

令和 6 年 1 月 29 日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20961

研究課題名(和文) iPS細胞由来巨核球血小板混合製剤を用いた難治性末梢神経障害への新規シーズの開発

研究課題名(英文) Development of novel seeds for refractory peripheral neuropathy with iPS cell-derived megakaryocytes and platelets formulation.

研究代表者

向井 務晃(Mukai, Michiaki)

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：40907698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：既存の神経絞扼モデル(chronic constriction model)を作成し、数日後に除圧術(神経剥離+糸の除去)を行う、より実臨床に近い、末梢神経障害除圧モデルを確立した。除圧術による神経内の細胞動態を検討し、除圧術により神経内のT細胞増加が抑制されることを確認した。同モデルを用いて、iPS細胞由来血小板・巨核球(iPM)製剤の神経障害性疼痛の回復促進効果を確認した。またin vitro実験にて、iPM製剤のSchwann細胞に対する、増殖・遊走能促進効果を認め、これらが作用機序の一旦を担っている可能性を示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規に作製した神経除圧術モデルは、従来のモデルに比べ、臨床に近いモデルであり、今後の末梢神経の研究に寄与できると考える。またiPM製剤が神経障害性疼痛の回復促進効果を有し、その機序がSchwann細胞を介する可能性が示唆され、今後の研究により、神経障害治療の新規治療シーズとして発展させ、社会貢献可能と考えた。

研究成果の概要(英文)：We established a decompression model of peripheral neuropathy that more closely resembles actual clinical practice, in which decompression surgery (nerve dissection + thread removal) is performed a few days after the existing chronic constriction model is created. We examined the cellular dynamics in the nerve after decompression surgery and confirmed that decompression surgery suppressed the increase of T cells in the nerve. Using this model, we confirmed the efficacy of iPS cell-derived platelets and megakaryocyte (iPMs) preparations in promoting recovery from neuropathic pain. In vitro experiments also showed that iPMs preparations promoted the proliferation and migration of Schwann cells, suggesting that these effects may play a role in the mechanism of action.

研究分野：再生医学

キーワード：iPS細胞 血小板 巨核球 神経障害 疼痛 多血小板血漿

1. 研究開始当初の背景

難治性末梢神経障害は、既存の治療に抵抗性であり、QOL・ADL の低下に加え、職場復帰の遅延、入院・通院加療による医療費増大など多大な経済損失にも直結する。我々は難治性末梢神経障害に対する治療法を開発すべく、既存治療法の分子機構解明と新規治療シーズの研究を行ってきた。

近年、血小板中に含まれる様々な増殖因子を利用する多血小板血漿 (Platelet-Rich Plasma; PRP) 療法は、創傷治癒や骨折、軟骨再生、神経再生、美容関連領域などの分野で組織再生療法として、盛んに行われるようになってきた。しかし、その効果はドナーの状態に依存し、また個々の PRP に含まれる栄養因子の量も様々であり、安定した効果が得られず、controversial な状態が続いている。

2. 研究の目的

本提案の目的は、難治性末梢神経障害に対して、自家 PRP の代替療法として、ドナーに依存せずに作製可能で、安定した効果が期待できる、iPS 細胞由来血小板・巨核球 (iPS-derived platelet and megakaryocyte; iPM) 製剤の治療効果を検証することとした。

3. 研究の方法

3 - 1) ラット絞扼性神経障害除圧モデルの作製

まず初めにラット、末梢神経障害除圧モデルの作成を行った。従来の末梢神経の疼痛に関する動物実験では、鑷子、糸、シートなどによる坐骨神経絞扼モデルが採用されてきた。神経保護に働く薬剤の投与実験は、上記神経障害と同時に進行されることが多く、神経障害による強い炎症と薬剤による神経保護効果が同時に起きるため、神経障害後の修復過程を評価することが困難であった。

そのため、神経をナイロン糸で絞扼する、chronic constriction injury (CCI) model を作成後 (初回神経絞扼手術) から神経周囲の剥離かつ糸を除去する除圧術までの日数を 1, 3, 5 日とした群と除圧しない群 (それぞれ 1R 群、3R 群、5R 群、NR 群とし、各群 n=5) の 4 条件を設定し、von Frey test による疼痛閾値を指標に、最適な日数の検討を行った。

3 - 2) ラット絞扼性神経障害除圧モデルを用いた神経除圧による神経内細胞動態の検討

3-1)の結果を踏まえ、初回神経絞扼術後 3 日目に神経除圧術を行うモデルを用いた。目的は神経絞扼後の除圧術により、神経内の細胞動態や炎症マーカーの発現にどのような変化が起きるか検討することであった。

神経絞扼手術後、除圧術を行わない群 (NR 群)、術後 3 日に除圧術を行った群 (dec 群) を作製し、術後 day3 (=神経除圧術日)、7, 14 に神経検体を摘出し、RT-PCR にて神経内の M1, M2 macrophage マーカー、T cell マーカー、各種炎症サイトカインの推移を検討した。無処置のラットを control 群として比較した。

また別実験として、上記 3 群について、day7 の神経検体より細胞を培養し、フローサイトメトリーにて全細胞における CD3 陽性細胞比率を計測した。

3 - 3) PRP の末梢性神経障害に対する効果の検討

本研究の positive control として、ラット他家 PRP (3-5 倍濃縮, leuko-poor) を CaCl₂ にて活性化させ、ゲル化した PRP ゲルの神経障害性疼痛改善効果を、3-2) と同様のモデルで評価した。対象群は除圧術直後に PRP ゲルを投与した群 (PRP 群) 除圧術のみを行った群 (dec 群) の 2 群とした。検討項目は von Frey test による疼痛閾値を day0, 3, 7, 10, 14 で測定した。また day7, 14 に神経検体を摘出し、神経内での炎症マーカー発現の推移を検討した。また day14 に神経検体を摘出し、病理評価にて有髄神経線維数、密度、径、ミエリン鞘の厚さを検討した。

3 - 4) iPM の末梢性神経障害に対する効果の検討

不死化巨核球 (cell stem cell, 2014) 5x10⁶ 個を 5 日間振盪培養し、血小板 15x10⁶ 個と成熟巨核球 5x10⁶ 個を回収後に、CaCl₂ と thrombin で活性化後、凍結乾燥した製剤を iPM 製剤とし、生食 1ml で溶解して使用した。尚、in vitro 実験では、iPM 製剤そのままを使用すると、well 底に細胞成分が沈着してしまうため、遠心後上清を用いた。

) in vivo 実験

3-1)の結果を踏まえ、初回神経絞扼術後 3 日目に神経除圧術を行うモデルを用いた。対象群は除圧術直後に iPM 製剤を浸したコラーゲンシートを投与した群 (iPM 群) 除圧術後、生食に浸したコラーゲンシートの投与を行った群 (control 群) の 2 群とした。検討項目は von Frey test による疼痛閾値を day0, 3, 7, 10, 14 で測定した。

) in vitro 実験

iPM 製剤含有サイトカイン量の PRP との比較 : iPM 製剤と iPM 製剤の遠心後上清と PRP 含有の TGF- β 1 と PDGF-BB を ELISA にて定量した。尚、PRP は 30, 40 代、健康成人 3 名をドナーとし、キ

ットを用いて 3-5 倍濃縮した leuko-poor 製剤で、CaCl₂ と thrombin で活性化後、遠心した上清を凍結乾燥し、生食で溶いて使用した。

iPM 製剤の神経障害性疼痛効果の抑制機序の検証: iPM 製剤による Schwann 細胞増殖促進効果、遊走促進効果を検討した。

対象は、増殖培地(GM)群と GM に iPM を以下の濃度で添加した群(iPM 群)(2.5%, 5%, 10%)、PRP を 5%濃度で添加した群(PRP 群)を作製し、増殖促進効果は day7 に細胞数をカウントし、遊走促進効果は 24 時間後に transwell assay にて遊走した細胞の染色面積を定量して行った。

4 . 研究成果

4 - 1) ラット絞扼性神経障害除圧モデルの作製

すべての群で初回手術により疼痛閾値は急激に下がり、除圧後 NR 群以外は徐々に回復する傾向となった(図 1, 除圧術日を d0 とした)。結果より除圧術までの日数は、3 日が適当と考えられた。理由は術後 1 日で除圧術を行った場合(1R 群)は、疼痛閾値の回復が早過ぎ、また術後 5 日の場合(5R 群)、疼痛閾値の回復が遅いのは良いが、絞扼した糸周囲の癒着が強く神経剥離と糸の除去が困難であり、除圧術時に神経を傷つけてしまうリスクが高いと考えられたからである。

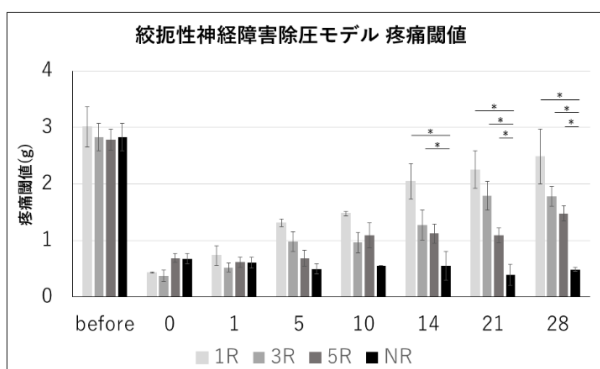


図 1 von Frey test 結果
(before は初回手術前とし、
除圧術日を day0 とした。)

4 - 2) ラット絞扼性神経障害除圧モデルを用いた神経除圧による神経内細胞動態の検討

RT-PCR にて、day7, 14 で dec 群は control 群に比べ、有意に神経内の CD3, CD8, TNF- mRNA の発現が高値であったが、NR 群より有意に低値であった。M1, M2 macrophage マーカーは有意差を認めなかった。またフローサイトメトリーでは、dec 群は control 群と有意差を認めず、NR 群と比べ、有意に CD3 陽性細胞が低値であった。

以上より神経絞扼術後の神経除圧術により神経内への T 細胞遊走が抑制され、これが疼痛閾値回復の一助になっている可能性が示唆された。

4 - 3) PRP の末梢性神経障害に対する効果の検討

day3 に除圧を行い、疼痛閾値の回復は day7 より PRP 群が有意に速く、14 日目には術前とほぼ同レベルまで回復していた。day7, 14 に神経内での TNFa, IL-6 mRNA の発現が有意に抑制された。また有髄神経線維数、密度について、PRP 投与群で有意に高値であり、PRP ゲルによる神経保護効果が示唆された。

4 - 4) iPM の末梢性神経障害に対する効果の検討

day3 に除圧を行い、疼痛閾値の回復は d7 より iPM 群が有意に速く、14 日目には術前とほぼ同レベルまで回復していた(図 2)。

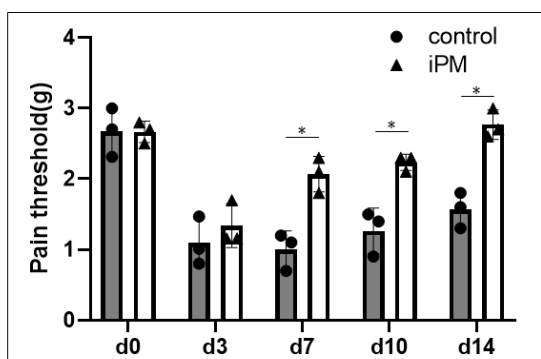


図 2: von Frey test 結果

)in vitro 実験

iPM 製剤含有サイトカイン量の PRP との比較： iPM 製剤と iPM 製剤の遠心後上清と PRP に含有される TGF- β 1 と PDGF-BB の量に有意差は認めなかった。

iPM 製剤の神経障害性疼痛効果の抑制機序の検証： 細胞増殖について、GM 群に対し、すべての iPM 投与群と PRP で約 2 倍の有意な増殖効果を認めた(図 3)。また遊走能について、GM 群に対し、iPM2.5%、5%投与群で有意な遊走促進効果を認めた(図 3)。

以上より iPM 製剤の疼痛閾値低下には Schwann 細胞の増殖、遊走促進効果が関与している可能性が示唆された。

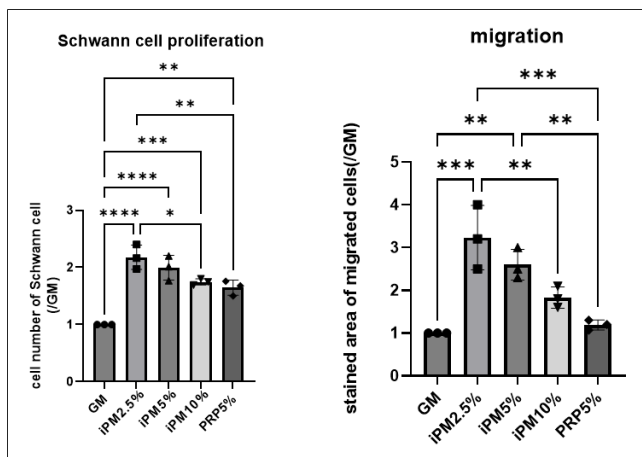


図 3 Schwann 細胞増殖試験・
遊走試験結果
(左 Schwann 細胞数比(/GM)、
右 遊走した細胞面積)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Michiaki Mukai, Kentaro Uchida, Gen Inoue, Masashi Satoh, Masayuki Miyagi, Yuji Yokozeki, Naoya Hirose, Yusuke Matsuura, Seiji Ohtori, Masashi Takaso	4. 巻 40(11)
2. 論文標題 Nerve decompression surgery suppresses TNF- α expression and T cell infiltration in a rat sciatic nerve chronic constriction injury model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 2537-2545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.25280. Online ahead of print.	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 -

1. 著者名 Mukai Michiaki, Uchida Kentaro, Hirose Naoya, Murakami Kenichi, Inoue Gen, Miyagi Masayuki, Shiga Yasuhiro, Sekiguchi Hiroyuki, Inage Kazuhide, Orita Sumihisa, Suzuki Takane, Matsuura Yusuke, Takaso Masashi, Ohtori Seiji	4. 巻 23(1)
2. 論文標題 Frozen vein wrapping for chronic nerve constriction injury reduces sciatic nerve allodynia in a rat model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12868-022-00719-7	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3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、志賀康浩、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Platelet-Rich Plasmaより生成したgelの痛覚過敏抑制効果とその機序に関する検討
3. 学会等名 第34回日本自己血輸血・周術期輸血学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井 務晃, 内田 健太郎, 廣澤 直也, 志賀 康浩, 稲毛 一秀, 折田 純久, 江口 和, 松浦 佑介, 井上 玄, 高相 晶士, 大鳥 精司
2. 発表標題 ラット神経損傷モデルに対するトロンピン添加, 非添加platelet-rich plasmaの痛覚過敏抑制効果の比較
3. 学会等名 第36回 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 向井務晃
2. 発表標題 ラット坐骨神経損傷モデルに対する新鮮Platelet-Rich Plasma gelの痛覚過敏抑制効果とその機序に関する検討
3. 学会等名 第17回Chiba Neuroreserch Meeting
4. 発表年 2022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	江藤 浩之 (Eto Koji)	京都大学・iPS研究所臨床応用研究部門・教授 (14301)	
研究協力者	高山 直也 (Takayama Naoya)	千葉大学・医学研究院イノベーション再生医学・准教授 (12501)	
研究協力者	内田 健太郎 (Uchida Kentaro)	北里大学・医学部整形外科・講師	

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
---------	---------