

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10944

研究課題名(和文) 重度末梢神経障害治療を可能とするHybrid Vein Wrapping法の開発

研究課題名(英文) Development of Hybrid Vein Wrapping to treat severe peripheral neuropathy

研究代表者

村上 賢一 (Murakami, Kenichi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：40447298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：外傷性末梢神経損傷、絞扼性神経障害、複合性局所疼痛症候群などの末梢性神経障害は治療に難渋する。本研究では既存治療法の一つであるVein Wrapping(VW)法の作用機序の解明と作用機序に基づいた新規材料(hybrid vein)の開発を行った。その結果、Veinから産生される塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)が抗酸化因子(HO-1)を介して神経保護に働いている可能性を明らかにした。高密度コラーゲン材料にbFGFを搭載し、神経障害部位にWrappingすることでVWを模擬出来ることを明らかにした。本シーズは広範囲障害に適応できる新たな治療法として有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重度末梢神経障害は、患者の肉体的精神的苦痛に加える。加えて、入院および通院治療の増加による医療費増加、社会復帰遅延による多大な経済損失に直結する。従って、重度末梢神経障害治療法の開発は急務である。Vein Wrappingは重度末梢神経障害に対する治療法の一つであるが、広範囲障害には対応できないという欠点があった。本シーズは広範囲障害に適応できる新たな治療法として有用である

研究成果の概要(英文)：Autologous vein wrapping is used to treat recurrent chronic constriction neuropathy and traumatic peripheral nerve injury. We showed that vein-derived basic fibroblast growth factor (bFGF) promotes heme oxygenase-1 (HO-1), which reduces allodynia via its anti-inflammatory properties. To mimic vein wrapping, we developed a collagen sheet(CS) impregnated with bFGF. Chronic constriction injury (CCI) was induced in male Wistar rats as a model of sciatic nerve injury. The bFGF/CS composites showed decreased allodynia and HO-1 induction, as observed with vein wrapping. Therefore, local application of bFGF may be an alternative treatment strategy for compressive neuropathy and peripheral nerve trauma in clinical settings.

研究分野：整形外科学

キーワード：Vein Wrapping 末梢神経障害 コラーゲンシート 塩基性線維芽細胞増殖因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷性末梢神経損傷、絞扼性神経障害、CRPS(複合性局所疼痛症候群)などの末梢性神経障害は神経障害性疼痛や麻痺を呈し治療に難渋する。重度末梢神経障害は、患者の肉体的精神的苦痛に加える。加えて、入院および通院治療の増加による医療費増加、社会復帰遅延による多大な経済損失に直結する。従って、重度末梢神経障害治療法の開発は急務である。

近年、薬物療法の発展により神経障害性疼痛や重度神経障害性疼痛に対して鎮痛作用を持つ薬剤の使用が可能となった。しかし、あくまで対症療法であり、長期服用による副作用の問題が残されている。一方、Masear 等が考案した vein wrapping 法(損傷神経に自家静脈を巻きつける方法)は外傷性神経障害や難治性・再発性の絞扼性神経障害に対して有用であると報告されている。しかし、その作用機序は明らかになっていなかった。一方、高密度コラーゲン材料を用いた成長因子徐放システムを確立してきた。

2. 研究の目的

本研究では、vein wrapping の機序解明とそれに基づいた新規治療材料(Hybrid vein) を作製し、重度末梢神経障害に対する新規治療シーズの確立を行うことである。

3. 研究の方法

(1) Vein wrapping 時に Vein から放出される神経栄養因子の検討

雄性 Wistar ラット 8 週齢を用い、Chronic Constriction Injury (CCI) モデルを作成した。実験群として CCI モデルに、他のラットの右下静脈を損傷神経に巻きつけて作成する vein wrapping 群(V 群)、CCI のみを行ったコントロール群(C 群)を作成し(各 n=20)、坐骨神経展開のみの Sham 群(S 群)(n=5)と比較検討を行った。疼痛関連行動評価として術後 1,3,5,7 日目に von Frey test を行った。また、疼痛刺激に関連して発現する疼痛関連物質を精査するため坐骨神経、vein を用いて PCR を実施し、神経栄養因子、抗酸化物質の発現量を検討した。

(2) Hybrid Vein の作製

50 µg/ml の bFGF 溶液に高密度コラーゲンシートを 30,60,90 分浸漬した。浸漬後、bFGF 溶液における bFGF 濃度を ELISA 法を用いて測定し、結合量を測定した(図 1A)。

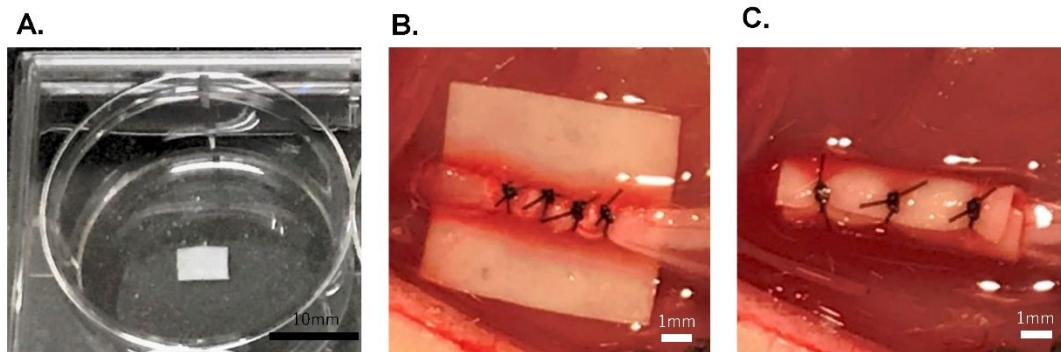


図 1. Hybrid Vein の作製と Hybrid Vein Wrapping

A. Hybrid Vein の作製, B,C Hybrid vein のラット坐骨神経への wrapping

(3) Hybrid vein の神経保護効果の検討

Wistar rat 8 週齢雄を使用し、末梢神経障害モデルとして、Chronic Constriction Injury(CCI) モデルを用いた。bFGF/CS を損傷神経に巻いた(bFGF/CS 群)、CS のみを損傷神経に巻いた(PBS/CS 群)、CCI のみを行ったコントロール群(Control 群)を作成した(各群 n=25)。行動学的評価として、術後 1,3,5,7,14 日目に von Frey test を行った(図 1B, 各群 n=5)。また術後 1,3,5,7,14 日目の坐骨神経から RNA を抽出し、RT-PCR を行い、損傷神経内での HO-1 の発現を検討した。また術後 1 日目の坐骨神経内での HO-1 蛋白の発現を ELISA 法で定量した。また HO-1 の免疫染色を行い、陽性細胞をカウントした。

4. 研究成果

(1) Vein wrapping 時に Vein から放出される神経栄養因子

von Frey test では、V 群、C 群で S 群に比し有意に疼痛過敏を呈し(p<0.05)、さらに V 群では C 群に比し改善を認めた(p<0.05)。PCR の結果、S 群の vein において、神経栄養因子である BDNF(Brain derived neurotrophic factor)および、bFGF (basic fibroblast growth factor) の発現が、坐骨神経と比し有意に高値を示した(p<0.05)。術後 3,5,7 日目における抗酸化物質である HO-1 (Heme oxygenase-1) の発現が、C 群、S 群に比し、V 群で有意に高値を示した(p<0.05)。本研究結果から移植 vein から産生放出される bFGF が、損傷神経における HO-1 発現上昇を促し神経保護作用をもたらしている可能性が示唆された。

(2) Hybrid veinの作製

コラーゲンシートへのbFGF結合量は反応時間の増加に伴い増加した。反応後90分におけるbFGFの結合量は $45.1 \pm 0.7 \mu\text{g}$ であった。この結果から溶液への浸漬時間は90分とした。

(3) Hybrid veinの神経保護効果の検討

術後1-5日目に、bFGF/CS群はPBS/CS群、control群に比し、有意に疼痛過敏が抑制された(図2)。また、術後1-5日目に、bFGF/CS群はPBS/CS群、control群に比し、損傷神経内でのHO-1 mRNA、タンパクの発現が有意に高値を示した(図3)。bFGF/CS群ではPBS/CS群、Control群に比しHO-1陽性細胞数の増加が認められた(図4, bFGF/CS, $59.6 \pm 5.2 \text{ cells/mm}^2$; PBS/CS, $11.1 \pm 3.6 \text{ cells/mm}^2$; control group, $32.6 \pm 4.7 \text{ cells/mm}^2$)。bFGF/CSによる疼痛過敏抑制が示され、また損傷した坐骨神経内でHO-1の発現が上昇した。bFGF/CSはHO-1の誘導を介して痛覚過敏を抑制している可能性が考えられた。このことから高密度コラーゲン材料にbFGFを搭載した本材料はVeinの代替材料として有用である可能性が示唆された。

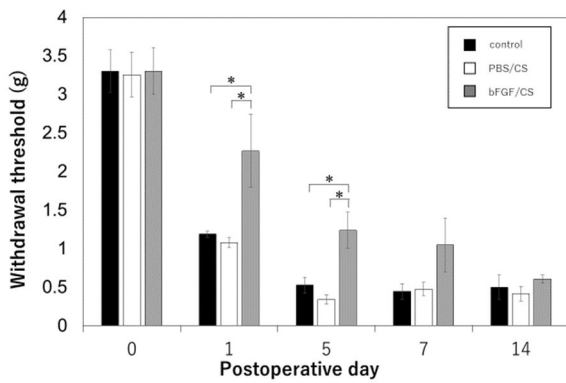


図2. 各群における疼痛閾値の変化

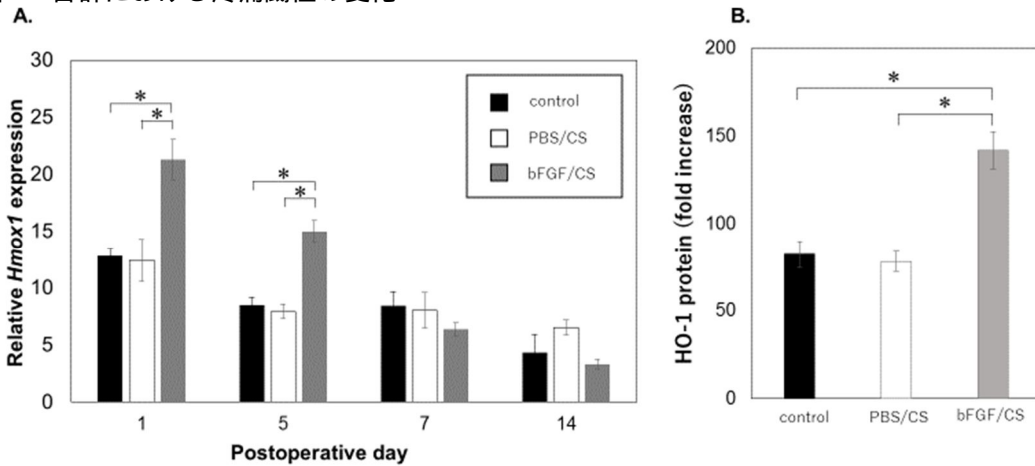


図3 各群におけるHO-1 mRNA (A) およびタンパク発現 (B)

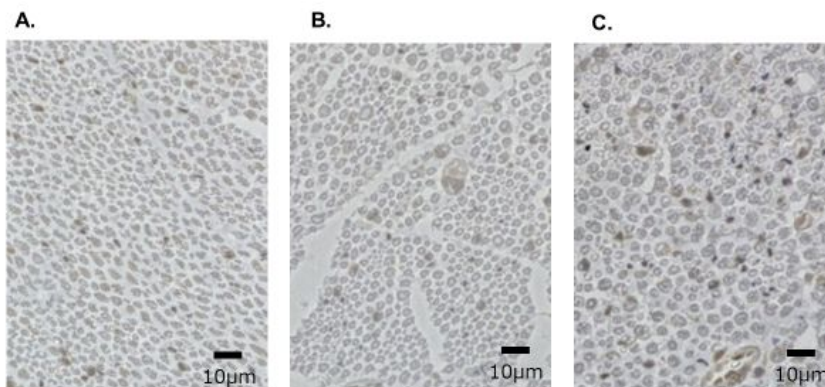


図4 各群における坐骨神経組織におけるHO-1の発現

A. control, B. PBS/CS, C. bFGF/CS

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mukai M, Uchida K, Hirose N, Murakami K, Kuniyoshi K, Inoue G, Miyagi M, Sekiguchi H, Shiga Y, Inage K, Orita S, Suzuki T, Matsuura Y, Takaso M, Ohtori S	4. 巻 37
2. 論文標題 Wrapping With Basic Fibroblast Growth Factor Impregnated Collagen Sheet Reduces Rat Sciatic Nerve Allodynia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 2258-2263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mukai M, Uchida K, Hirose N, Murakami K, Kuniyoshi K, Inoue G, Miyagi M, Sekiguchi H, Shiga Y, Inage K, Orita S, Suzuki T, Matsuura Y, Takaso M, Ohtori S	4. 巻 37
2. 論文標題 Wrapping with Basic Fibroblast Growth Factor-Impregnated Collagen Sheet Reduces Rat Sciatic Nerve Allodynia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 2258-2263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24349	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirose N, Uchida K, Kuniyoshi K, Murakami K, Inoue G, Miyagi M, Matsuura Y, Orita S, Inage K, Suzuki T, Takaso M, Ohtori S	4. 巻 36
2. 論文標題 Vein wrapping promotes M2 macrophage polarization in a rat chronic constriction injury model.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 2210-2217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.23875	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hirose N, Uchida K, Kuniyoshi K, Murakami K, Inoue G, Miyagi M, Matsuura Y, Orita S, Inage K, Suzuki T, Takaso M, Ohtori S	4. 巻 36
2. 論文標題 Vein wrapping facilitates basic fibroblast growth factor-induced heme oxygenase-1 expression following chronic nerve constriction injury.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Orthop Res	6. 最初と最後の頁 898-905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.23674	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 向井務晃、内田健太郎、廣澤直也、村上賢一、稲毛一秀、折田純久、松浦佑介、江口 和、國吉一樹、高相晶士、大鳥精司
2. 発表標題 ラット坐骨神経損傷モデルへの塩基性線維芽細胞増殖因子添加コラーゲンシートの痛覚過敏抑制効果とM2 macrophage誘導能の検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向井務晃、内田健太郎、廣澤直也、村上賢一、稲毛一秀、折田純久、松浦佑介、江口 和、國吉一樹、高相晶士、大鳥精司
2. 発表標題 ラット坐骨神経損傷モデルに対する vein wrappingにより誘導される M2 macrophage subtypeの検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 廣澤直也、内田健太郎、稲毛一秀、折田純久、鈴木都、宮城正行、井上 玄、高相晶士、大鳥精司
2. 発表標題 ラット坐骨神経損傷モデルにおいてVein Wrappingは、坐骨神経内のM2 macrophageの分化を誘導する
3. 学会等名 第39回日本疼痛学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣澤直也、内田健太郎、稲毛一秀、折田純久、鈴木都、宮城正行、井上 玄、國吉一樹、高相晶士、大鳥精司
2. 発表標題 ラット坐骨神経損傷モデルにおいてVein Wrappingは、坐骨神経内のM2 macrophageの分化を誘導する
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Naoya Hiroswa, Kentaro Uchida, Kazuki Kuniyoshi, Kenichi Murakami, Yuuske Matsuura
2. 発表標題 Basic fibroblast growth factor-induced heme oxygenase-1 mRNA experssion underlies the therapeutic benefits of vein wrapping
3. 学会等名 72 th Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 向井務晃、内田健太郎、廣澤直也、村上賢一、稲毛一秀、折田純久、松浦祐介、井上玄、國吉一樹、高相晶士、大鳥精司
2. 発表標題 ラット坐骨神経損傷モデルに対する塩基性繊維芽細胞増殖因子添加コラーゲンシートの痛覚過敏抑制効果とHO-1誘導能の検討
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	内田 健太郎 (UCHIDA KENTARO) (50547578)	北里大学・医学部・講師 (32607)	
研究分担者	國吉 一樹 (KUNIYOSHI KAZUKI) (40375788)	千葉大学・大学院医学研究院・准教授 (12501)	
研究分担者	大鳥 精司 (OHTORI SEIJI) (40361430)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	