



Title	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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14958
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85913
Type	doctoral thesis
File Information	SUZUKI_Tomoaki.pdf



学位論文

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

(Cellular and molecular characterization of repair Schwann cells and their effect
on promoting axonal regeneration)

2022年3月

北海道大学

鈴木 智亮

Tomoaki Suzuki

学位論文

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

(Cellular and molecular characterization of repair Schwann cells and their effect
on promoting axonal regeneration)

2022年3月

北海道大学

鈴木 智亮

Tomoaki Suzuki

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
諸言	8 頁
方法	10 頁
結果	19 頁
考察	37 頁
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。

Tomoaki Suzuki, Ken Kadoya, Takeshi Endo, Miwako Yamasaki, Masahiko Watanabe, Norimasa Iwasaki

GFR α 1 released from repair Schwann cells promotes axon regeneration by functioning as a ligand for NCAM-integrin complex

EMBO Journal (2021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. 鈴木智亮、角家健、遠藤健、岩崎倫政
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促進効果
第 137 回北海道整形災害外科学会、2019 年 6 月 22 日-23 日、北海道札幌市
2. 鈴木智亮、角家健、遠藤健、岩崎倫政
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促進効果
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. 鈴木智亮、角家健、遠藤健、岩崎倫政
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促進効果
第 34 回日本整形外科学会基礎学術集会、2019 年 10 月 17-18 日、神奈川県横浜市
4. Suzuki T, Kadoya K, Endo T, Iwasaki N.
Cellular and molecular characterization of repair Schwann cells.
The 75th Annual Meeting of the ASSH, October 1-3, 2020, San Antonio, Texas, United States

5. 鈴木智亮、角家健、遠藤健、岩崎倫政
修復型シュワン細胞の細胞学的小よび分子学的特徴と軸索再生促進効果
第 63 回日本手外科学会学術集会、2020 年 6 月 25 日-8 月 17 日、Web 開催

6. 鈴木智亮、角家健、遠藤健、山崎美和子、渡辺雅彦、岩崎倫政
新規軸索再生因子 GFR α 1 の末梢神経再生効果とその分子機構
第 140 回北海道整形災害外科学会、旭川市、2021 年 6 月 5 日-6 日、Web 開催. ※口演

7. 鈴木智亮、角家健、遠藤健、山崎美和子、渡辺雅彦、岩崎倫政
GFR α 1 の NCAM、Integrin 複合体を介した末梢神経軸索再生促進効果
第 32 回日本末梢神経学会学術集会、和歌山市、2021 年 9 月 10 日-11 日、
宝塚医療大学和歌山保健医療学部、ハイブリッド開催. ※口演

要旨

【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】

1. 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 細胞学的特徴

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 神経突起伸長効果

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。

③ 軸索再生効果

SC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。

④ トランスクリプトーム解析

R-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。

2. GFR $\alpha 1$ の軸索再生・機能再生効果とその機序

⑤ 末梢神経損傷後のSCのGFR $\alpha 1$ 発現と軸索再生効果

神経標本と培養 SC の免疫染色で、SC の GFR α 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 α 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 α 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 神経突起伸長効果と GDNF-RET 依存性評価

培養 DRG 神経細胞に GFR α 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。

⑦ 軸索再生機序

GFR α 1 の受容体同定のため、GFR α 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 α 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 軸索再生効果

坐骨神経圧挫後、GFR α 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る局所投与し、1 週後の軸索再生量を定量した。

⑨ 機能再生効果

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】

1. 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 細胞学的特徴

R-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。

② 神経突起伸長効果

SC 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。

③ 軸索再生効果

SC 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 トランスクリプトーム解析

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。

2. GFR α 1の軸索再生・機能再生効果とその機序

⑤ 末梢神経損傷後のSCのGFR α 1発現と軸索再生効果

神経標本、培養SC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。

⑥ 神経突起伸長効果とGDNF-RET依存性評価

GFR 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

⑦ 軸索再生機序

GFR 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

⑧ 軸索再生効果

GFR 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。

⑨ 機能再生効果

GFR 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、対照群に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 $GFR\alpha 1$ の効果につき検討した。 $GFR\alpha 1$ 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。

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
DE genes	differentially expressed genes
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRG	Dorsal root ganglion
Gastro	Gastrocnemius
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFR α 1	GDNF family receptor alpha 1
Itg	Integrin
I-SC	Intact Schwann cell
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome
NCAM	Neural cell adhesion molecule
PB	Phosphate buffer
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyde
pNF	pan Neuro Filament
PS	Penicillin streptomycin
RET	Rearranged During Transfection
R-SC	Repaired Schwann cell
SC	Schwann cell
SE	Standard error
TA	Tibialis anterior
TBS	Tris buffer saline
WB	Western blotting

諸言

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 (Siemionow et al., 2009)、より効果的な新規治療方法の開発が望まれている。先行研究では、末梢神経損傷後、シュワン細胞 (Schwann cell : SC) の表現型は劇的に変化し、内因性免疫反応の活性化、栄養因子の分泌、軸索の再髄鞘化など、末梢神経修復において重要な役割を果たす修復型シュワン細胞 (repair Schwann cell : R-SC) に分化する (Jessen et al., 2008; Chen et al., 2007; Brosius Lutz et al., 2014; Boerboom et al., 2017) ことが知られている。末梢神経の効果的再生方法確立のためには、R-SC が発現する軸索再生関与因子を明らかにすることが有用と考えるが、実際に正常時シュワン細胞 (intact Schwann cell : I-SC) と R-SC を直接的に比較した報告はなく、その詳細は不明な点が多い。本研究の一つ目の目的は、R-SC と I-SC との細胞学的、分子生物学的特徴を比較し、軸索再生関与因子を検索することとした。

R-SC が分泌する栄養因子のうち、Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) は末梢神経損傷後に軸索を再生し、その活性化状態を維持することが報告されている (Garcès et al., 2000)。また、GDNF の受容体である GDNF family receptor alpha 1 (GFR α 1) も、末梢神経損傷後に SC や軸索で発現が上昇し、その自己分泌および傍分泌効果を増強する (Beirowski et al., 2014; Nakajima et al., 2014)。GFR α 1 は、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカータンパク質であり、細胞内ドメインを持たず、GDNF の結合を細胞内シグナルに変換するためには、共受容体である Rearranged During Transfection (RET) または Neural cell adhesion molecule (NCAM) が必要である (Durbec et al., 1996; Jing et al., 1996; Treanor et al., 1996; Trupp et al., 1996)。先行研究では、1) 細胞表面の GFR α 1 に結合した GDNF は、SC の増殖や移動、神経突起の伸長、軸索の誘導、シナプスの形成などのシグナルカスケードを引き起こす (Nakajima et al., 2014; Durbec et al., 1996)、2) GFR α 1 は、細胞表面だけでなく、ホスホリパーゼによって GPI アンカーから解離した後、細胞外にも可溶性 GFR α 1 (soluble GFR α 1: sGFR α 1) として存在し (Ibáñez, 2010)、GDNF と結合し RET を刺激して、GDNF シグナルを伝達することができる (Paratcha et al., 2001)、3) GFR α 1 の発現は多くの組織や細胞で RET よりも大きく (Enomoto et al., 2004)、GFR α 1 は GDNF-RET とは独立して機能している可能性がある (Ibáñez et al., 2020)、4) GFR α 1 は主に生後の発生で重要な役割を果たす、ことが知られているが、GFR α 1 の成体神経系での修復プロセスにおける役割、およびリガンドとして細胞内シグナルをもたら

す機能に関して検討した報告はない。そこで、本研究の2つ目の目的は、GFR α 1の軸索再生効果、機能再生効果、分子機序を解明することとした。

一連の研究から、R-SCが末梢神経損傷に対し優れた軸索再生効果を有することを明らかになった。また、R-SCで発現が上昇するGFR α 1に着目し、末梢神経損傷後の修復過程での役割を検索した結果、GFR α 1はGDNF-RET非依存的に、成体DRG神経細胞上のNCAMとItg α 7 β 1の複合体を受容体として結合し、PI3Kをリン酸化し、末梢神経損傷後の軸索再生と機能回復を促進することを明らかにした。これらの結果は、GFR α 1の新しい機能を明らかにし、GFR α 1の投与が末梢神経損傷の有効な治療法となる可能性を示唆している。

方法

1. 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 細胞学的特徴

1-1) 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。8-14 週齢の野生型 LEWIS ラット (Charles River Laboratories Japan, Inc. Japan) を使用した。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 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。手術後、ラットは電子保温パッド(37°C) 上で保温し、アンチセダン(200 μ g/kg; Zenoaq, Japan) を腹腔内投与して麻酔からの覚醒を行った。

1-2) 坐骨神経の圧挫方法

麻酔導入後、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) で圧挫損傷を加えて作成した。

1-3) SC 調製

麻酔導入後、ラットを腹臥位にし、両大腿部を約 5cm 縦切開して坐骨神経を露出させ、正常神経から I-SC を、調製 1 週間前に圧挫損傷を加えた神経から R-SC を採取した。SC の調製は、過去のプロトコール(Kaewkhaw et al, 2012) を修正して施行した。坐骨切痕から大腿骨端部までの坐骨神経を摘出し、神経上膜を切除後にマイクロハサミで 1~2mm の神経片に切断し、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM/Ham's F-12, Wako, Osaka, Japan) に、1% コラゲナーゼ I (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) および 0.125% トリプシンを加えた溶液で、酵素分解した。37°C で 1 時間静置した後、DMEM 中に 10% ウシ胎児血清(FBS, Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を加えて酵素反応を停止させた。遠心分離にて上清を除去した後、DMEM/Ham's F-12 に 10% FBS、1% GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、1% Penicillin-Streptomycin (PS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を添加したシュワン細胞培養液中で、ピペットで 30 回攪拌し、神経片から機械的に細胞を単離した。この細胞懸濁液を 40 μ m のセルストレーナーでろ過して組織片を除去し、ノンコートフラスコに 30 分間静置して線維芽細胞を除去した。細胞生存率はトリパンブルー (Life Technologies, Grand Island, NY) を用いて評価した。

1-4) 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、Sox10 (1:100, goat from R&D) 抗体を使用した。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) および DAPI を使用した。染色後、Mowiol (Sigma-Aldrich, USA) で封入してカバーガラス (NEO cover glass, Matsunami Glass Ind., Japan) を乗せ観察した。

1-5) 細胞接着率、形態の計測

上記手法で調製した R-SC および I-SC を 5.0×10^4 細胞/cm² の密度で、ポリ-L-リジン (PLL, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) およびラミニン (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO) でコーティングしたプレートに播種し、24 時間培養した。その後、細胞を 0.1M リン酸緩衝液(phosphate buffer : PB) 中 4% パラホルムアルデヒド(PFA、ナカライテスク株式会社、京都、日本) で固定した。オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence, Osaka, Japan) を用いて観察し、プレートに接着した SC (Sox10 陽性細胞) を播種細胞数で除した数を細胞接着率とした。形態評価は、位相差像にて細胞体から出ている突起数を計測した。

② 神経突起伸長効果

2-1) dorsal root ganglion(DRG)神経細胞の調製

DRG 神経細胞調製は過去の報告に準じて行った(Kadoya et al., 2009)。腰椎両側 DRG を採取後、3~5 個に切断し、0.5% collagenase XI (Sigma-Aldrich) を添加した DMEM/Ham's F-12 で、37°C で 1 時間酵素処理した。酵素含有培地を除去した後、DMEM/Ham's F12 に 2% B27 サプリメント (Thermo Fisher Scientific)、1% PS、1% GlutaMAX を添加した DRG 用培地を 1ml 加えた。1ml のピペットで DRG 片を穏やかに攪拌して細胞を単離し、細胞生存率をトリパンブルーで評価した。

2-2) SC と DRG 神経細胞の共培養

R-SC と I-SC を、PLL とラミニンでコートした 48 ウェルプレートに 2.0×10^6 細胞/cm² の密度で播種した。その 3 時間後に、 5.0×10^3 個/cm² の DRG 神経細胞を、DRG 用培地を用いて SC 上に播種した。48 時間後、4%

PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定した。蛍光免疫染色は、1-4)と同様に
行い、一次抗体は pan neurofilament (pNF, 1:1000, mouse, BioLegend, San
Diego, CA, United States) 抗体を使用した。

2-3) 神経突起長の定量化

免疫標識した神経突起長の計測は、過去の報告に準じて行った (Endo et al.,
2019a)。画像はオールインワン蛍光顕微鏡で撮影した。神経突起長は Image J
(Schneider et al., 2012) と Neuron J プラグインを用いて計測した。神経細胞間
の相互作用の影響を避けるために、他の神経細胞の神経突起と接触した神経細
胞は解析から除外した。50 μ m 以上の神経突起長を有する神経細胞を伸長神経
細胞と定義した (Omura et al., 2015)。各ウェル 50 個以上の神経細胞を無作為
に選択し、伸長神経細胞の割合と最長神経突起長の平均値を算出した。

③ 軸索再生効果

3-1) 無細胞野モデルの作成

無細胞野モデル作成は、過去の報告に準じて行った (Endo et al., 2019b)。ラ
ット坐骨神経を、マイクロ鉗子を用いて 25mm 間隔で 2ヶ所圧挫し、鉗子で境
界された領域を液体窒素で凍結・融解を 5 回繰り返して作成した。

3-2) 坐骨神経への SC 移植

上記手法で無細胞モデルを作成し、(1)R-SC 移植、(2)I-SC 移植、(3)細胞
移植なしの 3 群を比較検討した。細胞移植群では、10 μ l の PBS に溶解した
1.0 $\times 10^6$ 個の細胞を、NanoFil シリンジ (World Precision Instruments,
Sarasota, FL, United States) と 34 ゲージ針を用いて 4 か所から注入し、坐骨神
経の無細胞領域に移植した。細胞移植なし群では、10 μ l の PBS のみ注入し
た。2 週間後、4% PFA を使用して灌流固定した。

3-3) 灌流固定および神経組織標本の作成

全身麻酔下に瀉血、PBS 灌流を行った後、4% PFA で灌流固定を行い、坐骨
神経を採取した。4°C で 1 晩、4% PFA に浸漬させて、翌日に 30% スクロース
/ 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 10 μ m 厚の矢状断切片を作成した。蛍光免疫染色は、1-4)と同様に
行い、一次抗体は pNF 抗体を使用した。

3-4) 再生軸索の定量化

作成した切片は、オールインワン蛍光顕微鏡で観察した。軸索の定量化は過去

の報告に準じて行った (Endo et al., 2019b)。神経の中央部分から同じスライド上で連続した 3 つの切片を使用し、定量化を行うポイントで、切片に垂直な線をひき、各線を横切る軸索を計測した。正規化のために、3 つの切片の軸索数の和を、各線の長さの和で割り軸索密度とした。軸索再生の割合を算出するために、各ポイントの軸索密度を、損傷部位から 1.5mm 近位にある無損傷部位の密度で割った。有髄軸索数の定量化は、圧挫部から 25mm 遠位の地点で横断した坐骨神経の組織標本を作成後、坐骨神経の脛骨部と腓骨部の両方の中心を横切るように 50 μ m 幅の長方形の領域を設定し、有髄軸索の数を計測し、領域面積で割って 1 平方ミリメートルあたりの有髄軸索の密度を算出した。すべての定量化は、ブラインドで行った。

④ トランスクリプトーム解析

RNA 抽出は、TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) と RNeasy plus mini kit (Qiagen, Netherland) を用いて、前項と同様の手技で単離した R-SC および I-SC から抽出した。RNA 抽出液の完全性と品質は、Aglient 2100 bioanalyzer (Aglient Technologies, Santa Clara, CA, USA) で評価し、RNA integrity number (RIN) が 7 以上の 1 μ g 以上のサンプルを RNA-seq に使用した。TruSeq Strandard mRNA Sample Preparation Kit (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を使用して、各ライブラリーを作成し、Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, Inc.) で paired end leads(100bp)を得た。lead は *rattus norvegicus* のゲノム rn6 のアライメントでマッピングし、TopHat、Cufflinks、Cuffdiff で解析した。p 値 < 0.01 かつ log₂FC > 2 の遺伝子を differentially expressed genes (DE genes) と定義した。DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) データベースを用いて、Gene ontology および KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genome)解析を行った。

2. GFR α 1 の軸索再生・機能再生効果とその機序

⑤ 末梢神経損傷後のシュワン細胞の GFR α 1 発現と軸索再生効果の検討

5-1) SC の GFR α 1 発現

圧挫損傷 1 週間後の坐骨神経および正常坐骨神経それぞれの切片標本を作成後、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF、S100 β (1:200, rabbit, Abcam, Cambridge, United Kingdom)、GFR α 1 (1:1000, Goat, R&D Systems, Minneapolis, MN)を使用した。また、SC を 24 時間培養後、4%PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定し、蛍光免疫染色を行った。一次抗体は、S100 β 、GFR α 1 抗体を使用した。さらに、R-SC から GFR α 1 が分泌されていることを確認するため、R-SC 培養液のウエスタンブロッティング(western

blotting: WB)を下記方法で行った。WB の一次抗体は GFR α 1 抗体を使用した。

5-2) ウェスタンブロッティング(western blotting: WB)

培養細胞の全タンパク質を溶解バッファで抽出した後、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、ポリフッ化ビニリデン膜 (Immobilon-P Membrane; Merck, Darmstadt, Germany)に転写した。その後、膜を PBS に溶解した 5%粉乳 (脂肪分 1%未満)液中加入し室温で 1 時間ブロッキングし、続いて一次抗体を使用し 4°Cで一晩静置した。洗浄後、膜を horseradish peroxidase 標識二次抗体 (1:1000、Novus Biologicals)と室温で 1 時間静置した。バンドは Ez WestLumi Plus (ATTO, Tokyo, Japan)と Quantity One v4.6.9 (Bio-Rad)ソフトウェアを用いて可視化した。

5-3) GFR α 1 阻害実験 (In vitro)

R-SC を PLL とラミニンでコーティングした 48 ウェルプレートに 2.0×10^6 個/cm²の密度で播種し、その 3 時間後、R-SC 上に DRG 神経細胞を 1.0×10^4 個/cm²の密度で播種した。GFR α 1 の機能を調べるために、GFR α 1 中和抗体 (GFR α 1 Neut.Ab, 10 μ g/mL, R&D Systems, Minneapolis, MN)を DRG 培地に添加した。対照群には、ヤギ IgG 抗体 (10 μ g/mL, R&D Systems)を添加した (n=3/群)。48 時間培養後、4%PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定し、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF、S100 β 抗体を使用した。2-3)同様に神経突起長を定量化した。

5-4) GFR α 1 阻害実験 (In vivo)

再生軸索周囲の R-SC の GFR α 1 を阻害するため、ラット圧挫損傷モデルの圧挫部から 5mm と 15mm の部位に、34 ゲージの針と NanoFil シリンジを用いて、GFR α 1 中和抗体 (合計 6 μ g、1 μ g/1 μ l PBS)を注入した。試薬の注入は、損傷時と損傷後 7 日目の 2 回注入した。対照群には、ヤギの IgG 抗体 (合計 6 μ l、1 μ g/ 1 μ l PBS)を注入した(n=3/群)。2 週後、3-3)と同様にラットを灌流固定し、切片作成後、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF 抗体を使用した。3-4)と同様に再生軸索を定量化した。

⑥ GFR α 1 の神経突起伸長効果と GDNF-RET 依存性評価

6-1) GFR α 1 投与実験 (In vitro)

可溶性 GFR α 1 (sGFR α 1)の神経突起伸長効果を解析するために、DRG 神経細胞を播種した後、ラット GFR α 1 タンパク質 (10 μ g/mL, R&D Systems)

を DRG 培地に添加した。対照群には、Human IgG (10 μ g/mL, R&D Systems) を加えた (n=3/群)。また、固定化 GFR α 1 (immobilized GFR α 1: iGFR α 1) の効果を解析するために、ラット GFR α 1 タンパク質溶液 (PBS 中 10 μ g/mL) または対照タンパク質 (ヒト IgG タンパク質、10 μ g/mL、R&D Systems) をコーティング (37°C、3 時間) した培養プレートに DRG 神経細胞を播種した。48 時間培養後、4%PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定し、1-4) と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF 抗体を使用した。2-3) 同様に神経突起長を定量化した。

6-2) GFR α 1 の GDNF 非依存性確認

GFR α 1 の神経突起伸長効果の GDNF 非依存性を調べるために、iGFR α 1 上に DRG 神経細胞を播種し、DRG 培地に GDNF 中和抗体 (10 μ g/mL, Goat, R&D Systems) を添加した。対照群には、ラット GDNF タンパク質 (2 μ g/ml, PeproTech) および、ヒト IgG タンパク質 (2 μ g/mL、R&D Systems) およびヤギ IgG 抗体 (10 μ g/mL、R&D Systems) をそれぞれ組み合わせて使用し、計 7 群で比較した (n=6/群)。48 時間培養後、4%PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定し、1-4) と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF 抗体を使用した。2-3) 同様に神経突起長を定量化した。

6-3) プルダウン法

iGFR α 1 上に播種した DRG 神経細胞の培養液に GDNF 中和抗体もしくは対照抗体を加えて、24 時間培養した細胞を使用した。EzRIPA Lysis buffer, protease inhibitor, phosphatase inhibitor (ATTO, Tokyo, Japan) からなるバッファーを投与して培養細胞の全タンパク質を抽出した後、抽出液を 50 μ l の Dynabeads His-Tag Isolation and Pulldown 溶液 (Thermo Fisher Scientific) と混合した。混合液を室温で 10 分間回転攪拌した後、100mM リン酸ナトリウム、600mM NaCl、0.02% Tween-20 (pH8.0) からなる結合/洗浄バッファーで 4 回洗浄し、ビーズを回収した。300mM イミダゾール、50mM リン酸ナトリウム、300mM NaCl、0.01% Tween-20 からなる pH8.0 の his-elution buffer をビーズに加えた後、室温で 5 分間回転させた。溶出したヒスチジンタグ付きタンパク質を含む上清を WB で解析した。一次抗体は、抗 GFR α 1、GDNF、RET (1:1000, rabbit, Thermo Fisher Scientific) 抗体を使用した。

6-4) 固定化 GFR α 1 と固定化 GDNF の効果比較

iGFR α 1 上への GDNF コーティング (immobilized GDNF: iGDNF) の効果を解析するため、iGFR α 1 上に GDNF (2 μ g/ml, Pepro Tech) を投与し、3 時

間静置した。iGDNF に対する対照群には、ヒト IgG タンパク質を使用した (n=3/群)。DRG 神経細胞を播種し、48 時間培養後、4%PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定し、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF 抗体を使用した。2-3)同様に神経突起長を定量化した。

⑦ GFR α 1 の軸索再生機序の検討：受容体と細胞内シグナル

7-1) GFR α 1 のラミニン依存性の確認

PLL とラミニン、PLL のみでそれぞれコーティングした 48 ウェルプレートに GFR α 1 (10 μ g/mL) を投与し、37°C で 3 時間静置した。DRG 神経細胞を播種し(n=3/群)、48 時間培養後、4%PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定し、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF 抗体を使用した。2-3)同様に神経突起長を定量化した。

7-2) GFR α 1 の受容体同定

A) プルダウン法

PLL とラミニン、PLL のみでそれぞれコーティングした 48 ウェルプレートに GFR α 1 (10 μ g/mL) を投与し、37°C で 3 時間静置した。DRG 神経細胞を播種し、24 時間培養した細胞を使用した。6-3)と同様の方法で、プルダウン法を行い、WB で解析した。一次抗体は、GFR α 1、NCAM (1:500, rabbit, GeneTex, Irvine, CA, USA)、Itg β 1 (1:200, Goat, R&D Systems)、Itg α 7(1:200, rabbit, Thermo Fisher Scientific)を使用した。

B) 免疫染色

48 時間培養した DRG 神経細胞を 4%PFA 含有 0.1M PB を加えて固定した後、また、圧挫損傷 1 週間後の坐骨神経および正常坐骨神経それぞれの切片標本を作成後、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は、NCAM、Itg β 1、Itg α 7 抗体を使用した。神経突起および軸索でのそれぞれの発現を確認した。

C) NCAM 阻害

GFR α 1 の NCAM 依存性を調べるために、iGFR α 1 上で培養した DRG 神経細胞の培養液に NCAM 中和抗体(NCAM Neut.Ab, 10 μ g/mL, rabbit, Merck)を加えた。対照群には、rabbit IgG (10 μ g/mL、R&D Systems)を使用した (n=3/群)。48 時間培養後、4%PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定し、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF 抗体を使用した。2-3)同様に神経突起長を定量化した。

D) Itg β 1 阻害

GFR α 1 の Itg β 1 依存性を調べるために、iGFR α 1 上で培養した DRG 神経細胞の培養液に Itg β 1 中和抗体 (Itg β 1 Neut.Ab, 10 μ g/mL, Goat, R&D Systems)を加えた。対照群には、goat IgG (10 μ g/mL, R&D Systems)を使用した (n=3/群)。48 時間培養後、4%PFA 含有 0.1M PB を加えて細胞を固定し、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は pNF 抗体を使用した。2-3)同様に神経突起長を定量化した。

7-3) 細胞内シグナル

iGFR α 1 上で培養した DRG 神経細胞の培養液に GDNF 中和抗体もしくは GDNF タンパク質を加えて、24 時間培養した細胞を、WB で解析した。一次抗体は、FAK (1:1000, Sheep, R&D Systems)、FAK (Phospho-Tyr397)(1:1000, Rabbit, Signalway Antibody)、Fyn (1:1000, Mouse, R&D Systems)、Fyn (Phospho-Tyr530)(1:1000, Rabbit, Signalway Antibody)、PI3K (1:500, Rabbit, BioVision)、PI3K (Phospho-Tyr397)(1:1000, Rabbit, Thermo Fisher)、ERK1/ERK2 (1:1000, Mouse, R&D Systems)、ERK1/ERK2 (Phospho-Thr202/Tyr204)(1:1000, Rabbit, Cell Signaling)抗体を使用した。

⑧ 軸索再生効果

圧挫損傷モデルを用い、圧挫部から 5mm と 15mm 遠位に、34 ゲージ針と NanoFil シリンジを用いて、GFR α 1 (合計 4 μ g、1 μ g/ 1 μ l PBS)と GDNF 阻害抗体 (合計 4 μ g、1 μ g/ 1 μ l PBS) を損傷直後に投与した。対照群には、ヒト IgG タンパク質とヤギ IgG 抗体を使用した (n=3/群)。損傷 1 週後にラットを灌流固定し、1-4)と同様に蛍光免疫染色を行った。一次抗体は SCG10 (1:1000, rabbit, Novus Bio, Centennial)抗体を使用し、2-3)同様に再生軸索を定量化した。

⑨ 機能再生効果

圧挫損傷モデルの圧挫部から 5mm と 15mm の部位に、34 ゲージの針と NanoFil シリンジを用いて、GFR α 1 (合計 4 μ l、1 μ g/1 μ l PBS)を、損傷時と損傷 7 日後の 2 回に分けて投与した。コントロールとして、ヒト IgG タンパク質を用いた (n=9/群)。損傷 8 週後にラットを灌流固定した。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。

歩行解析：トレッドミルでの歩行分析は、DigiGait システム (Mouse Specifics 社、Quincy, MA, USA)を用いて、過去の報告に準じて行った (Ganguly A, et al., 2017)。トレッドミルは 10cm/s の速度でスタートし、ラットが歩行可能な限り 20cm/s まで速度を上げた。歩行ビデオは、DigiGait Imaging and Analysis software 12.2 (Mouse Specifics 社)を用いて解析した。5 回の試行を行い、3 回の試行の平均値を受傷前の値で割って算出した。

感覚機能：感覚機能は、過去の報告に準じて、electric Von Frey テストと Hargreaves テストで評価した (Hargreaves et al., 1988; Nirogi et al., 2012; Deus et al., 2017)。後肢の機械的閾値は、Dynamic Planter Aesthesiometer (Ugo Vasil, Varese, Italy)を用いて測定した。0~50g のベンディング力を持つフィラメントで、後肢の左足中央部を 2.5g/秒の速度で刺激した。逃避反応が観察されたときのベンディング力を記録した。各足について 5 回の試行を行い、その平均時間を損傷前の値で割った。後肢の熱閾値は、Hargreaves 装置 (Ugo Basile, Varese, Italy)を用いて評価した。熱刺激は 35°C から 70°C まで、2.5°C 間隔で 10 秒間、後肢の逃避反応が観察されるまで加えた。5 回の試行の平均時間を受傷前の値で割った。

電気生理学：損傷神経の電気生理学的解析は、Neuropack MEB-9102 (日本光電工業、東京、日本)を用いて行った (Sayanagi et al., 2020)。全身麻酔下で、損傷部近位に双極性刺激電極を装着し、前脛骨筋に挿入した電極により複合筋活動電位と終末潜時を記録した。潜時 (latency)、神経伝導速度 (NCV)、および振幅 (amplitude)を測定した。

筋重量：ラットを灌流固定した後、前脛骨筋 (TA: tibialis anterior) と腓腹筋 (Gastro: gastrocnemius) を近位と遠位の骨付着部で切開し、その重量を測定した。

再髄鞘化：再髄鞘化軸索の評価のために、ラット灌流固定後、続いて 2.5% グルタルアルデヒド (TAAB, Berks, England) を加えた。坐骨神経の最遠位部をエポキシ樹脂に包埋し、1 μ m で軸方向に切片を作成した後、トルイジンブルーで染色した。画像はオールインワン蛍光顕微鏡を用いて撮影した。

⑩ 統計

複数群間の比較は、一元配置分散分析 (ANOVA) と Tukey-Kramer 検定を用いて行い、2 群間の比較は、対応のない両側の Student's t 検定を用いて行った。すべての解析は、JMP ソフトウェア (SAS, Cary, NC, USA) を用いて、事前に指定した有意水準 95% で行った。データは平均値 \pm 平均の標準誤差 (SEM) で示した。

結果

1. 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 細胞学的特徴

I-SC と R-SC の細胞学的機能を比較検討した。SC のマーカーは、あらゆる表現型の SC に発現する (Zhanhu et al., 2016; Jagalur et al., 2011) Sox10 を用いた。培養 24 時間後の接着細胞は、いずれの細胞も 90% 程度の純度を有していた (図 1a)。細胞の接着率を、Sox10 陽性細胞数を全培養細胞数で除して計測すると、R-SC は I-SC より 1.5 倍高い接着率を有していた (図 1b)。次に、接着細胞の形態を位相差像にて比較した。SC の形態は、突起を伸ばすように変化すると報告されているため (Mitchel & Hoffman, 2011; Wang et al., 2012)、伸長突起数を計測したところ、R-SC の方が、より多くの突起を伸ばすように形態が変化することが明らかになった (図 1c)。以上の結果から、損傷シグナルを受けた SC は、より突起を伸ばすように形態を変化させ、接着能力に優れることがわかった。

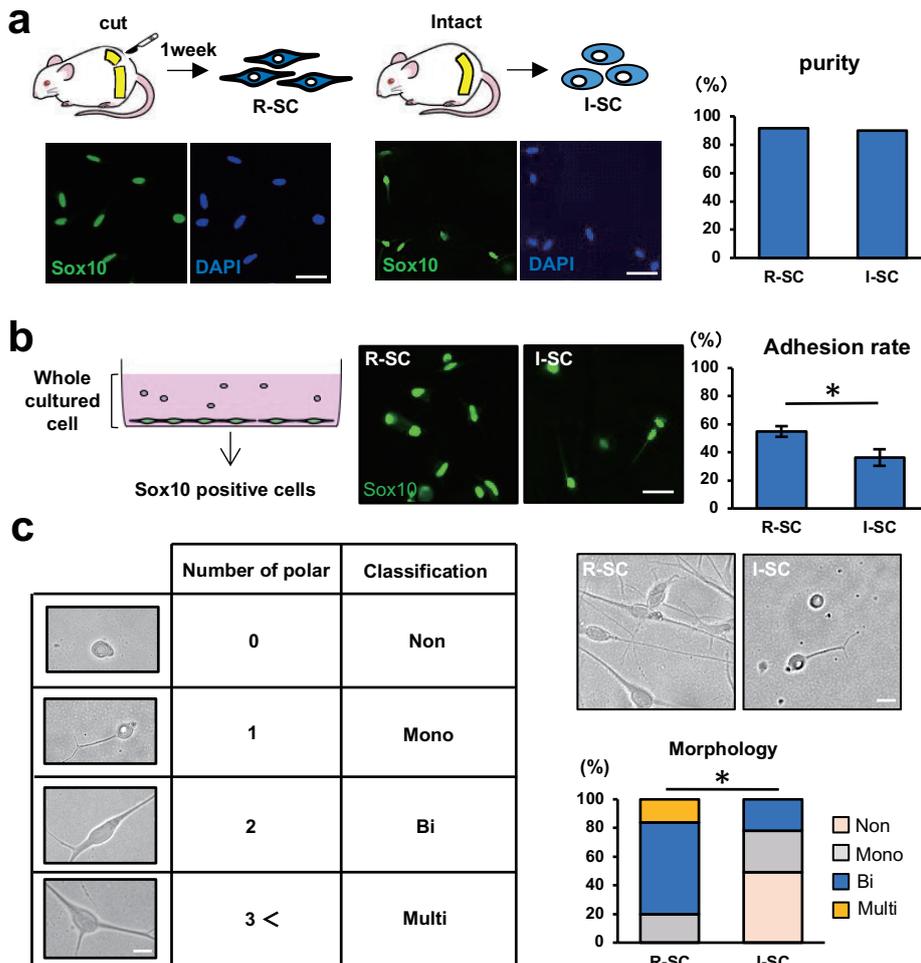


図 1. SC の形態学的特徴

- a. 左：R-SC 調製のシェーマと Sox10、DAPI 染色像。
中央：I-SC 調製のシェーマと Sox10、DAPI 染色像。スケールバー：10 μ m
右：SC の純度。縦軸：Sox10 陽性細胞数を DAPI 陽性細胞数で除した割合。
- b. 左：SC を培養したシェーマ。
中央：SC の Sox10 染色像。スケールバー：10 μ m
右：接着率。縦軸：Sox10 陽性細胞数を全培養細胞数で除した割合。
* $P < 0.05$: Student's test. Error bars represent the SEM.
- c. 左：SC の突起数での分類。スケールバー：10 μ m
右：培養 SC の位相差像と、形態の定量化。縦軸：培養 SC を突起数で分類した割合。
* $P < 0.05$: Student's test. Error bars represent the SEM.

② 神経突起伸長効果

R-SC と I-SC の神経突起伸長効果を比較するため、DRG 神経細胞と共培養を行った。接着した SC 上に DRG 神経細胞を播種し(図 2a, b)、平均神経突起長および伸長神経細胞率を計測した。SC と共培養した群は、非共培養群よりいずれも有意に高かった。R-SC 群と I-SC 群との比較では、伸長神経細胞率に有意差はなかったが、神経突起長は R-SC の方が 1.8 倍有意に伸長した(図 2c)。この結果は、神経細胞は SC の作用にて神経突起伸長効果を得るが、その効果は R-SC の方が明らかに高いことを示している。

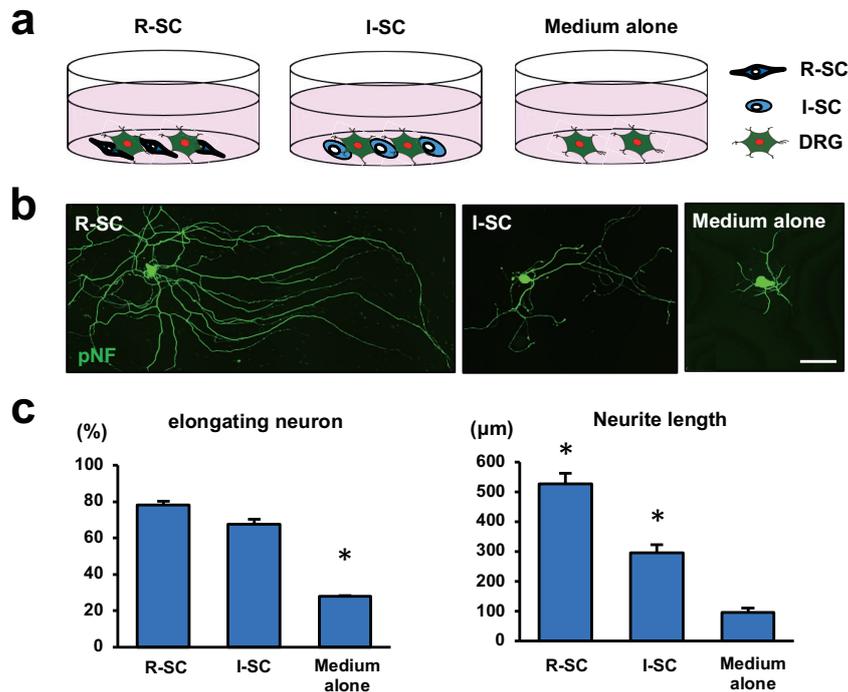


図 2. 神経突起伸長効果

- a. SC と DRG 神経細胞共培養のシエーマ。
 b. pNF 染色による神経突起長の評価。スケールバー: 100 μm
 c. 左: 伸長神経細胞率。縦軸: 伸長神経細胞率(%).
 右: 平均神経突起長。縦軸: 平均神経突起長(μm).

Data are presented as mean \pm SE. * $p < 0.05$ to others ONE-WAY ANOVA and Tukey-Kramer test.

③ 軸索再生効果

R-SC と I-SC の軸索再生効果を比較するため、ラット坐骨神経へ細胞移植を行った。SC 単独の効果をみるため、圧挫神経に凍結・融解を繰り返すことで作成した無細胞野に、移植を行った(図 3a)。非細胞移植群と比較して、SC 移植群は、いずれも有意に高い軸索再生効果を示した。さらに、R-SC 移植群は、I-SC 移植群と比べて、より多くの軸索を長く伸ばす傾向にあった(図 3b, c)。この結果は、SC 移植による軸索再生効果は、R-SC がより高いことを示している。

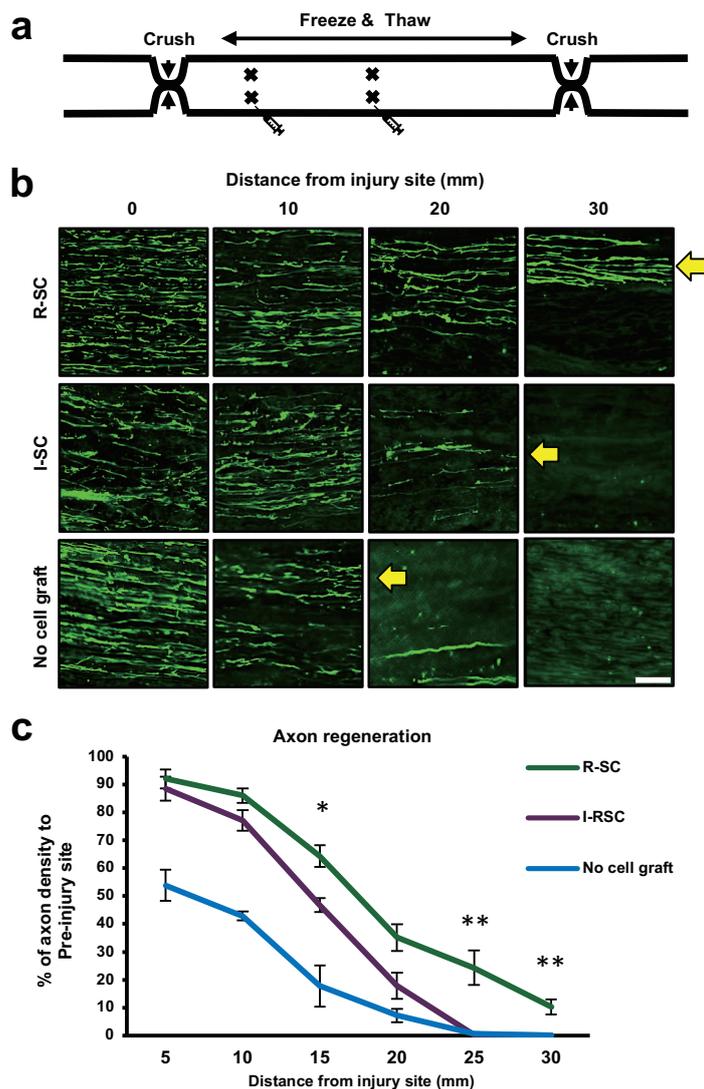


図 3. 軸索再生効果

- 坐骨神経無細胞野への細胞移植のシエーマ。
- pNF 染色による軸索の評価。スケールバー: $100\ \mu\text{m}$
- 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 others ONE-WAY ANOVA and Tukey-Kramer test.

④ トランスクリプトーム解析

R-SC と I-SC の軸索再生効果の分子メカニズムの違いを検索するため、RNA-seq でトランスクリプトーム解析を行った。R-SC と I-SC 間で約 10,000 個の

differentially expressed (DE) RNA を同定した。さらに、FPKM 値が 10 以上かつ $\log_2(\text{fold change})$ が 1.5 以上である遺伝子は約 800 個あり、R-SC と I-SC の遺伝子発現が明らかに異なることを示していた。R-SC と I-SC それぞれで発現が上昇している RNA の特徴を、gene ontology (GO) にて解析した (図 4a)。興味深いことに、いずれも cell adhesion に関する遺伝子の関与が同定された。しかし、その他の機能は明らかに異なっており、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ることが明らかになった。これは、シュワン細胞が損傷のシグナルを契機に、その働きを組織維持から組織再生にシフトすることを示唆している。

また、KEGG の pathway 解析を行ったところ、I-SC で発現が上昇した遺伝子群と最も関連した pathway は、Rap1 signaling pathway であった。また、その他は cAMP や cGMP-PKG signaling pathway も強く関連していた。Rap1 は、ミエリン関連糖タンパク質のシグナル伝達に関与している (Taniguchi et al., 2008) ことや、成長円錐内の cAMP と cGMP の比が、axon guidance に関係している (Hong et al., 2000; Nishiyama et al, 2003) ことから、I-SC で発現が上昇した遺伝子群が関連する pathway は、ミエリンの維持や、軸索ガイダンスに関するものが多いことがわかった。一方、R-SC に関連する pathway は、異物代謝、炎症に関与するものが主であった。軸索損傷時にエネルギー危機や炎症が起こるため (Giza & Hovda, 2014; Barkhoudarian et al, 2016)、それらに関与する反応である可能性が高いと考えた。

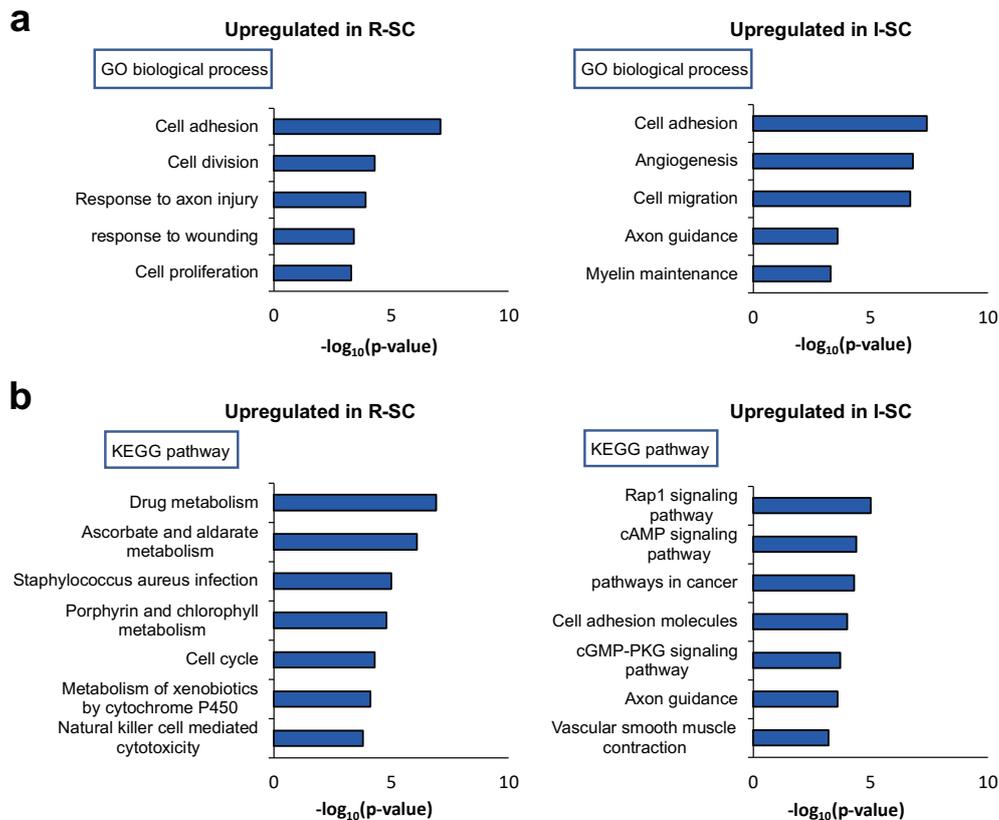


図 4. トランスクリプトーム解析

- SC 発現上昇因子の gene ontology 解析。
- SC 発現上昇因子の KEGG pathway 解析。

2. GFR α 1 の軸索再生・機能再生効果とその機序

⑤ 末梢神経損傷後の SC の GFR α 1 発現と軸索再生効果

成ラットを使用し、正常神経および損傷神経の SC の、GFR α 1 の発現をそれぞれ確認した(Enomoto et al., 2004)。GFR α 1 は、再生軸索に関連する SC で発現が検出されたが、正常神経に関連する SC では検出されなかった(図 5a)。同様に、GFR α 1 は、損傷神経由来の培養 SC でのみ検出された(図 5b)。重要なのは、GFR α 1 が SC の培養液にも含まれていたことで(図 5c)、末梢神経損傷後に SC が GFR α 1 を分泌していることが示された(Paratcha et al., 2001)。SC による GFR α 1 の発現が軸索再生に関与しているかどうかを調べるために、SC と成体 DRG 神経細胞の共培養系に中和抗体を加えて GFR α 1 を阻害した(図 5d)。GFR α 1 の阻害により、DRG 神経細胞の神経突起の伸長距離が約 40%短縮した(図 5e, f)。さらに、GFR α 1 の中和抗体および対照抗体

を坐骨神経に局所的に注射することで、損傷坐骨神経における $GFR\alpha 1$ の機能阻害の影響を検討した(図 5g)。2 週間後、中和抗体を投与した群は、対照抗体を投与した群に比べて、軸索の再生が著しく低下していた(図 5h, i)。以上のことから、末梢神経損傷後、SC は $GFR\alpha 1$ の発現・分泌を増加させ、 $GFR\alpha 1$ の発現増加が SC による軸索伸長・再生効果に寄与していることが明らかになった。

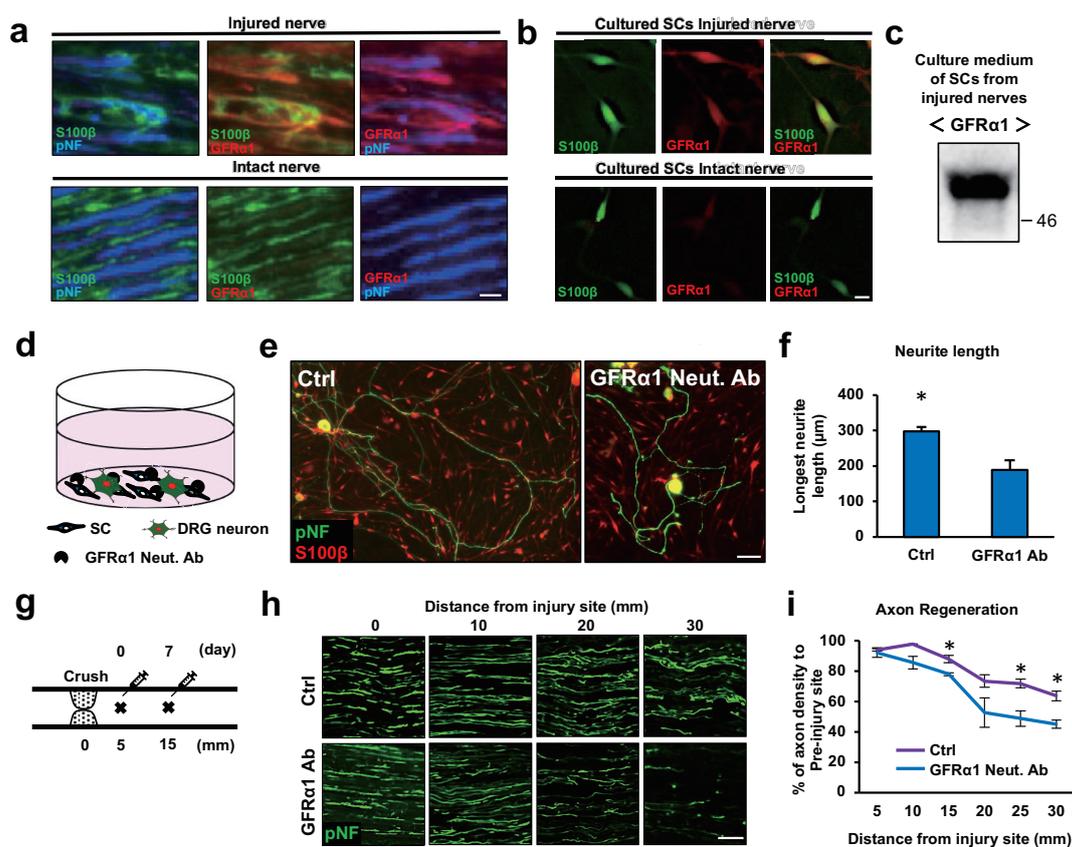


図 5. SC の $GFR\alpha 1$ 発現と軸索再生効果

- 軸索周囲 SC の $GFR\alpha 1$ 発現。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$
- 培養 SC の $GFR\alpha 1$ 発現。スケールバー: $10\ \mu\text{m}$
- R-SC 培養液の $GFR\alpha 1$ 発現。
- SC と DRG 神経細胞共培養系に $GFR\alpha 1$ 中和抗体を添加したシエーマ。
- pNF、S100 β 染色による神経突起長、SC の評価。スケールバー: $100\ \mu\text{m}$
- 神経突起長。縦軸: 平均神経突起長 (μm)。* $P < 0.05$: Student's test. Error bars represent the SEM.
- 圧挫神経へ $GFR\alpha 1$ 中和抗体を局所投与したシエーマ。
- pNF 染色による再生軸索の評価。スケールバー: $100\ \mu\text{m}$

- i. 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)

* $P < 0.05$: Student's test. Error bars represent the SEM.

⑥ 神経突起伸長効果と GDNF-RET 依存性評価

GFR α 1 は RET とともに GDNF の共受容体として機能しているので(Chen et al., 2018; Jessen et al., 2016)、先の実験で観察された軸索の障害は、GDNF の効果が阻害された結果であると考えられる。GFR α 1 のリガンドとしての作用を確認するため、GFR α 1 の外因性投与が成体 DRG 神経細胞の神経突起伸長に及ぼす影響を調べた。sGFR α 1 と iGFR α 1 いずれも、対照群に比べて伸長する神経細胞の割合と最長の神経突起の長さが有意に増加した(図 6a-f)。DRG 中の衛星細胞は、培養された DRG 神経細胞標本に常に存在し、少量の GDNF を分泌し(Avraham et al., 2020)、投与された GFR α 1 と複合体を形成してシグナル伝達を行う可能性がある。この問題を検証するために、GDNF 中和抗体を培養液に加えた(図 6g)。驚くべきことに、GDNF シグナルを阻害すると、GFR α 1 投与による神経突起伸長効果は減少するのではなく、さらに促進された(図 6h)。これは、外因性に投与された GFR α 1 が、正規の GDNF-RET 経路とは独立して神経突起伸長効果を発揮することを示している。さらに、GFR α 1 のプルダウン法では、GDNF 中和抗体が GDNF と RET との結合を完全に阻害することが示され(図 6i)、GFR α 1 の効果が GDNF-RET シグナルから独立していることが確認された。次に、GFR α 1 の神経突起伸長効果が、GDNF の添加によってどのように影響されるかを調べた。培養プレートに GDNF を固定化した場合(図 6j)、固定化 GFR α 1 の効果は著しく減弱した(図 6k)ことから、GDNF-GFR α 1 複合体は GFR α 1 単独よりも神経突起伸長を刺激する効果が低いことが示唆された。可溶性 GDNF を添加すると、予想通りに神経突起伸長が促進されたが、可溶性 GDNF と固定化 GFR α 1 の組み合わせでは、神経突起伸長に対する相加効果は得られなかった(図 6h)。これらの結果は、固定化されたすべての GFR α 1 が GDNF と複合体を形成し、GDNF の効果が飽和したためと考えられる(Jessen et al., 2016; Mills et al., 2007)。一方、GFR α 1 と GDNF 阻害の組み合わせは、試験したすべての条件において、神経突起の伸長を最も効果的に促進した(図 6h)。これらの結果は、GFR α 1 は GDNF-RET シグナルとは独立して、成体 DRG 神経細胞の神経突起伸長を刺激するリガンドとして機能し、その神経突起促進効果は GDNF-RET シグナルの刺激よりも大きいことを示している。

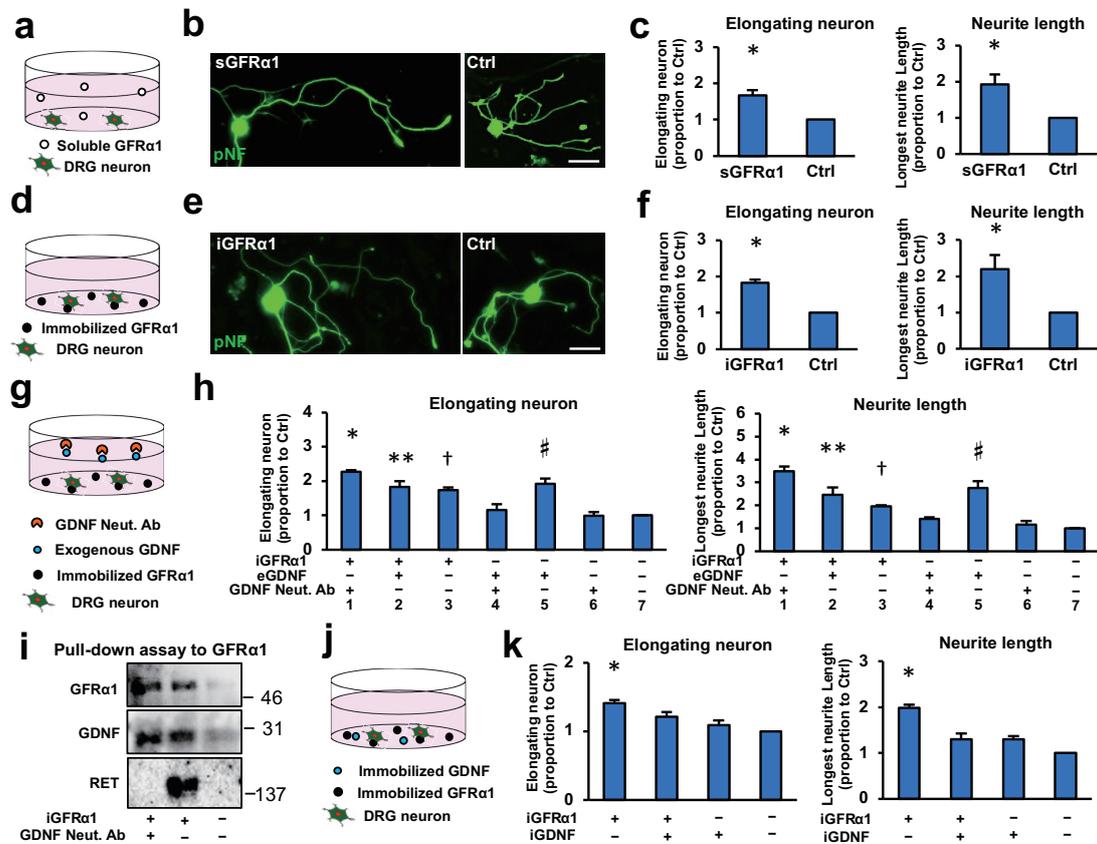


図 6. GFR α 1 投与による軸索再生効果と GDNF-RET 依存性評価

- a. DRG 神経細胞に sGFR α 1 を投与したシェーマ。
b. pNF 染色による神経突起長の評価。スケールバー: 100 μ m
c. 左: 伸長神経細胞率。右: 平均神経突起長。縦軸: コントロールに対して標準化した値。
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.
d. iGFR α 1 上で DRG 神経細胞を培養したシェーマ。
e. pNF 染色による神経突起長の評価。スケールバー: 100 μ m
f. 左: 伸長神経細胞率。右: 平均神経突起長。縦軸: コントロールに対して標準化した値。
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.
g. iGFR α 1 上で培養した DRG 神経細胞に GDNF、GDNF 中和抗体を添加したシェーマ。
h. 左: 伸長神経細胞率。右: 平均神経突起長。縦軸: コントロールに対して標準化した値。
左: *P < 0.05 compared to 3, 4, 6 and 7, **P†P‡P < 0.05 compared to 4, 6

and 7. 右: *P < 0.05 compared to 3,4, 6 and 7, **P#P < 0.05 compared to 4, 6 and 7. †P < 0.05 compared to 7. One-way ANOVA with the Tukey-Kramer test. Error bars represent the SEM.

- i. GFR α 1 のプルダウン法。GFR α 1、GDNF、RET の発現評価。
- j. iGFR α 1 と iGDNF 上で DRG 神経細胞を培養したシェーマ。
- k. 左: 伸長神経細胞率。右: 平均神経突起長。縦軸: コントロールに対して標準化した値。

*P < 0.05 compared to others. One-way ANOVA with the Tukey-Kramer test. Error bars represent the SEM

⑦ 軸索再生機序

GFR α 1 の受容体を同定するために、細胞外マトリックスがリガンドと受容体の結合の親和性を調節できることから、神経突起伸長に対する GFR α 1 効果のラミニン依存性を調べた(Hynes, 2009; Geiger et al., 2009)。興味深いことに、GFR α 1 はラミニンコーティングがない状態では神経突起の伸長に影響を与えなかった(図 7a)。このことは、GFR α 1 の受容体がラミニンによって活性化される可能性を示唆している。そこで、プルダウンアッセイを行ったところ、ラミニンの受容体である Itg α 7 β 1(Barczyk et al., 2010) が GFR α 1 と結合していることが明らかになった(図 7b)。また、NCAM が GFR α 1 と結合することも明らかになった(図 7b)(Sergaki et al., 2017)。重要なことは、Itg α 7 と NCAM の GFR α 1 への結合は、ラミニンの非存在下では弱まっていたことで、Itg の活性化が NCAM の受容体複合体への関与を制御していることが示唆された。さらに、免疫標識法により、NCAM と Itg α 7 β 1 が、培養した DRG 神経細胞の神経突起(図 7c)と、末梢神経損傷後に再生した軸索(図 7d)に発現していることが確認され、軸索上で GFR α 1 の受容体として機能している可能性が示された。次に、GFR α 1 がもつ神経突起伸長効果の NCAM 依存性を調べるために、中和抗体を用いて NCAM の機能を阻害した。NCAM を阻害すると、GFR α 1 の効果は完全に消失した(図 7e)。さらに、Itg β 1 を中和抗体で阻害して Itg 依存性を調べたところ、同様に GFR α 1 の神経突起伸長効果は完全に消失した(図 7f)。以上のことから、GFR α 1 はリガンドとして、ラミニン存在下で NCAM と Itg α 7 β 1 の複合体に結合し、神経細胞の伸長を促進することが明らかになった。

さらに、GFR α 1 をリガンドとして刺激した神経細胞の細胞内シグナルを明らかにするため、DRG 神経細胞の WB を行った(図 8a)。対照群として GDNF 投与群を用いた。Fyn は NCAM や Itg の下流のシグナル伝達のメディエーターとして知られているので(Beggs et al., 1997; Paratcha et al., 2003)、そ

の発現を調べたが、GFR α 1 や GDNF 投与による、Fyn およびリン酸化 Fyn の発現上昇はなかった。ERK1/2 は GDNF-GFR α 1-RET の下流シグナルメディエーターとして知られており (Iwase et al., 2005 : Carmillo et al., 2005 : You et al., 2001)、GDNF 存在下では予想通りリン酸化の亢進が認められたが、GDNF 中和抗体存在下の GFR α 1 ではリン酸化の亢進は認められなかった (図 8a, b)。PI3K のリン酸化は、軸索の再生を調節することが知られており (Mao et al., 2019: Nieuwenhuis et al., 2020: Wang et al., 2020)、GDNF シグナルを阻害した GFR α 1 によって最も大きく増加したが (図 8a, b)、GDNF 投与のみでは増加しなかった。これらの結果は、GFR α 1 がリガンドとして機能して神経突起伸長を促進する場合は、GDNF の受容体として機能する場合とは異なり、PI3K シグナルを増強することを示している。

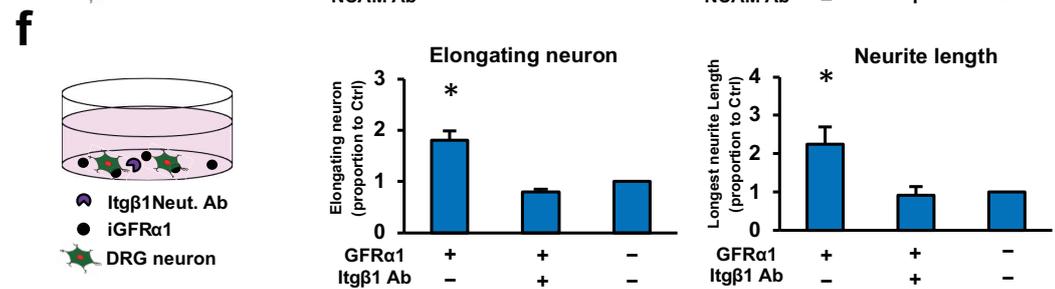
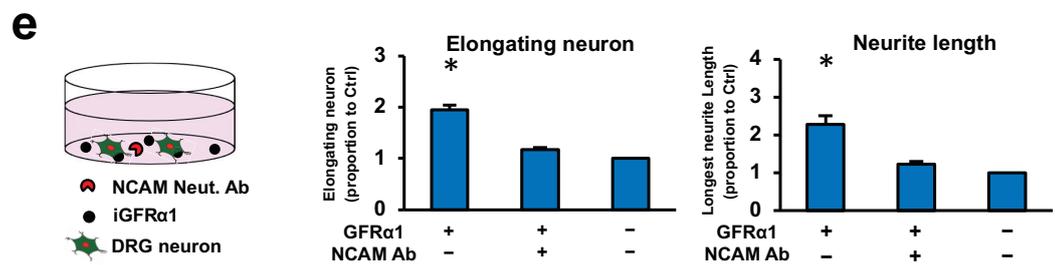
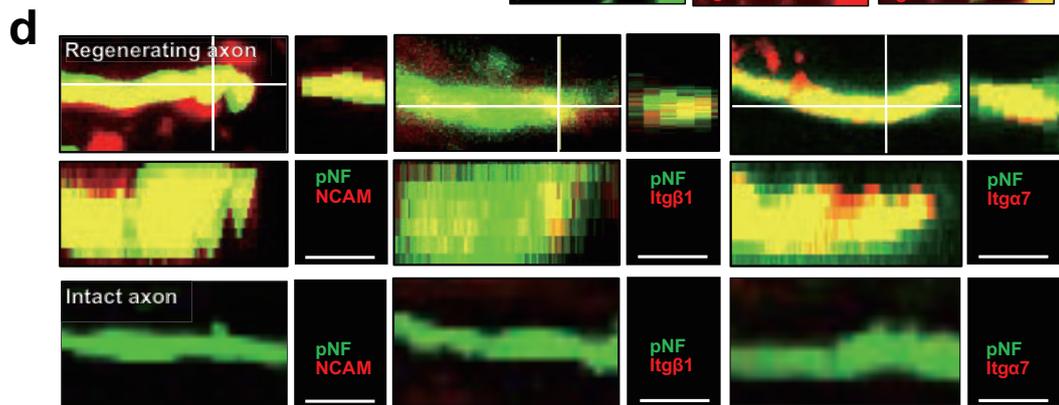
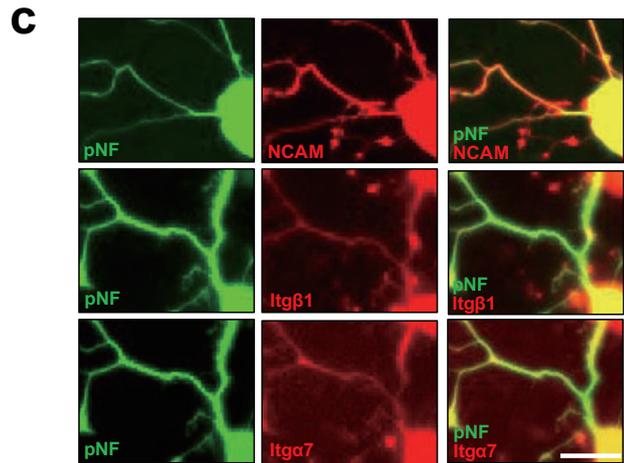
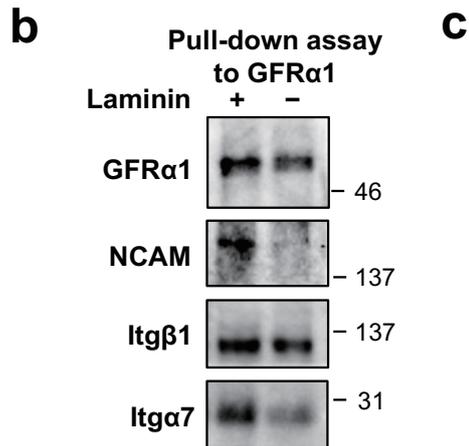
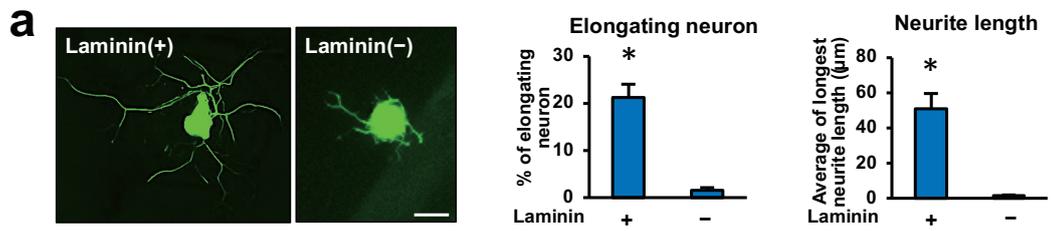


図 7. GFR α 1 の受容体

- a. 左：pNF 染色による神経突起長の評価。スケールバー: 100 μ m
 中央：伸長神経細胞率。縦軸：伸長神経細胞率(%)。
 右：平均神経突起長。縦軸：平均神経突起長(μ m)。
 *P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.
- b. GFR α 1 のプルダウン法。GFR α 1、NCAM、Itg α 7、Itg β 1 の発現評価。
- c. DRG 神経細胞の NCAM、Itg α 7、Itg β 1 発現評価。
- d. 再生軸索の NCAM、Itg α 7、Itg β 1 発現評価。
- e. 左：iGFR α 1 上で培養した DRG 神経細胞に NCAM 中和抗体を添加したシェーマ。
 中央：伸長神経細胞率。縦軸：コントロールに対して標準化した値。
 右：平均神経突起長。縦軸：コントロールに対して標準化した値。
 *P < 0.05 compared to others. One-way ANOVA with the Tukey-Kramer test. Error bars represent the SEM.
- f. 左：iGFR α 1 上で培養した DRG 神経細胞に Itg β 1 中和抗体を添加したシェーマ。
 中央：伸長神経細胞率。縦軸：コントロールに対して標準化した値。
 右：平均神経突起長。縦軸：コントロールに対して標準化した値。
 *P < 0.05 compared to others. One-way ANOVA with the Tukey-Kramer test. Error bars represent the SEM.

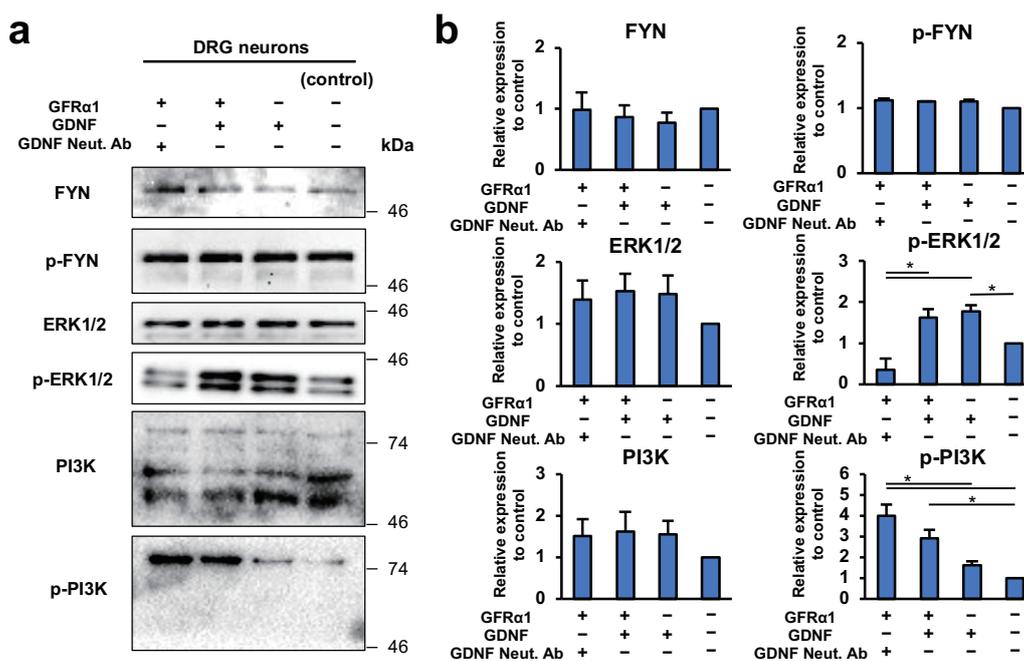


図 8. GFR α 1 の軸索再生細胞内シグナル

- a. iGFR α 1 に GDNF、GDNF 中和抗体を添加した培養 DRG 神経細胞の WB 画像。FYN、リン酸化 FYN、ERK1/2、リン酸化 ERK1/2、PI3K、リン酸化 PI3K の発現を解析した。
- b. WB でのタンパク質発現の半定量化。縦軸：コントロールに対して標準化した値。
*P < 0.05 compared to others. One-way ANOVA with the Tukey-Kramer test. Error bars represent the SEM.

⑧ 軸索再生効果

GFR α 1 が成体 DRG 神経細胞の神経突起伸長を促進した結果に基づいて、GFR α 1 の末梢神経損傷後の軸索再生効果を検討した。成体ラットの坐骨神経圧迫損傷の直後に、GFR α 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た。1 週間後、GFR α 1 と GDNF 中和抗体の両方を投与した群は、3 群の中で最も軸索再生量が大きかった (図 9a-c)。一方、GFR α 1 のみを投与された群は、対照タンパク質と対照抗体を投与した群に比べて、中程度ではあるが有意に多くの軸索再生量を認めた (図 9a-c)。以上のことから、GFR α 1 の損傷神経への局所投与は軸索再生を促進し、GDNF-GFR α 1-RET のシグナルを同時に阻害することで軸索再生をさらに促進することが示された。

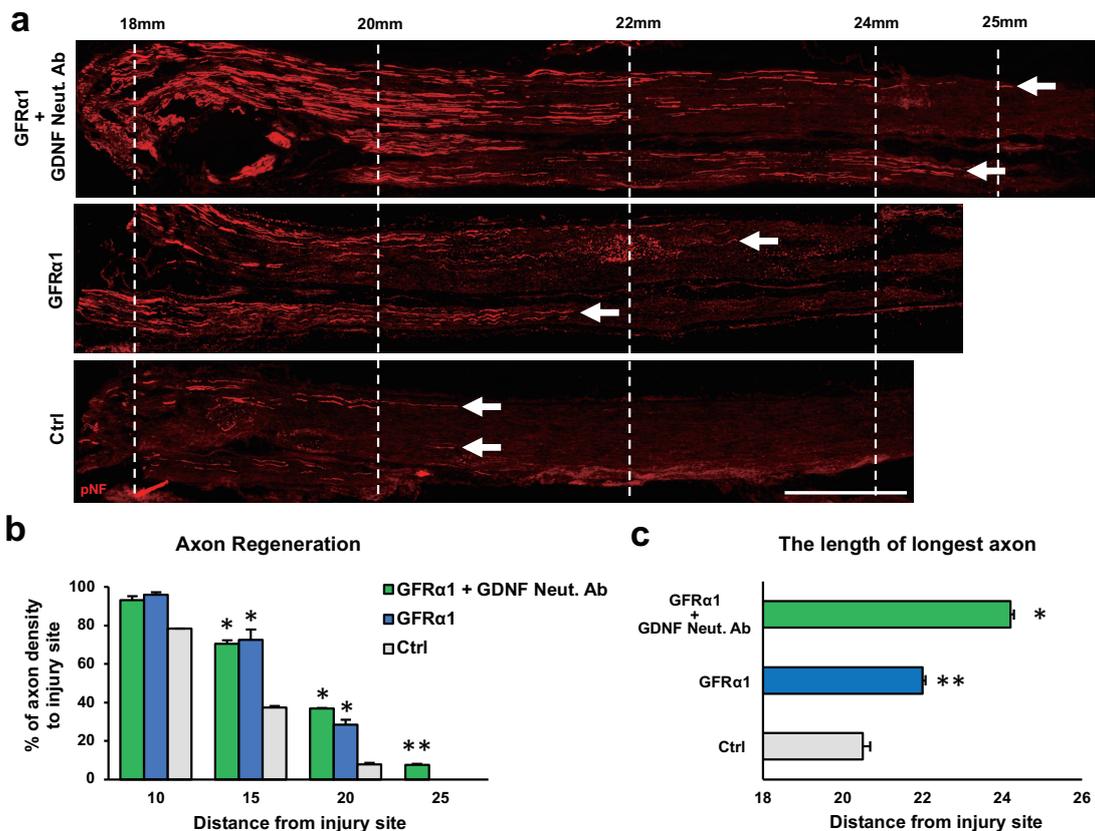


図9. GFRα1の軸索再生効果

a. pNF染色による再生軸索の評価。スケールバー: 1mm

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(mm)。

*P < 0.05 vs c control. **P < 0.05 vs others. One-way ANOVA with the Tukey-Kramer test. Error bars represent the SEM.

c. 最長再生軸索。横軸: 損傷部からの距離(mm)。

*P, **P < 0.05 compared to others. One-way ANOVA with the Tukey-Kramer test. Error bars represent the SEM.

⑨ 機能再生効果

次に、末梢神経損傷後の機能回復を評価することで、GFRα1の治療効果を調べた。ラット坐骨神経を圧迫した直後、先の実験と同様にGFRα1を損傷神経に局所投与し、その後8週観察した。Hargreavesテストでは、対照群では損傷後4週で患肢の反応時間が延長したのに対し、GFRα1群の反応時間は損傷前と近い値であった(図10a)。損傷後8週の時点では、両群ともに反応時間に有意な差はなかった。von Freyテストでは、損傷後4週の時点で、GFRα1投

与群の反応時間は対照群に比べて損傷前に近い値であった。損傷後8週では、両群間の反応時間に有意な差はなかった(図10b)。以上の結果から、ラット坐骨神経圧迫モデルにおいて、熱刺激および接触刺激で評価した感覚機能は、GFR α 1投与で回復が促進することがわかった。歩行解析の結果では、受傷後4週の時点で、両群間でstanceとstrideの時間に有意な差はなかった(図10c)。損傷後8週で、GFR α 1投与群のstanceとstrideの時間は、対照群よりも損傷前と近い値であった(図10c)。足部の機能については、損傷後、paw lengthに有意な変化はなかったのに対して、paw widthは、GFR α 1投与群において、損傷後4週で有意に改善した(図10d)。これらの結果は、GFR α 1投与が末梢神経損傷後の歩行機能の回復を促進することを示している。損傷坐骨神経の電気生理学的検査では、複合筋活動電位の神経伝導速度(NCV)には群間で有意な差がなかった。しかし、潜時(latency)はGFR α 1投与群で短縮する傾向がみられた($p=0.1$)。振幅(amplitude)は、GFR α 1投与群のTAで、対照群に比べて約2倍の数値であった(図10e)。さらに、GFR α 1投与群のTA筋重量は、対照群に比べて有意に増加しており(図10f)、GFR α 1投与が筋萎縮を抑制していることが示唆された。最後に、坐骨神経の最遠位部の有髄軸索数を定量化したところ、GFR α 1投与群は対照群に比べて有意に有髄軸索数が多く(図10g)、GFR α 1投与が軸索の再生と再髄鞘化を促進したことが示された。以上のことから、GFR α 1の局所投与は、末梢神経損傷後の機能回復を促進することが明らかになった。

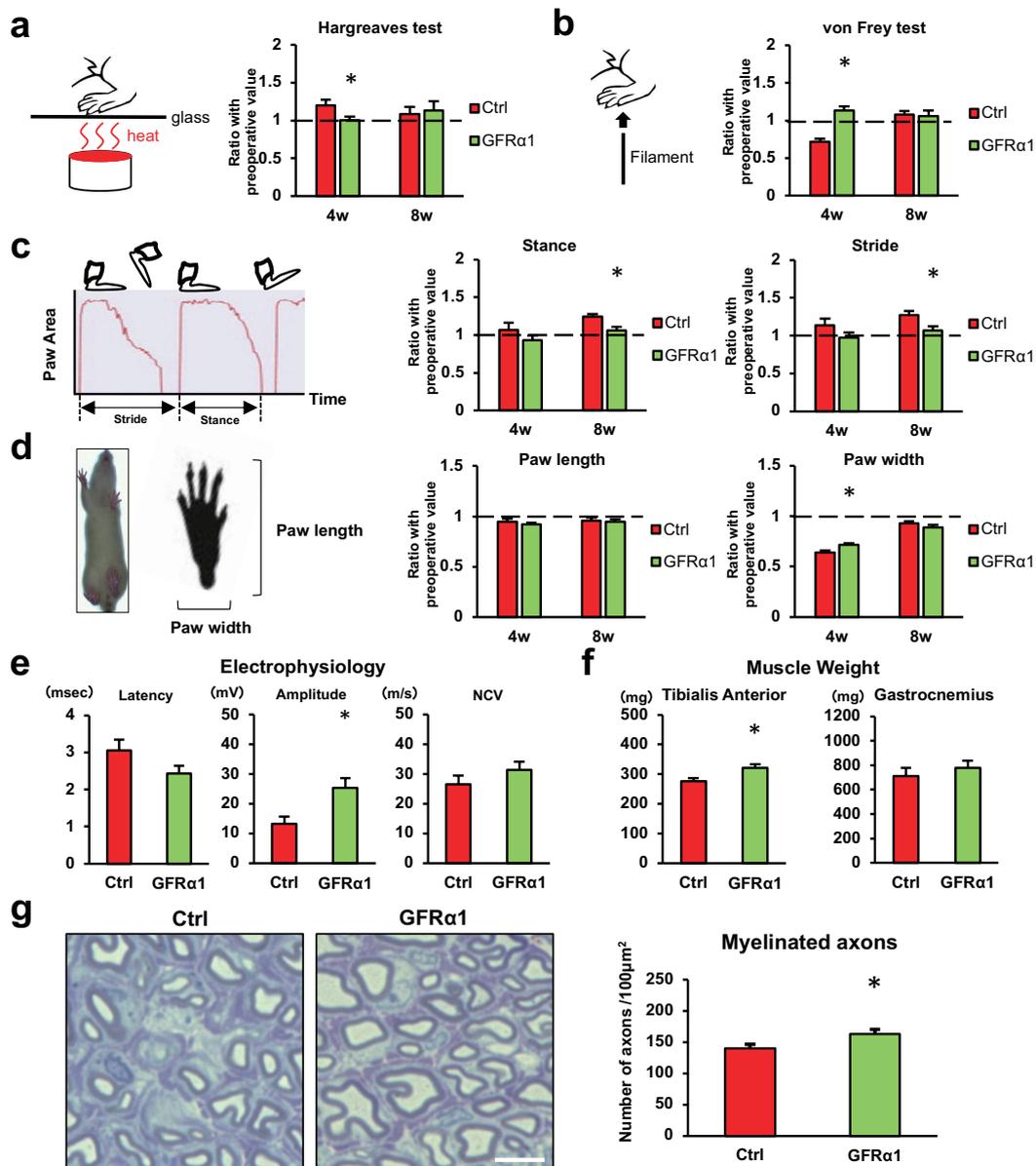


図 10. 機能再生効果

- a. 左：Hargreaves テストのシェーマ。右：損傷前の値で標準化した値。
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.
- b. 左：von Frey テストのシェーマ。右：損傷前の値で標準化した値。
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.
- c. 左：Digi-gait 解析による stance と stride のシェーマ。
中央：stance を損傷前の値で標準化した値。
右：stride を損傷前の値で標準化した値。
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.

- d. 左：paw length と width のシェーマ。
中央：paw length を損傷前の値で標準化した値。
右：paw width を損傷前の値で標準化した値。
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.
- e. 電気生理学検査での複合筋活動電位の潜時(latency)、振幅(amplitude)、神経伝導速度(NCV)の値。
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.
- f. TA と Gastro の筋重量測定値。
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.
- g. 左：再髄鞘化軸索のトルイジンブルー染色像。
右：再髄鞘化軸索数。縦軸：再髄鞘化軸索数/100 μm^2 。スケールバー：5 μm
*P < 0.05: Student's test. Error bars represent the SEM.

考察

SC は末梢神経損傷後に、形態と接着性を変化させ、SC とその基底膜および細胞接着関連分子が接着基質を形成し、神経再生を促進するとされてきた (Shibuya et al., 1995; Fu et al., 1997; Scherer et al., 1997) が、本研究で、損傷前後の SC の細胞学的、分子学的特徴および軸索再生効果が著明に異なることが明らかになった。R-SC は軸索損傷後のワラー変性部にて、デブリスや免疫系細胞を含む炎症の役割を担うとされており (Stoll et al., 2017; Boissonas et al., 2020; Lindborg et al., 2017)、本研究でもトランスクリプトーム解析で同様の結果を得た。R-SC で発現が上昇している因子が、軸索再生に寄与している可能性が高いと考え、その中の $GFR\alpha 1$ に着目した。

$GFR\alpha 1$ がリガンドとして GDNF-RET 非依存的に働くという事実は、 $GFR\alpha 1$ 発現細胞の分布が RET 発現細胞の分布よりも大きい理由を部分的に説明している (Hottinger et al., 2000)。成熟した DRG 神経細胞における $GFR\alpha 1$ の GDNF-RET シグナルからの独立性は、発達中のニューロンの神経突起伸長に対する $GFR\alpha 1$ の効果が完全に GDNF に依存していることを示した以前の研究 (Ledda et al., 2002) と非常に対照的である。この違いの主な理由は、分析した神経細胞の発達段階にあると考えられる。今回の研究では、成熟した神経細胞を使用しており、その表現型はこれまでの研究で使用されてきた発達中の神経細胞とは明らかに異なる。例えば、成熟した神経細胞の内因的成長は、発達中の神経細胞に比べて緩やかである (He et al., 2016)。さらに、成熟した神経細胞は SC からの支持を必要とするが、発達中の神経細胞は支持を必要としない (Grim M, et al., 1992; Riethmacher et al., 1997) だけでなく、末梢神経系では軸索の成長に適した基質が必要である (Wallquist et al., 2002; Rogers et al., 1986)。成熟した神経系を用いた $GFR\alpha$ ファミリーの研究は限られているため、さらなる研究によって、成熟した神経細胞における $GFR\alpha$ 受容体の機能の新たな側面が明らかになる可能性がある。

$GFR\alpha 1$ がリガンドとして機能する場合、GDNF-RET 結合とは独立して、NCAM と $Itg\alpha 7\beta 1$ からなる複合体と結合する。NCAM は、GDNF の非存在下で $GFR\alpha 1$ と直接結合できることが示されているので、受容体複合体の結合部位として有力な候補である (Enomoto H, et al., 2004)。さらに、 $Itg\beta 1$ は $GFR\alpha 1$ にも結合できることが示唆されている (Cao et al., 2008a)。したがって、 $GFR\alpha 1$ は、NCAM または $Itg\alpha 7\beta 1$ のいずれかの部位で受容体複合体に結合する可能性がある。 $GFR\alpha 1$ の受容体複合体への結合様式については、ラミニン依存性という現象から、3つの可能性が考えられる。一つ目は、ラミニンによって $Itg\alpha 7\beta 1$ が活性化されると、 Itg と NCAM の複合体が形成され、

続いて NCAM が GFR α 1 に結合する。二つ目は、Itg α 7 β 1 と NCAM が複合体を形成し、続いてラミニンの結合によって Itg が活性化され、その結果、複合体が GFR α 1 と結合するようになる。三つ目は、ラミニンが Itg α 7 β 1 の GFR α 1 への結合を可能にし、この複合体が NCAM と結合できるようになる。Itg α 7 β 1 や NCAM 以外にも、未同定の分子が受容体複合体の構成要素となり、GFR α 1 の作用の媒介に貢献している可能性がある。これらの分子の詳細を解明することで、GFR α 受容体が成熟した神経系の維持・修復プロセスにどのように関与しているかを理解することができる。

成体 DRG 神経細胞を GDNF の非存在下に GFR α 1 で刺激すると、PI3K が亢進し、ERK は亢進しなかった。一方、GDNF の刺激で、ERK は亢進したが、PI3K は亢進しなかった。ERK と PI3K の間のクロストークは神経細胞では生じないので (Mendoza et al., 2011)、この結果は、GFR α 1 のリガンドとしての機能が GDNF の受容体としての効果とは異なる細胞内シグナルを引き起こすことを示唆している。PI3K と ERK はともに軸索再生を媒介する主要な細胞内シグナルであるが (Huang et al., 2017a)、末梢神経損傷後に PI3K よりも ERK の増強の方が軸索再生をより多く誘導することが報告されており (Huang et al., 2017b)、今回の知見を支持するものである。GFR α 1 をリガンドとして成体 DRG 神経細胞を刺激すると、NCAM や Itg の直接の下流シグナル (Beggs et al., 1994) や PI3K の上流シグナル (Ditlevsen et al., 2008; Cao et al., 2008b) として知られている Fyn の発現は増加せず、リン酸化も誘導されなかった。この結果から、未同定の共受容体が NCAM や Itg との受容体複合体として存在し、その細胞内ドメインを介してシグナルを伝達している可能性や、NCAM や Itg が、Fyn 以外の未知の細胞内分子を介してシグナルを伝達する可能性が考えられる。

末梢神経損傷後に SC が GFR α 1 の発現を増加させることから、損傷神経の GFR α 1 濃度は増加していることが予想されるが、GFR α 1 の損傷神経への局所投与で軸索再生が促進したことから、GFR α 1 の損傷神経内の局所濃度は、軸索の成長を促進する最大の効果を発揮するには不十分であると考えられた。GFR α 1 の軸索再生促進効果は、GFR α 1 がリガンドとして作用するだけでなく、GDNF の受容体として作用することにより引き起こされている可能性がある。GDNF の神経突起伸長効果は低用量で飽和しており (Mills et al., 2007)、GDNF の局所投与が軸索再生を促進することを報告した研究は、ゲルや導管などの素材を用いて神経欠損部に長期間継続的に供給した研究 (Tajdaran et al., 2019) のほかにはなく、GFR α 1 の局所投与は GDNF 受容体としてではなく、リガンドとして機能することで軸索を刺激したと考えられる。GDNF は軸索再生を促進し、シュワン細胞を活性化状態に維持する (Iwase et al., 2005; Höke et

al., 2002)という事実を考慮すると、中和抗体による GDNF の阻害は、末梢神経損傷後の軸索再生を阻害する可能性がある。しかし、GDNF 阻害と GFR α 1 投与を併用すると、軸索再生がさらに促進されたことから、GFR α 1 の軸索再生を促進するリガンド効果は、in vitro 試験で示されたように強力なものであると考えられる。

GFR α 1 が RET 非依存的に、末梢神経損傷後の軸索再生に寄与するかどうかを調べる過去の報告では、RET を発現していない細胞で GFR α 1 遺伝子を欠失させた変異マウスの軸索再生の程度は、野生型と同程度であったという結果から、末梢神経損傷後の軸索再生に RET 非依存性の GFR α 1 は不要と結論づけており (Enomoto et al., 2004)、本研究の結果と矛盾する。しかし、SC は RET を発現しているため、突然変異マウスの SC における GFR α 1 の発現には影響がないことから、ワーラー変性領域での GFR α 1 の量は変化していないと考えられ、これらの変異マウスで軸索再生の低下が観察されなかった理由が説明できる。

GFR α 1 のリガンドとしての作用に着目すると、培養した成熟 DRG 神経細胞の神経突起伸長を誘導するためにラミニンコーティングを必要とするが、末梢神経損傷後の軸索再生を促進するためには、損傷神経に GFR α 1 とラミニンを共存させる必要はなかった。これは、ラミニンが損傷神経に豊富に存在し、神経内膜基底膜の主要な細胞外マトリックス成分であるためであり (Gonzalez-Perez et al., 2013)、さらに再生軸索は常に SC と隣接しラミニンを分泌するため (Wallquist et al., 2002; Endo et al., 2019)、GFR α 1 の損傷神経での軸索再生効果は、ラミニン併用を必要としなかったと考えられる。

腕神経叢など近位部での末梢神経損傷は、常に運動機能の低下をもたらす (Songcharoen et al., 2001; Lundborg G, 2000; Terzis et al, 2009)が、これは、除神経された筋は、神経再支配の時期が臨界期を越えると神経再支配に対する感度が低下することが原因であるため (Sakuma et al., 2016; Gordon et al., 2011)、軸索の再生速度を上げる効果的な治療法を開発する必要がある。今回使用した末梢神経損傷モデルは、ラット坐骨神経の圧迫損傷で、切断や導管による再建など他のモデル損傷とは異なり、最終的にすべての軸索が再生するのであったため (Bridge et al., 1994)、本モデルで軸索再生が促進するということは、軸索再生の速度が上がることを意味しており、このモデルで GFR α 1 が軸索再生と機能回復を促進したことは、GFR α 1 が末梢神経損傷後の軸索再生速度を上げることを示している。本研究で明らかとなった GFR α 1 の軸索再生効果は、末梢神経損傷に対する新しい治療法として臨床への応用が期待でき、特に局所投与のみではなく、固定化した GFR α 1 も軸索再生を効果的に誘導したことから、人工神経導管の表面コーティングに利用する方法も効果的だと考

えられる。

一連の結果から、 $GFR\alpha 1$ は GDNF の受容体としてだけでなく、GDNF-RET 非依存的にリガンドとして機能し、成体神経細胞の軸索再生を促進することが明らかとなり、 $GFR\alpha 1$ に関する理解を深めることができた。成体神経細胞への $GFR\alpha 1$ 投与は、末梢神経障害に代表される軸索再生を必要とする疾患に対する新たな治療法となりえる。

結論

・シュワン細胞は、損傷を契機として修復型シュワン細胞に分化し、細胞学的には、より突起を伸ばすように形態を変化させ、接着能、軸索再生効果が増加することが明らかとなった。また、トランスクリプトーム解析により、分子生物学的には、恒常性維持から炎症、修復に役割を変化させることが明らかとなり、修復型シュワン細胞で発現が上昇している軸索再生候補因子として、 $GFR\alpha 1$ を同定した。

・免疫染色およびウェスタンブロッティングで、修復型シュワン細胞の $GFR\alpha 1$ 発現・分泌の増加を確認後、 $GFR\alpha 1$ 中和抗体投与で、修復型シュワン細胞と共培養した DRG 神経細胞の神経突起長は減少し、損傷坐骨神経の軸索再生率は低下することを示した。これらの結果から、末梢神経損傷後、シュワン細胞は $GFR\alpha 1$ の発現・分泌を増加させ、 $GFR\alpha 1$ の発現増加がシュワン細胞による軸索伸長・再生効果に寄与していることが明らかになった。

・ $GFR\alpha 1$ 投与で、神経突起長は有意に増加した。 $GFR\alpha 1$ が GDNF-RET と複合体を形成して作用した可能性を検証するために、 $GFR\alpha 1$ 投与に GDNF 中和抗体投与を併用したところ、神経突起長はさらに増加し、プルダウンアッセイで RET の発現が消失した。また、 $GFR\alpha 1$ 、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く、 $GFR\alpha 1$ と GDNF 阻害の組み合わせが、試験したすべての条件において、神経突起伸長および軸索再生を最も効果的に促進した。これらの結果は、 $GFR\alpha 1$ は GDNF-RET シグナルとは独立して、神経突起伸長および軸索再生を刺激するリガンドとして機能し、その効果は GDNF-RET シグナルの刺激よりも大きいことを示している。

・ $GFR\alpha 1$ はリガンドとして、ラミニン存在下で NCAM と Integrin $\alpha 7\beta 1$ の複合体に結合し、神経細胞の伸長を促進することが明らかになった。細胞内シグナルは、GDNF 投与時は ERK1/2 のリン酸化が亢進したのに対して、 $GFR\alpha 1$ と GDNF 中和抗体併用時は、PI3K のリン酸化が亢進した。これらの結果は、 $GFR\alpha 1$ がリガンドとして機能して神経突起伸長を促進する場合は、GDNF の受容体として機能する場合は異なり、PI3K シグナルを増強することを示している。

・ $GFR\alpha 1$ の局所投与で、感覚機能は損傷後 4 週で有意に改善し、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、

対照群に比較して有意に改善した。

・一連の結果から、 $GFR\alpha 1$ は GDNF の受容体としてだけでなく、GDNF-RET 非依存的にリガンドとして機能し、成体神経細胞の軸索再生を促進することが明らかとなり、 $GFR\alpha 1$ に関する理解を深めることができた。成体神経細胞への $GFR\alpha 1$ 投与は、末梢神経障害に代表される軸索再生を必要とする疾患に対する新たな治療法となりえる。

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

Avraham O, Deng PY, Jones S, Kuruvilla R, Semenkovich CF, Klyachko VA, et al (2020) Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. *Nat Commun.* 11(1): 4891

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010) Integrins. *Cell Tissue Res.* 339(1): 269-80

Barkhoudarian G, Hovda DA, Giza CC (2016) The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury – an update. *Phys Med Rehabil Clin N Am.* 27(2): 373-93

Beggs HE, Baragona SC, Hemperly JJ, Maness PF (1997) NCAM140 interacts with the focal adhesion kinase p125(fak) and the SRC-related tyrosine kinase p59(fyn). *J Biol Chem.* 272(13): 8310-9

Beggs HE, Soriano P, Maness PF (1994) NCAM-dependent neurite outgrowth is inhibited in neurons from Fyn-minus mice. *J Cell Biol.* 127(3): 825-33

Beirowski B, Babetto E, Golden JP, Chen YJ, Yang K, Gross RW, et al (2014) Metabolic regulator LKB1 plays a crucial role in Schwann cell-mediated axon maintenance. *Nat Neurosci.* 17(10): 1351-61

Boerboom A, Dion V, Chariot A, Franzen R (2017) Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. *Front Mol Neurosci.* 10: 38

Bridge PM, Ball DJ, Mackinnon SE, Nakao Y, Brandt K, Hunter DA, et al (1994) Nerve crush injuries--a model for axonotmesis. *Exp Neurol.* 127(2): 284-90

Brosius Lutz A, Barres BA (2014) Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. *Dev Cell.* 28(1): 7-17

Cao JP, Yu JK, Li C, Sun Y, Yuan HH, Wang HJ, et al (2008) Integrin beta1 is

involved in the signaling of glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Comp Neurol.* 509(2): 203-10

Cao JP, Wang HJ, Yu JK, Yang H, Xiao CH, Gao DS (2008) Involvement of NCAM in the effects of GDNF on the neurite outgrowth in the dopamine neurons. *Neurosci Res.* 61(4): 390-7

Carmillo P, Dagø L, Day ES, Worley DS, Rossomando A, Walus L, et al (2005) Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) receptor alpha-1 (GFR alpha 1) is highly selective for GDNF versus artemin. *Biochemistry.* 44(7): 2545-54

Chen BK, Madigan NN, Hakim JS, Dadsetan M, McMahon SS, Yaszemski MJ, et al (2018) GDNF Schwann cells in hydrogel scaffolds promote regional axon regeneration, remyelination and functional improvement after spinal cord transection in rats. *J Tissue Eng Regen Med.* 12(1): e398-e407

Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007) Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci.* 30: 209-33

Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I (2017) Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front Mol Neurosci.* 10: 284

Ditlevsen DK, Povlsen GK, Berezin V, Bock E (2008) NCAM-induced intracellular signaling revisited. *J Neurosci Res.* 86(4): 727-43

Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, et al (1996) GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature.* 381(6585): 789-93

Endo T, Kadoya K, Kawamura D, Iwasaki N (2019) Evidence for cell-contact factor involvement in neurite outgrowth of dorsal root ganglion neurons stimulated by Schwann cells. *Exp Physiol.* 104(10): 1447-54

Endo T, Kadoya K, Suzuki Y, Kawamura D, Iwasaki N (2019) A Novel Experimental Model to Determine the Axon-Promoting Effects of Grafted Cells After Peripheral Nerve Injury. *Front Cell Neurosci.* 13: 280

Enomoto H, Hughes I, Golden J, Baloh RH, Yonemura S, Heuckeroth RO, et al (2004) GFRalpha1 expression in cells lacking RET is dispensable for organogenesis and nerve regeneration. *Neuron.* 44(4): 623-36

Ganguly A, McEwen C, Troy EL, Colburn RW, Caggiano AO, Schallert TJ, et al (2017) Recovery of sensorimotor function following sciatic nerve injury across multiple rat strains. *J Neurosci Methods.* 275: 25-32

Garcès A, Haase G, Airaksinen MS, Livet J, Filippi P, deLapeyrière O (2000) GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron. *J Neurosci.* 20(13): 4992-5000

Geiger B, Spatz JP, Bershadsky AD (2009) Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10(1): 21-33

Giza CC, Hovda DA (2014) The new neurometabolic cascade of concussion. *Neurosurgery.* 75 Suppl 4(0 4): S24-33

Gonzalez-Perez F, Udina E, Navarro X. 2013. Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 108: 257-75

Gordon T, Tyreman N, Raji MA (2011) The basis for diminished functional recovery after delayed peripheral nerve repair. *J Neurosci.* 31(14): 5325-34

Grim M, Halata Z, Franz T (1992) Schwann cells are not required for guidance of motor nerves in the hindlimb in Splotch mutant mouse embryos. *Anat Embryol (Berl).* 186(4): 311-8

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J (1988) A new and sensitive

- method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*. 32(1): 77-88
- He Z, Jin Y (2016) Intrinsic Control of Axon Regeneration. *Neuron*. 90(3): 437-51
- Höke A, Gordon T, Zochodne DW, Sulaiman OA (2002) A decline in glial cell-line-derived neurotrophic factor expression is associated with impaired regeneration after long-term Schwann cell denervation. *Exp Neurol*. 173(1): 77-85
- Hong K, Nishiyama M, Henley J, Tessier LM, Poo M (2000) Calcium signalling in the guidance of nerve growth by netrin-1. *Nature*. 403(6765): 93-8
- Hottinger AF, Azzouz M, Déglon N, Aebischer P, Zurn AD (2000) Complete and long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci*. 20(15): 5587-93
- Huang H, Liu H, Yan R, Hu M (2017) PI3K/Akt and ERK/MAPK Signaling Promote Different Aspects of Neuron Survival and Axonal Regrowth Following Rat Facial Nerve Axotomy. *Neurochem Res*. 42(12): 3515-24
- Huang HT, Sun ZG, Liu HW, Ma JT, Hu M (2017) ERK/MAPK and PI3K/AKT signal channels simultaneously activated in nerve cell and axon after facial nerve injury. *Saudi J Biol Sci*. 24(8): 1853-8
- Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. 326(5957): 1216-9
- Ibáñez CF (2010) Beyond the cell surface: new mechanisms of receptor function. *Biochem Biophys Res Commun*. 396(1): 24-7

Ibáñez CF, Paratcha G, Ledda F (2020) RET-independent signaling by GDNF ligands and GFR α receptors. *Cell Tissue Res.* 382(1): 71-82

Iwase T, Jung CG, Bae H, Zhang M, Soliven B (2005) Glial cell line-derived neurotrophic factor-induced signaling in Schwann cells. *J Neurochem.* 94(6): 1488-99

Jagalur NB, Ghazvini M, Mandemakers W, Driegen S, Maas A, Jones EA, Jaegle M, Grosveld F, Svaren J, Meijer D (2011) Functional dissection of the Oct6 Schwann cell enhancer reveals an essential role for dimeric Sox10 binding. *J Neurosci.* 31(23): 8585-94

Kadoya K, Tsukada S, Lu P, Coppola G, Geschwind D, Filbin MT, et al (2009) Combined intrinsic and extrinsic neuronal mechanisms facilitate bridging axonal regeneration one year after spinal cord injury. *Neuron.* 64(2): 165-72

Jessen KR, Mirsky R (2008) Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia.* 56(14): 1552-65

Jessen KR, Mirsky R (2016) The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol.* 594(13): 3521-31

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, et al (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell.* 85(7): 1113-24

Kaewkhaw R, Scutt AM, Haycock JW (2012) Integrated culture and purification of rat Schwann cells from freshly isolated adult tissue. *Nat Protoc.* 7(11): 1996-2004

Ledda F, Paratcha G, Ibáñez CF (2002) Target-derived GFRalpha1 as an attractive guidance signal for developing sensory and sympathetic axons via

activation of Cdk5. *Neuron*. 36(3): 387-401

Lundborg G (2000) A 25-year perspective of peripheral nerve surgery: evolving neuroscientific concepts and clinical significance. *J Hand Surg Am*. 25(3): 391-414

Mao S, Huang T, Chen Y, Shen L, Zhou S, Zhang S, et al (2019) Circ-Spindr enhances axon regeneration after peripheral nerve injury. *Cell Death Dis*. 10(11): 787

Mendoza MC, Er EE, Blenis J (2011) The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 36(6): 320-8

Mills CD, Allchorne AJ, Griffin RS, Woolf CJ, Costigan M (2007) GDNF selectively promotes regeneration of injury-primed sensory neurons in the lesioned spinal cord. *Mol Cell Neurosci*. 36(2): 185-94

Mitchel JA, Hoffman KA (2011) Cellular scale anisotropic topography guides Schwann cell motility. *PLoS One*. 6(9): e24316

Nakajima S, Hayashi M, Kouguchi T, Yamaguchi K, Miwa M, Yoshizaki G (2014) Expression patterns of *gdnf* and *gfr α 1* in rainbow trout testis. *Gene Expr Patterns*. 14(2): 111-20

Nieuwenhuis B, Barber AC, Evans RS, Pearson CS, Fuchs J, MacQueen AR, et al (2020) PI 3-kinase delta enhances axonal PIP(3) to support axon regeneration in the adult CNS. *EMBO Mol Med*. 12(8): e11674

Nirogi R, Goura V, Shanmuganathan D, Jayarajan P, Abraham R (2012) Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 66(1): 8-13

Nishiyama M, Hoshino A, Tsai L, Henley JR, Goshima Y, Tessier LM, Poo M,

Hong K (2003) Cyclic AMP/GMP-dependent modulation of Ca²⁺ channels sets the polarity of nerve growth-cone turning. *Nature*. 423(6943): 990-5

Omura T, Omura K, Tedeschi A, Riva P, Painter MW, Rojas L, et al (2015) Robust Axonal Regeneration Occurs in the Injured CAST/Ei Mouse CNS. *Neuron*. 86(5): 1215-275

Paratcha G, Ledda F, Baars L, Coulpier M, Besset V, Anders J, et al (2001) Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron*. 29(1): 171-84

Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF (2003) The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*. 113(7): 867-79

Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C (1997) Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature*. 389(6652): 725-30

Rogers SL, Edson KJ, Letourneau PC, McLoon SC (1986) Distribution of laminin in the developing peripheral nervous system of the chick. *Dev Biol*. 113(2): 429-35

Sakuma M, Gorski G, Sheu SH, Lee S, Barrett LB, Singh B, et al (2016) Lack of motor recovery after prolonged denervation of the neuromuscular junction is not due to regenerative failure. *Eur J Neurosci*. 43(3): 451-62

Sayanagi J, Tanaka H, Ebara M, Okada K, Oka K, Murase T, et al (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(3): 245-53

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9(7): 671-5

Sergaki MC, Ibáñez CF (2017) GFR α 1 Regulates Purkinje Cell Migration by Counteracting NCAM Function. *Cell Rep.* 18(2): 367-79

Siemionow M, Brzezicki G (2009) Chapter 8: Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. *Int Rev Neurobiol.* 87: 141-72

Songcharoen P, Wongtrakul S, Mahaisavariya B, Spinner RJ (2001) Hemicontrolateral C7 transfer to median nerve in the treatment of root avulsion brachial plexus injury. *J Hand Surg Am.* 26(6): 1058-64

Tajdaran K, Chan K, Gordon T, Borschel GH (2019) Matrices, scaffolds, and carriers for protein and molecule delivery in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 319: 112817

Taniguchi J, Fujitani M, Endo M, Kubo T, Miller FD, Kaplan DR, Yamashita T (2008) Rap1 is involved in the signal transduction of myelin-associated glycoprotein. *Cell Death Differ.* 15(2): 408-19

Terzis JK, Kokkalis ZT (2009) Selective contralateral c7 transfer in posttraumatic brachial plexus injuries: a report of 56 cases. *Plast Reconstr Surg.* 123(3): 927-38

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, et al (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature.* 382(6586): 80-3

Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, et al (1996) Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene.

Nature. 381(6585): 785-9

Wallquist W, Patarroyo M, Thams S, Carlstedt T, Stark B, Cullheim S, et al (2002) Laminin chains in rat and human peripheral nerve: distribution and regulation during development and after axonal injury. *J Comp Neurol*. 454(3): 284-93

Wang Y, Teng HL, Huang ZH (2012) Intrinsic migratory properties of cultured Schwann cells based on single-cell migration assay. *PLoS One*. 7(12): e51824

Wang Y, Wang Z (2020) [Research progress on intrinsic signaling pathways in axon regeneration]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 49(1): 82-9

You L, Ebner S, Kruse FE (2001) Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)-induced migration and signal transduction in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 42(11): 2496-504.

Zhanhu Z, Bin Y, Yun G, Songlin Z, Tianmei Q, Yongjun W, Guohui D, Fei D, Xiaosong G (2016) Fibroblast-derived tenascin-C promotes Schwann cell migration through β 1-integrin dependent pathway during peripheral nerve regeneration. *GLIA*. 64(3): 374-385