

＜シンポジウム (2)-8-1＞末梢神経の再生医学：難治性末梢神経疾患治療の新たな展望

シュワン細胞株をもちいた末梢神経再生機構の解析

三五 一憲¹⁾ 渡部和彦²⁾

要旨：末梢神経再生過程においてシュワン細胞が主要な役割を担っていることに疑念の余地はないが、その作用機構には不明な点が多い。われわれは成熟 ICR マウスおよび Fischer ラット末梢神経の初代培養系から、不死化シュワン細胞株 IMS32 および IFRS1 を樹立した。これらの細胞株はグリア細胞マーカーや神経栄養因子を発現するとともに、その培養上清が成熟ラット後根神経節ニューロンや PC12 細胞の神経突起伸長を促進する。さらに IFRS1 は、これらニューロンとの共培養において髄鞘形成能を有する。以上より、IMS32 や IFRS1 は成熟シュワン細胞としての特性を保持しており、末梢神経再生機構の解析に有用と考えられる。

(臨床神経 2013;53:1117-1119)

Key words：不死化シュワン細胞，成熟齧歯類，軸索再生，共培養，髄鞘形成

はじめに

シュワン細胞は、末梢神経系のグリア細胞として髄鞘を形成・維持するとともに、運動・感覚ニューロンの生存や機能維持に重要な栄養因子、サイトカインを産生している。また損傷後の軸索再生過程において、活性化されたシュワン細胞が組織の修復、再生軸索の誘導、再髄鞘化などに主要な役割を担っている¹⁾。このようなシュワン細胞の多彩な機能を解明する上で、培養系をもちいた解析が有用である。幼弱動物の末梢神経組織からシュワン細胞を純培養する手法は確立されており、発生・分化・再生などの研究に広くもちいられてきた。しかしながら、神経再生機構の解析やニューロパチーの病態解明・治療法開発を目指す上では、成熟期シュワン細胞の培養系がより望ましい研究モデルと考えられる。われわれは成熟マウス・ラット末梢神経組織の初代培養系から自発的不死化シュワン細胞株を樹立した²⁾³⁾。本稿ではこれらシュワン細胞株の生物学的特性について述べるとともに、軸索再生研究モデルとしての有用性について議論する。

成熟マウス由来不死化シュワン細胞株 IMS32

成熟 ICR マウスの脊髄後根神経節 (dorsal root ganglia; DRG) および末梢神経組織を初代培養し 6 ヶ月以上継代維持すると、自発的なコロニー形成がみられる。われわれはこのコロニーから、不死化シュワン細胞株 immortalized mouse Schwann cells (IMS) 32 を樹立した²⁾。IMS32 は位相差顕微鏡下に紡錘形の形状を呈し、グリア細胞系マーカー蛋白 S100, glial fibrillary acidic protein (GFAP), 神経栄養因子 nerve growth factor (NGF), glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF),

ciliary neurotrophic factor (CNTF), 転写調節因子 PAX3, Krox20, SCIP, Sox10 などを発現している。また種々の成長因子やグリア増殖因子 neuregulin- β などに反応して IMS32 の増殖が促進される。さらにラット株化ニューロン PC12 やマウス DRG ニューロンを IMS32 培養上清の存在下で培養すると、神経突起伸長が促進される²⁾⁴⁾。これらのことから、IMS32 は成熟シュワン細胞の生理・生化学的特性の多くを保持しているものと考えられた。一方、初代培養シュワン細胞とことなり、IMS32 とニューロンとの共培養系においては髄鞘の形成はみとめられなかった。初代培養シュワン細胞にくらべ IMS32 の増殖能がきわめて高いことが、逆に長期間を要する共培養系での髄鞘形成に不向きである可能性もあり、現在、増殖能をおさええたマウスシュワン細胞株の樹立を試みている。

これまでに、CNTF, sonic hedgehog (SHH), galectin-1 (GAL-1) などをはじめとして、神経再生機構に関与する因子の発現調節・作用機構の解析に、IMS32 が利用されてきた⁵⁾。この中で、われわれが解明した GAL-1 の作用機構について簡単に紹介する。GAL-1 は動物レクチンの galectin family に属し、成熟期末梢神経系のニューロン、シュワン細胞に強く発現する。われわれは Western blotting 解析により、IMS32 の培養上清中に GAL-1 とその酸化型フォーム (GAL-1/Ox) に相当するシグナルを検出した⁶⁾。このことから、軸索の損傷にともないシュワン細胞から放出された GAL-1 の一部が、細胞外の酸化的環境下で GAL-1/Ox に変換されることが示唆された。還元型の GAL-1 はレクチン活性を有し、炎症因子として損傷部位の修復に係わっていることが推定される。これに対し GAL-1/Ox はレクチン活性を持たず、サイトカイン様因子としてマクロファージを刺激し、軸索再生の初期過程に深く関与するものと考えられる⁷⁾。

¹⁾ 東京都医学総合研究所末梢神経病態研究室 [〒156-8506 東京都世田谷区上北沢 2-1-6]

²⁾ 東京都医学総合研究所神経変性病態プロジェクト

(受付日：2013 年 5 月 30 日)

成熟ラット由来不死化シュワン細胞株 IFRS1

成熟 Fischer344 ラット末梢神経組織から分散培養したシュワン細胞を, neuregulin- β ならびに forskolin をふくむ無血清培養液で 4~5 ヶ月継代維持することにより, 不死化シュワン細胞株 IFRS (immortalized Fischer rat Schwann cells) 1 をえた³⁾. IFRS1 は初代培養シュワン細胞や IMS32 と同様に, グリア細胞系マーカータンパク (S100, GFAP), 神経栄養因子 NGF, GDNF, CNTF などを発現している. IFRS1 の継代維持には neuregulin- β , forskolin の添加を必要とし, IMS32 のような旺盛な増殖能を示さない. 逆にその細胞特性を利用し, われわれは IFRS1 と DRG ニューロンや PC12 との共培養系を確立し, 髄鞘形成を誘導することに成功した³⁾⁸⁾. 成熟動物由来の細胞同士, あるいは株化細胞同士による共培養系確立・髄鞘形成はこれまで報告がなく, 末梢神経の変性・再生機構の解析に有用と考えられる. とくに後者は, 煩雑な初代培養をせずにニューロン, シュワン細胞のクロストークを効率よく安定して解析できるという大きなメリットがある. 現在これらのシュワン細胞株やニューロンとの共培養系をもちいて, 損傷後の軸索再生・再髄鞘化を促進する諸因子 (可溶性 III 型 Neuregulin-1, Exendin-4) の作用機構を解析している.

おわりに

シュワン細胞は末梢神経系のグリア細胞として, 中枢神経系のアストロサイト, オリゴデンドロサイトの双方を併せたプロトタイプ的な性格を有している. 現在のところ, マウス・ラットの神経系で安定して樹立可能な分化型細胞株はわれわれのシュワン細胞以外にはない. IMS32 および IFRS1 は, 成熟シュワン細胞の生理・生化学的特性の多くを保持してお

り, 末梢神経研究に有用な細胞株と考えられた. 今後はニューロンとの共培養やマウス, ラットへの移植実験によってニューロン・シュワン細胞の相互連携にかかわる病態を解析するとともに, 有効な治療法の開発に役立てていきたい.

※本論文に関連し, 開示すべき COI 状態にある企業, 組織, 団体はいずれもありません.

文 献

- 1) Bunge RP. The role of Schwann cell in trophic support and regeneration. *J Neurosci* 1994;24:242:S19-S21.
- 2) Watabe K, Fukuda T, Tanaka J, et al. Spontaneously immortalized adult mouse Schwann cells secrete autocrine and paracrine growth-promoting activities. *J Neurosci Res* 1995;41:279-290.
- 3) Sango K, Yanagisawa H, Kawakami E, et al. Spontaneously immortalized Schwann cells from adult Fischer rat as a valuable tool for exploring neuron-Schwann cell interactions. *J Neurosci Res* 2011;89:898-908.
- 4) Tosaki T, Kamiya H, Yasuda Y, et al. Reduced NGF secretion by Schwann cells under the high glucose condition decreases neurite outgrowth of DRG neurons. *Exp Neurol* 2008;213:381-387.
- 5) 三五一憲, 渡部和彦. 成熟マウス・ラット由来シュワン細胞株の樹立とその末梢神経疾患研究への応用. *末梢神経* 2010;21:44-51.
- 6) Sango K, Tokashiki A, Ajiki K, et al. Synthesis, localization and externalization of galectin-1 in mature dorsal root ganglion neurons and Schwann cells. *Eur J Neurosci* 2004;19:55-64.
- 7) 三五一憲, 柳澤比呂子, 高久静香ら. 末梢神経系再生とガレクチン-1. *末梢神経* 2013;24:63-70.
- 8) Sango K, Kawakami E, Yanagisawa H, et al. Myelination in coculture of established neuronal and Schwann cell lines. *Histochem Cell Biol* 2012;137:829-839.

Abstract**Immortalized adult rodent Schwann cells as useful tools for the study of peripheral nerve regeneration**Kazunori Sango, M.D., Ph.D.¹⁾ and Kazuhiko Watabe, M.D., Ph.D.²⁾¹⁾Laboratory of Peripheral Nerve Pathophysiology, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science²⁾ALS/Neuropathy Project, Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science

We have established spontaneously immortalized Schwann cell lines from adult ICR mice [IMS32] and Fischer344 rats [IFRS1]. IMS32 cells display distinct Schwann cell phenotypes such as a spindle-shaped morphology and the expression of glial cell markers (*e.g.* S100, glial fibrillary acidic protein (GFAP), p75 low-affinity neurotrophin receptor (p75^{NTR})) and neurotrophic factors. In addition, conditioned medium obtained from IMS32 cells enhances neurite elongation of PC12 cells and mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons. IMS32 cells have been utilized to investigate the action mechanisms of various molecules that accelerate peripheral nerve regeneration (*e.g.* ciliary neurotrophic factor, sonic hedgehog, galectin-1). Like IMS32 cells, IFRS1 cells retain the characteristic features of mature Schwann cells as described above. Furthermore, IFRS1 cells have been shown to myelinate neurites in coculture with adult rat DRG neurons and PC12 cells. Our current investigation with IFRS1 cells focuses on the molecular mechanisms of myelination-inducible factors, such as soluble neuregulin-1 type III and exendin-4. These Schwann cell lines can be valuable tools for exploring neuron-Schwann cell interactions, pathobiology of axonal degeneration and regeneration in the peripheral nervous system, and novel therapeutic approaches against neurological disorders in patients with relevant diseases.

(Clin Neurol 2013;53:1117-1119)

Key words: immortalized Schwann cells, adult rodents, axonal regeneration, coculture, myelination
