

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18479

研究課題名（和文）ES細胞より分化誘導した知覚神経前駆細胞を用いた慢性疼痛の病態解明

研究課題名（英文）Study for chronic pain using sensory neural progenitors induced from ES cells

研究代表者

古井 豊士（Furui, Atsuo）

藤田医科大学・医学部・助教

研究者番号：30770705

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）：我が国における慢性疼痛に罹患している割合は成人ではほぼ4割に達している。慢性疼痛の起こる仕組みには不明な点が多く、治療法の確立は重要な課題である。慢性疼痛の解析には、痛みを伝達する知覚神経細胞の使用が欠かせない。そこで本研究ではES細胞から知覚神経細胞を効率よく分化誘導し、且つ近く新家細胞のみを集める系の開発に取り組んだ。知覚神経細胞特有の遺伝子が発現すると蛍光タンパクも同時に発現するようなES細胞を作出し、蛍光を指標にして知覚神経前駆細胞を選択的に得る系を開発した。また、ES細胞から知覚神経細胞を効率よく分化させる条件を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛の罹患率はほぼ4割に達しており、程度の差こそあれ、相当数の成人が慢性疼痛に悩まされていることになる。慢性疼痛がひどい場合には、日常生活にも支障を来すこととなる。本研究は、慢性疼痛の起こる仕組みを研究するに当たっては、痛みを伝達する知覚神経細胞が比較的容易且つ大量に入手できる技術が有用である。そのような基礎となる技術の開発を目的として、本研究を行った。ES細胞が知覚神経前駆細胞に分化すると蛍光タンパク質により光を発するようにすることで、慢性疼痛の仕組みの理解と治療法の開発に資することとなった。

研究成果の概要（英文）：Chronic pain is one of the most serious medical problems in Japan. About 40% of the adults in Japan are the patients of the pain. Methods of therapies for chronic pain have not established yet. Culture system of sensory neural progenitors is valuable for analysis of the mechanism of chronic pain and development of the therapy. To develop the method for obtaining a number of sensory neural progenitors, a fluorescent protein gene cassette was integrated to mouse embryonic stem cells' genome. Induced neural progenitors from the embryonic stem cells were collected using cell sorter. This would be a basic technique for therapy of chronic pain.

研究分野：整形外科学

キーワード：疼痛

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

疫学調査によれば、我が国における慢性疼痛に罹患している患者数は、成人では 39.3%、およそ 4 割に達していることが明らかとなっている (PLoS One, 10: e0129262, 2015)。この状況は、慢性疼痛がもはや国民病とも言える状態にあることを示している。痛みの感覚は、損傷など生存に対して負の影響のある状態を的確に捉えるために、ヒトを含めた動物が持つ、本来は必要不可欠な感覚である。一方、何かしらの理由によって痛みの感覚が長期的に持続し、慢性化することがある。このような持続する痛みは大変な苦痛の原因となることから、痛みを取り除いたり軽減したりするための治療を行う必要が出てくる。

慢性疼痛は、国際疼痛学会によると「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ガン性疼痛に基づく痛み」と定義されている。この「期待される時間を超え」とは、これまでは発症から 6 ヶ月以上にわたって症状が持続する場合を指す場合が多かったが、最近では 3 ヶ月以上とすることが多くなっており、この期間を超えた場合、治療対象となる。重度の場合は身体的苦痛に加えて精神的なストレスを引き起こし、鬱の原因ともなり得る。慢性疼痛が長期化すると、身体的にも精神的にも負担が増加し、就学や就労が難しくなる場合もあり、日常生活に多大な影響を及ぼすこととなる。そのため、病態機構の解明や治療法の開発は、極めて重要な課題であると考えられる。

現在のところ、慢性疼痛はその病態によりいくつかの種類に分類されている。ひとつは「侵害受容性疼痛」と呼ばれており、長期にわたって侵害刺激が加えられ続けることで引き起こされる。また「神経障害性疼痛」とは、神経組織が傷害されることで起こり、侵害刺激が消失した後も痛みが持続する。前者がそのまま後者の原因となることもあり、いずれにしても神経組織に起こる何かしらの異常によって慢性疼痛が誘発され则认为られている。しかしながら、慢性疼痛はその病態機構についてはいまだ未解明の点が多く残されたままとなっており、確立された治療法があるわけではない。以上の点から、慢性疼痛の病態機構を明らかにすることは、治療方法の開発や確立にも寄与しうる、医学的にも社会的にも極めて有意義なことであると期待される。

2. 研究の目的

以上のように、慢性疼痛は神経組織に引き起こされた何かしらの変化や異常が原因であると考えられているが、実際にそれらがどのような状態であるかは分かっていない。痛みを伝達するのは知覚神経系であるため、慢性疼痛の機構を解明するためには知覚神経細胞に如何なる異常が起こったのかを解析することが必要となる。しかし、生体内の知覚神経細胞をそのまま扱うことは容易ではない。一方、生体から知覚神経細胞を取り出して培養することは、ひとつの有用な解析法であると考えられる。培養系であれば病態機構のさまざまな解析が比較的容易となることが期待され、また、治療に使用可能な化学物質のスクリーニングも行い得る。しかし、生体から採取可能な知覚神経細胞の数は限定的であるため、初代培養系を使うことは解析の方法としては不向きである。

胚性幹細胞 (ES 細胞) や多能性幹細胞 (iPS 細胞) などの人工的に作成された幹細胞は、その未分化状態と多分化能を保持しながら際限なく増殖することができ、さまざまな組織の細胞へと分化することができる能力を持つ。したがって、これら幹細胞を用いて知覚神経細胞を分化誘導できれば、培養系を用いた解析を行うことが可能となると考えられる。

培養液や添加物質などの条件を整えることによって、現在では特定の組織の細胞を分化誘導することが可能となってきているが、目的とする細胞だけを純粋に分化させるのは難しく、程度の違いはあるものの目的以外の細胞の混入が起こる。したがって、知覚神経細胞に分化した細胞だけを何かしらの方法で選別し収集する必要がある。

知覚神経細胞の分化過程では Neurog1 および Neurog2 遺伝子が一過的に発現する。また、これらのノックアウトマウスでは知覚神経細胞の形成が不全となることが報告されている。したがって Neurog1 および Neurog2 は知覚神経細胞の分化に必須の遺伝子であり、幹細胞から分化誘導した知覚神経細胞を選別する際の優れた標識となりうる。そこで、Neurog2 を知覚神経細胞分化の標識とするため、蛍光タンパクにより Neurog2 発現細胞を選別できる系の確立と、知覚神経細胞の効率的な分化誘導条件の検討を目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

幹細胞としてマウス ES 細胞 (理化学研究所) を用いた。ES 細胞の培養および神経細胞の分化誘導に関しては Eiraku らの方法に従った (Eiraku et al., 2008)。

(2) ゲノム編集

Neurog2 遺伝子の発現を標識するため、蛍光タンパク質 (Venus) の遺伝子を Neurog2 遺伝子座のすぐ下流に挿入した。その方法として CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術を用いた。Cas9 の標的配列の探索には web 上のデータベースサービスを用いた。ガイド RNA と Cas9 の発現には pX330 (Addgene) を用いた。pX330 とターゲティングベクターの ES 細胞への導入

は Nucleofector (Lonza) を用いて行った。蛍光タンパク質遺伝子がゲノムに導入された細胞は、薬剤耐性と PCR により選別した。

(3) ベクターコンストラクトの作成

挿入配列の作成は PrimeStar (TaKaRa-Bio) を用いて PCR で行った。ベクターへの挿入には In-Fusion システム (Clontech) を用いた。定量 PCR は Thunderbird qPCR Mix (TOYOBO) と 7900HT (Applied Biosystems) を用いて行った。

(4) セルソーティング

セルソーター Astrios (Beckman Coulter) を用いてセルソーティングを行った。

(5) 免疫化学

4%パラホルムアルデヒドで固定し、OCT コンパウンドで包埋、凍結切片を作成した。一次抗体に続いて二次抗体を反応させ、蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1)

ES 細胞から分化誘導した知覚神経細胞を選別するため、Neurog2 遺伝子座の下流にレポーター遺伝子として Venus が挿入されている ES 細胞の作出を行った。Neurog2 遺伝子そのものは破壊することなく、Neurog2 遺伝子発現と Venus 遺伝子発現が同時に発現するようにするため、Neurog2 と Venus の間に 2A 配列を挿入するように設計した。最初にヌクレアーゼ Cas9 の標的として適切な領域を、web データベースサービスを利用して検索した。得られた領域の配列をガイド RNA の標的とし、ベクター-pX330 に挿入してガイド RNA と Cas9 を同時に発現するベクターを作成した。なお、選択した配列の切断活性はベクター-pCAG-EGFP を用いて確認し、十分な切断活性を持っている配列を選択した。

次に、切断したゲノム領域に Venus 遺伝子を挿入するための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は Neurog2-2A-Venus のカセットを組み込んだ。

作成した 2 種類のベクターを、Nucleofector を用いて ES 細胞に導入し、ES 細胞ゲノムへの Venus 遺伝子導入のためのゲノム編集を行った。ターゲティングベクターにはネオマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることから G418 による選別を行い、つづいてゲノム PCR とゲノムシーケンスの確認により、目的とするゲノム編集が起こった細胞を選択した。

作出した ES 細胞を用い、SFEB 法による神経細胞分化誘導を行った。神経細胞分化誘導の為に胚様体を作成し、Neurog2 と Venus の発現量を経時的に追跡したところ、どちらも培養開始から 10 日目に発現量が最も多くなっていた。この変化の様相は、Venus 遺伝子をゲノムに挿入していない ES 細胞が示すものと同様のものではなかった。したがって、Neurog2 の発現機構は Venus 遺伝子の挿入によって影響を受けておらず、また挿入された Venus 遺伝子は Neurog2 遺伝子のプロモーターにより発現が制御されていると判断した。

次に、作出した ES 細胞から作成した胚様体の免疫染色を、抗 Venus 抗体を用いて行ったところ、胚様体の周縁部に陽性の細胞を検出した。したがって、タンパク質発現も正確に行われていることが示された。

本実験の目的のひとつは、Neurog2 遺伝子の発現を標識として知覚神経前駆細胞を選別することにある。そこで、作出した ES 細胞から作成した胚様体を分散させ、セルソーターによるソーティングを行った。その結果、Venus 陽性細胞のグループと陰性細胞のグループを検出した。したがって、目的とする ES 細胞の作出に至ったと判断した。今後はこの細胞を用い、より効率的な知覚神経細胞への分化誘導条件の探索を行い、疼痛の病態機構解明の研究につなげていく。

(2)

ES 細胞を知覚神経細胞へと分化誘導する条件の検討を行った。ES 細胞を分化誘導する際に細胞増殖因子などを添加することで分化方向をある程度制御できることが知られている。知覚神経細胞は脊髄神経節で発生するので、後方化を促すレチノイン酸と背方化を促す Wnt を培養液に添加して胚様体作成を行った。その結果、知覚神経細胞の分子マーカーである BRN3a の発現を、定量 PCR と免疫染色により確認した。そこで、今後は(1)で作出した細胞を用い、さらに効率の良い知覚神経細胞誘導系の開発につなげていく。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7 . 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------