索が染色されないため (Shin et al., 2014)、再生軸索の同定が可能であった。約半分以上の軸索は、3 日、1 週、2 週で 5 mm、15 mm、25 mm まで再生していた (図 1)。

総マクロファージのマーカーである 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、ワーラー変性部に、偏りなく存在していた。一方、M2 マクロファージのマーカーである CD163 陽性細胞は、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)。同様に、別の M2 マーカーである CD206 も検討したが、CD163 と同様の場所に出現していた(図 3)。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(図 4)。

これらの結果は、末梢神経損傷後の再生軸索と M2 マクロファージの出現部位が相関しており、M2 マクロファージが軸索再生機序に関与している可能性を示唆している。

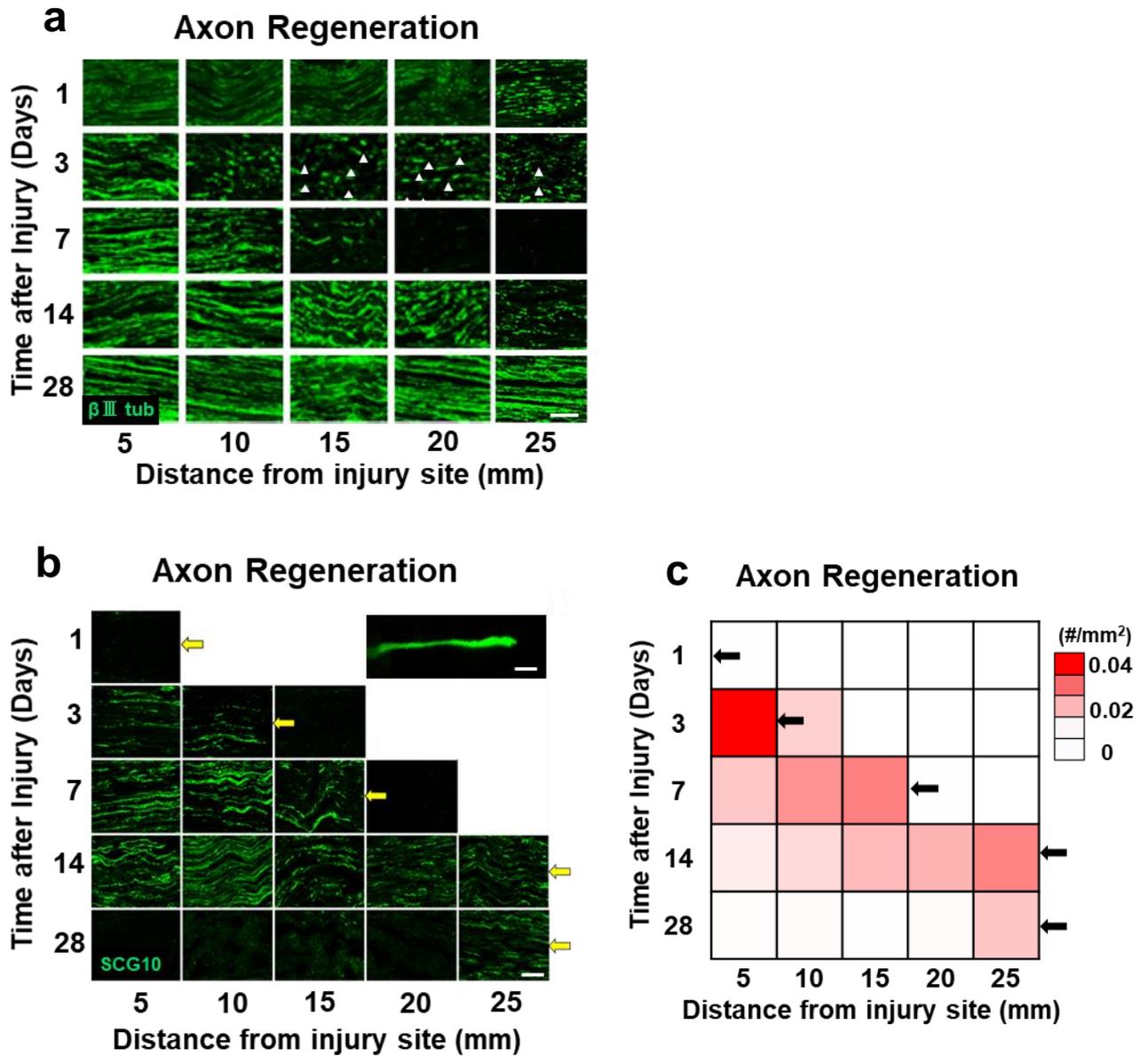


図 1. 軸索再生評価

- $\beta 3$ tubulin 染色による軸索の評価。矢頭：断片化された軸索
- SCG10 染色による再生軸索の評価。拡大図：再生軸索部。スケールバー：50 μm , 拡大像：5 μm 。
- SCG10 染色による再生軸索の時空間的関係のヒートマップ。
縦軸：損傷後の経過時間、横軸：損傷部からの位置。

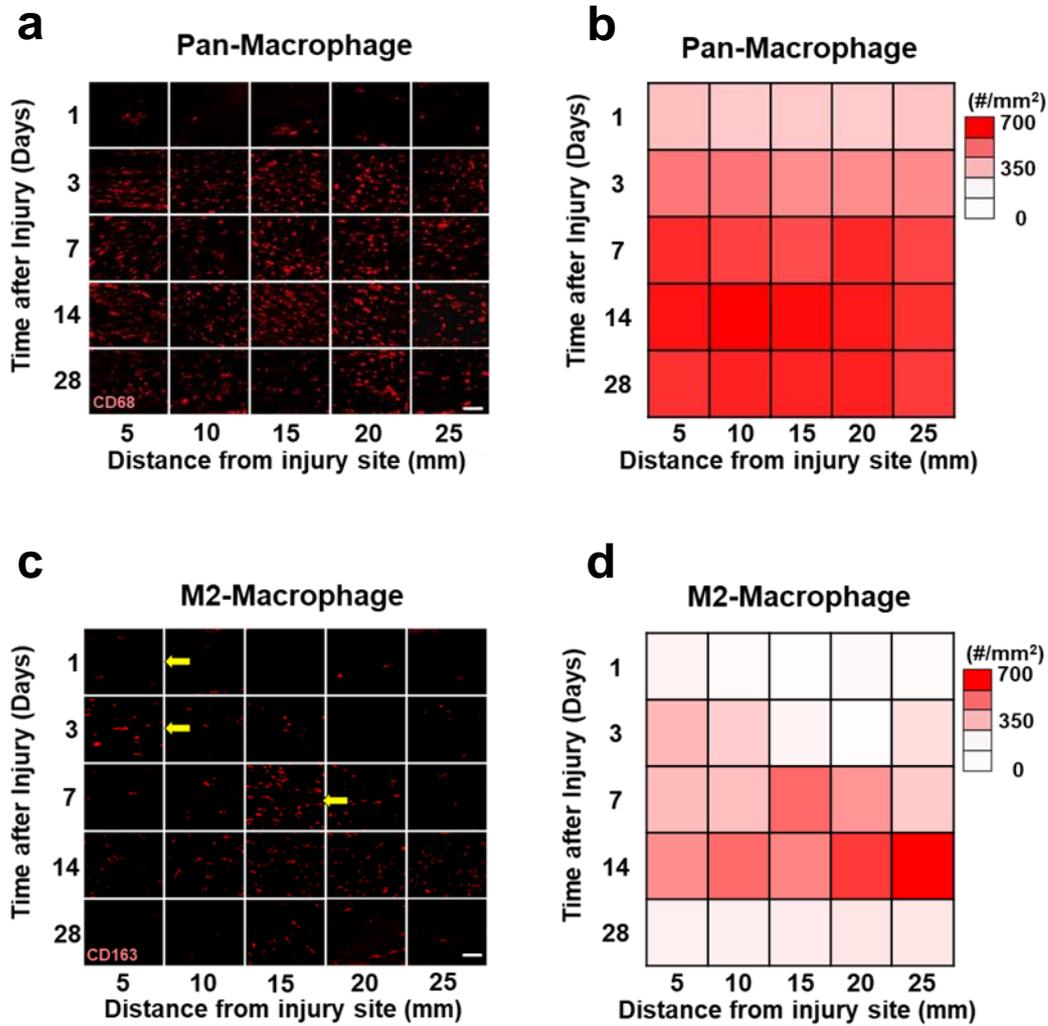


図 2. マクロファージの時空間的推移

- a. CD68 陽性細胞 (総マクロファージマーカー) の時空間的推移
- b. CD68 陽性細胞の時空間的推移のヒートマップ
- c. CD163 陽性細胞(M2 マクロファージマーカー)の時空間的推移。
- d. CD163 陽性細胞の時空間的推移のヒートマップ

スケールバー:50 μ m

縦軸：損傷後の経過時間、横軸：損傷部からの位置。

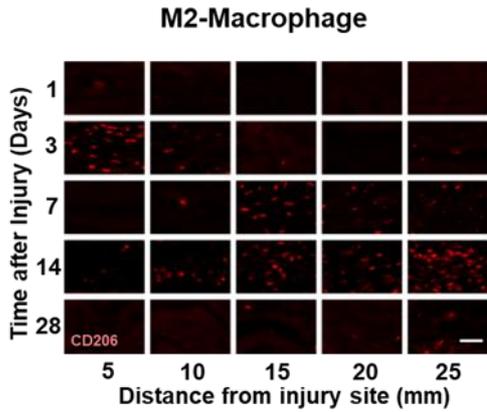


図 3. M2 マクロファージの時空間的推移

CD206 陽性細胞 (M2 マクロファージマーカー)の時空間的推移。縦軸：損傷後の経過時間、横軸：損傷部からの位置。

スケールバー:50 μ m

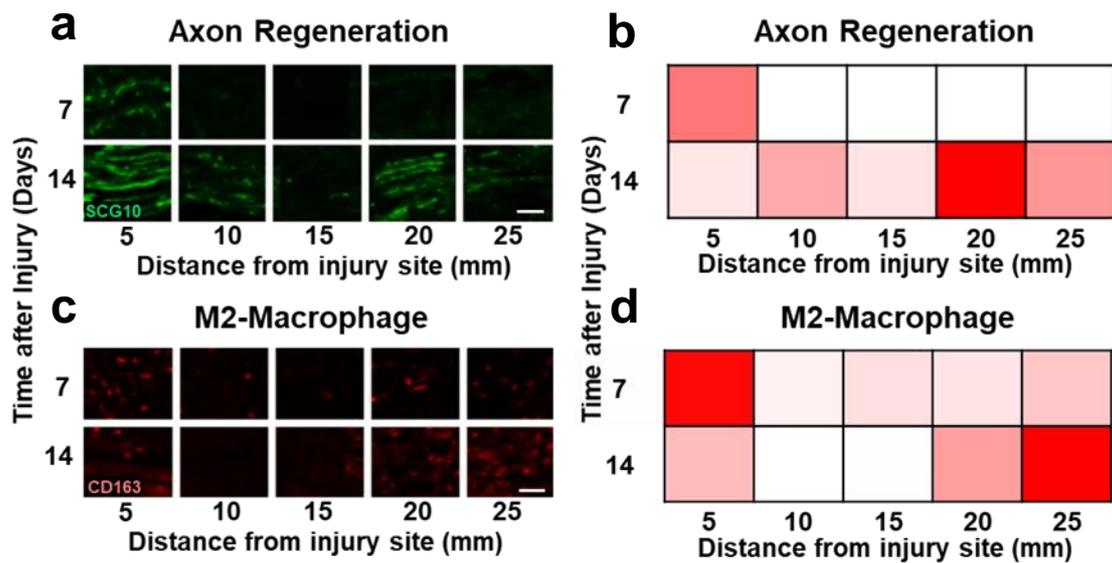


図 4. 坐骨神経切断モデルの軸索再生、マクロファージの時空間的推移

- β 3 tubulin 染色による軸索の評価。
- β 3 tubulin 染色による軸索の評価。ヒートマップ。
- CD163 陽性細胞の時空間的推移。
- CD163 陽性細胞の時空間的推移。ヒートマップ。

スケールバー:50 μ m

縦軸：損傷後の経過時間、横軸：損傷部からの位置。

2. M2 マクロファージの軸索再生効果

次に M2 マクロファージが軸索再生効果を有するか検討した。GFP 陽性の同系ラットの腹腔内マクロファージ(Lidia Jiménez-García, 2015)を IL-4 で刺激して、CD163、CD206 陽性マクロファージを作成し(Sica and Mantovani, 2012)(図 5)、ラット坐骨神経無細胞モデルに移植した(Endo et al., 2019b)。コントロールとして、IFN- γ と LPS で刺激した M1 マクロファージを使用した。

その結果、M2 マクロファージ移植は、移植後 2 週間の間生存せず(図 6)、総マクロファージ数も増加させなかったが、M2 マクロファージ数は有意に増加させ、軸索再生を促進させていた(図 7,8)。一方、M1 マクロファージ移植は、総マクロファージ数、M2 マクロファージ数も増加させず、軸索再生も促進させなかった(図 7,8)。これらの結果は、M1 ではなく M2 マクロファージが軸索再生効果を持っていることを示している。

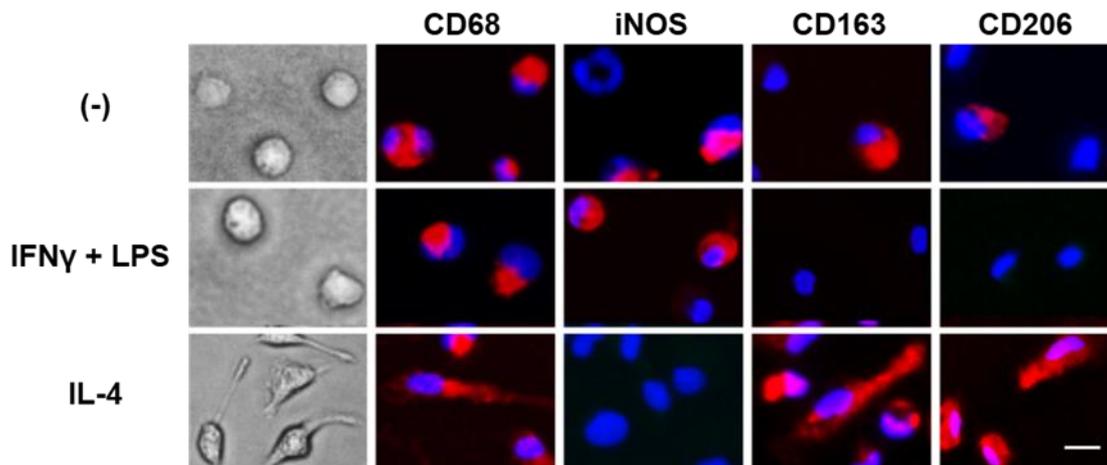


図 5. IL-4 誘導マクロファージの特徴

IFN γ +LPS, IL-4 分化誘導した M1, M2 マクロファージと M0 マクロファージの免疫蛍光染色。左から：フェーズコントラスト、anti-CD68 抗体、anti-iNOS 抗体、anti-CD163 抗体、anti-CD206 抗体による蛍光免疫染色。

スケールバー：10 μ m

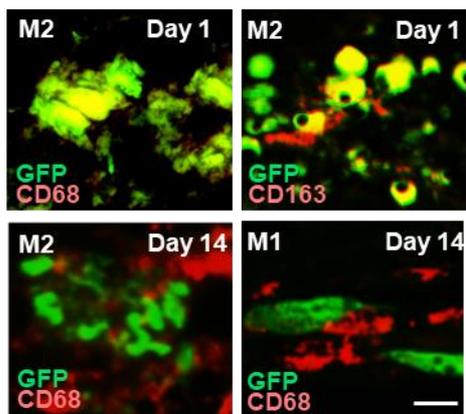


図 6. 移植後の M1, M2 マクロファージの蛍光免疫染色

左上：M2 マクロファージ移植翌日の GFP 陽性細胞、CD68 陽性細胞の評価。

右上：M2 マクロファージ移植翌日の GFP 陽性細胞、CD163 陽性細胞の評価。

左下：M2 マクロファージ移植 14 日後の GFP 陽性細胞、CD68 陽性細胞の評価。

右下：M1 マクロファージ移植 14 日後の GFP 陽性細胞、CD68 陽性細胞の評価。

スケールバー 10 μ m。

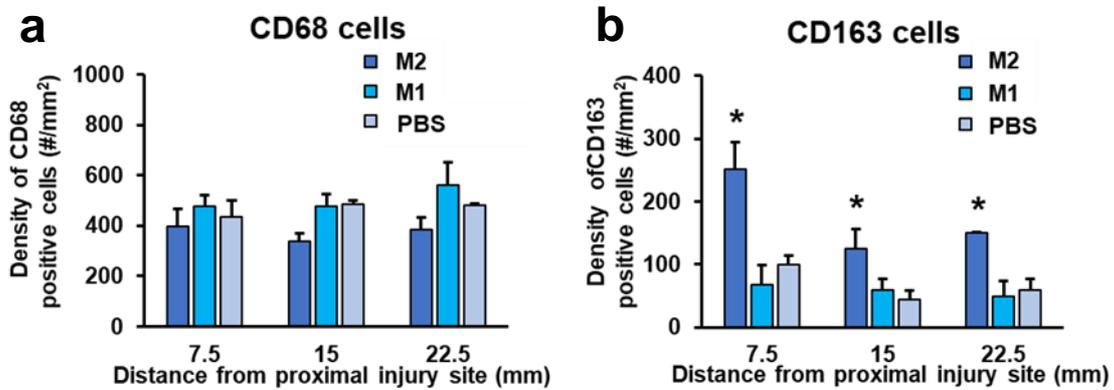


図 7. ラット坐骨神経無細胞モデルへのマクロファージ移植後 2 週時のマクロファージ密度

- a. CD68 陽性細胞数。縦軸：CD68 陽性細胞密度(#/mm²)、横軸：損傷部からの距離 (mm)。
- b. CD163 陽性細胞数。縦軸：CD68 陽性細胞密度(#/mm²)、横軸：損傷部からの距離 (mm)。

Data are presented as mean±SE. * p<0.05 to M1, PBS ONE-WAY ANOVA and Tukey-Kramer test.

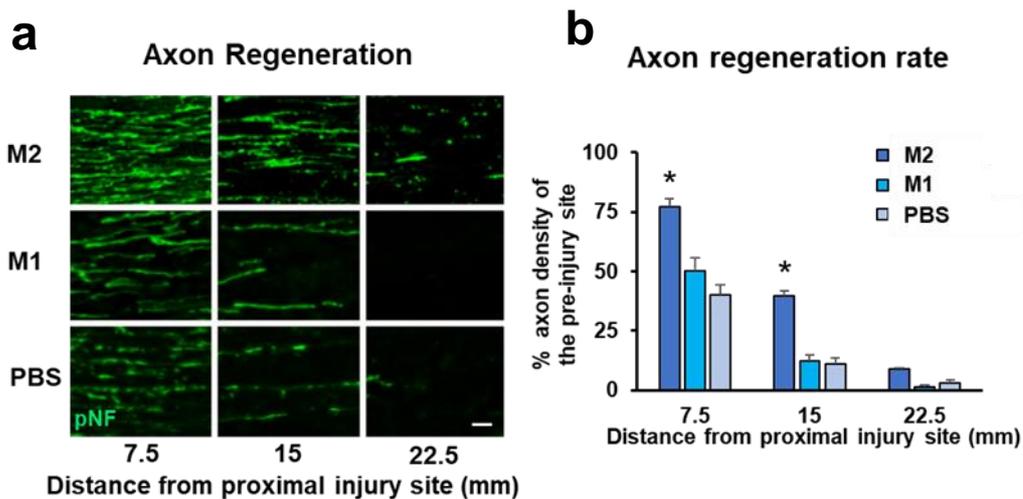


図 8. マクロファージ移植後 2 週時の軸索再生効果

- a. pNF 抗体の蛍光免疫染色による軸索再生の評価。上から M2 マクロファージ、M1 マクロファージ、PBS 移植。横軸：損傷部からの距離 (mm)。
- b. 軸索再生率。縦軸：損傷部近位部を基準とした軸索再生率。横軸：損傷部からの距離

離 (mm)。Data are presented as mean±SE.* $p < 0.05$ to M1, PBS ONE-WAY ANOVA and Tukey-Kramer test. スケールバー 50 μ m。

3. M2 マクロファージ制御実験

次に M2 マクロファージが末梢神経損傷後の軸索再生を制御しているか検討した。具体的には、末梢神経損傷後の M2 マクロファージを増減させることが軸索再生に及ぼす影響を検討した。

ラット坐骨神経圧挫損傷モデルのワーラー変性部に、50 万個の M2 マクロファージを 2 回移植した。その結果、M2 マクロファージは増加し、再生軸索数も有意に増加した(図 9)。

次に、M2 マクロファージを減少させるために、M2 マクロファージ特異的死滅薬である、mannosilated chondronate liposome (MCL) を 2 回に分けて、ワーラー変性部に注射し、同様に mannosilated liposome (ML) を投与した群をコントロールとした。その結果、MCL 投与によって、M2 マクロファージは有意に減少し、軸索再生も有意に減少していた(図 10)。

以上のことから、M2 マクロファージ数を増減させると、軸索再生の程度も増減することが明らかになり、末梢神経軸索再生は少なくとも部分的には、M2 マクロファージに依存していることが判明した。

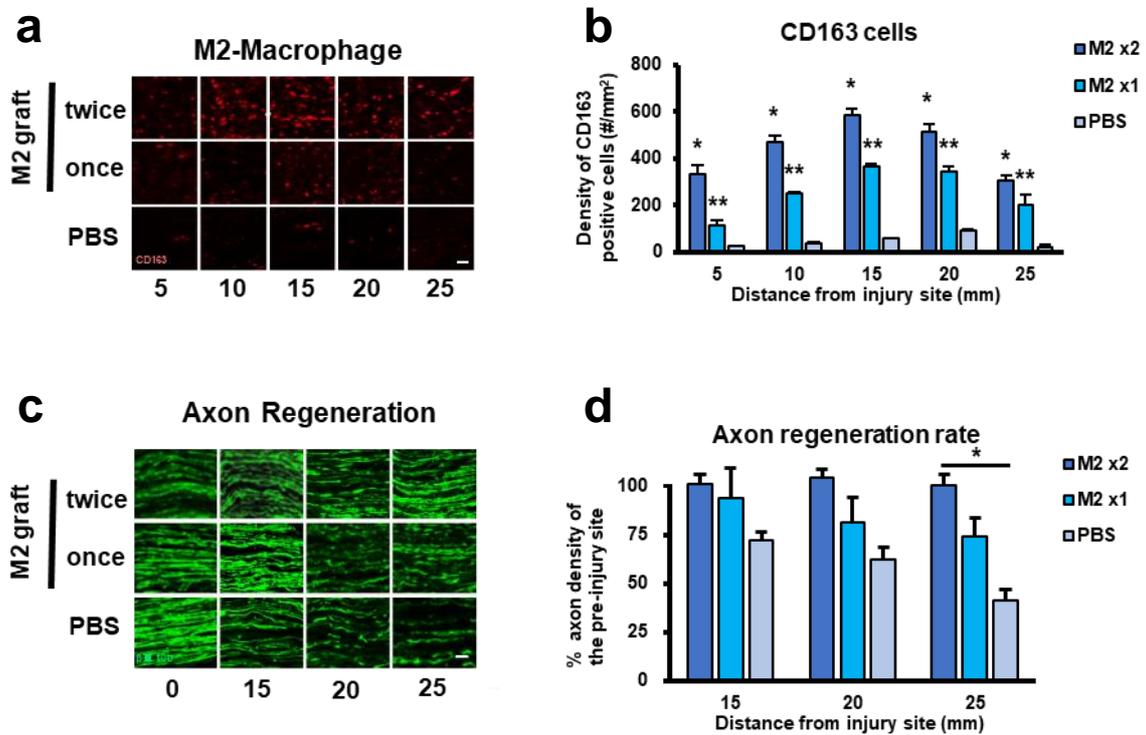


図9. M2 マクロファージ増加実験

- 蛍光免疫染色による CD163 陽性細胞評価。縦軸：M2 マクロファージ移植回数、横軸：損傷部からの距離 (mm)。
- CD163 陽性細胞数。縦軸：CD163 陽性細胞密度 (#/mm²)、横軸：損傷部からの距離 (mm)。
- 蛍光免疫染色による β III tubulin 陽性細胞評価。縦軸：M2 マクロファージ移植回数、横軸：損傷部からの距離 (mm)。
- 軸索再生率
縦軸：損傷部近位部を基準とした軸索再生率。横軸：損傷部からの距離 (mm)。

Data are presented as mean \pm SE.

*、** p<0.05 to PBS ONE-WAY ANOVA and Tukey-Kramer test. スケールバー 50 μ m。

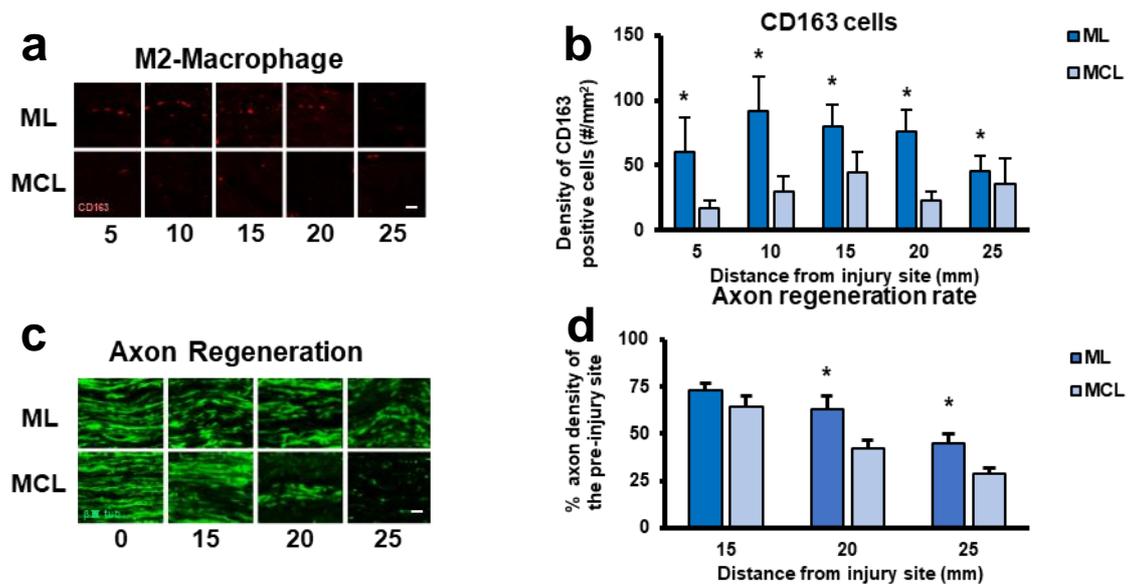


図 10. M2 マクロファージ減少実験

- a. 蛍光免疫染色による CD163 陽性細胞評価。縦軸：移植液、横軸：損傷部からの距離 (mm)。
- b. CD163 陽性細胞数。縦軸：CD163 陽性細胞密度($\#/mm^2$)、横軸：損傷部からの距離 (mm)。
- c. 蛍光免疫染色による β III tubulin 陽性細胞評価。縦軸：移植液、横軸：損傷部からの距離 (mm)。
- 軸索再生率。縦軸：損傷部近位部を基準とした軸索再生率。横軸：損傷部からの距離 (mm)。

Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ to ML Student's t 検定 (two-tailed) スケールバー 50 μ m

4. M2 マクロファージの機能再生効果

次にM2 マクロファージ数増加による機能再生促進効果を検討した。ラット坐骨神経に圧挫損傷を作成し、3回に分けて50万個のM2 マクロファージを移植した。コントロール群にはPBSを注入した。損傷後4週、8週時に歩行機能と感覚機能に関する検査を行い、最後に灌流固定を行った。

その結果、M2 マクロファージ移植群がコントロール群と比べて、坐骨神経遠位端の髄鞘化軸索数を有意に増加させていた(図11)。また、M2 マクロファージ移植によって、損傷部より近位で電気刺激した際の腓腹筋のCMAPが有意に高くなり、終末潜時は有意に短縮した(図12)。詳細な歩行機能解析では、粗大運動のパラメーター群において、両群間に違いを認めなかったが、耐久力の指標であるpaw dragでは、M2 マクロファージ移植群が有意に回復していた(図13)。筋湿重量、感覚機能に関しては、両群間で有意な違いを認めなかった(図14,15)。これらの結果は、M2 マクロファージ移植が機能再生を促進することを示している。

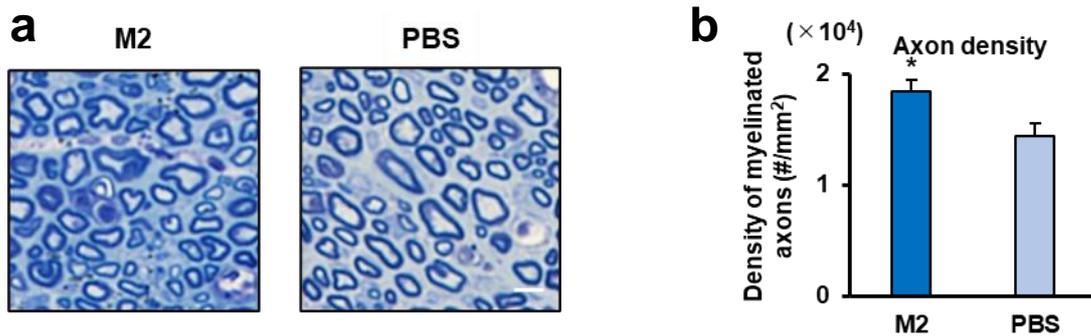


図 11. 髄鞘化軸索密度

a. M2 移植群と PBS 移植群の髄鞘化軸索。

b. 髄鞘化軸索密度。縦軸：髄鞘化軸索密度 (#/mm²)

Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ to PBS Student's t 検定 (two-tailed) スケールバー10 μ m。

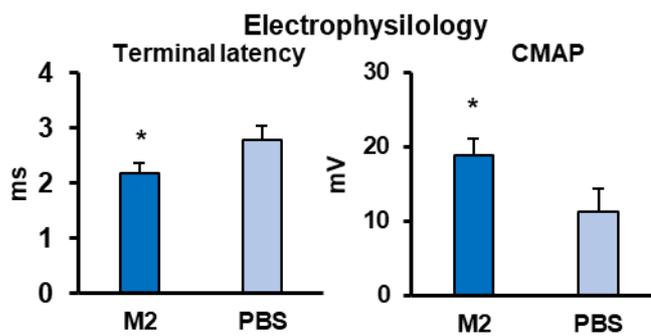


図 12. 電気生理学的試験

左：Terminal latency (ms)

右：CMAP (mV)。

Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ to PBS Student's t 検定 (two-tailed)

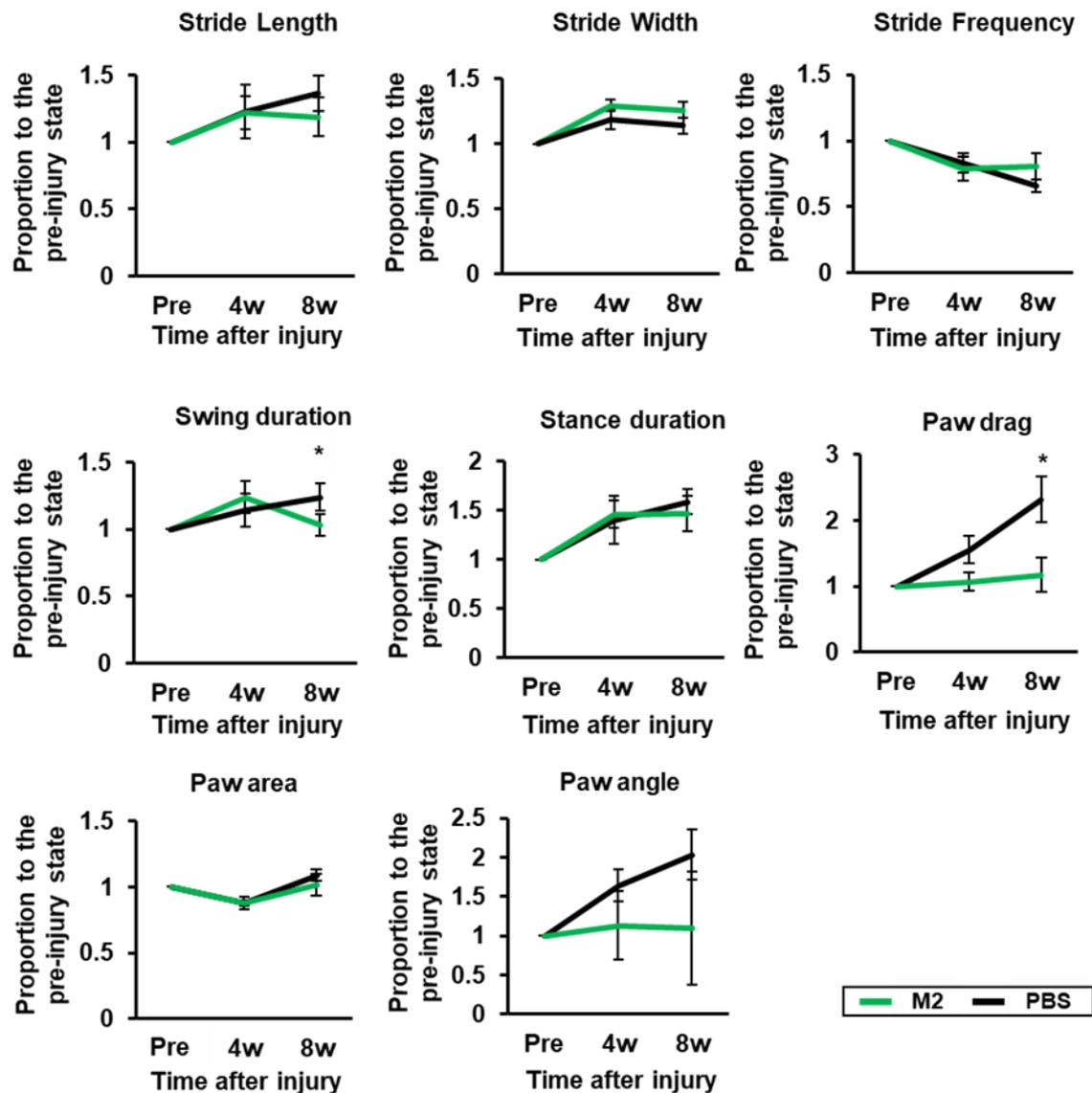


図 13. DigiGait による歩行解析

M2 マクロファージ 3 回移植群と control 群を術前、術後 4 週、術後 8 週時の術前と比較。縦軸：損傷前を基準とした比率。横軸：損傷からの経過時間。Data are presented as mean±SE. *p<0.05 to PBS Student's t 検定 (two-tailed)

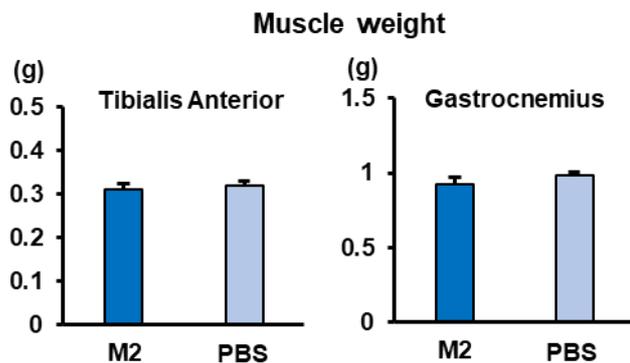


図 14. 筋湿重量評価

前脛骨筋、腓腹筋の筋湿重量。縦軸：筋湿重量 (g)。Data are presented as mean±SE.

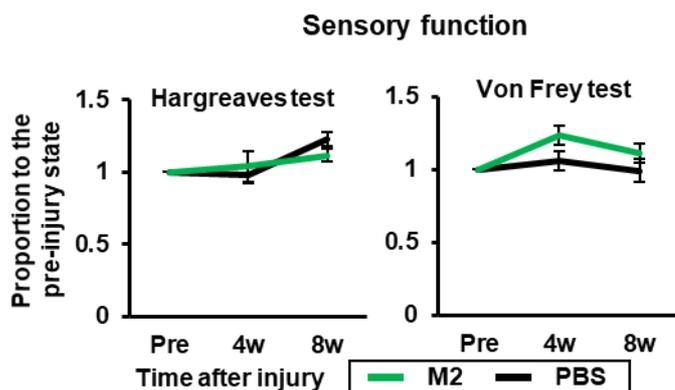


図 15. 感覚機能検査

Hargreaves test、Von Frey test の術後 4 週時、8 週時の術前との比較。

縦軸：術前との比。横軸：損傷からの経過時間。

Data are presented as mean±SE.

5. 他家 M2 マクロファージ移植の軸索再生効果

M2 マクロファージ移植の機能再生効果が明らかになったが、他家移植でも同様の効果があれば、より臨床的実用性が高まる。そこで、他家 M2 マクロファージ移植の軸索再生効果の有無を、前述と同様の無細胞モデルを使用して検討した。

その結果、他家 M2 マクロファージ移植は、CD163 陽性細胞数も CD68 細胞数も増加させず、軸索再生効果も損傷部より 7.5mm 地点で認めるのみであった(図 16)。また、CD3 陽性細胞数を、他家 M2 マクロファージ移植群に認め、拒絶反応が起きていることを示唆していた(図 17)。これらの結果は、他家 M2 マクロファージの移植は、拒絶反応により、自家 M2 マクロファージ移植よりも、軸索再生効果に劣ることを示している。

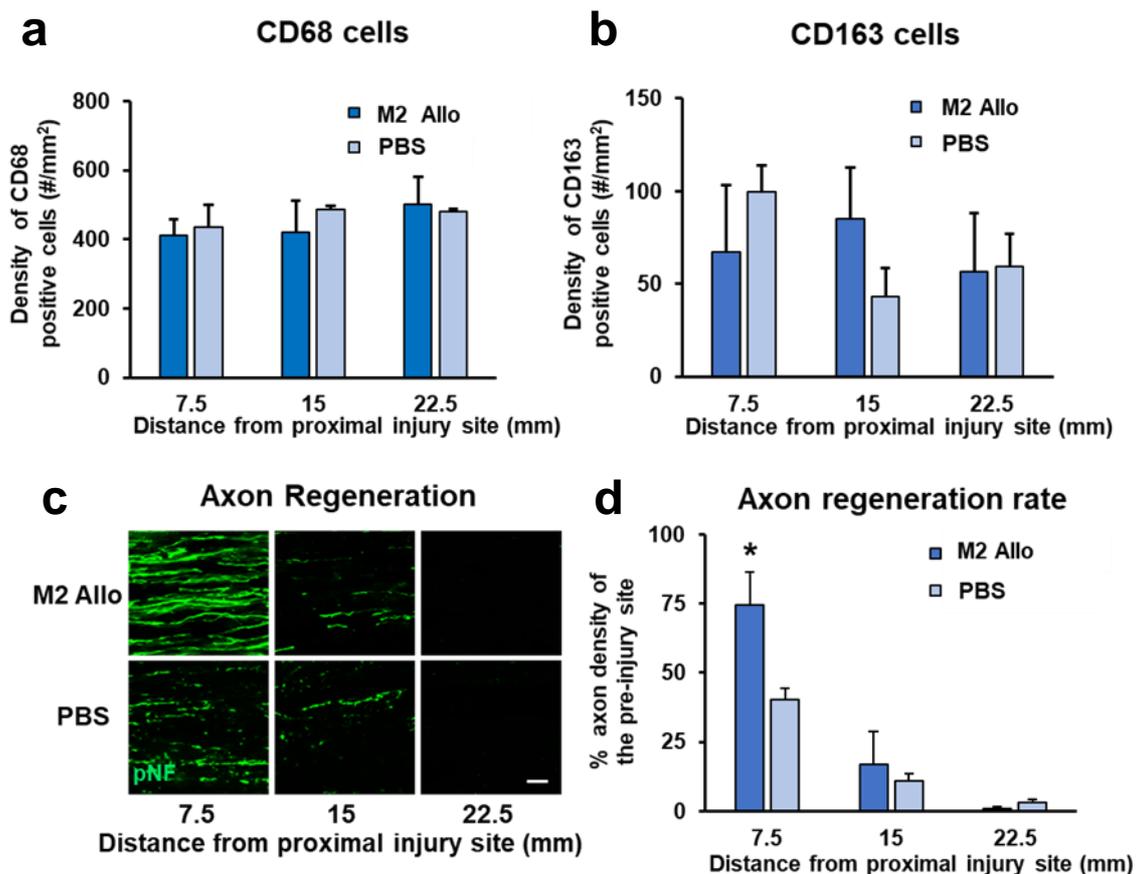


図 16. ラット坐骨神経圧座損傷モデルに対する他家 M2 マクロファージ移植術後 2 週後のマクロファージ、軸索再生評価

- a. CD68 陽性細胞密度。縦軸：CD68 陽性細胞密度 (#/mm²)。横軸；損傷部からの距離 (mm)。
- b. CD163 陽性細胞密度。縦軸：CD163 陽性細胞密度 (#/mm²)。横軸；損傷部からの距離 (mm)。
- c. Anti-pNF 抗体の蛍光免疫染色による軸索再生評価。横軸：損傷部からの距離(mm)。軸索再生率。縦軸：損傷部近位部を基準とした軸索再生率。横軸：損傷部からの距離 (mm)。

Data are presented as mean±SE. * p<0.05 to PBS Student's t 検定 (two-tailed) スケールバー 50μm

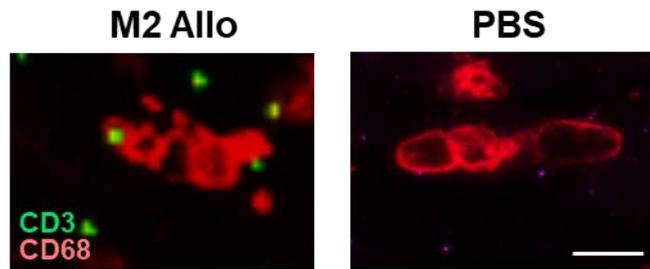


図 17. CD3 陽性細胞評価

蛍光免疫染色による CD3 陽性細胞、CD68 陽性細胞の評価。

スケールバー10 μ m

6. M2 マクロファージ由来 uPA は、損傷軸索で多く発現される uPAR を刺激することで軸索再生を促進する

M2 マクロファージの軸索再生効果の分子的機序を明らかにするために、マクロファージ培養液 (conditioning medium : CM) の、成熟 DRG 神経細胞への神経突起伸長効果を検討した。その結果、M1 および M2 マクロファージ由来 CM は、ともに有意な神経突起伸長効果を示さなかった。そこで、より *in vivo* 環境を模擬するために、軸索損傷を事前に加えた DRG 神経細胞を使用した。その結果、M2 マクロファージ由来 CM が有意に神経突起を伸長したが、M1 マクロファージ由来 CM に同様の効果は認めなかった(図 18)。以上より、M2 マクロファージ由来の液性因子が神経突起伸長効果を持つこと、またその効果は損傷を受けた神経のみが感受性を有することが明らかになった。

次に、M2 マクロファージ由来の液性因子がリガンドとなり、損傷を受けた DRG 神経細胞がその受容体の発現を上昇させていると考え、GEO の RNA sequence データセットから、M2 マクロファージで上昇している液性因子と、損傷 DRG で上昇している受容体を抽出し、直接的にリガンドと受容体の関係にあるものを探索したところ、uPA と uPAR が同定された(図 19)。実際に、M2 マクロファージ由来 CM には uPA が存在していたが、M1 マクロファージ由来 CM には、ほとんど存在していなかった(図 20)。また、再生軸索近傍にある M2 マクロファージは uPA を発現していたが、再生軸索が全く存在しない場所のマクロファージは、uPA を発現していなかった(図 21)。uPAR の発現に関しては、損傷を受けた DRG 神経細胞の神経突起先端は uPAR を発現していたが、正常 DRG 神経細胞の神経突起先端は uPAR を発現していなかった(図 22)。これらの結果は、M2 マクロファージは uPA を分泌し、再生軸索はその受容体である uPAR の発現を上昇させていることを示している。

次に、損傷を受けた DRG 神経細胞を uPA で刺激したところ、有意に神経突起が伸長し、その効果は uPA 特異的阻害剤の BC11 によって消滅した(図 23)。また、M2 マクロファージ由来 CM を、BC11 で阻害したところ、神経突起伸長効果が完全に消滅した(図 24)。これらの結果は、M2 マクロファージの軸索再生効果は、M2 マクロファージが分泌する uPA の、損傷神経で発現する uPAR への刺激による効果であることを示唆している。

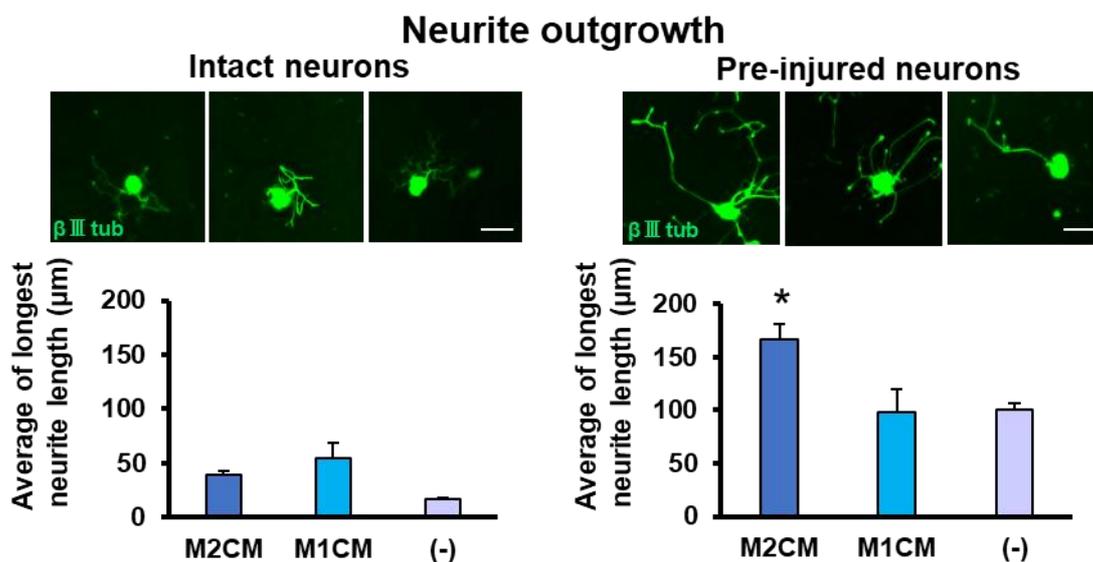


図 18. マクロファージ CM の神経突起伸長効果評価

左上：正常 DRG における、マクロファージ CM による、anti- β III tubulin 抗体による蛍光免疫染色による神経突起伸長評価。

右上：損傷 DRG における、マクロファージ CM による、anti- β III tubulin 抗体による蛍光免疫染色による神経突起伸長評価。

左下：正常 DRG における平均最長神経突起伸長。縦軸：平均最長突起伸長(μ m)。

右下；損傷 DRG における平均最長神経突起伸長。縦軸：平均最長突起伸長(μ m)。

Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ to M1CM, (-) ONE-WAY ANOVA and Tukey-Kramer test. スケールバー100 μ m。

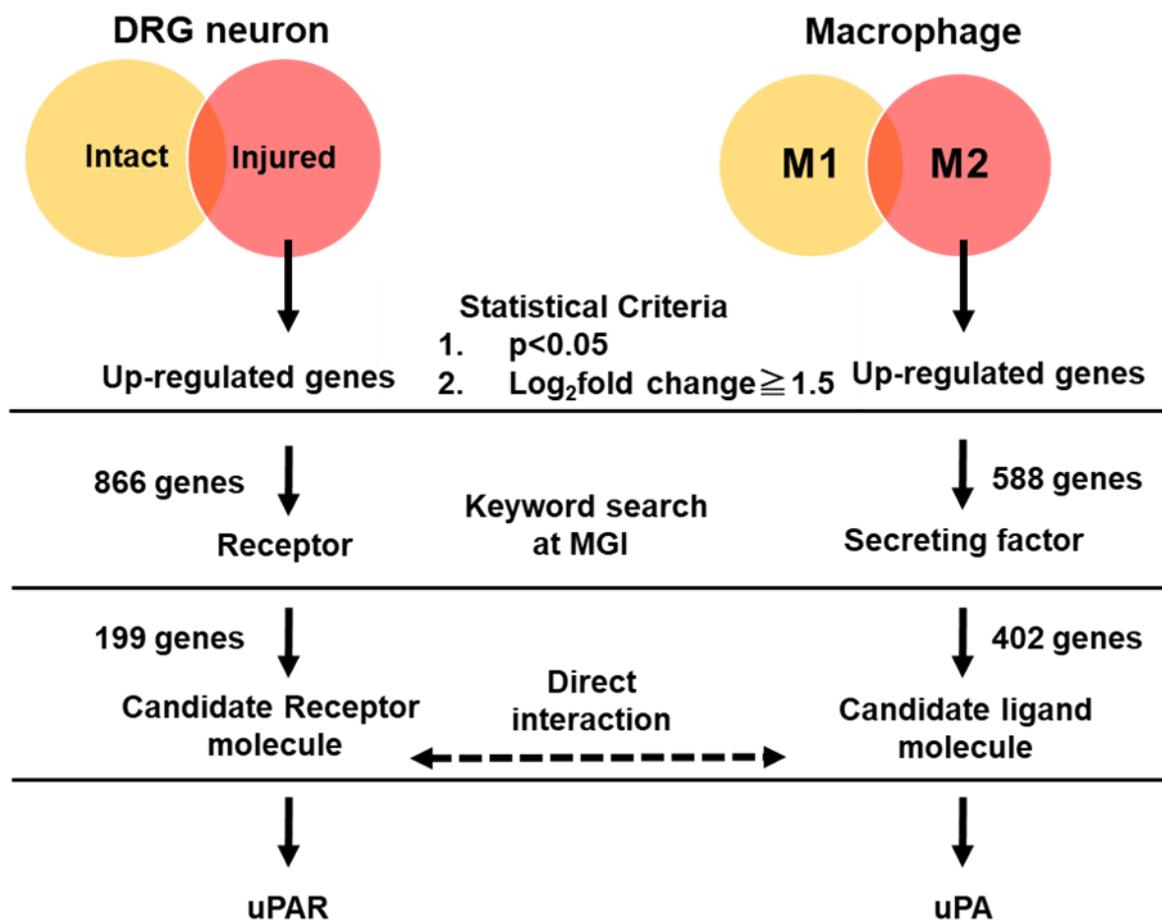


図 19. DRG とマクロファージのトランスクリプトーム解析

損傷DRGで多く発現する遺伝子と、M2マクロファージで多く発現する遺伝子を検索。MGIにより、それぞれ受容体、分泌因子を同定。その後、直接的な因果関係のあるものを調べ、uPAとuPARを同定した。



図 20. Western Boltting による uPA の発現
M2CM と M1CM の uPA の発現評価。

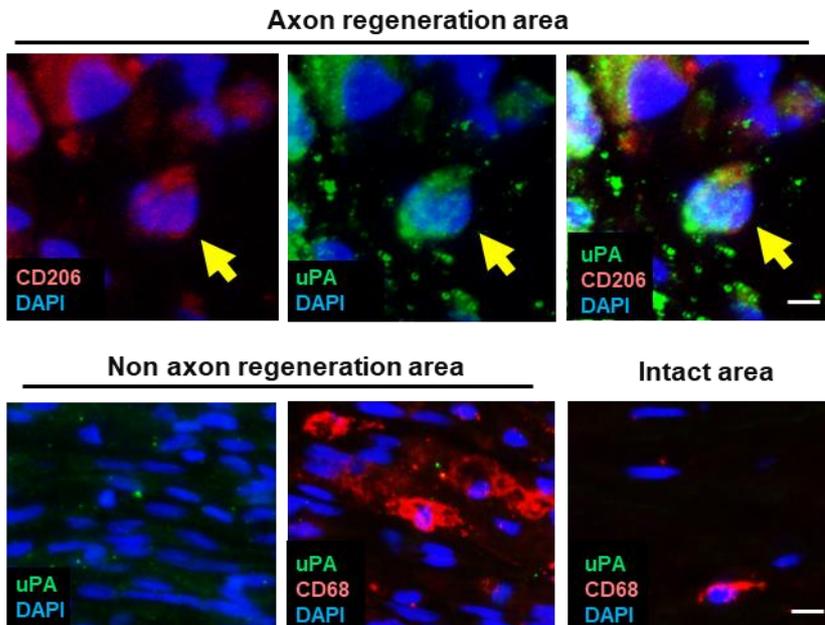


図 21. ラット坐骨神経損傷モデルにおける uPA の発現

上段：軸索再生部位。左 CD206 と DAPI、中 uPA と DAPI、右 uPA、CD206、DAPI の蛍光免疫染色による評価。

下段：軸索非再生部位。左 uPA と DAPI、中 uOA、CD68、DAPI の蛍光免疫染色による評価。右 正常領域、uPA、CD68、DAPI の蛍光免疫染色による評価。

スケールバー10 μ m。

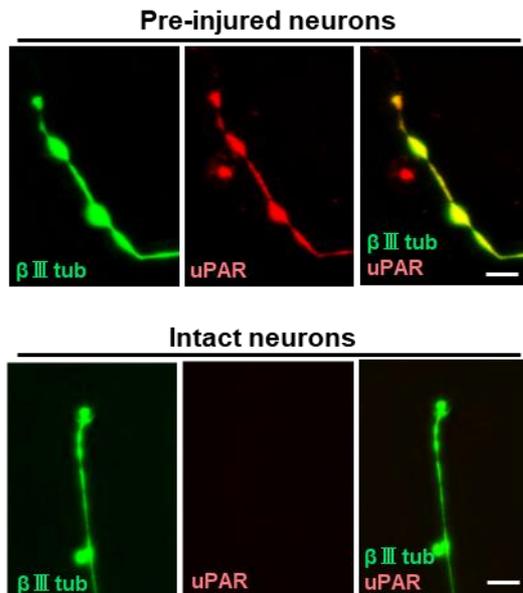


図 22. DRG の神経突起における uPAR の発現

上段：損傷 DRG 左 β III tubulin、中 uPAR、右 merge

下段：正常 DRG 上段：損傷 DRG 左 β III tubulin、中 uPAR、右 merge

スケールバー：10 μ m。

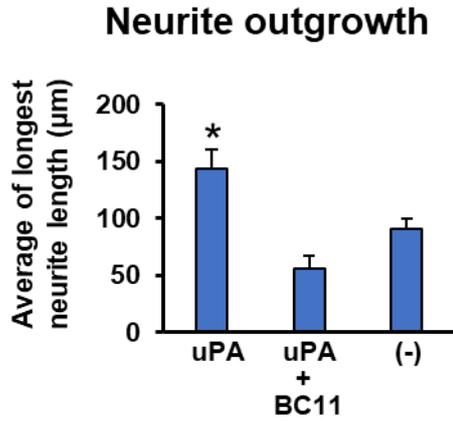


図 23. uPA の DRG 神経突起伸長効果

損傷 DRG に uPA+BC11 により刺激を与えたことによる神経突起伸長評価。Data are presented as mean \pm SE.

* $p < 0.05$ to uPA+BC11 ONE-WAY ANOVA and Tukey-Kramer test.

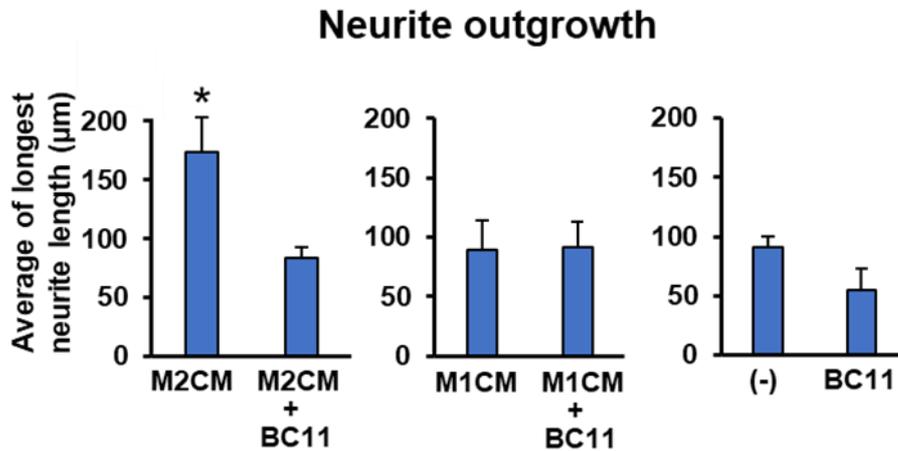


図 24. uPA 阻害による M2CM の神経突起伸長効果への影響

損傷 DRG に M2CM+BC11 により刺激を与えたことによる神経突起伸長評価。Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ to M2 CM+BC11 Student's t 検定 (two-tailed)

考察

本研究は、M2 マクロファージが末梢神経損傷後の軸索再生を制御しているという仮説を検討するために、末梢神経損傷後の M2 マクロファージと再生軸索の時空間的關係、M2 マクロファージの軸索再生効果、機能再生効果、分子学的機序を解析した。その結果、M2 マクロファージは再生軸索先端の近傍に存在し、直接的に末梢神経の軸索再生を制御していることが明らかになった。また、その分子学的機序は、M2 マクロファージが分泌する uPA が、損傷軸索が発現を上昇させる uPAR を刺激することであることが示唆された。さらに、M2 マクロファージ移植によって、損傷神経内の M2 マクロファージ数を増加させると、末梢神経損傷後の機能再生も促進できることが明らかになった。これらの知見は、末梢神経損傷後の軸索再生過程において、M2 マクロファージが非常に重要な役割を果たしていることを示すものである。

末梢神経の修復機序は軸索、ミエリンの断裂化、それらのデブリスの除去、軸索再生、再髄鞘化である(Ide, 1996; Scheib and Hoke, 2013; Sulaiman and Gordon, 2000)。これらの過程は、組織の破壊、クリアランス、組織修復が経時的に進むものであり、シュワン細胞と M1、M2 マクロファージが強調して機能していることが推測されていたが、その詳細は不明であった(Chen et al., 2015b; Gensel et al., 2009; Liu et al., 2019; Mokarram et al., 2012; Tomlinson et al., 2018; Zigmund and Echevarria, 2019)。今回、M2 マクロファージの集積部位が軸索再生部位の移動に応じて移動し、軸索再生を支持していることが判明し、マクロファージが関与する、末梢神経の高度な修復機構の一端が明らかになった。

この修復機構に関する未解明の点は、M2 マクロファージが再生軸索部位の移動に応じて移動する機序であるが、大まかに3つの可能性がある。1つ目は、再生軸索が分泌する因子が、直接的に M2 マクロファージの分化誘導を促進している可能性、2つ目は修復シュワン細胞が、再生軸索を感知して、M2 マクロファージの分化誘導を促進している可能性、3つ目は、ワーラー変性の自然経過の中で、M2 マクロファージが集積するタイミングと軸索再生のタイミングが偶然重なった可能性である。近年、神経細胞が炎症をコントロールする知見が報告されていること(Chazaud, 2014; Thomas et al., 2016; Tidball, 2017; Vannella and Wynn, 2017)、損傷モデルを変えても、軸

索再生部位に M2 マクロファージを認める (図 4) ことから、前 2 者の可能性が高いと考えられるが、今後の研究により解明されるべきである。

今回、M2 マクロファージが軸索再生を制御していることが明らかになったが、M2 マクロファージが無くても軸索は再生すること、培養 DRG 神経細胞も M2 マクロファージ CM が無くても神経突起を伸長することが可能であるから、軸索再生に M2 マクロファージが必ずしも必要ないことがわかる。つまり、M2 マクロファージは、末梢神経の軸索再生機構を構成する、高度な細胞相互作用の 1 細胞種であって、必須の細胞ではない。この理由として、末梢神経が内因性に旺盛な再生能を有すること (Scheib and Hoke, 2013; Stoll and Muller, 1999)、外因性にシュワン細胞による、細胞外基質、液性因子の強力なサポートがあるから (Endo et al., 2019a) と考える。

今回、M2 マクロファージの軸索再生機序として uPA-uPAR のシグナルが同定された。このシグナルは、中枢神経の軸索の発達、軸索再生に関与し、LRP1 や $\alpha 5\beta 1$ インテグリンを介していることが報告されている (Lino et al., 2014; Merino et al., 2017; Merino and Yepes, 2018)。末梢神経でも、マウスモデルでこのシグナルの末梢神経軸索再生への関与が報告されているが、凝固線溶系が旺盛に働く、損傷部での報告であり、ワーラー変性部での観察の報告は未だない (Klimovich et al., 2020)。また、末梢神経で uPA を分泌する細胞の詳細も不明なままであった。今回、M2 マクロファージの軸索再生効果が uPA の分泌によること、また損傷軸索が uPAR の発現を上昇させて、その感受性を高めていることが判明し、uPA-uPAR のシグナルが軸索再生に働く新しい機序が明らかになった。

これまで、中枢神経での M2 マクロファージの軸索再生効果に関する研究はいくつかあるものの、その効果を担う具体的な液性因子は同定されていなかった (Kigerl et al., 2009; Ma et al., 2015; Miron et al., 2013; Zhang et al., 2020)。例えば、M2 マクロファージが分泌する代表的液性因子である IL-10 を欠損させると、軸索再生が阻害されることがわかっているが (Siqueira Mietto et al., 2015)、IL-10 自体が軸索再生効果を有するかは不明なままである。今まで、液性因子が同定されなかった理由として、それらの研究の *in vitro* 実験で、正常由来の神経細胞しか使用しなかったことが挙げられる。本研究では、より *in vivo* の状況を反映した損傷神経細胞を使用することで、M2 マクロファージの液性因子効果を *in vitro* で確定することが可能となり、uPA-uPAR のシグナルを同定することが可能となった。これらのことは、軸索再生の *in vitro* 研究で

は、正常細胞だけではなく、損傷を受けた神経細胞を使用することの重要性を示唆している。

近位部損傷の場合、感覚機能は回復するのに、運動機能が回復しない理由は、筋肉が神経再支配の感受性を失ってから、再生軸索が到達するためであり(Sakuma et al., 2016)、軸索再生速度を早くする方法の開発が望まれていた。本研究で使用した坐骨神経圧挫モデルは、最終的に軸索が全て再生する、軸索再生が旺盛なモデルであるため(Bridge et al., 1994)、このモデルで機能再生が促進したということは、M2 マクロファージ移植が軸索再生速度を加速させたことを示している。このことは、M2 マクロファージ移植が、末梢神経の再建例だけでなく、縫合例や、圧迫のみで保存加療が可能な症例など、様々なタイプの損傷例に有効な治療方法となりうることを示唆している。

本研究では、M2 マクロファージ数を増加させるために、M2 マクロファージ移植を行ったが、その効果を得るためには自家移植である必要があった。臨床応用を考慮した場合、すぐにM2 マクロファージを一定数用意するのは容易ではないので、代替方法で、M2 マクロファージ数を増加させるのが实际的であろう。M2 マクロファージを誘導できる、IL-4、IL-10、コラーゲンVI、トロンボモジュリン(Chen et al., 2015b; Huang et al., 2020; Mokarram et al., 2012; Potas et al., 2015; Wang et al., 2012)などの応用が望ましい可能性がある。もちろん、uPA の投与も魅力的な方法である。これらの方法を応用する際に、重要なことは、再生軸索の先端部のM2 マクロファージ細胞密度、もしくはuPA 濃度が高くなるように調節されなければ効果を期待できないということである。軸索再生部位は、時間とともに遠位に移動していくこと、損傷内容によって異なることから、この高度な調整をどのように実現するかが技術的な問題であると考えられる。

最後に、本研究により、M2 マクロファージが末梢神経損傷後に軸索再生を直接的に制御していることが明らかになり、末梢神経の再生機構の一端が解明された。再生軸索近傍のM2 マクロファージ数を上げることが、軸索再生効果につながる事が判明したが、今後、M2 マクロファージ集積の制御機構や、M2 マクロファージが分泌するuPA と軸索上のuPAR の反応機構を明らかにすることで、さらに新規軸索再生治療方法開発につながると思われる。

総括および結論

・末梢神経損傷後の自然経過において、M2 マクロファージは再生軸索近傍に出現していた。そのため M1 マクロファージと M2 マクロファージをラット坐骨神経無細胞モデルに移植したところ、M2 マクロファージのみが軸索再生効果を示した。

・ラット坐骨神経圧挫損傷モデルのワーラー変性部の M2 マクロファージ数を増減させると、それに応じて軸索再生量も増減した。機能成績の評価でも、M2 マクロファージ移植により、坐骨神経遠位端の髄鞘化軸索数が有意に増加し、腓腹筋の CMAP が有意に高くなり、終末潜時も有意に短くなった。また、詳細な歩行機能解析では、paw drag の項目で有意に損傷前近くまで回復していた。しかし、筋湿重量や感覚機能に有意な差は認めなかった。

・他家 M2 マクロファージ移植は M2 マクロファージ陽性細胞数を有意に増加させず、軸索再生効果も限定的であった。また、拒絶反応の出現が示唆された。

・正常 DRG 神経細胞に対しては、マクロファージ由来培養液による神経突起伸長効果を認めなかったが、損傷 DRG に対しては、M2 マクロファージ由来の培養液が有意に神経突起を伸長させた。そのためトランスクリプトーム解析を用いて、M2 マクロファージが有意に多く発現するリガンドと、損傷 DRG で有意に多く発現する受容体を検索したところ、uPA と uPAR が候補となった。

・Western blotting の結果、M1CM ではなく、M2CM で有意に uPA の発現を認め、免疫染色では、再生軸索近傍にある M2 マクロファージは uPA の発現を認めたが、再生軸索が存在しない場所のマクロファージは uPA を発現していなかった。また、損傷 DRG の神経突起は uPAR を発現していたが、正常 DRG では uPAR を発現していなかった。

・損傷 DRG を uPA で刺激したところ、有意に神経突起が伸長していた。また、M2CM の uPA を阻害したところ、M2CM の神経突起伸長効果が消失した。

一連の研究結果から、M2 マクロファージが末梢神経損傷後に軸索再生を直接的に制御していることが明らかになり、末梢神経の再生機構の一端が解明された。再生軸索近傍の M2 マクロファージ数を上げることが、軸索再生効果につながることもわかった。今後、M2 マクロファージ集積の制御機構や、M2 マクロファージが分泌する uPA と軸索上の uPAR の反応機構を明らかにすることで、さらに新規軸索再生治療法

開発につながると考えられる。

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の在学中に行った研究をまとめたものです。稿を終えるにあたり、研究の機会をくださっ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・岩崎倫政教授に深い謝意を表します。また、本研究全般にわたり、直接のご指導ご鞭撻を賜りました同運動器先端医学分野・角家健特任准教授に心より感謝いたします。

最後に本研究を遂行するにあたり、数々のご助言、ご協力、ご支援頂きました、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、のすべてのみなさまに、心より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 References

- Anderson, K.D., Gunawan, A., and Steward, O. (2005). Quantitative assessment of forelimb motor function after cervical spinal cord injury in rats: relationship to the corticospinal tract. *Exp Neurol* 194, 161-174.
- Benowitz, L.I., and Popovich, P.G. (2011). Inflammation and axon regeneration. *Curr Opin Neurol* 24, 577-583.
- Bridge, P.M., Ball, D.J., Mackinnon, S.E., Nakao, Y., Brandt, K., Hunter, D.A., and Hertl, C. (1994). Nerve crush injuries--a model for axonotmesis. *Exp Neurol* 127, 284-290.
- Chazaud, B. (2014). Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* 219, 172-178.
- Chen, P., Cescon, M., Zuccolotto, G., Nobbio, L., Colombelli, C., Filaferro, M., Vitale, G., Feltri, M.L., and Bonaldo, P. (2015a). Collagen VI regulates peripheral nerve regeneration by modulating macrophage recruitment and polarization. *Acta Neuropathol* 129, 97-113.
- Chen, P., Piao, X., and Bonaldo, P. (2015b). Role of macrophages in Wallerian degeneration and axonal regeneration after peripheral nerve injury. *Acta Neuropathol* 130, 605-618.
- Deuis, J.R., Dvorakova, L.S., and Vetter, I. (2017). Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci* 10, 284.
- Endo, T., Kadoya, K., Kawamura, D., and Iwasaki, N. (2019a). Evidence for cell-contact factor involvement in neurite outgrowth of DRG neurons stimulated by Schwann cells. *Exp Physiol*.
- Endo, T., Kadoya, K., Suzuki, Y., Kawamura, D., and Iwasaki, N. (2019b). A Novel Experimental Model to Determine the Axon-Promoting Effects of Grafted Cells After Peripheral Nerve Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13.
- Eser, F., Aktekin, L.A., Bodur, H., and Atan, C. (2009). Etiological factors of traumatic peripheral nerve injuries. *Neurol India* 57, 434-437.
- 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.
- Gensel, J.C., Nakamura, S., Guan, Z., van Rooijen, N., Ankeny, D.P., and Popovich, P.G. (2009). Macrophages promote axon regeneration with concurrent neurotoxicity. *J Neurosci* 29, 3956-3968.
- Gerrick, K.Y., Gerrick, E.R., Gupta, A., Wheelan, S.J., Yegnasubramanian, S., and Jaffee, E.M. (2018). Transcriptional profiling identifies novel regulators of macrophage polarization. *PLoS One* 13, e0208602.
- Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C., and Joris, J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88.

- Hirose, K., Iwakura, N., Orita, S., Yamashita, M., Inoue, G., Yamauchi, K., Eguchi, Y., Ochiai, N., Kishida, S., Nakamura, J., *et al.* (2010). Evaluation of behavior and neuropeptide markers of pain in a simple, sciatic nerve-pinch pain model in rats. *Eur Spine J* 19, 1746-1752.
- Huang, T.C., Wu, H.L., Chen, S.H., Wang, Y.T., and Wu, C.C. (2020). Thrombomodulin facilitates peripheral nerve regeneration through regulating M1/M2 switching. *J Neuroinflammation* 17, 240.
- Ide, C. (1996). Peripheral nerve regeneration. *Neurosci Res* 25, 101-121.
- Kadoya, K., Tsukada, S., Lu, P., Coppola, G., Geschwind, D., Filbin, M.T., Blesch, A., and Tuszynski, M.H. (2009). Combined intrinsic and extrinsic neuronal mechanisms facilitate bridging axonal regeneration one year after spinal cord injury. *Neuron* 64, 165-172.
- Kigerl, K.A., Gensel, J.C., Ankeny, D.P., Alexander, J.K., Donnelly, D.J., and Popovich, P.G. (2009). Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci* 29, 13435-13444.
- Klimovich, P.S., Semina, E.V., Karagyaur, M.N., Rysenkova, K.D., Sysoeva, V.Y., Mironov, N.A., Sagaradze, G.D., Az'muko, A.A., Popov, V.S., Rubina, K.A., *et al.* (2020). Urokinase receptor regulates nerve regeneration through its interaction with alpha5beta1-integrin. *Biomed Pharmacother* 125, 110008.
- Li, R., Liu, Z., Pan, Y., Chen, L., Zhang, Z., and Lu, L. (2014). Peripheral nerve injuries treatment: a systematic review. *Cell Biochem Biophys* 68, 449-454.
- Lidia Jiménez-García, S.H., Alfonso Luque and Sonsoles Hortelano (2015). Thioglycollate-elicited Peritoneal Macrophages Preparation and Arginase Activity Measurement in IL-4 Stimulated Macrophages. *bio-protocol* 5.
- Lino, N., Fiore, L., Rapacioli, M., Teruel, L., Flores, V., Scicolone, G., and Sanchez, V. (2014). uPA-uPAR Molecular Complex is Involved in Cell Signaling During Neuronal Migration and Neuritogenesis. *Dev Dynam* 243, 676-689.
- Liu, P., Peng, J., Han, G.H., Ding, X., Wei, S., Gao, G., Huang, K., Chang, F., and Wang, Y. (2019). Role of macrophages in peripheral nerve injury and repair. *Neural Regen Res* 14, 1335-1342.
- Lundborg, G. (2000). A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am* 25, 391-414.
- Ma, S.F., Chen, Y.J., Zhang, J.X., Shen, L., Wang, R., Zhou, J.S., Hu, J.G., and Lu, H.Z. (2015). Adoptive transfer of M2 macrophages promotes locomotor recovery in adult rats after spinal cord injury. *Brain Behav Immun* 45, 157-170.
- Meijering, E., Jacob, M., Sarria, J.C., Steiner, P., Hirling, H., and Unser, M. (2004). Design and validation of a tool for neurite tracing and analysis in fluorescence microscopy images. *Cytometry A* 58, 167-176.

Merino, P., Diaz, A., Jeanneret, V., Wu, F., Torre, E., Cheng, L., and Yepes, M. (2017). Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA) Binding to the uPA Receptor (uPAR) Promotes Axonal Regeneration in the Central Nervous System. *J Biol Chem* 292, 2741-2753.

Merino, P., and Yepes, M. (2018). Urokinase-type Plasminogen Activator Induces Neurorepair in the Ischemic Brain. *J Neurol Exp Neurosci* 4, 24-29.

Miron, V.E., Boyd, A., Zhao, J.W., Yuen, T.J., Ruckh, J.M., Shadrach, J.L., van Wijngaarden, P., Wagers, A.J., Williams, A., Franklin, R.J.M., *et al.* (2013). M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat Neurosci* 16, 1211-1218.

Mokarram, N., Merchant, A., Mukhatyar, V., Patel, G., and Bellamkonda, R.V. (2012). Effect of modulating macrophage phenotype on peripheral nerve repair. *Biomaterials* 33, 8793-8801.

Motti, D., Lerch, J.K., Danzi, M.C., Gans, J.H., Kuo, F., Slepak, T.I., Bixby, J.L., and Lemmon, V.P. (2017). Identification of miRNAs involved in DRG neurite outgrowth and their putative targets. *FEBS Lett* 591, 2091-2105.

Nirogi, R., Goura, V., Shanmuganathan, D., Jayarajan, P., and Abraham, R. (2012). Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods* 66, 8-13.

Noble, J., Munro, C.A., Prasad, V.S., and Midha, R. (1998). Analysis of upper and lower extremity peripheral nerve injuries in a population of patients with multiple injuries. *J Trauma* 45, 116-122.

Oishi, Y., and Manabe, I. (2018). Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol* 30, 511-528.

Perrin, F.E., Lacroix, S., Aviles-Trigueros, M., and David, S. (2005). Involvement of monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein-1alpha and interleukin-1beta in Wallerian degeneration. *Brain* 128, 854-866.

Potas, J.R., Haque, F., Maclean, F.L., and Nisbet, D.R. (2015). Interleukin-10 conjugated electrospun polycaprolactone (PCL) nanofiber scaffolds for promoting alternatively activated (M2) macrophages around the peripheral nerve in vivo. *J Immunol Methods* 420, 38-49.

Sakuma, M., Gorski, G., Sheu, S.H., Lee, S., Barrett, L.B., Singh, B., Omura, T., Latremoliere, A., and Woolf, C.J. (2016). Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *Eur J Neurosci* 43, 451-462.

Sayanagi, J., Tanaka, H., Ebara, M., Okada, K., Oka, K., Murase, T., and Yoshikawa, H. (2020). Combination of Electrospun Nanofiber Sheet Incorporating Methylcobalamin and PGA-Collagen Tube for Treatment of a Sciatic Nerve Defect in a Rat Model. *J Bone Joint Surg Am* 102, 245-253.

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

- Seddon, H.J. (1947). Nerve grafts. *Rev Neurol (Paris)* 79, 261.
- Seddon, H.J. (1963). Nerve Grafting. *J Bone Joint Surg Br* 45, 447-461.
- Shin, J.E., Geisler, S., and DiAntonio, A. (2014). Dynamic regulation of SCG10 in regenerating axons after injury. *Exp Neurol* 252, 1-11.
- Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 122, 787-795.
- Siqueira Mietto, B., Kroner, A., Girolami, E.I., Santos-Nogueira, E., Zhang, J., and David, S. (2015). Role of IL-10 in Resolution of Inflammation and Functional Recovery after Peripheral Nerve Injury. *J Neurosci* 35, 16431-16442.
- Stoll, G., and Muller, H.W. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol* 9, 313-325.
- Sulaiman, O.A., and Gordon, T. (2000). Effects of short- and long-term Schwann cell denervation on peripheral nerve regeneration, myelination, and size. *Glia* 32, 234-246.
- Thomas, G.D., Hanna, R.N., Vasudevan, N.T., Hamers, A.A., Romanoski, C.E., McArdle, S., Ross, K.D., Blatchley, A., Yoakum, D., Hamilton, B.A., *et al.* (2016). Deleting an Nr4a1 Super-Enhancer Subdomain Ablates Ly6C(low) Monocytes while Preserving Macrophage Gene Function. *Immunity* 45, 975-987.
- Tidball, J.G. (2017). Regulation of muscle growth and regeneration by the immune system. *Nat Rev Immunol* 17, 165-178.
- Tomlinson, J.E., Zygelyte, E., Grenier, J.K., Edwards, M.G., and Cheetham, J. (2018). Temporal changes in macrophage phenotype after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 15, 185.
- Vannella, K.M., and Wynn, T.A. (2017). Mechanisms of Organ Injury and Repair by Macrophages. *Annu Rev Physiol* 79, 593-617.
- Wang, T.Y., Forsythe, J.S., Nisbet, D.R., and Parish, C.L. (2012). Promoting engraftment of transplanted neural stem cells/progenitors using biofunctionalised electrospun scaffolds. *Biomaterials* 33, 9188-9197.
- Zhang, J., Li, Y., Duan, Z., Kang, J., Chen, K., Li, G., Weng, C., Zhang, D., Zhang, L., Wang, J., *et al.* (2020). The effects of the M2a macrophage-induced axonal regeneration of neurons by arginase 1. *Biosci Rep* 40.
- Zigmond, R.E., and Echevarria, F.D. (2019). Macrophage biology in the peripheral nervous system after injury. *Prog Neurobiol* 173, 102-121.