

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659692

研究課題名(和文) 転換神経細胞による疼痛治療

研究課題名(英文) Pain treatment by using induced neuronal cell

研究代表者

青江 知彦 (AOE, Tomohiko)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90311612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：慢性の神経障害性疼痛に対しては、三環系抗うつ薬やプレガバリン、ガバペンチンなどの抗てんかん薬による内服治療が主体になるが、難治性で服薬も長期に渡る症例が多い。最近、新たな治療の試みとして、ラットを用いた実験で胚性幹細胞(ES)細胞から分化誘導させたGABAergic神経細胞のくも膜下投与によって脊髄損傷に因る神経障害性疼痛が軽減される事が報告されている。将来的な臨床応用を目指して、マウス線維芽細胞を神経細胞に変換し、GABAergic神経細胞を誘導分離する方法を検討する。神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、試験的に分離細胞をくも膜下に投与し、神経障害性疼痛が軽減されるかどうかを検討する。

研究成果の概要(英文)：For future clinical application, we tried to convert a mouse fibroblast into nerve cells and examined a method to derive it, in order to isolate GABAergic nerve cells. We prepared neuropathic pain model mice for intrathecal administration of the separation cells on a trial basis, to consider whether neuropathic sharp pain would be reduced.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：再生医学、神経科学

1. 研究開始当初の背景

末梢神経あるいは中枢神経の損傷による神経障害性疼痛に対しては、慢性期には三環系抗うつ薬やプレガバリン、ガバペンチン、クロナゼパムなどの抗てんかん薬による内服治療が主体になるが、難治性で服薬も長期に渡る症例が多い。最近、新たな治療の試みとして、ラットを用いた実験でマウスの胚性幹細胞(ES)細胞から分化誘導させたGABAergic神経細胞のくも膜下投与によって脊髄損傷に因る神経障害性疼痛が軽減される事が報告されている(1)。本研究者はマウスのES細胞や受精卵を用いて遺伝子変異マウスの作製に従事した経験が多くあり(2-5)、こうした発生工学を生かした新たな疼痛治療の開発を着想した。

将来的な臨床応用を考えるとES細胞の使用は問題が多い。2006年にYamanakaらによって、ES細胞の様に多様な細胞に分化出来る分化万能性(pluripotency)と、分裂増殖を経てそれを維持出来る自己複製能を持つiPS細胞(induced pluripotent stem cells)が、マウスの線維芽細胞に4種類の遺伝子を導入することにより、世界で初めて作られた(6)。また、2007年にはヒトの線維芽細胞からも同様にiPS細胞が作成された(7)。iPS細胞は体を構成するすべての組織や臓器に分化誘導することが可能と考えられ、ヒトの患者自身からiPS細胞を樹立する技術が確立されれば、拒絶反応の無い移植用組織や臓器の作製が可能になると期待されている。また、患者自身の細胞からiPS細胞を作製し、そのiPS細胞を特定の細胞へ分化誘導することで、従来は採取が困難であった組織の細胞を得ることができ、今まで治療法がなかった難病に対してその病因や発症メカニズムを研究したり、薬剤の効果・毒性を評価することが可能となる。実際、2008年には筋萎縮性側索硬化症の患者の線維芽細胞からiPS細胞を経て運動神経細胞が作製されている(8)。

一方、体細胞からiPS細胞へのde-differentiationとiPS細胞から特定の分化した細胞へのre-differentiationの過程を簡略化して、iPS細胞を経ずに体細胞を直接特定の細胞に変換分化させる試みも始まっている。2010年には3種類の遺伝子を導入する事により、マウス線維芽細胞を神経細胞に変換出来た事が発表された(9)。Vierbuchenらはこの神経細胞をinduced neuronal(iN)cell(転換神経細胞と仮に呼ぶ)と名付けた。このiN cellは大部分が興奮性の神経細胞だが一部はGABAergic神経細胞である。

本研究は、将来的に患者由来の線維芽細胞からその患者のiN cellを作製し、これを患者のくも膜下などに投与することによって、難治性の神経障害疼痛の治療を行うための基礎研究である。そのために、マウス線維芽細胞からiN cellを作成する方法を検討する。また、脊髄損傷モデルマウスを作製し、iN cellをくも膜下投与し、疼痛が軽減されるかどうかを検討することを旨とする。

1. Kim, D. S. et al. Transplantation of GABAergic Neurons from ES Cells Attenuates Tactile Hypersensitivity Following Spinal Cord Injury. *Stem Cells*.
2. Ohno, H, **Aoe, T.** et al. Developmental and functional impairment of T cells in mice lacking CD3 zeta chains. *EMBO J* 12, 4357-66 (1993).
3. **Aoe, T.** et al. Preferential requirement of CD3 zeta-mediated signals for development of immature rather than mature thymocytes. *Int Immunol* 8, 1055-66 (1996).
4. Hamada, H. et al. and **Aoe T** Dilated cardiomyopathy caused by aberrant endoplasmic reticulum quality control in mutant KDEL receptor transgenic mice. *Mol Cell Biol* 24, 8007-8017 (2004).
5. Mimura, N. et al. and **Aoe T** Aberrant quality control in the endoplasmic reticulum impairs the biosynthesis of pulmonary surfactant in mice expressing mutant BiP. *Cell Death Differ* 14, 1475-1485 (2007).
6. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-76 (2006).
7. Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-72 (2007).
8. Dimos, J. T. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321, 1218-21 (2008).
9. Vierbuchen, T. et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035-41.

2. 研究の目的

iPS細胞のヒトへの臨床応用での最大の懸念は、iPS細胞の癌化である。iPS細胞は分裂増殖能を持ち、また、患者自身の細胞であるので免疫機構による排除も受けない。iPS細胞を用いる場合は混入したiPS細胞の癌化の懸念がある。従って患者から採取し易い線維芽細胞などからiPS細胞の段階を経ずに直接目的の分化した細胞、本研究ではiN cellが得られれば、そうした可能性は少なくなる。

もう一つの懸念はiPS細胞作製時に遺伝子導入に用いるレトロウイルスが染色体内の不特定部位に挿入されるため、遺伝子変異をもたらす可能性がある事である。VierbuchenらもiN cell作製のために、線維芽細胞にレトロウイルスであるレンチウイルスを用いて3種類の遺伝子を導入発現させている。これに対して、レトロウイルスを用いずに遺伝子導入を行う方法や、遺伝子導入を用いずに薬剤によってiPS細胞を作成する試みが行われている。KimらはiPS細胞作成に必要な4種類の遺伝子から出来る蛋白質にそれぞれcell penetrating peptide(CPP)を融合した蛋白質を作製した。これらの融合蛋白は線維芽細胞に細胞外から取り込まれる性質を持ち、これらを用いてiPS細胞を作製する事に成功している(10)。

本研究では、iN cell作製に必要な3種類の遺伝子産物(蛋白質)にCPPを融合させ、これをマウス線維芽細胞に取り込ませ、遺伝

子導入を用いずに、線維芽細胞から iN cell を作成する事を目指す。この方法論によって、癌化や遺伝子変異の危険性を小さくする事が出来る。

患者自身の皮膚などの線維芽細胞から iN cell を作製し、GABAergic 神経細胞を誘導分離し、脊髄損傷による神経障害痛のある患者にくも膜下投与する。これによって疼痛が軽減されれば、患者は服薬から解放される。神経障害性疼痛に対しても処方される三環系抗うつ薬やプレガバリン、クロナゼパムなどの抗てんかん薬は眠気、だるさなどの訴えも多く、患者の肉体的並びに精神的な活動性も制限される。また、iN cell は患者由来の細胞であるので、臓器移植患者の様に免疫抑制剤を服薬する必要もない。

テーラーメイド医療の見地からも、患者由来の iN cell 作製法が確立すれば、線維筋痛症など抑制性神経系に何らかの変異（患者毎に異なる変異がある可能性もある）が関与していると考えられる疾患の患者由来の iN cell を作製し解析する事によって、病態の解明、治療法の開発、より有効な治療法や内服薬の選択に寄与すると考えられる。

本研究計画の方法論は現在世界中で競争が繰り広げられている分野である。研究期間中により優れた方法論が開発される可能性は高い。実際にはその時点での他の研究者による研究成果を適宜取り入れて行なう事になるにしても、本研究計画を実行する事は、いざ患者に対して臨床応用する場合に有益な経験となると考えられ、準備段階としてマウスを用いた基礎研究は必要な課程である。

10. Kim, D. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472-6 (2009).

3. 研究の方法

臨床応用への準備段階として、マウス線維芽細胞を神経細胞に変換し、GABAergic 神経細胞を誘導分離する方法を検討する。神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、試験的に分離細胞をくも膜下に投与し、神経障害性疼痛が軽減されるかどうかを検討する。

モデルマウスにおける疼痛試験は、プランター式鎮痛効果測定装置 (UGO BASILE社) とホットプレートテストによって行なう。プランター式鎮痛効果測定装置ではマウスの後肢に赤外線光源から熱刺激を与え、反応時間をカウンターで自動測定し、熱刺激に対する痛覚過敏度を患側肢と健側肢それぞれ測定している。ホットプレートテストではマウス用足底熱刺激装置 (hot plate) により熱刺激を与え、それに対する反応時間を測定する。Hot plate の温度設定は54.5度とする。測定時間は熱による組織の障害を防ぐため、60秒を最大値とし、それ以上の場合はすみやかにマウスをhot plate から移動させる。

4. 研究成果

Vierbuchenらはマウス線維芽細胞がAscl1、Brn2、Myt1lの3種類の蛋白質によって、iN cellになる事を示した。また、KimらはiPS細胞作製に必要な蛋白質にnine arginine repeat (9R)配列を融合させると、細胞培養液に加えた融合蛋白質が線維芽細胞の細胞内に取り込まれiPS細胞に転換される事を報告している。そこで、Ascl1、Brn2、Myt1lの3種類の蛋白質のカルボキシル末端にそれぞれ9R配列を付加し、また、アミノ末端に6 x histidine tagを付加した融合蛋白質を発現するcDNAを含む発現プラスミドベクターを作製する。各蛋白質のcDNAはマウス胎児脳RNAからRT-PCR反応によって作製中であり、この発現プラスミドベクターをHEK293細胞 (ヒト胎児腎臓細胞由来) に遺伝子導入し、融合蛋白質を一種類ずつ産生する安定発現細胞株を得る予定である。安定発現細胞株作製については、リポフェクチンによるプラスミド遺伝子導入後にネオマイシンによるセレクションを行なう事によって作製するが、過去の研究で実施している (J Biol Chem. 2003 Sep 5;278(36):34525-32. PMID: 12821650 Epub 2003 Jun 23. The KDEL receptor modulates the endoplasmic reticulum stress response through mitogen-activated protein kinase signaling cascades. Yamamoto KI, Hamada H, Shinkai H, Kohno Y, Koseki H, Aoe T.)。

並行して、神経障害性疼痛モデルマウスの作成を進めている。C57/BL6マウスを用いて坐骨神経部分損傷モデル (partial sciatic nerve injury, PSL, Seltzer model) を作製した。プランター式鎮痛効果測定装置 (UGO BASILE社) を用いて、熱刺激に対する痛覚過敏度を患側肢と健側肢それぞれ継時的に測定している。

Ascl1、Brn2、Myt1lの3種類の融合蛋白質の作成に時間がかかっており、今後これをさらに進める。この発現プラスミドベクターをHEK293細胞 (ヒト胎児腎臓細胞由来) に遺伝子導入し、融合蛋白質を一種類ずつ産生する安定発現細胞株を得る予定である。これらの細胞は遺伝子導入された各融合蛋白質を産生する。各融合蛋白質を一つずつ、マウス線維芽細胞の培養液に加える。マウス線維芽細胞はC57/BL6マウスの受精後13,5日胚から作製済みである。Dulbecco's modified essential medium (DMEM; Sigma Chemical Co.) に10% fetal bovine serum (FBS), 2mM glutamine, 50 mg/mlのstreptomycin と50 U/mlのpenicillin G.を加えた通常の細胞培養液で5% CO₂、37度の培養器で培養可能であった。継代の過程で自然に形質転換し、増殖能を獲得した。従って、必要なだけ細胞を増殖させて確保する事が可能である。ただ、神経細胞への形質転換後に、増殖能がどうなるのか検討が必要である。

各融合蛋白質の線維芽細胞への取り込みに最適な条件を検討した上で、それに従って、3種類の融合蛋白質をマウス線維芽細胞に同

時に投与する。線維芽細胞に融合蛋白質を投与して、12日前後から、細胞を一部固定し、神経細胞に発現するMAP2蛋白の発現を免疫蛍光染色で観察する。坐骨神経部分損傷モデルを作成後1週間で患側肢に痛覚過敏が検出出来たら、このモデルマウスにGABAergic神経細胞への分化を促進したiN cellをくも膜下投与する。対照群として生理食塩水注入群、マウス線維芽細胞注入群を設ける。投与後1週間ごとに、プランター式鎮痛効果測定装置またはホットプレートテストによる測定を行う。測定結果に応じて、iN cellの投与量、投与方法(複数回、単回)など改善点を適宜検討する。一部のiN cell投与後の神経障害性疼痛モデルマウスは、投与後1ヶ月経過した時点で、安楽死させ、経心臓的に灌流固定し、パラフィン包埋標本を作製する。組織切片を作製し、hematoxylin-eosin染色によって脳・脊髄の病理変化を、形態学的に観察する。

現在iN cellの作製に成功していないが、近年低分子化合物の投与でiN cellを作製したとの報告があり、今後はそうした方法も合わせて用いて作製を試み、研究を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

1 Komita, M., Jin, H., Aoe, T. The effect of endoplasmic reticulum stress on neurotoxicity caused by inhalational anesthetics. *Anesthesia&Analgesia*, 117(5):1197-204, 2013, doi: 10.1213/ANE.0b013e3182a74773. 査読有

2 青江知彦 小胞体ストレス反応とオピオイド耐性、退薬症状、麻酔 62, 283-289, 2013, <http://www.de-hon.ne.jp/digital/bin/product.asp?sku=1491008313033300400P>、査読無

3 青江知彦 小胞体ストレスと神経系細胞、*Anesthesia 21 Century* 15, 16-23, 2013, <http://www.maruishi-pharm.co.jp/med2/files/anesth/book/3/4.pdf?1366097691>、査読無

4 小見田 真理、奥山陽太、神久予、磯野史朗、青江知彦 小胞体ストレスと疾患、*千葉医学雑誌*、89巻、p87-94、2013、<http://mitizane.ll.chiba-u.jp/metadb/up/igakukai/89-3-87.pdf>、査読無

[学会発表](計8件)

1 青江知彦、化学シャペロンによるオピオイド耐性形成の抑制、第8回臨床ストレス応答学会大会プログラム 2013年11月15日 松本

2 青江知彦、小胞体シャペロンBiPのソーティング異常によって起こる発生過程から老年期に見られる病態、*日本細胞生物学会* 2013、6、21 名古屋

3 青江 知彦、小見田 真理、奥山陽太、神久予、吸入麻酔薬による神経障害と小胞体ストレス、*日本麻酔科学会* 第60回学術集会 札幌、2013、5、23

4 奥山陽太、神久予、磯野史朗、青江知彦 化学シャペロンを用いたモルヒネ耐性形成抑制の実験、*日本麻酔科学会* 第60回学術集会 札幌、2013、5、23

5 小見田 真理、神久予、青江知彦 吸入麻酔薬による神経細胞障害と小胞体ストレス、第7回臨床ストレス応答学会 東京、2012、11、24

6 青江知彦、三村尚也、木村敬太、小見田真理、奥山陽太、神久予、変異BiPノックインマウスの加齢病変、第7回臨床ストレス応答学会 東京、2012、11、24

7 Aoe, T., Komita, M., Aono, M., Okuyama, Y., Jin, H. The influence of endoplasmic reticulum stress on neurotoxicity caused by inhalational anesthetics *American Society of Anesthesiologists annual meeting* 2012, Oct. 14 Washington DC, USA

8 小見田 真理、青江知彦、神久予 吸入麻酔薬による神経障害と小胞体ストレス *日本麻酔科学会* 第59回学術集会 神戸、2012、6、07

[図書](計1件)

1 Tomohiko Aoe, Ed. Vivian Jacobs and Alexander Lang, Modulation of the development of morphine antinociceptive tolerance by endoplasmic reticulum chaperones. In "Analgesics: New Research", 2012, p75-98

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青江 知彦 (AOE, Tomohiko)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：90311612

(2)研究分担者

小見田 真理 (KOMITA, Mari)
千葉大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：90589194

(3)連携研究者

()

研究者番号：