



Title	神経組織特異的線維芽細胞が末梢神経再生に及ぼす影響とその分子機構に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	原, 健人
Description	配架番号 : 2780
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15462号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90009
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	HARA_Masato_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 原 健人

学 位 論 文 題 名

神経組織特異的線維芽細胞が末梢神経再生に及ぼす影響とその分子機構に関する研究
(Elucidation of the role of Nerve Tissue-Specific Fibroblasts on Peripheral Nerve
Regeneration and Their Molecular Mechanisms)

【背景と目的】

末梢神経は中枢神経と異なり再生するが、切断損傷など重度損傷の場合の臨床成績は未だ不良であり、より効果的な治療方法の開発が求められている。しかし、治療方法開発の基盤となる、末梢神経修復機構の詳細は未だ不明な点が多い。近年の神経科学の進展により、末梢神経損傷部の修復機構は、マクロファージ (Macrophage; M ϕ)、血管内皮細胞 (Endothelial cell; EC)、シュワン細胞 (Schwann cell; SC)、線維芽細胞 (Fibroblast; Fb) の高度な連携で維持されていることが明らかになってきた。しかし、他臓器では、組織特異的 Fb が直接的あるいは間接的に、組織修復や病態形成に関与していることが判明しているにも関わらず、末梢神経特異的 Fb が、末梢神経の組織修復や病態形成で果たす役割の詳細は未だ解明されていない。そこで、本研究の中心仮説を、末梢神経特異的 Fb は末梢神経損傷後の組織修復機構に直接的に関与するとし、以下の2つの具体的目的を設定した。

A : 神経組織特異的 Fb が有する直接的神経突起伸長効果を明らかにする

B : 神経組織特異的 Fb が末梢神経損傷部の修復機構で果たす具体的役割を明らかにする

【方法】

A-1) 単離培養した末梢神経由来 Fb の確認

野生型 LEWIS ラットより、坐骨神経の神経上膜 (Epineurium; Epn) と神経実質 (Parenchyma; Par)、皮膚 (Skin; Skn) からそれぞれ Fb を単離し免疫染色で純度を定量した。

A-2) 末梢神経由来 Fb が有する神経突起伸長効果の定量

成体ラット後根神経節 (Dorsal root ganglion; DRG) から感覚神経細胞を単離し、三種類の Fb (皮膚由来; Fb-Skn、神経上膜由来; Fb-Epn、神経実質由来; Fb-Par) 上での接触共培養と半透膜インサートを介した非接触培養の2種類の実験により、各 Fb の神経突起伸長効果を検証した。

A-3) 軸索再生部における Fb の局在の確認

末梢神経損傷の主な形態である圧挫損傷と切断損傷 (PNTI) 後 7 日時点での再生軸索先端と Fb の位置関係を免疫組織学的に検討した。

A-4) 末梢神経由来 Fb の分子学的特徴の同定

Fb-Epn, Fb-Par, Fb-Skn について網羅的遺伝子発現解析を行い、DEG (Differential Expressed Genes) 解析、GO (Gene ontology) 解析および KEGG (Encyclopedia of Genes and Genomes) 解析を施行した。

B-1) 末梢神経損傷部を架橋する修復組織の分子細胞学的特徴の同定

マウス坐骨神経切断損傷後 2 日目の近位・遠位断端間に形成される架橋組織の single cell RNA sequence (sc RNA seq) 解析を施行した。

B-2) 末梢神経損傷部に集積する神経組織特異的 Fb の時空間的推移の同定

損傷後超早期に集積する Fb 細胞集団の特徴的な細胞表面マーカーとして同定した PDGFR α に着目して PNTI 後の神経組織特異的 Fb の挙動を経時的に観察した。

B-3) 神経上膜の除去が末梢神経損傷部の修復機構に及ぼす影響の解明

ラット坐骨神経に切断損傷を作成し、神経上膜除去の有無が、損傷部の治癒過程に与える影響を、4 日後の組織評価で検討した。

B-4) 損傷後早期に損傷部に集積する神経組織特異的 Fb の機能の解明

神経上膜由来 PDGFR α 発現 Fb (Epn-PDGFR α ⁺) と皮膚由来 PDGFR α 発現 Fb (Skn-PDGFR α ⁺) を FACS で収集し、損傷直後に損傷部に移植した。移植後 4 日目と 7 日目で組織学的に評価した。さらに、PDGFR α 機能阻害抗体を同様に損傷直後に損傷部に投与し、投与後 4 日目と 7 日目で同様に評価した。

B-5) 神経特異的 Fb 分子学的特徴の同定

Epn-PDGFR α ⁺ および Skn-PDGFR α ⁺ を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、同じ PDGFR α 陽性 Fb 間の発現上昇因子を比較し、特に EC 伸展に関わる因子を検索した。

B-6) 神経特異的 Fb が分泌する組織修復因子の同定

Epn-PDGFR α ⁺ で有意に発現上昇を認めた液性因子として CHRDL1 を同定した。CHRDL1 は BMP4 アンタゴニストとして機能する分子である。そこで、まず損傷後 2 日目の CHRDL1 と BMP4 の局在を免疫組織学的

に評価した。次に、培養神経上膜由来血管内皮細胞(Epn-EC)を用いて、BMP4 と CHRDL1 が Epn-EC の遊走能に与える影響を migration assay で評価した。最後に、損傷部に CHRDL1 を投与し、損傷部の修復機転に及ぼす影響を、4日後と7日後の組織学的評価で検討した。

【結果】

A-1) 末梢神経由来 Fb の単離培養技術の確立

今回使用した Fb はすべて type 1 collagen および Thy1 陽性で、SC や EC の混入は 1%未満であった。

A-2) 末梢神経由来 Fb の神経突起伸長効果

接触の有無に関わらず、Fb-Epn が伸長細胞割合と最長神経突起長の両方に優れていた。非接触共培養では接触共培養と比較して、伸長細胞割合と最長神経突起長は、ともに半分程度であった。

A-3) 軸索再生部における Fb の局在の確認

圧挫損傷、切断損傷のいずれも、Fb と再生軸索の接触は認めず、軸索再生における Fb の役割は、主に液性因子を介している可能性を示していた。

A-4) 末梢神経由来 Fb の神経突起伸長効果の分子学的特徴

各 Fb の網羅的遺伝子発現解析結果は、これら 3 種類の Fb の分子学的特徴が明確に異なることを示した。神経組織由来 Fb では細胞増殖に関連する遺伝子が高発現し、恒常性の維持・調節および炎症性細胞の動員において機能していることが示唆された。また、Fb-Par と Fb-Epn の比較では、Fb-Epn が血管新生や炎症を制御し、免疫細胞を誘導することで傷害反応に関与する可能性が示された。

B-1) 末梢神経損傷部を架橋する修復組織の分子細胞学的特徴

PNTI 後 2 日目の架橋組織の scRNAseq 解析により、損傷後超早期に集積する 12 種類の細胞集団を同定した。Fb の特徴的な細胞表面マーカーとして PDGFR α を同定した。

B-2) 末梢神経損傷部を集積する神経組織特異的 Fb の時空間的推移の同定

PDGFR α 陽性細胞は、非損傷時には神経上膜領域に多数存在し、損傷後は早期より神経上膜から損傷中心に向かって、EC に先行する形で遊走していた。損傷後早期に損傷中心部へ集積する PDGFR α 陽性 Fb は、神経上膜由来と考えられた。

B-3) 神経上膜の除去が末梢神経損傷部の修復機構に及ぼす影響の解明

神経上膜除去により、架橋形成が著しく阻害されていた。

B-4) 損傷後早期に損傷部を集積する神経組織特異的 Fb の機能の解明

Epn-PDGFR α^+ 移植群で損傷後 4 日目の架橋組織内への EC の遊走が促進し、損傷 7 日目の架橋形成が促進していた。一方、PDGFR α 機能阻害抗体の投与では、損傷 4 日目の架橋組織内への EC の遊走、損傷後 7 日目の架橋形成が共に阻害された。

B-5) 神経特異的 Fb 分子学的特徴の同定

Epn-PDGFR α^+ および Skn-PDGFR α^+ の網羅的遺伝子発現解析により、両者間の遺伝子発現プロファイルに明確な相違が見られた。血管新生に関する遺伝子が Epn-PDGFR α^+ で有意に上昇し、DEG 解析では CHRDL1 が最も高い有意差を示した。

B-6) 神経特異的 Fb が分泌する組織修復因子の同定

損傷後 2 日目の末梢神経断端部に、PDGFR α と CHRDL1 の共局在、CD68 と BMP4 の共局在を認めたことから、CHRDL1 の産生は PDGFR α 発現細胞が担い、BMP4 の産生は M ϕ が担うことを免疫組織学的に確認した。続いて Epn-EC を用いた migration assay では、BMP4 投与群では control に比較し EC の進展が阻害され、BMP4 に CHRDL1 を加えるとその阻害効果が解除された。損傷部への CHRDL1 投与により、損傷 4 日目の架橋組織内への EC の遊走が促進し、損傷 7 日目の架橋形成が促進していた。

【考察】

末梢神経由来 Fb は優れた神経突起伸長効果を有し、網羅的遺伝子発現解析により得られた知見は、末梢神経内の局在の異なる Fb は、異なる機能を有するという結論を支持した。Fb は一般的に調製や増殖が容易であることから、細胞治療の材料として探索されてきた。成長因子を分泌するように遺伝子改変した Fb の組織損傷部投与や、皮膚由来 Fb で 3D 神経導管などの報告があり、本研究の知見から、神経組織特異的 Fb はこれらの細胞治療材料として有望である。また、損傷後超早期より神経上膜から損傷部を集積する Epn-PDGFR α^+ の存在と有用性が明らかとなり、従来注目されていなかった神経上膜が末梢神経の修復機構で重要な役割を果たしていること、M ϕ 由来の BMP4 が末梢神経損傷の治療標的となること、CHRDL1 および BMP4 阻害薬が末梢神経損傷の治療薬となりうることを示している。

【結論】

末梢神経由来 Fb は Fb-Skn より、Fb-Epn は Fb-Par より神経突起伸長効果が高い。Fb は神経組織内の局在によって分子的・機能的に異なり、Fb-Epn が PNI 後の軸索再生に関与する可能性がある。神経切断端から損傷部を集積する Epn-PDGFR α^+ が CHRDL1 を分泌し、M ϕ が分泌する BMP4 を阻害することで、EC 細胞の損傷部への集積を促進していた。CHRDL1 は末梢神経損傷部の新規修復促進薬として期待できる。