

主論文の要旨

**Secreted Ectodomain of Sialic Acid-Binding Ig-Like  
Lectin-9 and Monocyte Chemoattractant Protein-1  
Synergistically Regenerate Transected Rat  
Peripheral Nerves by Altering Macrophage Polarity**

〔 Siglec-9 細胞外ドメインと MCP-1 はマクロファージの極性を  
制御することで切断されたラット末梢神経を相乗的に再生する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

(指導：日比 英晴 教授)

加納 史也

## 【緒言】

中枢神経では一度障害を受けると神経再生は困難とされているが、末梢神経は再生可能である。末梢神経では、Schwann 細胞(SC)やマクロファージ(M $\phi$ )が再生軸索の足場を確保するとともに、神経栄養因子を供給して、軸索の伸長を助ける。しかし神経切断や神経離断などの神経ギャップを形成する損傷では、自然修復は困難になる。最も有効な治療法とされる自家神経移植には、移植する神経の長さの限界や採取元の神経機能の損失などの欠点がある。近年、自家神経移植の代替治療として、神経誘導管や成長因子による治療が検討されている。しかしこれらの方法では、部分的な回復しか得られない。

近年、活性化 M $\phi$  が様々な難治性疾患の病態に関係していると報告されている。活性化 M $\phi$  には炎症性 M1 と抗炎症性 M2 という 2 つの表現型が存在する。M1 は炎症に関与し、炎症促進性サイトカイン・酸化窒素 (NO) を放出することによって組織破壊を促進する。一方 M2 は細胞破片を捕捉・抗炎症性サイトカインを分泌することにより炎症反応を緩和し、線維瘢痕の形成を抑制する。一般的な創傷治癒では、M1 と M2 がそれぞれ炎症の惹起と消退に関わると報告されている。したがって、M $\phi$  の極性を調節することで、末梢神経損傷 (PNI) に対しても治療効果が期待できると考えられる。

幹細胞移植は PNI に対する新たな治療戦略として注目されている。骨髄、脂肪組織、臍帯由来間葉系幹細胞移植が、パラクライン効果により PNI モデル動物の神経機能を改善したと報告されている。我々は過去に、歯髄幹細胞由来無血清培養上清 (SHED-CM) のラット坐骨神経切断モデルに対する治療効果を報告した。さらに、ラット骨髄由来 M $\phi$  を用いて SHED-CM の含有するタンパク群が炎症性 M1 を抗炎症性 M2 へ変換することを見出した。新規 M2 誘導因子はシアル酸認識レクチン-9 の細胞外ドメイン (sSiglec-9) と単球走化性因子 (MCP-1) で構成されている。

本研究は、SHED-CM と MCP-1/sSiglec-9 をラット顔面神経切除モデル (FNI-rat) へ投与し治療効果を検証した。

## 【材料と方法】

本学倫理委員会承認のもと本学附属病院で患者の同意を得て提供されたヒト乳歯より SHED を分離・培養した。80%コンフルエント状態で無血清培地交換、48 時間培養し、細胞残骸を除去した上清を CM として使用した。MCP-1 および sSiglec-9 は BD 社から購入した。また SHED-CM から MCP-1/sSiglec-9 を免疫沈降法にてディプリーションした CM (dSHED-CM) を作成した。8 週齢雌 SD ラットの顔面神経を露出し、頬筋枝と下顎縁枝を 5mm 切除した。神経切除部位にアテロコラーゲンに含浸した各因子を留置し閉創した。FNI-rat のヒゲ運動評価 Vibrissae Movement score (VMs) と動画解析、免疫組織学的解析および Real time RT-PCR 法による遺伝子発現解析にて SHED-CM および MCP-1/sSiglec-9 の治療効果を検討した。

ラット大腿骨由来単球に M-CSF 添加培養して M $\phi$  を作成し、MCP-1/sSiglec-9 を作用させたときの M2 誘導能を遺伝子発現解析にて検討した。また、誘導した M $\phi$  から

得られた CM をヒト SC(hSC)および初代培養ラットの DRG 神経細胞へ作用させ、SC の増殖・遊走・分化能と DRG 神経細胞の神経突起伸長について評価した。

さらに、選択的に M2 $\phi$  を除去する mannosylated-Clodronate (m-Clodronate) を作用させた際の MCP-1/sSiglec-9 の神経再生効果が受ける影響を検討した。

## 【結果】

FNI-rat に SHED-CM、dSHED-CM または MCP-1/sSiglec-9 を投与し、ヒゲの運動機能を比較した。顔面神経を露出し閉創したのみの非手術群 (Sham 群) は運動機能を損なわなかった。SHED-CM 投与群および MCP-1/sSiglec-9 投与群は投与 2 週目で著しい運動機能の回復を認め、4 週目で Sham 群と同程度の運動機能まで回復した。dSHED-CM 投与群および sSiglec-9 単独投与群では神経機能回復を認めなかった(図 1A, B)。動画解析でヒゲの運動角度および角加速度を解析した結果、PBS 投与群と比較し MCP-1/sSiglec-9 投与群が有意に機能回復した。組織学的解析では、SHED-CM 投与群と MCP-1/sSiglec-9 投与群の再生軸索は有意に増加した(図 2A, B)。神経線維の興奮伝導効率を表す G-ratio は電子顕微鏡を用いて、軸索直径/有髄神経線維直径で算出した。伝導効率は G-ratio が 0.6~0.7 で最大で、0.8~1 に近づくと急速に低下した。SHED-CM 投与群と MCP-1/sSiglec-9 投与群は Sham 群同程度まで回復した(図 2C, D)。神経切除 24 時間後の遺伝子発現解析では、MCP-1/sSiglec-9 投与群では炎症性/組織破壊因子の遺伝子発現が減少し、抗炎症性/組織再生因子群の遺伝子発現が有意に増加した (図 3A)。免疫組織学的解析では、神経切除 24 時間後の中枢側神経断端に集積する M $\phi$  を観察した。MCP-1/sSiglec9 投与群では、iNOS/CD11b 陽性 M1 細胞数が減少し、CD206/CD11b 陽性 M2 細胞数が増加した(図 3B-D)。

ラット骨髄由来 M $\phi$  を MCP-1/sSiglec-9 で刺激すると、M $\phi$  は M2 様に細胞形態変化し、M2 関連遺伝子の発現が上昇した (図 4A, B)。さらに M2(MCP-1/sSiglec-9)は様々な神経栄養因子および血管形成促進因子、組織再生因子を産生していた (図 4B)。

M2(MCP-1/sSiglec-9)の SC への影響を解析するため、M2(MCP-1/sSiglec-9)-CM を用いて hSC を培養した。MCP-1/sSiglec-9 で直接刺激・処理した hSC の増殖能・遊走能は影響されなかったが、M2(MCP-1/sSiglec-9)-CM で培養した hSC の増殖能・遊走能は促進された (図 5A, B)。培養後 hSC の遺伝子発現を Real time RT-PCR 法で解析すると、ミエリン形成に関わる転写因子や成熟 SC マーカー、関連神経栄養因子が上昇した (図 5C)。初代培養ラット DRG 神経細胞に M2(MCP-1/sSiglec-9)-CM を作用させると、他の M0-CM や M2(IL-4)-CM と比較し有意に突起伸長が促進された (図 5D, E)。

SC と神経細胞への影響を *in vivo* で確認するために、MCP-1/sSiglec-9 投与後 24 時間後と 14 日後の組織で免疫組織学的解析を行った。24 時間後の神経断端の中枢側には S100 $\beta$  陽性 SC 細胞の有意な集積を認めた (図 6A, B)。14 日後の神経断端にはミエリン形成様の SC に沿って走行する Neurofilament 陽性神経細胞を認めた(図 6C)。神経経路の接続を確認するために、MCP-1/sSiglec-9 投与 6 週後に損傷部位より 10mm 末梢側から逆行性トレーサー Fluoro-Gold (FG) を投与した。さらに 2 週間後に脳幹内の顔面

神経核を観察したところ、MCP-1/sSiglec-9 投与群では有意な FG 陽性細胞数の増加を認めた (図 6D)。

MCP-1/sSiglec-9 と同時に m-Clodronate を投与した結果、MCP-1/sSiglec-9 の M2 誘導は起こらなかった。MCP-1/sSiglec-9 投与群と比較し、m-Clodronate 投与群では 24 時間後の炎症性/組織破壊因子の遺伝子発現は低下せず、抗炎症性/組織再生因子群の遺伝子発現が上昇しなかった(図 7A)。VMs でも同様に m-Clodronate 投与群では、ラット顔面神経の機能回復は得られなかった (図 7B)。

### 【考察】

ラット FNI 後の SHED-CM による機能回復には、MCP-1/sSiglec-9 が不可欠であることを示した。MCP-1/sSiglec-9 は神経損傷後の炎症反応で発現する M1 を抗炎症 M2 に誘導する。誘導された M2 は SC の増殖・遊走・分化の促進と、神経細胞の突起伸長を促進する。M2 は自己修復困難な神経ギャップに SC による架橋を形成し、神経軸索の伸長を促進したことで、神経機能を回復した。これまでの研究で、神経誘導チューブ内に様々な栄養因子(NGF, BDNF, NT-3, 4, 5, IGF-1, CNTF など)を注入すると、末梢神経の再生が促されることが報告されている。それぞれの栄養因子は SC の増殖・遊走促進や神経軸索成長促進、神経細胞保護に寄与する。これらの栄養因子は末梢神経再生に必要な長い行程の一部に作用する。それに比べ、MCP-1/sSiglec-9 によって誘導した M2 は多種の神経栄養因子を放出することで神経再生に関わる全行程に効果的に作用したと考えられる。

MCP-1 は炎症組織に M $\phi$  を動員し炎症環境形成に寄与する因子として知られている。我々は過去に、MCP-1 と sSiglec-9 は協調し M $\phi$  の CCR2 を介して M2 を誘導することを報告した。Siglec は細胞質の免疫受容体を介して、免疫細胞の様々なシグナル伝達を調節するシアル酸結合 I 型膜貫通 Ig 様レクチンと知られている。炎症および他の細胞応答における sSiglec の役割はほとんど知られていない。我々の研究により、Siglec が様々な細胞の細胞間シグナル伝達に重要な役割を果たし、リガンドと受容体の両方の機能を持つことを示唆している。

本研究結果から、末梢神経損傷後に対して MCP-1/sSiglec-9 による M2 誘導を基盤とする、新しい治療法の可能性が示唆された。

### 【結語】

SHED-CM に含まれる MCP-1/sSiglec-9 が抗炎症性 M2 環境を誘導することで、炎症を抑制し、末梢神経の神経再生能力を促進した。本研究より、ヒト歯髄幹細胞が分泌する因子による新しい再生医療の確立の可能性が示唆された。