

末梢神経の再生；末梢神経の内部環境を改変する

神田 隆

(臨床神経, 48 : 1028—1030, 2008)

Key words : 血液神経関門, 微小血管内皮細胞, 血管周細胞, 神経栄養因子, タイトジャンクション

末梢神経の効率的な再生には各種サイトカイン, 神経栄養因子の適切な関与が不可欠であることが近年明らかにされ, これらの分子による末梢性ニューロパチーの治療への期待が高まっている。しかし, サイトカインや神経栄養因子の多くは MW15,000~30,000 前後の比較的大きなポリペプチドであり, また, ほとんどのものは神経実質内への特殊な移送系を持たないことから, 循環血液からの神経内膜組織への移行は血液神経関門 (blood-nerve barrier, BNB) によって阻まれている。有髄神経軸索の再生期には, 基底膜内に Büngner's band と呼ばれる再生 Schwann 細胞の突起の複合体を中心とした構造物が形成され, この中を軸索がゆっくりと伸長してくる像が観察される。この Schwann 細胞複合体は, GDNF をはじめとする神経栄養因子を分泌して軸索再生に寄与していると考えられている¹⁾が, これだけでは十分でないことは多くの末梢神経損傷, 末梢性ニューロパチーは不完全な回復に留まることをみても明らかであろう。

末梢神経系で BNB を構成している部位は, ①神経周膜の最内層と, ②神経内膜内微小血管の 2カ所である。外傷や entrapment neuropathy を中心とした局所の末梢神経の機械的損傷が問題となる整形外科領域では, ①が話題の中心となるが, 神経内科医としては末梢神経障害を治療するにあたって全身循環系からアプローチする視点をとりたいので, 本シンポジウムでは, ②を中心に考察をおこないたい。②の神経内膜微小血管に存在する BNB を越えて神経内膜組織へ潤沢に神経栄養因子を供給する方法として 2つの戦術が考えられる。1つは単純に BNB を破壊して血中蛋白の神経内膜内流入をうながす方策である。軸索変性の急性期には一時的に BNB が開くことはよく知られており²⁾, これは, 軸索再生のために必要な物質をある時期に限定して循環血液から神経内膜内へ移行させるという意味では合目的な現象であると考えて良いが, 一方, BNB の破壊によって有害物質も自由に末梢神経神経内膜へアクセスできることはいうまでもない。また, 各種炎症性ニューロパチーでの神経内膜内微小血管の形態学的³⁾あるいは分子レベル⁴⁾での異常を筆者は報告してきたが, これらも炎症性ニューロパチーの増悪因子として捉えるのが妥当と思われる。したがって, BNB の単なる破壊は末梢神経再生の戦略としては採択しがたい。

第 2 の方策は BNB 構成内皮細胞を改変して選択的に有用

物質を神経内膜内へと通す, あるいは BNB 構成内皮細胞から神経栄養因子を供給させるという戦術である。しかしながら, 一時的かつ可逆的な BNB の破壊, あるいは BNB 上のトランスポーターの機能改変などを達成できる程には, 現時点では BNB 構成細胞の細胞学的特質は十分に明らかになっていない。中枢神経系のバリアーである血液脳関門 (blood-brain barrier, BBB) は, この 15 年余の間に多くの細胞学的知見が蓄積されており, これには, BBB 構成内皮細胞株の樹立が大きく貢献している。一方, BNB 構成細胞の単離は限られた数施設でしか試みられておらず, 細胞株はまったく樹立されていないという現状で, BNB の細胞学的研究は BBB のそれに大きく遅れをとっている。

筆者はこの状況を打開すべく, 1990 年代後半から BNB 由来内皮細胞の単離培養を試みてきた⁵⁾が, 最近になってようやく, BNB を構成する 2つの細胞, すなわち神経内膜微小血管由来内皮細胞と同由来血管周細胞のヒトおよびラット不死化細胞株樹立に世界に先駆けて成功した^{6,7)}。ラット BNB 由来不死化細胞株の作製には温度感受性 SV40 トランスジェニックラット⁸⁾をもちい, ヒト BNB 由来不死化細胞株は文書による同意がえられたヒト剖検例より採取した坐骨神経組織から樹立した。細胞の単離は定法^{5,9)}にしたがった。坐骨神経を無菌的に取り出し, 実体顕微鏡下で神経外膜, 周膜を取り除いたのち神経内膜組織を mince し, 0.25% collagenase 溶液で 2 時間消化した。ペレットを 15% dextran に浮遊させて遠心して血管画分を分離し, 洗浄のち I 型コラーゲンでコートされた plastic dish へ播種し 37°C で培養した。ヒト細胞の不死化を目的として播種 4 日後に温度感受性 SV40 を, 8 日後に hTERT をレトロウイルスベクターをもちいて導入した。クローニングカップをもちいて微小血管内皮細胞および血管周細胞の純粋なコロニーを単離した。

ラットおよびヒト BNB 由来内皮細胞株を Fig. 1 に示す。いずれも BBB 由来内皮細胞と同じく紡錘形の細胞が集合して 1 枚のシートを作る形態を示していた。von Willebrand 因子陽性, アセチル化 LDL 取り込み陽性, tight junction 形成などのバリアー構成内皮細胞の基本的属性を有している他, claudin-5, occludin, ZO-1 などの tight junction 関連蛋白や GLUT-1, mdr1, LAT1, ABCG2 などの各種トランスポーターの発現も明らかで, BBB 構成内皮細胞とほぼ同等の細胞

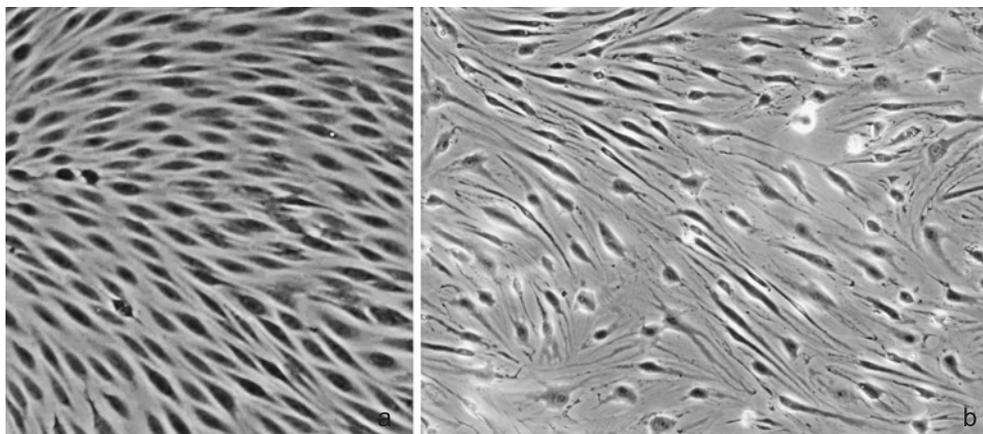


Fig. 1 Phase contrast micrographs of rat (a) and human (b) immortal peripheral nerve endothelial cell lines. Spindle-fiber-shaped morphology is prominent.

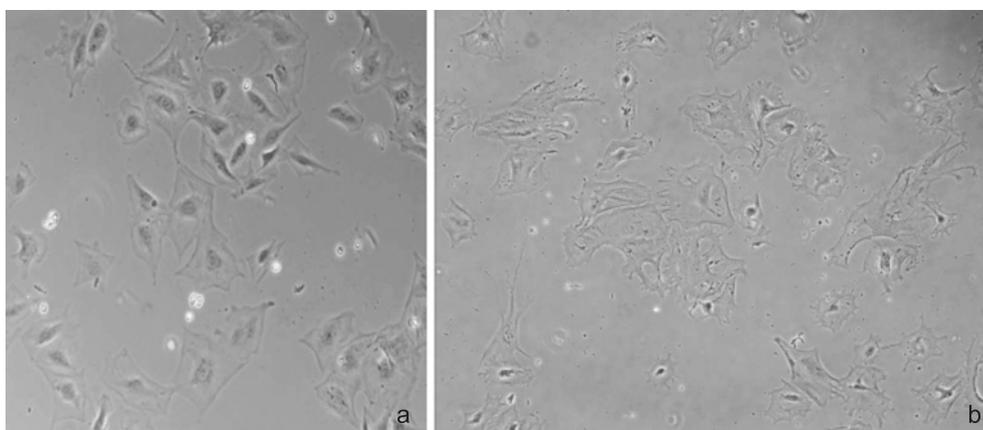


Fig. 2 Phase contrast micrographs of rat (a) and human (b) immortal pericyte cell lines originating from microvessels in the endoneurium. Note the ruffled-border morphology with highly irregular edges.

学的性質を有していることが明らかになった。唯一、ラット BNB 由来内皮細胞では OAT3 が欠損していることが明らかになったが、このトランスポーターは HVA などを血管腔へと排出する efflux transporter であり、シナプスが存在しない末梢神経内膜内では本来まったく必要ないものである。このトランスポーターの欠損は BNB を構成する内皮細胞としては合目的であると同時に、同じ神経系のバリアーといっても BBB と BNB をまったく同列に扱う事が誤りであることを示す重要な知見である⁶⁾。

Fig. 2 にラットおよびヒト BNB 由来血管周細胞 (pericyte) を示す。いずれも多角形の不整な形態を示し、 α -smooth muscle actin, NG2, osteopontin などの血管周細胞マーカーが陽性であった。Claudin-5 は陰性であったが、occludin, mdrl をはじめとするその他のバリアー構成内皮細胞に発現する蛋白を共有していた。これらのバリアー蛋白は、血管周細胞株を confluent に培養することによって細胞間境界に集積して発現するようになり、血管周細胞そのものもバリアー形成に直

接関与していることが示唆された⁷⁾。

BNB を構成するこの 2 つの細胞を組み合わせることで BNB の体外モデルを構築する事が可能となる。BBB 機能の維持に神経膠細胞が必須であることは半ば常識であり、内皮細胞/神経膠細胞の組み合わせによる BBB 体外モデルは広くもちいられているが、ここに血管周細胞を加えるべきであるという考えが最近支持されている。微小血管での血管周細胞と内皮細胞の比率は各臓器によってことなり、中枢神経系や網膜では血管周細胞の比率がほぼ 1 : 1 と非常に高い¹⁰⁾ ことから、バリアー機能の維持に血管周細胞も関与しているであろう事は以前から指摘されていた。血管周細胞の conditioned medium によって BNB 由来内皮細胞株のバリアー機能上昇が確認され、神経膠細胞の存在しない末梢神経系にあって、血管周細胞がバリアーの regulator としての機能を担っていることが明らかになった⁷⁾。

これら 2 つの BNB 構成細胞の個々の生化学的解析、および共培養系の生理学的機能解析は筆者らの教室で端緒につい

たばかりであるが、血液脳関門 (BBB) と比較して遙かに遅れをとっている BNB 研究の起爆剤となることが期待され、今までまったくのブラックボックスであった BNB の細胞学的本質が数年以内に明らかになるものと考えられる。末梢神経系は元来再生機能のきわめて強い臓器であり、BNB を人為的に制御して末梢神経系の内部環境を整えることにより、難治性末梢性ニューロパチーの内科的治療はさらに新しい局面を迎えることになるであろうと期待される。

文 献

- 1) Frostick S, Yin Q, Kemp G: Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 1998; 18
- 2) Ohara S, Ikuta F: On the occurrence of the fenestrated vessels in Wallerian degeneration of the peripheral nerve. *Acta Neuropathol* 1985; 68: 259—262
- 3) Kanda T, Yamawaki M, Iwasaki T, et al: Glycosphingolipid antibodies and blood-nerve barrier in autoimmune demyelinating neuropathy. *Neurology* 2000; 54: 1459—1464
- 4) Kanda T, Numata Y, Mizusawa H: Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy; decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: 765—769
- 5) Kanda T, Iwasaki T, Yamawaki M, et al: Isolation and culture of bovine endothelial cells of endoneurial origin. *J Neurosci Res* 1997; 49: 769—777
- 6) Sano Y, Shimizu F, Nakayama H, et al: Endothelial cells constituting blood-nerve barrier have highly specialized characteristics as barrier-forming cells. *Cell Struct Funct* 2007; 32: 139—147
- 7) Shimizu F, Sano Y, Maeda T, et al: Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol* 2008; in press
- 8) Takahashi R, Hirabayashi M, Yanai N, et al: Establishment of SV40-tsA58 transgenic rat as a source of conditionally immortalized cell lines. *Exp Anim* 1999; 48: 255—261
- 9) Kanda T, Yoshino H, Ariga T, et al: Glycosphingolipid antigens in cultured microvascular bovine endothelial cells; sulfoglucuronosyl paragloboside as a target of monoclonal IgM in demyelinating neuropathy. *J Cell Biol* 1994; 126: 235—246
- 10) Shepro D, Morel N: Pericyte physiology. *FASEB J* 1993; 7: 1031—1038

Abstract

Therapeutic strategy for peripheral nerve regeneration; molecular permeability control at the blood-nerve barrier

Takashi Kanda, M.D., Ph.D.

Department of Neurology and Clinical Neuroscience, Yamaguchi University Graduate School of Medicine

The blood-nerve barrier (BNB) is one of the functional barriers sheltering the nervous system from systemic blood. Although BNB is effective in controlling the endoneurial environment in normal condition, it may interfere the entrance of beneficial substances including various growth factors into the endoneurial space and inhibit the axonal regeneration in peripheral neuropathy. Since endothelial cells and pericytes of endoneurial microvascular origin are structural basis of BNB, investigation of the characteristics of these two cells using cell culture technique may provide novel strategies to modify BNB functions to promote peripheral nerve regeneration; however, no adequate cell lines possessing in vivo BNB characteristics were present so far. Recently we successfully established cell lines of endothelial cells and pericytes of endoneurial microvessel origin using transgenic rats harboring the temperature-sensitive simian virus 40 large T antigen. We also obtained immortal endothelial and pericyte cell lines originating from human BNB. Analyses of physiological characteristics and protein profiles in these BNB-forming cells are underway in our laboratory.

(*Clin Neurol*, 48: 1028—1030, 2008)

Key words: blood-nerve barrier, microvascular endothelial cell, pericyte, growth factor, tight junction