

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16718

研究課題名(和文)患者皮膚から誘導する神経膠様細胞を用いた難治性疼痛に対する移植治療

研究課題名(英文)Skin-derived glial-like cell transplantation therapy for intractable pain

研究代表者

村上 徹(Murakami, Toru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90756248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞移植治療の効果を判定可能なモデル確立を第一に行った。坐骨神経に一定の圧力を加えたラット(クリップ群)で神経障害性痛治療薬が著明な効果を示した一方、抗炎症性鎮痛薬は無効であった。坐骨神経運動機能指数の評価では、クリップ群では1日後から2週間後まで運動機能低下を示した。障害部位と後根神経節における免疫組織化学的検討により、軸索障害と脱髄を確認した。ラットシュワン細胞を障害部位へ移植したところ当初明らかな効果を示さなかったが、より強い圧力でクリップ障害を作成したところ、細胞移植により有為な痛覚過敏の改善が認められた。以上により、細胞移植が神経障害性痛の新たな治療法となりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性痛は先進国で1～7%、本邦で600万人の患者が存在するとされており、著しいQOL低下が長期間持続し、国家の経済にも無視できない負荷を与えていると言われている。治療は薬物療法、運動療法、神経ブロックなどが行われるが、いずれも現時点では根治的な治療法とはなっていない。本研究で確立したラット神経障害性痛モデルは、実際の神経障害性痛の病態に近い、体内に異物が残らないため神経障害部位に直接働きかける治療法の開発に使用可能である、という特徴があり、さらに神経再生に主要な役割を果たすシュワン細胞投与の効果が確認され始めていることから、本症候群の新たな根治的治療法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We first established a rat model for the judgement of cell transplantation therapies. Drugs for neuropathic pain were effective in rats with their left sciatic nerve pinched at fixed constant pressure, whereas NSAIDs were ineffective. The rats showed motor function decline represented by Sciatic Function Index from one day to two weeks after surgery. Immunohistochemistry using clipped site of sciatic nerve and dorsal root ganglia showed the evidence of axonopathy and demyelination. Although rat Schwann cells transplantation into injured sites were not clearly effective, statistically significant relief of hyperalgesia was observed with the stronger clip pressure. Above results indicated the possibility of cell transplantation therapies for neuropathic pain.

研究分野：神経障害性痛

キーワード：神経障害性胃痛 動物モデル 細胞移植

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性痛は、末梢神経及び中枢神経における体性感覚神経系の病変や疾患によって引き起こされる痛みであり、様々な病因により発症する。その有病率は全人口の数%にも及ぶと言われ、さまざまな治療に抵抗性の難治性疼痛を示す一方、主体となる症状が痛みという外部からは認識し難い症状であるための苦悩もあり、患者の生活の質を著しく低下させ経済にも悪影響を与える疾患として学術的、社会的に近年問題となっている。

現存する治療として、三環系抗うつ薬、セトロニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬、カルシウムチャンネルリガンド、および麻薬性鎮痛薬などの薬物療法、神経ブロック、種々の電気刺激療法などが行われているが、必ずしも十分な鎮痛は得られず、以下に示すようないくつかの問題点を避けられない。薬物療法は患者への侵襲が少ないという利点があるが対症療法である点是否めず、治療効果が一時的であるという点が問題となる。神経ブロックは永続的なブロックができれば根治療法となりうるが、痛みに関与する神経線維のみをブロックすることは難しく、運動麻痺などの副効果を来す可能性がある。

治療による副作用を極力減らし、根治的な治療を目指すためには、対症療法ではなく、障害を受けた神経そのものの組織レベル、細胞レベルでの再生が理想であると考えられる。

そこで本研究では、末梢神経再生に主要な役割を担っているシュワン細胞に着目した。シュワン細胞は末梢神経組織に存在するグリア細胞であり、通常末梢神経の軸索においてミエリンを形成しており跳躍伝導に関与しているが、ひとたび軸索が障害を受けると脱分化を経て増殖し、神経成長因子に加えて成長軸索の足場となる細胞外基質を分泌し、さらに再生した軸索を再ミエリン化することにより、末梢神経組織の再生において主要な役割を果たしていることが知られているため、神経障害性痛においても治療効果を期待できる細胞である。

しかしながら、患者からシュワン細胞を得るためには患者自身の末梢神経組織を採取しなければならないため、侵襲を伴う手術を必要とし、有痛性神経異栄養症などの合併症の危険性が高い。また、シュワン細胞の純粋培養は容易ではない。したがって、患者自身のシュワン細胞そのものを治療に使用することは現実的ではないと考えられる。以上の背景から、他の細胞種からの内在性シュワン細胞に相当する細胞の誘導が複数報告されてきた。我々は近年、患者の皮膚結合組織から容易に採取できる、ヒト皮膚線維芽細胞からシュワン様細胞が効率的に誘導する技術を確立している。線維芽細胞は生体内に豊富に存在し、増殖力も高く、最小限の侵襲で皮膚生検から細胞を得ることができるという特徴を有しており、生体の中で最も採取しやすい細胞の一つである。また、生体由来の細胞であるため、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)で問題となる腫瘍形成性が認められないことから、臨床応用に際して安全性が期待できる。ヒト皮膚線維芽細胞から誘導によって得られたシュワン様細胞は、もともと末梢神経に存在する内在性シュワン細胞と同様の遺伝子、タンパク発現を示し、*in vitro*および*in vivo*でミエリン形成能を持ち、ラット坐骨神経切断モデルにおける運動機能の改善、軸索再生促進作用、脱神経によって生じた神経筋接合部の再形成促進作用を示した。

神経障害性痛の動物モデルとして確立されているものの多くは坐骨神経などの末梢神経を糸で結紮する手法を用いており、本研究のように神経障害部位に直接アプローチする研究には適していなかった。そこで我々は以前の研究で、既存の神経障害性痛モデルと違い、一定の圧力を加えるクリップを用いて坐骨神経損傷を起こす神経障害性痛モデル(坐骨神経クリップ損傷モデル)を新たに作成し、ラットにおいて神経障害性痛の主症状の一つであるアロディニア(通常は痛みとして知覚されない刺激を痛みと認識する感覚異常)が起こることを確認していた。

2. 研究の目的

本研究の目標は難治性の末梢性神経障害性痛に対する治療法の開発であるが、これまでの最大の問題点は、現存する動物モデルでシュワン様細胞移植など再生医療の治療効果を判定できないことであった。そこで、本研究期間では坐骨神経クリップ損傷モデルの神経障害性痛モデルとしての妥当性および、神経損傷部位をターゲットとした治療による治療効果の検証、を行った。

3. 研究の方法

(1)坐骨神経クリップ損傷モデルの神経障害性痛モデルとしての妥当性の検証

イソフルランによる全身麻酔下に8週齢オスSDラットの左坐骨神経を露出し、一定の力で圧迫することができる動物用クリップを用いて10分間坐骨神経を圧迫することでラット坐骨神経クリップ損傷モデルを作成した。神経障害性痛の主症状であるアロディニア及び痛覚過敏を評価した。アロディニアは術前、術後1日、2日、4日、7日、14日、21日目に0.40、0.60、1、2、4、6、8、15gのvon Freyフィラメントを用いて左後肢足底を刺激し、Dixonのup-down methodで疼痛閾値を評価した。痛覚過敏はHargreaves法によりラットの足底部中央に熱を加え始めてから逃避するまでの時間を計測することで判定した。また、坐骨神経クリップ障害による運動機能の変化を、坐骨神経の運動機能の評価する方法として一般的に行われているsciatic function index(SFI)を測定することで手術後28日目まで観察した。

その後、同モデルにおける免疫組織学的検討を行った。神経障害性痛では、脊髄後角においてマイクログリアの増生が認められ、マイクログリアのマーカーであるIba1の発現が上昇すると言われている。そこで、坐骨神経が入力しているL5レベルの脊髄から凍結切片を作成し、

Iba-1 の発現を観察した。また後根神経節における変化として、軸索障害マーカーとして知られる ATF-3 の発現を観察した。さらに坐骨神経障害部位において、軸索マーカーであるニューロフィラメントおよびミエリンマーカーであるミエリン塩基性タンパクの発現を観察し、軸索障害および脱髄の評価を行った。

次に、各種鎮痛薬に対する反応を観察した。坐骨神経クリップ損傷 2 週間後において、神経障害性痛患者に効果があるとされるガバペンチンとデュロキセチン、侵害受容性痛に効果を示すジクロフェナクを腹腔内投与し、30 分後 von Frey 試験および Hargreaves 試験を行った。

(2)神経障害性痛モデルにおける、神経損傷部位をターゲットとした治療による治療効果の検証
末梢神経損傷部位の修復による神経障害性痛治療の可能性を検証するため、上記の坐骨神経クリップ損傷モデルにラットシュワン細胞の移植を行い、細胞移植群と非移植群で痛覚過敏を比較した。

4. 研究成果

(1)坐骨神経クリップ損傷モデルの神経障害性痛モデルとしての妥当性の検証

坐骨神経クリップ損傷モデルは神経損傷後 21 日後まで有意なアロディニア(図 1)を、7 日後まで有意な痛覚過敏を示した。SFI による運動機能の評価では、クリップ損傷群では術後 1 日から 14 日後まで偽手術群と比較して有意な運動機能低下を示し、術後 21 日には偽手術群と同程度に回復した。

脊髄後角における Iba-1 の観察では、障害側において切片上の Iba-1 が現している面積の有意な増大が認められた。後根神経節においては、障害側にものみ ATF-3 の発現が認められた。またクリップ損傷 1 週間後の標本においてニューロフィラメントおよびミエリン塩基性タンパクの発現が低下しており、軸索障害および脱髄が起きていることを示唆した(図 2)。

鎮痛薬投与と実験では、ガバペンチン投与後のアロディニアおよび痛覚過敏の改善、およびデュロキセチン投与後痛覚過敏の改善が観察された一方、ジクロフェナク投与後に痛み行動の改善が認められなかった。

(2)神経障害性痛モデルにおける、神経損傷部位をターゲットとした治療による治療効果の検証

はじめにラットシュワン細胞を障害部位に移植し、細胞移植を行っていないラットと比較したが、当初の予想と異なり、両群の痛み行動に有意な差は認められなかった。原因検索としてクリップ損傷 1 週間後の坐骨神経を軸索マーカーであるニューロフィラメントの抗体を用いた免疫組織化学を行なったところ、軸索の障害が軽微であることが考えられたため、神経組織の損傷が少なく、行動実験の結果からも約 4 週間で自然治癒する弱い神経障害であったことにより、投与した細胞による効果を検出できなかった可能性が考えられた。そこで、より強い力を発生するクリップを用いて坐骨神経クリップ損傷モデルを作成したところ、痛覚過敏が 6 週間持続し、圧迫後 1 週間の坐骨神経圧迫部位から末梢でニューロフィラメントおよびミエリン塩基性タンパクの発現が著明に低下しており、軸索障害および脱髄をきたしていることが確認された。再びクリップ損傷後にラットシュワン細胞を移植したところ、移植 5 週間において細胞非移植群と比較して有意な痛覚過敏の改善が認められた。

以上の成果により、ラット坐骨神経クリップ損傷モデルは神経障害性痛の動物モデルとして適切であり、シュワン様細胞移植などの神経再生治療が神経障害性痛の根治的治療法となりうることを示された。

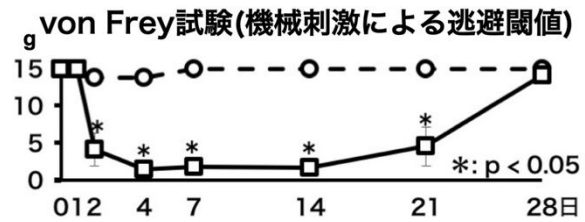


図 1. クリップ損傷によるアロディニアの発現

またクリップ損傷 1 週間後の標本においてニューロフィラメントおよびミエリン塩基性タンパクの発現が低下しており、軸索障害および脱髄が起きていることを示唆した(図 2)。

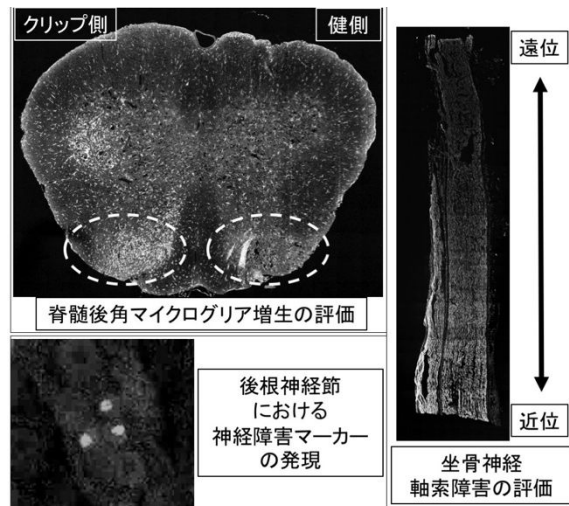


図 2. クリップ損傷による免疫組織学的変化

そこで、より強い力を発生するクリップを用いて坐骨神経クリップ損傷モデルを作成したところ、痛覚過敏が 6 週間持続し、圧迫後 1 週間の坐骨神経圧迫部位から末梢でニューロフィラメントおよびミエリン塩基性タンパクの発現が著明に低下しており、軸索障害および脱髄をきたしていることが確認された。再びクリップ損傷後にラットシュワン細胞を移植したところ、移植 5 週間において細胞非移植群と比較して有意な痛覚過敏の改善が認められた。

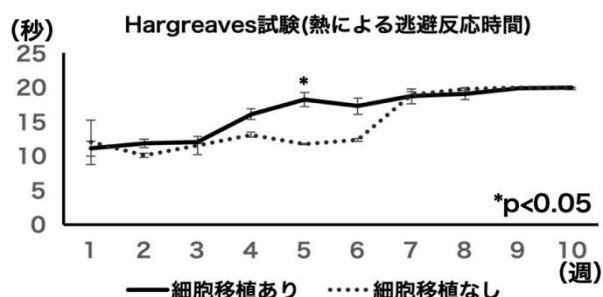


図 3. シュワン細胞投与による痛覚過敏の改善

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kitada Masaaki, Murakami Toru, Wakao Shohei, Li Gen, Dezawa Mari	4. 巻 67
2. 論文標題 Direct conversion of adult human skin fibroblasts into functional Schwann cells that achieve robust recovery of the severed peripheral nerve in rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 950-966
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/glia.23582	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Michio Kumagai, Toru Murakami, Masanori Yamauchi, Hideaki Obata
2. 発表標題 A novel rat model of neuropathic pain established by clamping the sciatic nerve shows mechanical allodynia and microglial hyperplasia in the spinal cord
3. 学会等名 Neuroscience 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊谷道雄, 村上徹, 山内正憲
2. 発表標題 末梢性神経障害性痛に対する神経再生療法に向けたラットモデルの開発
3. 学会等名 日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Michio Kumagai, Toru Murakami, Hideaki Obata, Shigekazu Sugino, Masanori Yamauchi
2. 発表標題 A Novel Rat Model of Neuropathic Pain by Clamping the Sciatic Nerve for Cell Transplantation
3. 学会等名 ANESTHESIOLOGY 2017（国際学会）
4. 発表年 2017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
研究協力者	杉野 繁一 (Sugino Shigekazu)		
研究協力者	熊谷 道雄 (Kumagai Michio)		