

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19927

研究課題名（和文）ヒト末梢神経系のin vitro再構成系の構築による痛み緩和メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of the pain alleviation mechanism by constructing an in vitro reconstitution system of the human peripheral nervous system

研究代表者

岡 浩太郎（Oka, Kotaro）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：10276412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：この研究ではヒト末梢神経系、具体的には皮膚の主要な細胞であるケラチノサイトとそれが受けたシグナルを中枢に送る末梢神経細胞を人工的に再構成することにより、ヒトの末梢での痛み刺激の伝達過程とその緩和について明らかにすることを目指した。ヒトケラチノサイトは容易に入手可能であることから、ヒト歯髄幹細胞から末梢神経細胞を誘導することをまず試み、分化誘導条件について検討したところ、ヒト末梢系と考えられる特徴を有した神経細胞を誘導することに成功した。またこれと並行して、ヒトケラチノサイトとラット後根神経節(DRG)神経細胞の共培養を行い、オキシトシンが痛みシグナル伝達を緩和することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛みのシグナルが皮膚から中枢に伝わることは、危険を知らせる重要な情報伝達である。一方で慢性的な痛みが中枢に常に伝達されることは、QOLの観点からも適切ではない。この研究では全てヒトの細胞による末梢神経系（ケラチノサイトと感覚神経細胞）を構築し、痛みの刺激が末梢で緩和されるメカニズムを明らかにすることを試みた。ヒト歯髄にある肝細胞から末梢神経系を分化誘導することに成功したこととから、オールヒト細胞による末梢神経系の再構築へ目処がたった。また並行して進めたヒトケラチノサイトとラット感覚神経細胞の共培養系の実験から、末梢組織によるオキシトシンによる痛み伝達の緩和を見出した。

研究成果の概要（英文）：In this research, we aimed to reconstitute the human peripheral nervous system in vitro by keratinocytes, which are the main cells of the skin, and peripheral neurons that send the signals they receive to the central nervous system. We tried to clarify the pain signal transmission process and its mitigation. Since human keratinocytes are easily available, we first attempted to induce the peripheral nervous system from human dental pulp stem cells. We investigated the induction of differentiation and succeeded in inducing human peripheral neurons. In parallel, we co-cultured human keratinocytes with rat dorsal root ganglion (DRG) neurons and demonstrated that oxytocin alleviates pain signaling.

研究分野：神経科学

キーワード：歯髄幹細胞 ケラチノサイト 痛み緩和 バイオイメーjing オキシトシン

1. 研究開始当初の背景

皮膚は様々な外的刺激を受容して脊髄後根神経節細胞を介して脳へこの刺激を伝えている(図1)。脳は過剰な刺激を痒みや痛みとして受容しているが、過剰で慢性的な刺激は不快である。このような慢性的な痛みをどのように緩和するのかは Quality of Life (QOL)を向上させるために重要であるが、末梢での痛み緩和メカニズムを調べるための適切なモデル系は今までなかった。

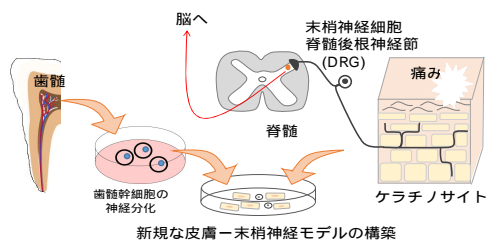


図1 研究概要

2. 研究の目的

この研究では、ヒト歯髄幹細胞から末梢神経を分化誘導し、その神経細胞とヒト皮膚の主要な細胞であるケラチノサイトを共培養することにより、全てヒトの細胞による末梢神経系 in vitro モデルを構築することを目指した。このモデルを構築することで、慢性的な痛みや痒みの末梢モデル系を提供するとともに、様々な国で昔から言われている皮膚を撫でることにより痛みが緩和するメカニズム(痛い痛いの飛んで行け!)について末梢レベルで生理学として説明できないかを検討した。

3. 研究の方法

(1)ヒト歯髄幹細胞からの末梢神経分化誘導

これまでに我々はヒト歯髄幹細胞から神経細胞を誘導する研究と進めてきた。ヒト歯髄幹細胞は歯の内部に存在しているため、この細胞を再生医療に利用することは新規な幹細胞研究のターゲットとなっている。最近では日本歯科大学が「歯の細胞バンク」を作っていて、乳歯から得た幹細胞を保存することにより、将来の再生医療への準備を進めている(詳しくは <http://www.ndu.ac.jp/cell-bank/>)。

我々はこの細胞バンクより歯髄幹細胞を得て、神経細胞に分化・誘導する可能性を探ってきた。我々は、この幹細胞を神経細胞様に分化させることが可能であることを明らかにした(Kogo et al. *Biophysics and Physicobiology*, <https://doi.org/10.2142/biophysico.BSJ-2020023>)。しかし一方でこの分化誘導した神経細胞が末梢神経細胞として機能するのかについてはさらに検討を進め、末梢神経細胞のマーカータンパク質の存在や末梢神経に存在するはずの様々な受容体の刺激を与えた時に応答することがわかってきている。現在のところこの段階は順調に予備検討が進んでいるが、さらなる分化条件の検討が必要となる。

(2)ケラチノサイトとラット後根神経節(DRG)神経細胞との共培養系を用いた痛み・痒み情報伝達系の解明のイメージングによる調査

市販されているヒトケラチノサイトを利用し、ラット後根神経節(DRG)神経細胞との共培養を試みた。ケラチノサイトとDRG神経細胞の培養液は異なること、また市販のケラチノサイト用に最適化された培養液についてはその組成が明らかにされていないことなどから、「ケラチノサイトと神経細胞のそれぞれの特徴を維持したまま、健全な皮膚末梢の機能を維持させる条件」を検討した。共培養条件を確定したところで、実際にケラチノサイトから神経細胞に情報伝達が行われているのかを調べた。ケラチノサイトへの刺激としてはマイクロピペットによる機械的刺激のほか、ケラチノサイトに存在する様々な受容体の化学刺激などを行なった。神経細胞やケラチノサイトの応答はCaイメージングにより行なった。またケラチノサイトと神経細胞間での情報伝達にはケラチノサイトからのATP放出によるものと考えられている。そこでケラチノサイトからのATP放出を直接計測するために、ケラチノサイトまたは神経細胞外側に蛍光タンパク質型ATPセンサーATeamを導入した。このセンサーについては中枢神経細胞とグリア細胞とのコミュニケーションを調べるために既に開発したものがあつたため、このセンサーを本研究にも利用できるかを検討した。

(3)末梢神経での痛み緩和メカニズムの解明

痛みの緩和は中枢神経で行われている以外にも末梢で起きている可能性を明らかにする。先行研究からケラチノサイトや末梢神経細胞が痛み緩和を誘導するオキシトシンを合成している可能性が指摘されている(例えば Denda et al. *Exp Dermatol.*: 535-7(2012).)。オキシトシンは脳下垂体後葉から分泌されるホルモンで、抗ストレスや摂食抑制などの他に、最近では「幸せホルモン」として知られてきている。そこで上記(2)と同様な手法により細胞外にオキシトシンが放出されるかを検出した。オキシトシンセンサーについては既に国内外で幾つかの報告があるので、このセンサーを作製し、細胞外に配置する。さらにCaイメージングによる神経細胞での痛み刺激受容を検出した。どのような刺激条件でオキシトシンが細胞外に放出され、それにより神経応答が減弱するかを明らかにすることにより、「痛い痛いの飛んで行け」を末梢レベルで検証した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯髄幹細胞からの末梢神経分化誘導

神経分化誘導した hDPSCs をアストロサイトマーカーである GFAP と神経細胞マーカーである β -tubulin で免疫抗体染色したところ、全ての細胞で陽性反応を示した。そこで各マーカーの発現量を比較したところ、神経分化後神経系細胞マーカー発現量は増加していたことから、神経系細胞に分化していると示唆された。また、発現部位に注目すると、細胞体で GFAP、突起で β -tubulin の強い発現が見られた。

次にグルタミン酸 (20 μ M)、ATP (20 μ M)、高濃度 KCl (60 mM) 刺激を行ったところ、グルタミン酸では Ca^{2+} 応答は見られなかったが、ATP と KCl では応答が得られた。神経分化誘導後 ATP および KCl 刺激に対して応答する細胞の割合は増加した。また、膜電位依存性 Na^{+} チャネルの活性化剤であるペラトリジン (VTD) (30 μ M) による刺激でも Ca^{2+} 応答が得られた。神経分化誘導後には VTD 刺激に対する Ca^{2+} 応答振幅は KCl 刺激によるものと比較して増大した。これらの結果は、神経分化誘導による膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルと膜電位依存性 Na^{+} チャネルの発現を示す。さらに、TRPV1 チャネルのアゴニストであるカプサイシン (10 μ M) に対しても Ca^{2+} 応答を示した。この結果とグルタミン酸に Ca^{2+} 応答を示さないことから、特に末梢神経細胞に分化している可能性がある。神経分化誘導後 28 日の hDPSCs の KCl 刺激に対する Ca^{2+} 応答と免疫抗体染色の結果を対応付けたところ、KCl 応答した細胞は GFAP と比べ β -tubulin がより強く発現していた (図 2)。神経系細胞マーカーの発現量の増加、 β -tubulin 発現量の関係、膜電位依存性 Ca^{2+} チャネルと膜電位依存性 Na^{+} チャネルの発現が示されたことから、歯髄幹細胞は神経細胞に分化していると判断した。

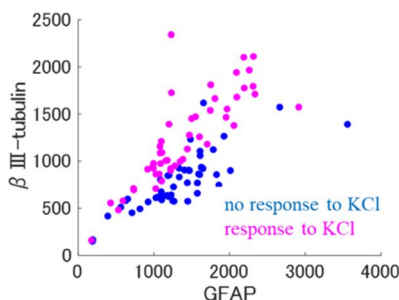


図 2 KCl に対しての Ca^{2+} 応答の有無と GFAP と β -tubulin 発現量の関係

一方で今回神経様に分化させた歯髄幹細胞に関しては、その形態は神経細胞と同じとは言いがたいところがある。これまでに、神経細胞との共培養や、Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤の添加により、間葉系幹細胞は神経分化することが報告されている。そこでヒト歯髄由来の間葉系幹細胞 (hDPSCs) を対象にして、従来の神経分化誘導方法を用いて、素早く分化度合いの高い神経分化誘導方法の開発を試みた。その結果、ラット由来の神経細胞との共培養及びその馴化培地は、ヒト歯髄幹細胞を神経分化させる能力を有することがわかった。またラット海馬神経細胞の希釈順化培地に ROCK 阻害剤を加えて培養すると、素早くかつ分化度合いの高い神経分化を促すことがわかった。

(2) ケラチノサイトとラット後根神経節 (DRG) 神経細胞との共培養系を用いた痛み・痒み情報伝達系の解明のイメージングによる調査

ヒトケラチノサイトとラット DRG ニューロンの異種二細胞を共培養するため、培養液や細胞外基質などの共培養条件を検討した。その結果、培養液にはケラチノサイト用培養液に NGF (神経成長因子) と B27 (神経細胞培養用サプリメント) を加えたものを用い、また細胞外基質にはコラーゲンを用いることにより共培養した。ケラチノサイトの機械刺激により、刺激されたケラチノサイト (K1) の細胞内 Ca^{2+} 濃度は上昇し、その後、隣接する DRG ニューロン (N1, N2) の細胞内 Ca^{2+} 濃度も上昇した (図 3)。

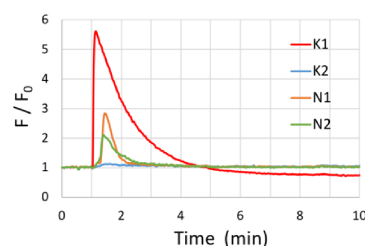


図 3 ケラチノサイト (K1, K2) から DRG 神経細胞 (N1, N2) への情報伝達

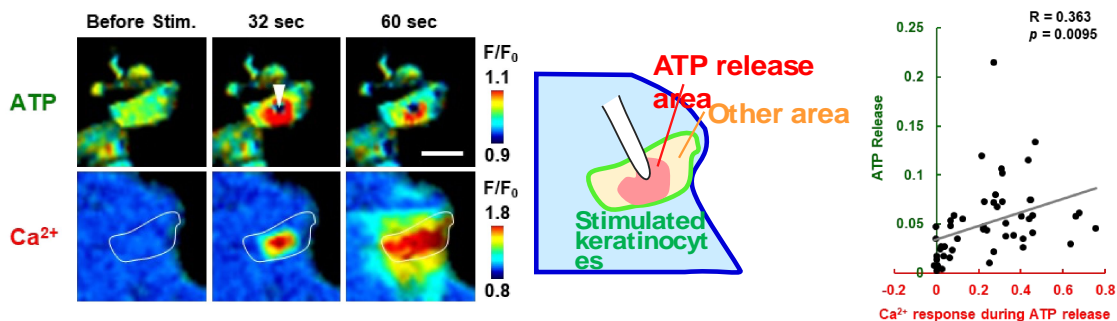


図 4 ケラチノサイト内 Ca^{2+} 応答と ATP 放出の同時イメージング

またケラチノサイトと末梢神経細胞とのシグナル伝達は、ケラチノサイトから刺激依存的に放

出される ATP が担っていると考えられていることから、ケラチノサイトの細胞表面に ATP 濃度を受感するセンサー-ATeam を導入し、ケラチノサイトでのカルシウム応答と ATP 放出との関係を調べた (図 4)。その結果、細胞内 Ca 応答と ATP 放出量には正の相関があることから、ケラチノサイトは機械刺激を細胞内 Ca²⁺濃度上昇としてコードし、それに応じて受けての細胞に ATP でシグナル伝達することが明らかになった。

(3)末梢神経での痛み緩和メカニズムの解明

末梢組織の痛み伝達におけるケラチノサイトと DRG 細胞での オキシトシン(OT) 放出については未だ十分には解明されていない。そこで *in vitro* 培養細胞系によりケラチノサイトと DRG 細胞を用い、痛みとその緩和を Ca²⁺と OT センサー(Qian et al., 2023)を用いて評価した。ケラチノサイトと DRG 細胞に蛍光タンパク質型 Ca²⁺センサーと細胞外 OT センサーを導入し、細胞外に ATP と OT を濃度依存的に加えた際の応答を、蛍光顕微鏡を用いて調べた。また、DRG 細胞に膜電位センサーを導入し OT による応答の変化を調べた。

ケラチノサイトと DRG 細胞に蛍光タンパク質型 Ca²⁺センサーを導入後、ATP を 10⁻⁹~10⁻³ M で添加した(図 5)。OT 処理の有無を比べたところ、OT 処理することでケラチノサイトでは 50% 応答濃度は 10⁻⁶ M から 10⁻⁵ M に上がり、ATP に対する感受性は下がった。一方で、DRG 細胞では 50% 応答濃度は 10^{-6.5} M から 10^{-7.8} M に下がり、ATP に対する感受性は上がったが、最大細胞内 Ca²⁺濃度は下がり、応答強度も下がった。

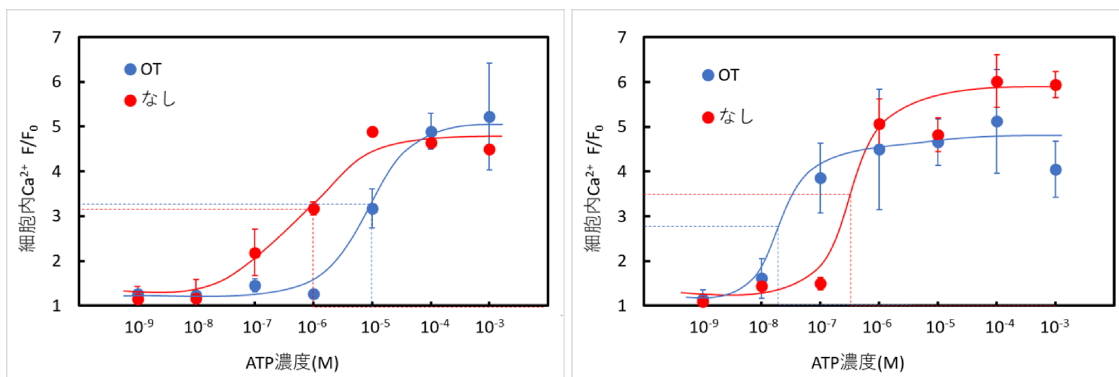


図 5 ケラチノサイト(左)とDRG神経細胞(右)のATP応答曲線とOTによる鎮痛効果

次に、細胞外 OT センサーを用いて ATP を 10⁻⁹~10⁻³ M で添加した際に、細胞外 OT 濃度と細胞内 Ca²⁺濃度はどのように変化するかを調べた (図 6)。その結果、ケラチノサイトでは ATP が 10⁻⁴ M 以上で細胞外へ OT が放出され、DRG 細胞では ATP が 10⁻⁸ M 以上で細胞外へ OT が放出されることがわかった。

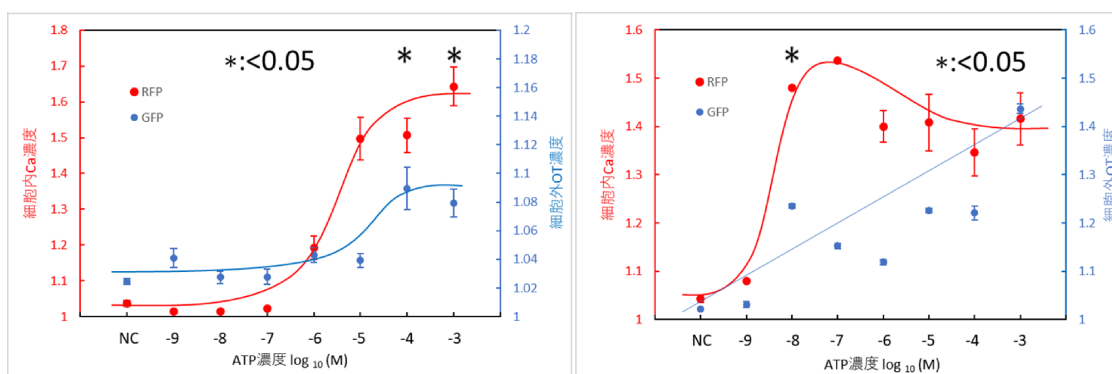


図 6 ケラチノ(左)とDRG神経細胞のATP添加による細胞内Ca応答とOT放出

これらの結果は、様々な刺激をケラチノサイトで受容して DRG 細胞に伝達することから、ケラチノサイトでは強い刺激のみに応答して OT を放出し、刺激に対する感受性を減じると考えられる(図 4, 5 左)。また、DRG 細胞ではケラチノサイトから伝達された刺激に対しては全て応答し OT を放出することで、自らが応答強度を抑制すると考えられる(図 4, 5 右)。末梢組織では痛みの強度や感受性を OT 放出によってコントロールしていると考えられる。

以上の結果から、ケラチノサイトと DRG 神経細胞では異なる痛み緩和メカニズムが存在し、末梢組織局所での OT 放出がこれを制御していることが判明した。末梢での OT 放出が、ケラチノサイトでの機械刺激によるものであると考えれば、「痛い痛い飛んでいけ！」のメカニズム

ムを明らかにできたものと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Arimura Yuki, Shindo Yutaka, Yamanaka Ryu, Mochizuki Mai, Hotta Kohji, Nakahara Taka, Ito Etsuro, Yoshioka Tohru, Oka Kotaro	4. 巻 16
2. 論文標題 Peripheral-neuron-like properties of differentiated human dental pulp stem cells (hDPSCs)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0251356
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0251356	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 Shindo Y, Fujita K, Tanaka M, Fujio H, Hotta K, Oka K.	4. 巻 582
2. 論文標題 Mechanical stimulus-evoked signal transduction between keratinocytes and sensory neurons via extracellular ATP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 131-136
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.10.046.	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 Fujimoto Kanta, Inada Kosuke, Oka Kotaro, Ito Etsuro	4. 巻 20
2. 論文標題 Revisiting oxytocin generation in keratinocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biophysics and Physicobiology	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） 10.2142/biophysico.bppb-v20.0003	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 Fujita Keigo, Shindo Yutaka, Katsuta Yuji, Goto Makiko, Hotta Kohji, Oka Kotaro	4. 巻 6
2. 論文標題 Intracellular Mg ²⁺ protects mitochondria from oxidative stress in human keratinocytes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	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） 10.1038/s42003-023-05247-6	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 K. FUJITA, M. TANAKA, Y. SHINDO, K. HOTTA, K. OKA
2. 発表標題 Signal transduction between keratinocytes and dorsal root ganglion neurons via extracellular ATP
3. 学会等名 NEUROSCIENCE 2021（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------