

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10405

研究課題名(和文) シュワン細胞ミトコンドリア機能制御による神経因性疼痛に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for neuropathic pain by regulating mitochondrial function in Schwann cells

研究代表者

田中 啓之(Tanaka, Hiroyuki)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00432542

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：シュワン細胞のミトコンドリア機能制御に関わる薬剤の探索において、末梢神経障害治療薬として使用されているメチルコバラミンが候補物質の1つであることを見いだした。メチルコバラミンはシュワン細胞においてミトコンドリア機能の指標となるNAD⁺/NADH値を上昇させ、*in vitro*においてはシュワン細胞の脱分化を抑制、分化・髄鞘化を促進し、*in vivo*においても末梢神経の脱髄を抑制することが分かった。メチルコバラミンはシュワン細胞のミトコンドリア機能を制御することで神経因性疼痛に対する新規治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that methylcobalamin, which is used as a therapeutic agent for peripheral neuropathy, is one of candidate substances to regulate mitochondrial function in Schwann cells. Methylcobalamin increases the NAD⁺/NADH value, which is an indicator of mitochondrial function in Schwann cells, inhibits dedifferentiation and promotes differentiation/myelination of Schwann cells *in vitro*. Methylcobalamin also inhibits demyelination of peripheral nerve *in vivo*. It was suggested that methylcobalamin could be a novel treatment for neuropathic pain by regulating the mitochondrial function in Schwann cells.

研究分野：整形外科学

キーワード：シュワン細胞 ミトコンドリア 神経因性疼痛

1. 研究開始当初の背景

脊髄神経根・末梢神経損傷により引き起こされる難治性神経因性疼痛は、患者の ADL や QOL を著しく損ない、全世界で 1500 万人以上の患者が罹患しているとされる。その一因として末梢神経の脱髄が挙げられており、これを制御することで神経因性疼痛を治療できる可能性がある。末梢神経の髄鞘を構成する主成分は脂質であり全体の 70-80% を占め、残りの 20-30% が蛋白質であるとされている。また cerebroside と sulfatide が全脂質の 30% を占めており (Garbay 2000, Prog. neurobiol)、脂質代謝が髄鞘形成の重要なポイントとなっている。

ミトコンドリアは ATP 産生やアポトーシスに関与するとされており、神経細胞におけるミトコンドリア機能についてはこれまでによく研究されているが、末梢神経において髄鞘を形成する細胞であるシュワン細胞におけるミトコンドリア機能についてはほとんど報告がない。近年になりシュワン細胞のミトコンドリア機能異常により脂肪酸の酸化促進 (NAD⁺/NADH 低下、Acyl-Carnitine 上昇、-OH-acyl-CoA 上昇) や脂質合成低下 (Sulfatide 低下、Cerebroside 低下) が生じ、軸索変性、脱髄が誘導されることが報告された (Neuron, 2008 & 2013)。すなわち、シュワン細胞のミトコンドリア機能を制御することで軸索変性、脱髄を抑制し、神経因性疼痛の改善を図れる可能性がある。

近年、ドラッグ・リポジショニングが注目されているが、これは既存の薬剤を新規効能を有する薬剤として再利用する手法であり、その最大の利点は、開発期間の短縮と研究開発コストの軽減にある。また、体内動態、安全性や臨床薬理に関する情報が利用できるため、非常に有用な方法であると考えられている。そこで本研究では、このドラッグ・リポジショニングの手法を用いて、FDA 認可薬ライブラリーのスクリーニングにより、ミトコンドリア機能促進に重要な役割を果たす薬剤の探索と神経因性疼痛に対する治療薬への応用を検討することを目的とする。

2. 研究の目的

神経因性疼痛の発生機序はいまだに完全には解明されていないが、脱髄もその一因であるとされている。末梢神経系において髄鞘を形成するシュワン細胞のミトコンドリア機能異常により脱髄を生じることが分かっており、シュワン細胞のミトコンドリア機能促進が脱髄抑制に重要な役割を担っている。本研究の目的は、既存薬剤の新規効能を見いだすドラッグ・リポジショニングにより、FDA 認可薬を用いて網羅的にシュワン細胞ミトコンドリア機能促進に関与する候補薬剤を探索し、その機能を詳細に検討することである。さらに動物モデルを用いてミトコンドリア機能制御による脱髄抑制薬を投与す

ることで、神経因性疼痛に対する新規治療法を開発することである。

3. 研究の方法

神経因性疼痛に対する新規治療法の開発に向けて、本研究では以下の 3 ステップに焦点を絞って研究を進める。

(1) シュワン細胞ミトコンドリア機能制御に関わる薬剤 X の探索

上記のドラッグ・リポジショニングの観点より、FDA 認可薬ライブラリーを用いて、NAD⁺/NADH を指標としたスクリーニングを行い、シュワン細胞ミトコンドリア機能促進に働く薬剤の探索を行う。

(2) 薬剤 X がシュワン細胞に及ぼす機能の解明

上記により抽出された候補薬が、invitro でシュワン細胞に与える影響を解明する。初代シュワン細胞培養を行い、増殖、アポトーシスについて検討を行う。またシュワン細胞を分化させた状態にて、髄鞘関連タンパク質の発現についても検討を行う。また後根神経節細胞とシュワン細胞との共培養においても、髄鞘関連タンパク質の発現について検討を行う。

(3) 神経障害性疼痛モデルにおける薬剤 X の治療効果判定

ラット神経障害性疼痛モデルを作製し、薬剤 X 投与による治療効果判定を行う。組織学的には軸索変性、脱髄の程度に関して検討を行い、行動学的評価にて疼痛軽減の有無に関して検討を行う。

4. 研究成果

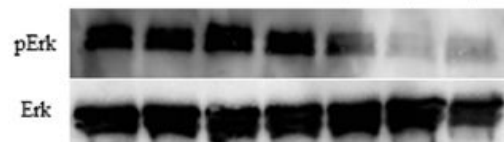
(1) シュワン細胞においてメチルコバラミンは NAD⁺/NADH 値を上昇させる

生後 1-3 日のラット坐骨神経を採取し、酵素処理することでラットシュワン細胞の単離、培養を行った。シュワン細胞培養液中に、FDA 認可薬ライブラリーをそれぞれ添加し、NAD⁺/NADH を指標としたスクリーニングを行った結果、末梢神経障害治療薬として使用されているメチルコバラミン (MeCbl) が候補物質の一つとして候補に挙げられた。すなわち、メチルコバラミンは NADH 値を低下させることで、NAD⁺/NADH 値を上昇させることが分かった。

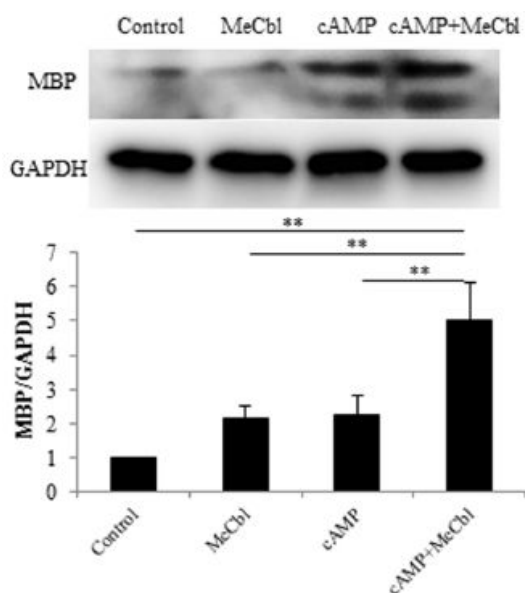
(2) メチルコバラミンはシュワン細胞において Erk 活性を阻害し、分化促進効果を示す

シュワン細胞培養液に db-cAMP を添加した分化メディウムで培養し分化誘導したところ、Erk1/2 のリン酸化を阻害することが分かった。

MeCbl Control 1nM 10nM 100nM 1μM 10μM 100μM

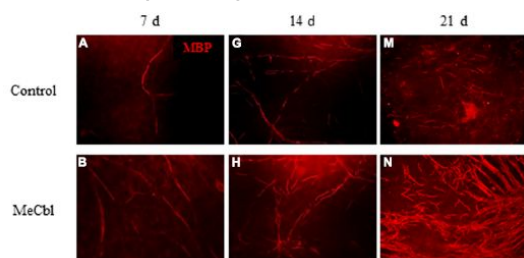


またシュワン細胞の分化マーカーである MBP の発現が上昇することが分かった。



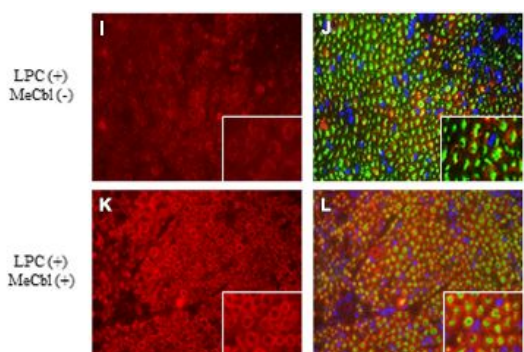
(3) メチルコバラミンはシュワン細胞と後根神経節の共培養において分化、髄鞘化を促進する

シュワン細胞と後根神経節細胞の共培養を行うことで MBP の発現が上昇するが、メチルコバラミン添加により発現が上昇することがわかった (下記 N)。



(4) メチルコバラミンはラット坐骨神経脱髄モデルにおいて再髄鞘化を促進する

Lysophosphatidylcholine (LPC) をラット坐骨神経に局所投与することで、局所脱髄モデルを作製した。メチルコバラミンを浸透圧ポンプを用いて全身投与することで、局所脱髄部分の再髄鞘化が促進されることが分かった (下記 L)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Matsuoka H, Tanaka H, Sayanagi J, Iwahashi T, Suzuki K, Nishimoto S, Okada K, Murase T, Yoshikawa H. Neurotrophin accelerates the differentiation of Schwann cells and remyelination in a rat lysophosphatidylcholine-induced demyelination model. *Int. J. Mol. Sci.* 査読有. 19, 2018, 516. DOI: 10.3390/ijms19020516
- (2) Suzuki K, Tanaka H, Ebara M, Uto K, Matsuoka H, Nishimoto S, Okada K, Murase T, Yoshikawa H. Electrospun nanofiber sheets incorporating methylcobalamin promote nerve regeneration and functional recovery in a rat sciatic nerve crush injury model. *Acta Biomater.* 査読有. 53, 2017, 250-259. DOI: 10.1016/j.actbio.2017.02.004
- (3) Nishimoto S, Okada K, Tanaka H, Okamoto M, Fujisawa H, Okada T, Naiki M, Murase T, Yoshikawa H. Neurotrophin attenuates local inflammatory response and inhibits demyelination induced by chronic constriction injury of the mouse sciatic nerve. *Biologicals.* 査読有. 44, 2016, 206-211. DOI: 10.1016/j.biologicals.2016.03.005
- (4) Nishimoto S, Tanaka H, Okamoto M, Okada K, Murase T, Yoshikawa H. Methylcobalamin promotes the differentiation of Schwann cells and remyelination in lysophosphatidylcholine-induced demyelination of the rat sciatic nerve. *Front Cell Neurosci.* 査読有. 9, 2015, 298. DOI: 10.3389/fncel.2015.00298

〔学会発表〕(計 24 件)

- (1) 松岡峰造、蛭名耕介、平尾真、田中啓之、吉川秀樹 酸素ウルトラファインバブル水投与はラットの坐骨神経損傷後の機能障害を改善する 第 60 回日本手外科学会学術集会 2017 年
- (2) 鈴木浩司、田中啓之、荏原充宏、村瀬剛、吉川秀樹 メチルコバラミン徐放ナノファイバーシートはラット坐骨神経損傷モデルの神経再生と機能回復を促進する 第 60 回日本手外科学会学術集会 2017 年
- (3) 田中啓之、岡田潔、岡久仁洋、村瀬剛、吉川秀樹 メチルコバラミン反復投与による尺骨神経部分移行術(Oberlin 法)後の機能回復促進効果 第 60 回日本手外科学会学術集会 2017 年
- (4) 田中啓之 高濃度メチルコバラミンに

- よる末梢神経再生 第 28 回日本末梢神経学会学術集会 2017 年
- (5) 松岡峰造、蛭名耕介、平尾眞、田中啓之、佐柳潤一、岩橋徹、北口和真、鈴木浩司、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 酸素ウルトラファインバブル水投与はラット坐骨神経圧挫損傷モデルの機能障害を改善する 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年
- (6) 佐柳潤一、田中啓之、岩橋徹、松岡峰造、岡田潔、岡久仁洋、村瀬剛 メチルコバラミン含有局所徐放ナノファイバーシートと神経再生誘導チューブの併用によるラット坐骨神経欠損モデルにおける末梢神経再生 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年
- (7) 田中啓之、鈴木浩司、荏原充宏、宇都甲一郎、松岡峰造、岩橋徹、佐柳潤一、岡田潔、岡久仁洋、村瀬剛、名井陽、吉川秀樹 メチルコバラミン含有局所徐放ナノファイバーシートはラット坐骨神経損傷後の神経再生を促進する 第 37 回整形外科バイオマテリアル研究会 2017 年
- (8) Matsuoka H, Tanaka H, Sayanagi J, Iwahashi T, Suzuki K, Okada K, Murase T, Yoshikawa H. Neurotrophin accelerates peripheral nerve regeneration by promoting the differentiation of Schwann cells. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2017 年
- (9) Suzuki K, Tanaka H, Ebara M, Sayanagi J, Iwahashi T, Matsuoka H, Okada K, Murase T, Yoshikawa H. Electrospun nanofiber sheets including methylcobalamin promote nerve regeneration and functional recovery in a rat sciatic nerve injury model. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society. 2017 年
- (10) Suzuki K, Tanaka H, Okada K, Murase T, Yoshikawa H. Effect of Neurotrophin on peripheral nerve regeneration. American Society for Surgery of the Hand. 2017 年
- (11) 田中啓之 末梢神経系におけるノイロトロピンの効果 日本ペインクリニック学会 2016 年
- (12) 鈴木浩司、田中啓之、荏原充宏、佐柳潤一、岩橋徹、松岡峰造、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 メチルコバラミン徐放ナノファイバーシートはラット坐骨神経圧挫損傷後の神経再生を促進する 日本マイクロサージャリー学会 2016 年
- (13) 松岡峰造、田中啓之、佐柳潤一、岩橋徹、鈴木浩司、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 ノイロトロピンはシュワン細胞の分化を促進させ末梢神経再生効果を発揮する 日本マイクロサージャリー学会 2016 年
- (14) 田中啓之 末梢神経障害と薬物療法 第 59 回日本手外科学会学術集会 2016 年
- (15) 西本俊介、田中啓之、村瀬剛、吉川秀樹 全身振動・加速度刺激によるラット坐骨神経損傷モデルに対する神経再生促進効果 第 59 回日本手外科学会学術集会 2016 年
- (16) 松岡峰造、田中啓之、鈴木浩司、村瀬剛、吉川秀樹 ラット坐骨神経局所脱髄モデルにおいてノイロトロピンは再髄鞘化を促進する 第 59 回日本手外科学会学術集会 2016 年
- (17) 鈴木浩司、田中啓之、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 ラット坐骨神経圧挫損傷モデルに対するノイロトロピンの治療効果 第 59 回日本手外科学会学術集会 2016 年
- (18) 松岡峰造、田中啓之、岩橋徹、鈴木浩司、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 ノイロトロピンは AKT、ERK シグナルを介してシュワン細胞の分化を促進させる 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016 年
- (19) 鈴木浩司、田中啓之、岩橋徹、松岡峰造、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 ノイロトロピンの末梢神経再生に対する効果 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016 年
- (20) 鈴木浩司、田中啓之、荏原充宏、岩橋徹、松岡峰造、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 メチルコバラミン含有局所徐放ナノファイバーシートは神経再生を促進する 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016 年
- (21) 田中啓之、鈴木浩司、荏原充宏、松岡峰造、岩橋徹、佐柳潤一、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 メチルコバラミン徐放ナノファイバーシートによるラット坐骨神経損傷後の末梢神経再生 日本運動器移植・再生医学研究会 2016 年
- (22) 西本俊介、田中啓之、村瀬剛、吉川秀樹 Methylcobalamin はシュワン細胞の分化を促進し、ラット脱髄モデルの再髄鞘化を促進する 第 58 回日本手外科学会学術集会 2015 年
- (23) 田中啓之、西本俊介、籾内洋輔、鈴木浩司、松岡峰造、岡田潔、村瀬剛、吉川秀樹 高濃度メチルコバラミンによる包括的末梢神経再生 第 88 回日本整形外科学会学術総会 2015 年
- (24) 田中啓之 高濃度メチルコバラミンを用いた末梢神経構成細胞賦活化による包括的末梢神経再生 細胞再生医療研究会 2015 年
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
田中 啓之 (TANAKA, Hiroyuki)

大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：00432542

(2)研究分担者

岡田 潔 (OKADA, Kiyoshi)
大阪大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：40576279

岡 久仁洋 (OKA, Kunihiro)
大阪大学・学内共同利用施設等・助教
研究者番号：50724085

村瀬 剛 (MURASE, Tsuyoshi)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：50335361