

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16760

研究課題名(和文)ES細胞由来知覚神経前駆細胞を用いた新規の慢性疼痛モデルの作製とその病態の解明

研究課題名(英文)Study of novel model system for chronic pain with sensory neuron progenitors derived from embryonic stem cells

研究代表者

川治 崇泰(Kawaji, Takahiro)

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：80771245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛には国内全人口のうち約15%もの人々が罹患しており、疼痛の病態解明と治療法の確立は社会的にも大きな課題である。疼痛研究には、痛みの感覚を生み出す知覚神経細胞の培養系が大いに役立つと考えられる。幹細胞から分化誘導した知覚神経細胞を効率的に集めて培養することができれば、疼痛研究の進展に大いに資することができる。そこで、知覚神経細胞の分化過程に必須の遺伝子の発現を蛍光タンパク質で可視化し、FACSによって知覚神経細胞のみを集めて濃縮することを目指した。緑色蛍光タンパク質の遺伝子を幹細胞のゲノムに挿入し、このゲノム改変幹細胞から神経細胞を分化誘導し、FACSによる細胞選別を行うことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内において慢性疼痛に罹患している人はおよそ2000万人おり、国民病と呼べるような様相を呈している。重度の場合では就労・就学にも影響を及ぼしてくるため、慢性疼痛の病態機序の解明と、それに基づく治療法の確立は重要な医学的社会的課題である。慢性疼痛の仕組みの理解には、痛みの感覚を担う知覚神経細胞の培養系が有用であるが、生体から十分な数を採取し続けることは容易でない。本研究では、幹細胞から知覚神経細胞を分化誘導し、さらにそれを濃縮する方法の確立を目指し、その基盤となる幹細胞の作出に成功した。この結果は今後の慢性疼痛研究に大いに資する成果となりうる。

研究成果の概要(英文)：Chronic pain is a critical problem not only in Japan but also over the world. There are a great number of patients of the pain. As it would be difficult for the patients to keep working in some serious cases, unraveling of the mechanisms of chronic pain is very important. Cell culture of sensory neurons is useful way to study for the mechanisms of chronic pain. Sensory neurons can be induced from embryonic stem cells (ESC) but it is not easy to avoid induction of differentiation of other types of cells at the same time. To collect sensory neuron exclusively from different types of cells after the induction, we integrated gene of fluorescent protein into the ESC genome as a reporter gene. In consequence, we successfully collected the labeled cells with fluorescence-activated cell sorter and cultured the sorted neuronal cells.

研究分野：麻酔科学

キーワード：疼痛 幹細胞

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

疼痛に関する疫学調査によると、日本国内における全人口のうち約 15%、すなわち 2000 万人近い人々が慢性疼痛に罹患していることが報告されている (J. Orthop. Sci. 2011)。痛みとは本来、生存に悪影響のある事象を感知するために生物が持っている生体感覚であり、生存の持続のために極めて重要な意味を持っているものである。しかし、この痛みの信号が何からの理由で長期化し、その結果慢性化すると、痛みの感覚そのものを取り除くあるいは軽減するための治療が必要となってくる。

慢性疼痛とは、国際疼痛学会の定義によれば、「治療に要すると期待される時間の枠を超えて持続する痛み、あるいは進行性の非癌性疼痛に基づく痛み」と定義されている。日本では、3 ヶ月あるいは 6 ヶ月以上持続する痛みを慢性疼痛としており、治療の対象となっている。慢性疼痛は、放置すると身体的負担が大きくなっていくのはもちろんのこと、精神的な負担もまた大きくなり、抑うつ状態に陥ることもある。慢性疼痛が強くとつ長期化してくると、身体的・精神的負担が増大し、就労や就学に支障を及ぼす例もあるが、慢性疼痛は難治であることが多いこともあり、慢性疼痛の発生メカニズムを明らかにすること、およびそれに基づいた治療法の開発を行うことは、現代社会にとって極めて重要である。

慢性疼痛の原因として、神経系に起こる何らかの異常であることが指摘されている。慢性疼痛はいくつかの種類に分類されており、主に侵害受容性疼痛と神経障害性疼痛に分けられる。前者は侵害刺激が長期間加わり続けることによって起こり、後者は神経系の損傷もしくは機能的障害によって起こる。また、この 2 つが混合している場合もあるが、いずれにせよ、神経組織における異常が主たる原因と考えられている。しかし上述したように慢性疼痛はその治療が難しく、とつ長期にわたることも珍しくないのは、慢性疼痛の病態についての詳細がいまだ多くの点が未解明であるためである。以上のことから、慢性疼痛の発症メカニズムの詳細についての理解を深めることは、現代社会において極めて意義深いことであると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、慢性疼痛の病態機序の解明のためのモデル系を構築することを目的とする。慢性疼痛の原因としては前述したように、神経系において起こる何らかの異常が考えられている。しかし、その異常とはどのようなものであるのかについてはいまだ理解の進んでおらず、それが故に慢性疼痛は難治の症状となっている。慢性疼痛の病態や発症メカニズムを解析するためには、痛みを伝達する役割を担う知覚神経細胞を培養し、培養系において種々の解析を行うことが有用である。培養系であれば病態の観察や解析を生体内に比べて容易に行うことが可能である。また、薬剤として有用な化学物質の選定も行うことができるであろう。しかしながら、生体から採取できる知覚神経細胞の数には限りがあるため、持続的な培養に必要なとつ十分な量の知覚神経細胞を採取することは簡単ではない。

現在、このような問題を解決するために胚性幹(ES)細胞や人工多能性幹(iPS)細胞などの幹細胞が使われるようになってきている。これら幹細胞は未分化状態のまま無限に増えることができ、とつさまざまな種類の細胞に分化誘導される能力を持つ。このような幹細胞から知覚神経細胞を分化誘導することで、培養系に必要なとつ十分な細胞数を獲得することができる。

幹細胞からは、培養液の組成の違いなどによって、さまざまな種類の細胞を分化誘導することができることについては多くの報告があるが、目的とする細胞種以外にも、程度の差はあれ目的としない細胞種もまた同時に混在する。したがって、知覚神経細胞のみを選別する過程が必要となる。このためには、フローサイトメーターによるセルソーティングが有用な方法である。知覚神経細胞が分化誘導される過程で特異的に機能する遺伝子の発現を指標とすることによって、より効率的に知覚神経前駆細胞を得ることが可能となる。

そこで、知覚神経細胞が分化する過程において発現する遺伝子に関して文献から調べ、Neurogenin1 と Neurogenin2 に着目した。これら両遺伝子は、知覚神経細胞が分化する過程で一時的にその発現量が増加する。とつ、これら両遺伝子を欠損させたマウスでは、知覚神経細胞の分化が著しく阻害されることが分かっている。つまり、これら両遺伝子は知覚神経細胞の分化過程に不可欠の遺伝子であり、知覚神経前駆細胞を選別する上で、有用な遺伝子マーカーといえる。以上のことから、幹細胞から知覚神経細胞を効率的に分化誘導できる培養条件の探索と、Neurogenin1 と Neurogenin2 の遺伝子発現を指標とした知覚神経前駆細胞の選別・濃縮の系の確立を目指して研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

幹細胞にはマウスの胚性幹(ES)細胞を使用した。理化学研究所が提供している EB5 を用いた。EB5 の培養方法と神経細胞の分化誘導法については基本的に Eiraku らの方法(Cell Stem Cell, 2008)にしたがった。

#### (2) Neurogenin1/2 の遺伝子発現の指標化

Neurogenin1 と Neurogenin2 の発現を検出可能とするために、レポーター遺伝子を各遺伝子座に挿入した。その方法としてゲノム編集技術(Crispr/Cas9)を用いた。ゲノム編集を行うにあたっては pX330 と pCAG-EGFP(いずれも addgene)を用いた。Cas9 の標的配列の探索には、公開ウェブツール(CRISPOR, CRISPRdirect)を活用した。作成したコンスト

ラクトを細胞に導入する際には、リポフェクション法あるいは電気穿孔法を行った。リポフェクション法には ScreenFect A (富士フイルム和光純薬)を使用した。電気穿孔法には Nucleofector (ロンザジャパン)を使用した。

### (3) 細胞選別

セルソーティングは MoFlo Astrios (Beckman)を用いて行った。

### (4) コンストラクト作成, PCR, リアルタイム PCR

コンストラクト構築にあたって、PCR には PrimeSTAR(タカラバイオ)を、PCR 産物をベクターにサブクローニングするには In-Fusion(タカラバイオ)を用いた。発現量測定のためのリアルタイム PCR は、7900HT(Applied Biosystems)と Thunderbird SYBR qPCR Mix(東洋紡)を用いた。

### (5) 免疫染色

パラホルムアルデヒド(4%)で固定したのち、O.C.T. Compound (Sakura Finetek)で包埋し、薄切した。一次抗体を滴加し室温で 1 時間反応させ、続いて蛍光標識二次抗体を室温で 1 時間反応させた。蛍光顕微鏡(Keyence, BZ9000)を用いて観察した。

## 4. 研究成果

前述したように、マウス ES 細胞から分化誘導した知覚神経細胞を効率的に得るために、ゲノム上のマーカー遺伝子座の下流へのレポーター遺伝子(eGFP)の挿入を行った。マーカー遺伝子は Neurogenin1 と Neurogenin2 とした。Neurogenin1 / 2 は知覚神経細胞分化に必須の遺伝子であることがこれまでの報告から知られており、また分化過程で一過的に発現が亢進するため、優良なマーカーであると判断した。

まず、マウス ES 細胞からの神経細胞分化誘導で、これら両遺伝子の発現変化を次世代シーケンスのデータから解析したところ、Neurogenin1 は胚様体形成 8 日目に、Neurogenin2 は 10 日目にその発現量が最大になり、その後減少した。また、この変化をリアルタイム PCR によってあらためて検証してみると、同様の変化を呈した。この一過的な発現亢進は、生体内で見られる変化と酷似している。したがって Neurogenin1 / 2 の発現変動のパターンから、胚様体において知覚神経細胞の分化過程は、生体内のそれに近いと判断した。

次に、Neurogenin1 遺伝子座の下流にレポーター遺伝子である eGFP の挿入を行った。これにはゲノム編集技術 Crispr/Cas9 を用いた。まず Neurogenin1 の翻訳領域の 3'下流で適切なガイド RNA 配列をウェブツール(CRISPOR, CRISPRdirect)を使って探索した。オフターゲット効果の低い候補を複数選択し、pX330 にガイド RNA の配列を、pCAG-EGFP に切断標的配列をサブクローニングし、SSA アッセイによって実際の切断効率を確認後、最も切断効率の高いものを選んだ。次に、ターゲティングベクターの作成を行った。ターゲティングベクターに Neurogenin1, P2A 配列, eGFP をタンデムに挿入することで、Neurogenin1 の発現量には影響を与えずに eGFP を共発現するようにした。

作成したガイド RNA/Cas9 共発現ベクター-pX330 とターゲティングベクターを、Nucleofector を用いてマウス ES 細胞に導入し、ゲノム編集を行った。Geneticin による選別と PCR による選別を経て、Neurogenin1-P2A-eGFP の配列を持つマウス ES 細胞を作成した。

この作成した ES 細胞を用いて胚様体を作成し、神経分化誘導を行い、eGFP の蛍光を観察した。しかし Neurogenin1 の発現が最も増加する 10 日目およびその前後の期間を含めて eGFP の蛍光は認められなかった。レチノイン酸には神経細胞への分化に対して亢進作用があることが報告されていることから、レチノイン酸の添加を行ったが、eGFP の蛍光は確認されなかった。リアルタイム PCR によって Neurogenin1 の発現変動を確認してみると、ゲノム改変前に見られていた発現上昇が見られなかった。ゲノム上の Neurogenin1 遺伝子とその周囲に異常は確認されていないため、原因は特定できないが、ゲノム編集時に何らかの変化が起こり、Neurogenin1 の発現の仕組みが影響を受けた可能性がある。

Neurogenin1 については以上のような状態となったため、対象とする遺伝子を Neurogenin1 から Neurogenin2 へと移した。既に述べたように Neurogenin2 も知覚神経細胞の分化過程には必須の遺伝子であり、且つその発現上昇も同じく一過的であり、且つその発現上昇率は Neurogenin1 よりも大きいため、こちらもマーカー遺伝子としてふさわしいと判断した。Neurogenin1 の場合と同様の方法で Neurogenin2 遺伝子座の 3'直下流に P2A-eGFP 配列を挿入したマウス ES 細胞を作成した。

作成した ES マウスを用いて胚様体を形成し、神経細胞分化誘導を行った。そのときの Neurogenin2 と eGFP の遺伝子発現をリアルタイム PCR で調べたところ、Neurogenin2 の発現は胚様体形成後 10 日目で最も高くなり、その後減少に転じた。eGFP の発現変動も同様のパターンを示した。両遺伝子が示した発現変動パターンは、ゲノム編集を行う以前のマウス ES 細胞が示した Neurogenin2 の発現変動パターンと同じであったため、Neurogenin2 と eGFP は同じ発現制御下にあると判断した。次に、eGFP に対する抗体で胚様体の免疫染色を行ったところ、染色される細胞を確認したことから、eGFP のタンパクの存在も確認した。つづいて FACS を用いて eGFP の蛍光を検出することによるセルソーティングを行ったところ、eGFP に陽性の細胞と陰性の細胞の 2 集団を検出した。以上により、作成した ES 細胞を使用して、知覚神経細胞を効率よく分化誘導する系と、知覚神経細胞を FACS によって選別・濃縮が可能となる培養系の確立を目指していく。

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 Kawaji Takahiro, Sakai Toshikazu, Moriyama Kazuhiro, Hara Yoshitaka, Nakamura Tomoyuki, Kuriyama Naohide, Shimomura Yasuyo, Kato Yu, Komura Hidefumi, Yamashita Chizuru, Kurimoto Yasuyoshi, Hasegawa Daisuke, Nishida Osamu	4. 巻 22
2. 論文標題 Influence of Blood Purification and Differential Injection Sites of Cold Saline on Transpulmonary Thermodilution Values	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Therapeutic Apheresis and Dialysis	6. 最初と最後の頁 290 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1744-9987.12696	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 1件）

1. 発表者名 川治崇泰、原嘉孝、加藤由布、原田達彦、栗本恭好、長谷川大祐、下村泰代、西田 修
2. 発表標題 血液浄化施行時の心拍出量測定値（経肺熱希釈法）低下は返血温度の低下が原因であった
3. 学会等名 第29回日本急性血液浄化学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川治崇泰、中村智之、小川 慧、長谷川大祐、栗本恭好、小嶋美奈、永田麻里子、鈴木紳也、小野由季加、西田 修
2. 発表標題 血漿シトルリン濃度は、重症長期低栄養患者の腸管機能の忍容性の評価に有用である
3. 学会等名 第46回 日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Kawaji, Tatsuhiko Harada, Yu Kato, Daisuke Hasegawa, Mariko Nagata, Tomoyuki Nakamura, Osamu Nishida
2. 発表標題 The Cause of Underrating Cardiac Output via Transpulmonary Thermodilution During Blood Purification
3. 学会等名 Society of Critical Care Medicine 48thCritical Care Congress (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----