

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18241

研究課題名（和文）ミクログリア由来エクソソームによる神経障害性疼痛のメカニズム解明

研究課題名（英文）Mechanisms of neuropathic pain elucidated by microglia-derived exosomes

研究代表者

加納 史也（KANO, Fumiya）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教

研究者番号：40801626

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）：神経因性疼痛では、体性感覚系の損傷や疾患により、しばしば慢性疼痛が引き起こされる。現在、神経因性疼痛の決定的な治療薬となる薬剤は存在しない。研究代表者は、マウス坐骨神経部分結紮モデルを用いて、ヒト剥離乳歯由来幹細胞由来の培養上清(CM)の治療可能性を検討した。行動試験では、CMの静脈内投与はPSLによる知覚過敏を大きく改善した。CMを投与すると、損傷した坐骨神経と同側のL4/L5後根神経節にM2マクロファージが動員され、脊髄ではミクログリアの活性化が抑制されることがわかった。また、M2-CMIはシュワン細胞における侵害受容体および炎症性メディエーターの発現を直接抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛などの慢性疼痛は発症機序が不明な点から、根本的な治療法の確立には未だ至っていない。近年、神経組織の炎症が慢性疼痛の維持と悪化と関連すると報告がある。本研究は、PSL後に末梢から脊髄で活性化したマクロファージ/ミクログリアをM2へ誘導することで、マウスの疼痛過敏状態を改善することを見出した。さらにM2から分泌される疼痛制御因子群を明らかにできた。これらの知見は、神経障害性疼痛だけでなく、多くの慢性疼痛へ対する新たな製剤化および創薬への途を開いた。以上の方法は、慢性疼痛の原因となる神経炎症と免疫細胞をターゲットにしているため、既存薬と比べ有効であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In neuropathic pain, injury or diseases of the somatosensory system often result in chronic pain. Currently, there is no effective drug for the definitive treatment of NP. We investigated the therapeutic potential of conditioned medium derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth (CM) against NP using a mouse partial sciatic nerve ligation (PSL) model. In the behavioral test, intravenous administration of CM greatly improved PSL-induced hypersensitivity. We found that treatment with CM resulted in the recruitment of M2 macrophages in the injured sciatic nerve and ipsilateral L4/L5 dorsal root ganglion and suppressed microglial activation in the spinal cord. We found that M2-CM directly suppressed the expression of nociceptive receptors as well as proinflammatory mediators in Schwann cells.

研究分野：神経科学

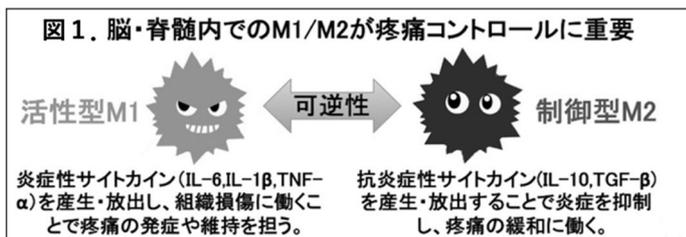
キーワード：神経障害性疼痛 歯髄幹細胞 培養上清 マクロファージ ミクログリア

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん、糖尿病、帯状疱疹あるいは脳卒中などで神経に障害が起きると、「神経障害性疼痛」という慢性痛が発症する。原疾患が寛解しても、過剰な疼痛の慢性化・難治化は残存し、患者のQOLは極度に低下する。既存の非ステロイド性抗炎症薬や麻薬性鎮痛薬が奏効しがたいために、本邦では約2200万人以上の患者が苦しんでいるといわれている。難治性のメカニズム解明と効果的な新しい鎮痛薬の開発が求められている。

ミクログリアはその機能によりM1とM2に分類される。M1は炎症系サイトカインを産生・放出し炎症の促進や組織損傷に働くことで疼痛の発症や維持を担う。一方、M2は抗炎症性サイトカインを産生・放出することで、炎症を抑制し疼痛の緩和に働くことが知られている(図1)。研究代表者はM2誘導因子を神経障害性疼痛モデルマウスに投与することで、脊髄後根の環境を活性型M1からM2へ転換し疼痛を制御することを見出した。M2の放出するタンパク質や細胞外小胞による疼痛制御の新たな可能性を示唆した。



重症免疫不全マウスなどを用いた研究では、免疫細胞(ミクログリア、T細胞、B細胞など)がないと疼痛刺激時の逃避行動の欠如、中枢神経組織の変性の減少などを報告している。しかし、免疫細胞が疼痛の増悪・緩和に影響を及ぼす根本的なメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

神経障害性モデルマウスに歯髄幹細胞由来のエクソソームを含む培養上清(DPSC-CM)を投与し、その治療効果と治療メカニズムを明らかにするものであった。またM2マクロファージ/ミクログリアが分泌する抗炎症・疼痛制御に関連する因子を明らかにするものであった。

3. 研究の方法

幹細胞培養上清は、所定の手続きを得たヒト細胞を培養して調整した。神経障害性モデルマウスは坐骨神経の1/3~1/2を縫合糸で結紮するPSLモデルマウスを作成した。PSL誘発の触覚アロディニアは後肢の足底を対象にvon Freyフィラメントを用いて記録した。結紮した坐骨神経や脊髄後根節、脊髄の状態は免疫組織学的解析で神経細胞やグリア細胞の活性化、集積したマクロファージ/ミクログリアの極性を解析した。またその遺伝子発現について、組織からRNAを抽出し、real time RT-PCRで解析した。モデルマウスで観察された鎮痛メカニズムをin vitroで評価するため、Schwann細胞をTNF- α で活性化し、DPSC-CMやM2マクロファージ/ミクログリア由来の分泌タンパクを投与し、免疫組織学的解析と遺伝子発現解析を行った。

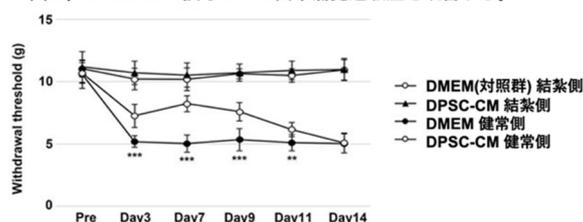
M2マクロファージ/ミクログリアが分泌する因子群を明らかにするために、LC-MS/MSによるショットガンプロテオミクスを用いて解析した。M2マクロファージ/ミクログリアはマウスの骨髄と胎生マウスの小脳から採取培養し、無血清下でDPSC-CMやM2誘導因子で誘導した。

4. 研究成果

(1) DPSC-CMはPSL後の神経障害性疼痛を予防し、運動機能を維持する。

PSL後のアロディニアは術後3日目が発現し、2週間は継続した。DPSC-CM投与後群は、1週間を超えて疼痛の閾値が高い状態で維持された(図2)。またロータロッドを用いた運動試験でもDPSC-CM投与後群、DMEM群、線維芽細胞-CM群よりも歩行時間が長かった。

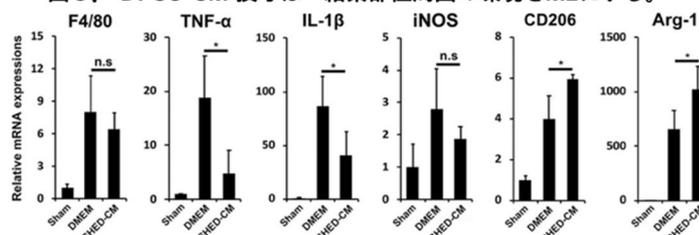
図2. DPSC-CM投与はPSL由来痛覚過敏症を改善する。



(2) DPSC-CM投与は結紮部位の局所環境をM2へ誘導する

PSL後の坐骨神経周囲の組織環境は、TNF- α やIL-1の発現が有意に高くなった。DPSC-CM投与により、炎症系サイトカインの発現量が低下するだけでなく、CD206やArgnase-1の発現量が増加した(図3)。

図3. DPSC-CM投与は結紮部位周囲の環境をM2にする。



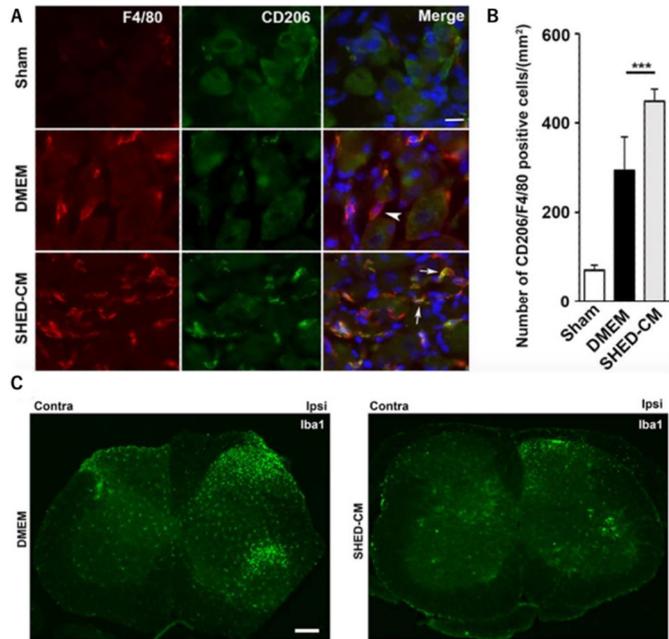
(3) DPSC-CM は PSL 部位より中枢側の組織炎症を抑制する。

次に、PSL から 7 日後の脊髄後根節(DRG)と脊髄の活性化を検討した。PSL 後の DRG は炎症系 M1 マクローファージ/ミクログリアの集積を認めた。DPSC-CM 投与群では、炎症系マクローファージ/ミクログリアの集積は抑制され、抗炎症系 M2 が有意に多く集積していた(図 4AB)。

L3/4 同側後角と腹角の Iba1+ミクログリア数は、対側と比較して増加していた。また、同側では細胞体が肥大し、突起が太く後退した活性化したミクログリア形態を示したが、対側では細胞体が小さく、突起が隆起した静止期にあるようであった(図 4C 左)。

DPSC-CM 投与群では、同側の後角と腹角の両方で Iba1+ミクログリアの数が減少し、その形態は対側のものと非常に似ていた(図 4C 右)。これらの結果から、DPSC-CM 投与は PSL によって誘発された脊髄のミクログリア活性化を抑制することが示された。

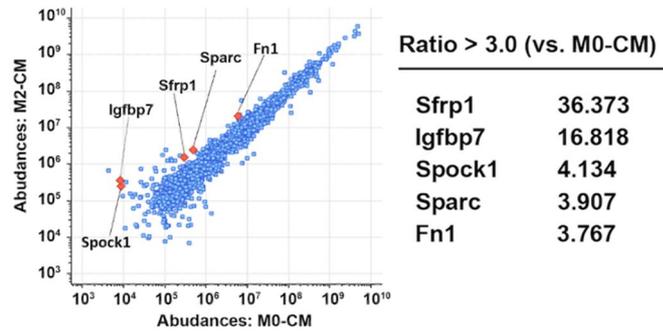
図 4. DPSC-CM 投与は DRG や脊髄の活性化を抑制する。



(4) M2 マクローファージ/ミクログリアは抗炎症・神経保護因子を分泌する。

M2-CM の分泌タンパクのうち、PSL モデルで観察された治療効果因子を特定するために、M2-CM と M0-CM のセクレトーム解析(LC-MS/MS)を実施した。その結果、合計 2824 個のタンパク質が同定され、そのうち 41 個は M2-CM で M0-CM のそれと比較して 3 倍以上高発現し、細胞膜または細胞外領域に位置していた(図 5)。これらの 41 の分泌タンパク質のうち、5 つは抗炎症および/または神経保護に関与することが知られているタンパクであった。これまでの報告に基づき、Wnt シグナル阻害剤である sFRP1 が M2-CM のマクローファージ/ミクログリアへの抗炎症機能に関与している可能性が推測される。

図 5. M2 マクローファージのセクレトーム解析



Wnt シグナル阻害剤である sFRP1 が M2-CM のマクローファージ/ミクログリアへの抗炎症機能に関与している可能性が推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Fumiya Kano, Noboru Hashimoto, Yao Liu, Linze Xia, Takaaki Nishihara, Wakana Oki, Keita Kawarabayashi, Noriko Mizusawa, Keiko Aota, Takayoshi Sakai, Masayuki Azuma, Hideharu Hibi, Tomonori Iwasaki, Tsutomu Iwamoto, Nobuyasu Horimai, Akihito Yamamoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Therapeutic benefits of factors derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth for radiation induced mouse xerostomia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2706-2706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29176-w	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 Linze Xia, Fumiya Kano, Noboru Hashimoto, Cheng Ding, Yang Xu, Hideharu Hibi, Tomonori Iwasaki, Eiji Tanaka, Akihito Yamamoto	4. 巻 35
2. 論文標題 Conditioned Medium from Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Partially Alters the Expression of Inflammation-associated Molecules of Mouse Condylar Chondrocytes via Secreted Frizzled-related Protein 1	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 52-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20738/johb.35.2_52	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 Liu Yao, Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Xia Linze, Zhou Qiao, Feng Xingmei, Hibi Hideharu, Miyazaki Aya, Iwamoto Tsutomu, Matsuka Yoshizo, Zhang Zhijun, Tanaka Eiji, Yamamoto Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Conditioned Medium From the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Neuropathic Pain in a Partial Sciatic Nerve Ligation Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.745020	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 Muto Hisanori, Ito Takanori, Tanaka Taku, Yokoyama Shinya, Yamamoto Kenta, Imai Norihiro, Ishizu Yoji, Maeda Keiko, Honda Takashi, Ishikawa Tetsuya, Kato Asuka, Ohshiro Taichi, Kano Fumiya, Yamamoto Akihito, Sakai Kiyoshi, Hibi Hideharu, Ishigami Masatoshi, Fujishiro Mitsuhiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Conditioned medium from stem cells derived from human exfoliated deciduous teeth ameliorates NASH via the Gut-Liver axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98254-8	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 Khurel Ochir Tsendsuren, Izawa Takashi, Iwasa Akihiko, Kano Fumiya, Yamamoto Akihito, Tanaka Eiji	4. 巻 7
2. 論文標題 The immunoregulatory role of p21 in the development of the temporomandibular joint osteoarthritis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Dental Research	6. 最初と最後の頁 313 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cre2.404	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 Keita Kawarabayashi, Fumiya Kano, Noboru Hashimoto, Hideharu Hibi, Tsutomu Iwamoto, Akihito Yamoto	4. 巻 33
2. 論文標題 Conditioned Media from Human Dental Pulp Stem Cells Prevent Radiation-induced Skin Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20738/johb.33.1_1	査読の有無 無
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 Ogasawara N., Kano F., Hashimoto N., Mori H., Liu Y., Xia L., Sakamaki T., Hibi H., Iwamoto T., Tanaka E., Yamamoto A.	4. 巻 28
2. 論文標題 Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental temporomandibular joint osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 831 ~ 841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2020.03.010	査読の有無 無
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 Tanaka Eiji, Liu Yao, Xia Linze, Ogasawara Naoko, Sakamaki Takuma, Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Feng Xingmei, Yamamoto Akihito	4. 巻 48
2. 論文標題 Effectiveness of low-intensity pulsed ultrasound on osteoarthritis of the temporomandibular joint: A review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 2158 ~ 2170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10439-020-02540-x	査読の有無 無
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13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 沖若奈, 西原嵩晃, 加納史也
2. 発表標題 Therapeutic benefits of factors derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth for radiation-induced mouse xerostomia
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖 若奈, 加納史也, 西原嵩晃, 橋本 登, 山本朗仁
2. 発表標題 歯髓幹細胞培養上清の抗酸化効果による放射線性口腔乾燥症の治療メカニズム
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森岡莉彩, 猿山善章, 加納史也, 橋本 登, 山本朗仁
2. 発表標題 分泌型シアル酸認識レクチンを用いた関節リウマチの新規治療法の開発
3. 学会等名 第76回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沖 若奈, 加納史也, 西原嵩晃, 橋本 登, 山本朗仁
2. 発表標題 歯髓幹細胞培養上清の抗酸化効果による放射線性口腔乾燥症の治療メカニズム
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猿山善章, 森岡莉彩, 加納史也, 橋本 登, 山本朗仁
2. 発表標題 分泌型シアル酸認識レクチンを用いた関節リウマチの新規治療法の開発
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Linze Xia, Fumiya Kano, Noboru Hashimoto, Eiji Tanaka, Akihito Yamamoto
2. 発表標題 Conditioned Medium from M2 Macrophage Alleviates Murine Temporomandibular Joint Osteoarthritis
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Cheng Ding, Fumiya Kano, Noboru Hashimoto, Linze Xia, Yang Xu, Akihito Yamamoto
2. 発表標題 Soluble Siglec-9 attenuated the joint destruction in Collagen Antibody Induced Arthritis mouse model
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加納 史也, 小笠原直子, 橋本 登, 森 浩喜, 宮寄 彩, 岩本 勉, 田中 栄二, 山本 朗仁
2. 発表標題 Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental temporomandibular joint osteoarthritis
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加納史也, Liu Yao, 橋本登, 松香芳三, 田中栄二, 山本朗仁
2. 発表標題 Conditioned Medium from the dental pulp stem cells Ameliorates Neuropathic Pain in mouse Partial Sciatic Nerve Ligation Models
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加納史也, Liu Yao, 橋本登, 松香芳三, 田中栄二, 山本朗仁
2. 発表標題 歯髄幹細胞由来無血清培養上清は坐骨神経結紮モデルマウスの神経障害性疼痛を改善する
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fumiya Kano
2. 発表標題 Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for Synergistically Regenerate Transected Rat Peripheral Nerves by Altering Macrophage Polarity.
3. 学会等名 Japanese Association for Dental Research (IADR) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 有馬秀貴, 加納史也, 後藤秀一郎, 橋本登, 寺町順平, 岩本勉, 山本朗仁
2. 発表標題 種々の細胞由来培養上清のヒトSchwann細胞に与える影響
3. 学会等名 四国歯学会第56回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 後野秀一郎, 加納史也, 有馬秀貴, 橋本登, 寺町順平, 岩本勉, 山本朗仁
2. 発表標題 歯髄幹細胞培養上清によるラット脊髄損傷への治療効果の検討
3. 学会等名 四国歯学会第56回例会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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