



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	修復型シュワン細胞の細胞学的および分子学的特徴と軸索再生効果 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	鈴木, 智亮
Description	配架番号 : 2699
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14958号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85819
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SUZUKI_Tomoaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 鈴木 智亮

学位論文題名

修復型シュワン細胞の細胞学および分子学的特徴と軸索再生効果
(Cellular and molecular characterization of repair Schwann cells and their effect on promoting axonal regeneration)

【背景と目的】末梢神経は、中枢神経と異なり再生するが、近位部損傷例や再建不良例など重度神経損傷例ではその治療成績は不良であり、より効果的な新規治療方法の開発が望まれている。末梢神経損傷後、シュワン細胞(Schwann cell : SC)は修復型シュワン細胞(repair Schwann cell : R-SC)に分化し、末梢神経修復において重要な役割を果たすが、その詳細については不明な点が多い。本研究の1つめの目的は、R-SCと正常時シュワン細胞(intact Schwann cell : I-SC)の細胞学的、分子学的特徴および軸索再生効果を比較し、軸索再生促進因子を検索することである。検索の結果、R-SCの細胞表面上で発現するGDNFファミリー受容体 $\alpha 1$ (GFR $\alpha 1$)が、軸索再生促進に関与する可能性を見出した。

GFR $\alpha 1$ は、GDNF-RETの受容体として神経細胞の発達において作用することは知られているが、修復過程におけるGFR $\alpha 1$ の役割は未だ不明である。本研究の2つめの目的は、GFR $\alpha 1$ の末梢神経再生に果たす役割と、その機能再生効果を明らかにすることである。

【方法】シュワン細胞の細胞学的、分子学的特徴および軸索再生効果：①野生型LEWISラット坐骨神経を使用して、正常神経由来のSC(I-SC)および圧挫損傷1週後の神経由来のSC(R-SC)をそれぞれ24時間培養し、接着した細胞の比率と細胞の形態を比較した。②後根神経節(dorsal root ganglion : DRG)神経細胞を、それぞれのSC上で48時間培養し、神経突起伸長効果を免疫染色で定量比較した。③SCを、ラット坐骨神経無細胞モデルにそれぞれ移植した。移植2週後の軸索再生量を免疫染色で定量比較した。④R-SCとI-SCのトランスクリプトーム解析を行い、発現上昇因子の機能や局在を比較し、軸索再生に関与している可能性がある因子を検索した。GFR $\alpha 1$ の軸索再生・機能再生効果とその機序：⑤神経標本と培養SCの免疫染色で、SCのGFR $\alpha 1$ 発現を確認した。また、ウエスタンブロッティング(western blotting: WB)で、SCのGFR $\alpha 1$ 分泌を確認した。R-SCとDRG神経細胞の共培養、圧挫損傷神経へそれぞれGFR $\alpha 1$ 中和抗体を投与し、神経突起長・軸索再生量を定量した。⑥培養DRG神経細胞にGFR $\alpha 1$ を投与し、神経突起長を定量した。GDNF非依存性確認のため、GDNF機能阻害抗体を併用投与し、神経突起長を定量した。また、プルダウン法によりGDNF、RETとの関連を調べた。GDNFとの相乗効果を確認するため、GDNFを併用投与し、神経突起長を定量した。⑦GFR $\alpha 1$ の受容体同定のため、GFR $\alpha 1$ 効果のラミニン依存性を調べ、プルダウン法、免疫染色、阻害実験を行った。さらに、GFR $\alpha 1$ を投与したDRG神経細胞のWBで、細胞内シグナルを調べた。⑧坐骨神経圧挫後、GFR $\alpha 1$ 、対

照タンパク質、GDNF 中和抗体、対照抗体をそれぞれ組み合わせて局所投与し、1 週後の軸索再生量を定量した。⑨坐骨神経圧挫後、GFR α 1 を神経内に局所投与した。歩行機能 (DigiGait)、感覚機能 (von Frey test、Hargreaves test) 評価を、損傷前、損傷後 4 週、8 週に、電気生理学検査 (神経伝導速度、振幅、潜時) を損傷後 8 週に、筋重量測定 (前脛骨筋および腓腹筋) と再髄鞘化軸索の定量化を還流固定後に施行した。

【結果】シュワン細胞の細胞学的、分子学的特徴および軸索再生効果：①R-SC は、I-SC と比較して、1.5 倍程度高い接着率を有し、より多くの突起を伸ばすように形態を変えた。②SC と共培養した群の神経突起長は、非共培養群よりいずれも有意に高かった。R-SC 群の神経突起長は I-SC 群と比べて、1.8 倍程度有意に高かった。③SC 移植群の再生軸索率は、細胞非移植群と比較して、いずれも有意に高かった。R-SC 移植群と I-SC 移植群の比較では、R-SC 移植群の再生軸索率が有意に高かった。④両細胞の遺伝子発現パターンは約 800 の遺伝子で有意に異なっていた。R-SC では修復、再生に関する遺伝子の発現が優位に上昇しているのに対し、I-SC は発達、維持に関する遺伝子の発現が優位に上昇していた。GFR α 1 の軸索再生・機能再生効果とその機序：⑤神経標本、培養 SC とともに、GFR α 1 は R-SC では発現したが、I-SC では発現しなかった。また、R-SC は GFR α 1 を分泌していた。GFR α 1 中和抗体投与で、R-SC と共培養した DRG ニューロンの神経突起長は約 40% 減少し、損傷坐骨神経の軸索再生率は有意に低下した。⑥GFR α 1 投与で、神経突起長は有意に増加した。GDNF 中和抗体の併用で、神経突起長はさらに増加し、プルダウン法で RET の発現が消失した。GFR α 1、GDNF それぞれの単独投与で、神経突起長は増加したが、同時に投与することで相乗効果はなかった。⑦GFR α 1 の NCAM、Integrin (Itg) α 7 β 1 への結合および、同因子の軸索再生効果への関与が明らかになった。GFR α 1 と GDNF 中和抗体の併用群では PI3K のリン酸化が亢進したが、GDNF 投与群では亢進しなかった。⑧GFR α 1 と GDNF 中和抗体の併用群は、最も軸索再生率が高かった。GFR α 1 群は、対照群と比べて、中程度ではあるが有意に軸索再生率が高かった。⑨GFR α 1 の局所投与で、感覚機能は損傷後 4 週で、歩行機能は損傷 8 週で有意に改善した。電気生理学機能、下腿筋重量、髄鞘化軸索数も、対照群と比較して有意に改善した。

【考察】I-SC が損傷シグナルを受けた後に分化する R-SC は、炎症や修復に関与する因子を多く発現し、神経突起伸長および軸索再生を促進した。R-SC で発現が上昇する因子の一つである GFR α 1 は、GDNF の受容体としてよく知られているが、今回 GFR α 1 単体でも生物学的作用をもち、NCAM、Itg α 7 β 1 に結合して、GDNF-GFR α 1 複合体形成時と異なるシグナルで作用することが初めて明らかになった。GFR α 1 による軸索再生効果は、液性因子・接着因子のいずれにおいても有効であるため、末梢神経再生治療として局所投与薬、人工神経修飾薬など様々な応用がきく可能性が示された。

【結論】我々は、軸索再生に重要な役割を果たす SC に着目し、損傷後に発現が上昇する GFR α 1 の効果につき検討した。GFR α 1 はリガンドとして単独で軸索再生効果、機能再生効果をもつことが明らかになった。今後は、同手法による新規軸索再生因子検索の継続、および新規軸索再生因子の末梢神経再生治療への応用の検討が重要と考える。