

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07750

研究課題名（和文）難治性疼痛に対するヒト間葉系幹細胞による鎮痛作用のメカニズム解明とその臨床応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of analgesic action by human mesenchymal stem cells for intractable pain and its clinical application

研究代表者

宮野 加奈子（Miyano, Kanako）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50597888

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がん患者の7～8割はその過程で疼痛を経験するが、既存の鎮痛薬で緩和できないこともあり、新規鎮痛薬の開発が求められている。間葉系幹細胞（MSC）は多分化能を有し、抗炎症作用、神経保護作用など様々な作用があることが報告されており、その臨床応用が世界で注目されている。そこで、本研究では既存の鎮痛薬では制御しにくい疼痛を有するモデル動物を用いてヒトMSCの鎮痛効果ならびに鎮痛メカニズムを解析し、MSC臨床応用に向けて必要となる基礎的データの蓄積を目指した。その結果、ヒトMSCは難治性である坐骨神経部分結紮（PSNL）神経障害性疼痛を緩和することを明らかにし、その結果をPLOS ONEに発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既存の鎮痛薬での制御が難しいがん患者の疼痛には多数の因子が複雑に関与することが考えられている。本研究は、複雑ながん患者の疼痛に対し、多数の薬理学的作用点をもつMSCが有効である可能性を示した。本研究は、難治性疼痛の克服によりがん患者のがん治療の継続を可能にすることで治療の完遂を促し、患者のQuality of Lifeの向上に寄与するだけでなく、患者の生命予後の延長にも貢献すると考える。

研究成果の概要（英文）： Almost 70-80% of cancer patients experience pain, which is merely relieved by analgesics presently available, and there are needs for the development of novel analgesics. Mesenchymal stem cells (MSCs) have a multipotent differentiation potential and have been reported to have various effects such as anti-inflammatory and neuroprotective effects, and their clinical application is attracting attention worldwide. In this study, we analyzed the analgesic effects and mechanisms of human MSCs using an animal model of pain that is difficult to control with analgesics available, aiming to accumulate basic data necessary for the clinical application of MSCs for pain control. As a result, we found that human MSCs alleviate intractable sciatic nerve ligation (PSNL)-induced neuropathic pain, and published the results in PLOS ONE.

研究分野：薬理学

キーワード：間葉系幹細胞 疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん患者の7 - 8割はその過程で疼痛を経験するが、既存の鎮痛薬で緩和できないことも少なくなく、新規鎮痛薬の開発が求められている。間葉系幹細胞(MSC)は多分化能を有し、抗炎症作用、神経保護作用など様々な作用があることが報告されており、その臨床応用が世界で注目されている。これまでに申請者は鎮痛薬の開発を目指し、様々なターゲットに着目し研究を進めてきたが、がん患者の疼痛は多数の因子が複雑に連関しており、ひとつの因子の制御だけでは十分な鎮痛効果を発揮させることは難しいことが考えられた。そのため、ひとつの製剤で多数の薬理学的作用点を持つ新規治療法を得ることができれば実臨床への応用として望ましい方向であると考えた。そこで、本研究では既存の鎮痛薬では制御しにくい疼痛モデル動物を作製し、同モデルを用いてヒトMSCの鎮痛効果ならびに鎮痛メカニズムを解析し、MSC臨床応用に向けて必要となる基礎的データの蓄積を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、脂肪組織および臍帯組織より容易かつ安全に大量に採取できるMSCに着目し、ヒト脂肪組織由来MSC(AD-MSC)及びヒト臍帯組織由来MSC(UC-MSC)を用い、これらのMSCの鎮痛効果を既存の鎮痛薬では制御しにくい疼痛モデル動物を用いて評価することを目的とする。さらに、MSCの鎮痛メカニズムを解明し、MSC製品の鎮痛作用についての動物モデルにおけるProof of Concept(POC)を得る。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデル動物の作製 坐骨神経部分結紮(PSNL)モデル

SDラット(150-200g, 雄性, 4週齢; 日本クレア)を用いて、Seltzerらの方法¹に従い作製した。すなわち、イソフルラン麻酔下で大腿部より、左後肢坐骨神経を露出させ6号絹糸を用いて、神経の1/3から1/2を強く結紮し作製した。Sham群においては、神経を露出させるのみで結紮は行わなかった。

(2) MSC投与

坐骨神経結紮4日後、MSCをPBSを用いて 5×10^6 cells/mLに調製し、尾静脈から1mLを静脈投与した。

(3) 疼痛評価

von Frey test

Chaplanらの方法²を参考にvon Frey filament(1.0g ~ 15.0g)を後肢足底を刺激し、Up and down法により50%疼痛閾値を算出した。

Dynamic weight bearing (DWB) test

動物を観察用ケージ(11.0 × 19.7 × 11.0 cm)に入れ、5分間自由行動下での歩行を記録し、DWBソフトウェアにより後肢左右の荷重(g)を分析した。本研究では後肢左右の荷重(結紮側と非結紮側)の比率を算出した結果を示した。

(4) 免疫組織化学染色

イソフルランによる深麻酔後、左心室から PBS、4% paraformaldehyde を還流し固定した。結紮側坐骨神経および、L4-5 の脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) を摘出後、パラフィンで包埋し、5 μm の厚さで薄切した。1 次抗体として、rabbit activation transcription factor 3 (ATF-3, 1:100), goat ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1 1:250), rabbit-myelin basic protein (MBP, 1:500), and rabbit interleukin-1 (IL-1, 1:500), mouse neuronal specific nuclear protein (NeuN), chicken neurofilament heavy polypeptide (NF200, 1:250) を用いてインキュベート (室温、1 時間) した。2 次抗体は、goat polyclonal anti-rabbit antibody conjugated with Alexa Fluor[®] 594 (1:1000, Abcam) and anti-goat, mouse, or chicken Alexa Fluor[®] 488 (1:1000, Abcam) を用いてインキュベート (室温、1 時間) した。その後、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of DAPI を含んだ mounting medium にて封入した。観察は、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, Keyence) にて観察し、ImageJ software (National Institutes of Health) を用いて定量化した。

(5) 統計解析

全てのデータは、平均値 \pm 標準誤差にて表記した。統計解析は、GraphPad Prism 6 (GraphPad Software) を用いて、one- or two-way ANOVA (Bonferroni test) を行った。p 値 < 0.05 を有意差ありとした。

4 . 研究成果

(1) AD-および UC-MSC は神経障害性疼痛を改善する

ラットの坐骨神経を部分結紮 (PSNL) すると、結紮後 4 日目 (Day 4) から痛み閾値の低下および後肢の荷重変化が引き起こされた³。これらの疼痛反応は、AD-および UC-MSC を投与により有意に抑制された。これらの MSC による鎮痛作用は 1 回の投与で 3-7 日間持続した³。

(2) AD-および UC-MSC は神経障害を改善し、マクロファージの集積および IL-1 産生を抑制する

MSC 投与後 3 日目後に脊髄後根神経節 (DRG) を採取し、神経障害マーカー ATF-3 および神経マーカー NeuN を用いて二重染色した結果、sham 群と比較し、PSNL により ATF-3 が有意に上昇した³。また、ATF-3 陽性細胞は NeuN と共発現していた³。さらに、AD-および UC-MSC 投与すると、ATF-3 陽性細胞は有意に抑制された³。

次にマクロファージのマーカー Iba-1 を染色した結果、PSNL により Iba-1 が有意に上昇した³。この上昇は、AD-および UC-MSC 投与により有意に減少した³。

IL-1 染色の結果、PSNL により IL-1 が有意に上昇することが明らかとなった³。この上昇は、AD-および UC-MSC 投与により有意に抑制された³。そこで、IL-1 および NeuN、ならびに IL-1 と Iba-1 で二重染色した結果、IL-1 は NeuN と共発現した³。したがって、AD-および UC-MSC は、神経から産生された IL-1 を抑制することが明らかとなった。

(3) UC-MSC は坐骨神経の脱髄を改善する

末梢神経傷害により脱髄が引き起こされ、神経障害性疼痛を発症することが報告されている。そこで、髄鞘を構成するタンパク質 MBP および有髄神経マーカー NF-200 の抗体を用いて、坐骨神経を 2 重染色した。その結果、sham 群では、NF-200 陽性細胞の周りに MBP が発現しているのに対し、PSNL 群では MBP が減少していた³。AD-MSC 投与群は、PSNL による MBP 減少を改善する

傾向がみられたが、有意差はなかった³。一方、UC-MSC 投与群は、PSNL による MBP 減少を有意に改善した³。

以上の結果より、AD-及び UC-MSC は神経損傷の改善、並びに抗炎症作用により神経障害性疼痛を抑制することが明らかとなった。さらに、UC-MSC は坐骨神経の脱髄を改善することが示唆された。本成果は PLOS ONE にて発表した³。

引用文献

1. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*. 1990;43(2): 205-218. doi:10.1016/0304-3959(90)91074-s.
2. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*. 1994;53(1): 55-63. doi:10.1016/0165-0270(94)90144-9.
3. Miyano K, Ikehata M, Ohshima K, Yoshida Y, Nose Y, Yoshihara SI, Oki K, Shiraishi S, Uzu M, Nonaka M, Higami Y, Uezono Y. Intravenous administration of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and umbilical cord improves neuropathic pain via suppression of neuronal damage and anti-inflammatory actions in rats. *PLoS One*. 2022 17(2):e0262892. doi: 10.1371/journal.pone.0262892.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Uezono, E., Mizobuchi, Y., Miyano, K., Ohbuchi, K., Murata, H., Komatsu, A., Manabe, S., Nonaka, M., Hirokawa, T., Yamaguchi, K., Iseki, M., Uezono, Y., Hayashida, M., Kawagoe, I.	4. 巻 24
2. 論文標題 Distinct profiles of desensitization of μ -opioid receptors caused by remifentanyl or fentanyl: In vitro assay with cells and three-dimensional structural analyses.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 8369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms24098369.	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 Kajitani, N., Okada-Tsuchioka, M., Inoue, A., Miyano, K., Masuda, T., Boku, S., Iwamoto, K., Ohtsuki, S., Uezono, Y., Aoki, J., Takebayashi, M.	4. 巻 49
2. 論文標題 G protein-biased LPAR1 agonism of prototypic antidepressants: Implication in the identification of novel therapeutic target for depression.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 561-572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41386-023-01727-9.	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 Murakami, S., Asada, T., Kubota, T., Kawakami, H., Kokubun, H., Uezono, Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 A successful case of switching treatment from ketamine to methadone for complex neuropathic pain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Palliat Med	6. 最初と最後の頁 685-689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/jpm.2021.0056.	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 Komatsu, A., Miyano, K., Nakayama, D., Mizobuchi, Y., Uezono, E., Ohshima, K., Karasawa, Y., Kuroda, Y., Nonaka, M., Yamaguchi, K., Iseki, M., Uezono, Y., Hayashida, M.	4. 巻 134
2. 論文標題 Novel opioid analgesics for the development of transdermal opioid patches that possess morphine-like pharmacological profiles rather than fentanyl: possible opioid switching alternatives among patch formula.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anesth Analg	6. 最初と最後の頁 1082-1093
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1213/ANE.0000000000005954.	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 Takemura, Y., Sudo, Y., Saeki, T., Kurata, S., Suzuki, T., Mori, T., Uezono, Y.	4. 巻 149
2. 論文標題 Involvement of spinal G-protein inwardly rectifying potassium (GIRK) channels in the enhanced antinociceptive effects of the activation of both μ -opioid and cannabinoid CB1 receptors.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 85-92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2022.04.002.	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 Yamaguchi, M., Miyano, K., Hirayama, S., Karasawa, Y., Oshima, K., Uezono, E., Komatsu, A., Nonaka, M., Fujii, H., Yamaguchi, K., Iseki, M., Hayashida, M., Uezono, Y.	4. 巻 27
2. 論文標題 valuation of the intracellular signaling activities of μ -opioid receptor agonists, nalfurafine analogs; focusing on the selectivity of G protein- and β -arrestin-mediated pathways.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27207065.	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 Gondoh E, Hamada Y, Mori T, Iwazawa Y, Shinohara A, Narita M, Sato D, Tezuka H, Yamauchi T, Tsujimura M, Yoshida S, Tanaka K, Yamashita K, Akatori H, Higashiyama K, Arakawa K, Suda Y, Miyano K, Iseki M, Inada E, Kuzumaki N, Narita M.	4. 巻 127
2. 論文標題 Possible mechanism for improving the endogenous immune system through the blockade of peripheral μ -opioid receptors by treatment with naldemedine.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Br J Cancer	6. 最初と最後の頁 565-1574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-022-01928-x.	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 Miyano K, Ikehata M, Ohshima K, Yoshida Y, Nose Y, Yoshihara S, Oki K, Shiraishi S, Uzu M, Nonaka M, Higami Y, Uezono Y	4. 巻 17
2. 論文標題 Intravenous administration of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and umbilical cord improves neuropathic pain via suppression of neuronal damage and anti-inflammatory actions in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0262892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0262892.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田遥香、山田大航、稲垣美紅、野中美希、宮野加奈子、平山重人、浦明日香、相磯沙耶花、室伏美佳、藤井秀明、上園保仁。
2. 発表標題 オピオイド μ / ヘテロダイマーに対する新規モルヒナン誘導体の活性評価 -副作用及び鎮痛耐性の少ない新規鎮痛薬の開発を目指して-
3. 学会等名 第146回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浦明日香、宮野加奈子、曾友佳、平山重人、唐木文霞、野中美希、相磯沙耶花、室伏美佳、吉田遥香、藤井秀明、上園保仁。
2. 発表標題 DuoLink近接ライゲーションアッセイを用いた μ / ORヘテロ二量体の可視化法の確立： μ / ORヘテロ二量体制御による新規鎮痛薬開発を目指して。
3. 学会等名 第146回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口政広、宮野加奈子、根本徹、原田幸昌、今出慧海、野村俊宗、唐澤佑輔、大島佳織、上園瑛子、小松茜、平山重人、藤井秀明、山口敬介、井関雅子、上園保仁、林田真和。
2. 発表標題 オピオイド受容体作動薬ナルフラフィン誘導体の細胞内シグナル活性の評価；Gタンパク質および アレスチンを介した経路の選択性に着目して。
3. 学会等名 第41回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 唐澤佑輔、宮野加奈子、山口政広、野中美希、山口敬介、井関雅子、上園保仁。
2. 発表標題 植物由来のG protein-biased opioid agonist ルビスコリンの細胞内活性経路解析および経口ペプチド薬開発の可能性。
3. 学会等名 第41回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大島佳織、野中美希、黒田唯、宮野加奈子、高柳広、上園保仁。
2. 発表標題 新規エンドセリンA受容体拮抗薬はオピオイド製剤の長期使用で起こる鎮痛耐性および鎮痛減弱作用を解除する。
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会 / 第43回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kanakano Miyano, Minori Ikehata, Kaori Ohshima, Yuki Yoshida, Yasuhiro Nose, Sei-ichi Yoshihara, Katsuyuki Oki, Seiji Shiraiishi, Miaki Uzu, Miki Nonaka, Yoshikazu Higami, Minoru Narita, Yasuhito Uezono.
2. 発表標題 Human mesenchymal stem cells from adipose tissue and umbilical cord improved neuropathic pain by regulating inflammation and recovery of the demyelination of sciatic nerve in rats.
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮野加奈子、目黒由行、吉田有輝、水口貴章、平山重人、成田年、樋上賀一、藤井秀明、上園保仁。
2. 発表標題 μ オピオイド受容体をアロステリックに修飾する内因性非オピオイドペプチドの解析。
3. 学会等名 第16回日本緩和医療薬学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島佳織、野中美希、黒田唯、宮野加奈子、高柳広、上園保仁。
2. 発表標題 エンドセリンA受容体と μ オピオイド受容体は二量体化受容体を形成し、新規エンドセリンA受容体拮抗薬はエンドセリンによるオピオイド鎮痛減弱作用を回復させる。
3. 学会等名 第148回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上園保仁、宮野加奈子、野中美希 .
2. 発表標題 がん対策推進基本計画に基づく支持療法開発研究の推進：難治性疼痛克服のための新規鎮痛薬の創薬開発 .
3. 学会等名 第8回日本がんサポーターブケア学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮野加奈子 .
2. 発表標題 オキシトシンは μ -および δ -オピオイド受容体活性を促進させる~オキシトシンの μ -および δ -positive allosteric modulator (PAM)としての可能性~ .
3. 学会等名 第42回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島佳織、野中美希、黒田唯、宮野加奈子、高柳広、上園保仁 .
2. 発表標題 エンドセリン-1による鎮痛減弱作用は各オピオイド製剤において異なる 新規エンドセリンA受容体拮抗薬を用いた解析 .
3. 学会等名 第42回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島佳織、野中美希、黒田唯、宮野加奈子、高柳広、上園保仁 .
2. 発表標題 新規エンドセリンA受容体拮抗薬はエンドセリンによるオピオイド鎮痛減弱作用を回復させる .
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島佳織、野中美希、黒田唯、宮野加奈子、高柳広、上園保仁。
2. 発表標題 オピオイド製剤の特性の違いによってエンドセリンA受容体拮抗薬による μ オピオイド受容体減弱回復作用の様式が異なる。
3. 学会等名 第149回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上園保仁、宮野加奈子。
2. 発表標題 がん患者の訴えを受け止めることから始まる真に必要な新薬開発。
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大島佳織、野中美希、黒田唯、宮野加奈子、高柳広、上園保仁。
2. 発表標題 エンドセリン-1はモルヒネとフェンタニルによる μ オピオイド受容体活性化作用を異なるefficacyで抑制する。
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京慈恵会医科大学 痛み脳科学センター 支持療法疼痛制御研究室
http://www.jikei.ac.jp/academic/course/84_itamioukagaku_center_toutsuu.html

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	上園 保仁 (Uezono Yasuhito) (20213340)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

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