

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06040

研究課題名(和文)患者皮膚由来シュワン細胞を用いた難治性神経障害性疼痛の治療戦略

研究課題名(英文)A strategy for the treatments of refractory neuropathic pain using Schwann-like cells derived from dermal fibroblasts

研究代表者

村上 徹 (Murakami, Toru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90756248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：すでに報告されている方法に小変更を加え、ヒト皮膚線維芽細胞からシュワン様細胞を誘導した。

神経再生に必須であるミエリン形成能を評価するため、誘導細胞を人工チューブに充填し、ラット坐骨神経切断モデルの神経障害部位に移植し、電子顕微鏡及び免疫蛍光染色で観察したところ、誘導細胞によるミエリン形成が観察された。

現存する神経障害性痛モデルは糸が残存する問題点があり、我々が目指す細胞移植治療のモデルとしては適していない。そこで、クリップを使用し異物が残存しない新しいラットモデルを作成した。このモデルラットは痛覚域値の低下と脊髄後角におけるマイクログリアの増生を認め、神経障害性痛の特徴を有していた。

研究成果の概要(英文)：We induced Schwann-like cells by an existing method with minor modifications.

To estimate myelination, which is indispensable to nerve regeneration, we put the induced cells into artificial tubes, transplanted them between the cut ends of rat's sciatic nerve, observed the contents in the grafts. Myelin formation was successfully observed by electron microscopy and immunofluorescent staining.

Existing neuropathic pain models have the problems of remaining threads and are not suitable for the research for the purpose of cell transplantation therapies. Thus, we developed a new rat model with clips. The model rats are free from remaining artifacts, showed the drop of pain threshold and microglial proliferation, that are the characteristics of neuropathic pain.

研究分野：神経再生

キーワード：シュワン細胞 ミエリン 神経障害性痛

## 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、様々な病因により発症し、末梢神経及び中枢神経の物理的、機能的な障害による慢性疼痛疾患の一つである。その有病率は人口の数%にも及ぶと言われ、さまざまな治療に抵抗性の難治性疼痛を示す一方、主体となる症状が痛みという外部からは認識し難い症状であるための苦悩もあり、患者の生活の質を著しく低下させる疾患として学術的、社会的に近年問題となっている。

現存する治療として、非ステロイド性抗炎症薬、三環系抗うつ薬、カルシウムチャネルリガンド、麻薬性鎮痛薬などの薬物療法、神経ブロック、種々の電気刺激療法などが行われているが、必ずしも十分な鎮痛は得られず、以下に示すようないくつかの問題点を避けられない。薬物療法は患者への侵襲が少ないという利点があるが対症療法である点は否めず、治療効果が一時的であるという点が問題となる。神経ブロックは永続的なブロックができれば根治療法となりうるが、痛みに関与する神経線維のみをブロックすることは難しく、運動麻痺などの副効果を来す可能性がある。

治療による副作用を極力減らし、根治的な治療を目指すためには、対症療法ではなく、障害を受けた神経そのものの組織レベル、細胞レベルでの再生が理想であると考えられる。そこで本研究では、末梢神経再生に主要な役割を担っている、シュワン細胞に着目した。シュワン細胞は末梢神経組織に存在するグリア細胞であり、通常末梢神経の軸索においてミエリンを形成しており跳躍伝導に関与して

いるが、ひとたび軸索が障害を受けると脱分化を経て増殖し、神経成長因子に加えて成長軸索の足場となる細胞外基質を分泌し、さらに再生した軸索を再ミエリン化することにより、神経再生に寄与していることが知られているため、神経障害性疼痛においても治療効果を期待できる細胞である。

しかしながら、末梢神経障害を持つ患者からシュワン細胞を得るためには患者自身の末梢神経組織を採取しなければならず、侵襲を伴う手術を必要とし、有痛性神経栄養症などの合併症の可能性がある。また、シュワン細胞の純粋培養は容易ではない。したがって、患者自身のシュワン細胞そのものを治療に使用することは現実的ではないと考えられる。以上の背景から、他の細胞種から内在性シュワン細胞に相当する細胞を誘導する研究、2001年出澤らによって骨髄間葉系細胞からのシュワン細胞誘導が報告されて以来、脂肪由来幹細胞(2007年、Kinghamら)や臍帯間葉系細胞(2010年、松瀬ら)、メラニン産生細胞(2011年、Chiら)において報告されてきた。

これらの背景から、申請者は直近に所属していた研究室において、すでに報告されている誘導方法に小改変を加えることで、患者の皮膚由来の結合組織からより容易に採取できる、ヒト皮膚線維芽細胞からシュワン様細胞が効率的に誘導されることを見いだした。線維芽細胞は生体内に豊富に存在し、増殖力も高く、最小限の侵襲で皮膚生検から細胞を得ることができるという特徴を有しており、

生体の中で最も採取しやすい細胞の1つである。また、生体由来の細胞であるため、胚性幹細胞(ES 細胞)や人工多能性幹細胞(iPS 細胞)で問題となる腫瘍形成性が認められないことから、臨床応用に際して安全性が期待できる。ヒト皮膚線維芽細胞から誘導によって得られたシュワン様細胞は、もともと末梢神経に存在する内在性シュワン細胞と同様の遺伝子、タンパク発現を示し、*in vitro*および*in vivo*でミエリン形成能を持ち、ラット坐骨神経切断モデルにおける運動機能の改善、軸索再生促進作用、脱神経によって生じた神経筋接合部の再形成促進作用を示した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト皮膚線維芽細胞から誘導されたシュワン様細胞を用いた細胞移植治療が、神経障害性疼痛に対する有効な治療法となりうるかどうかを検討することを目的としている。

本研究期間では、神経障害性疼痛の治療効果において重要であると考えられるミエリン形成能を詳細に評価した。また、既存の真景障害性痛モデルでは、細胞移植治療の評価に適さないことが分かったため新しい動物モデルを作成し、神経障害性疼痛の主症状であるアロディニア(通常は痛みとして認識されない刺激を痛みとして感じる感覚異常)、痛覚過敏(微小な痛みを強い痛みとして認識する感覚異常)、脊髄後角のマイクログリアの増生を評価した。

本研究では、移植細胞にヒト由来の細胞を

用いる。このことにより、ラットにおける実験において有効な治療効果が認められ、ヒトへの臨床応用に移行できることになった場合、患者本人の細胞を使用することができることから、臓器移植などの際にしばしば問題となる副作用を引き起こす免疫抑制剤の投与が不要であると考えられる。他方、これまでに神経障害性疼痛に対する治療法として、薬物療法、神経ブロックなどが報告されているが、本研究では現存する治療法と異なり对症療法ではなく、神経再生そのものを目指すという点、および治療の方法として細胞移植を行う。申請者の以前の研究において、坐骨神経切断モデルにおいて神経系の遠心路である運動機能が改善されたこと、また求心路においても神経軸索再生機構は同様であると考えられていることから、求心路である感覚神経が関与している神経障害性疼痛においても有意な効果が予想される。本研究が発展することにより、現時点で難治性疾患である神経障害性疼痛の治療において新たな選択肢を提示し、将来的に患者のQOLの改善、痛みに対する恐怖の軽減につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

ヒト線維芽細胞からのシュワン細胞誘導は、これまで申請者が所属していたグループから学術誌で報告されている方法(2001年、出澤ら)に小改変を加え行った。まず細胞の準備として正常ヒト皮膚線維芽細胞を購入、培養し、緑色蛍光タンパク(GFP)遺伝子をレン

チウイルスによって導入した。その後還元剤、レチノイン酸、そして4種のサイトカイン(塩基性線維芽細胞増殖因子(basic-fibroblast growth factor; bFGF)、フォースコリン、血小板由来成長因子-AA (platelet-derived growth factor-AA; PDGF-AA)、ヘレグリン-1-上皮成長因子ドメイン (heregulin-1-EGF domain; HRG-1)を順に作用させることによって誘導した。この方法により、誘導開始後8日程度でシュワン様細胞が得られた。

次に坐骨神経切断モデルへの細胞移植を行った。誘導されたシュワン様細胞を人工チューブに充填し、全身麻酔下で8週齢オスラットの坐骨神経を切断、細胞の入った人工チューブで架橋した。6週間後灌流固定し、人工チューブを摘出、凍結切片を作成しGFPを金粒子でラベルされた2次抗体を用いて免疫染色後、樹脂で包埋し超薄切片を作成、電子顕微鏡を用いて移植細胞によるミエリン形成を観察した。

また、細胞移植治療の評価に有用なラットモデルの作成のためイソフルラン麻酔後、左坐骨神経を展開し、動物実験用止血クリップで坐骨神経を10分、5分、1分間挟み、坐骨神経圧挫モデルとした。坐骨神経を展開したのみの偽手術群を含め、計4群作成した。(各群n=3)。その後、行動評価として、神経障害性疼痛の主症状であるアロディニア(通常は痛みとして知覚されない刺激を痛みと認識する感覚異常)及び痛覚過敏(微小な痛みを大きな痛みとして知覚する感覚異常)を評

価した。術前、術後1日、2日、4日、7日、14日、21日目にVon Frey Filamentを用いた行動学的評価を行った。0.60gから60gのVon Frey Filamentを用いて左後肢足底を刺激し、Dixonのup-down methodで疼痛閾値を評価した。次にIba1による免疫組織学的評価を行った。Iba1はマクログリアのマーカーであるが、神経障害性痛が発症すると脊髄後角での発現が上昇されている。モデル作成後21日に再度イソフルラン麻酔下に、灌流固定。L4/5レベルの脊髄を採取した。免疫組織化学染色法を用いIba1にて染色を行った。脊髄の後角におけるIba1の単位面積あたりの陽性細胞の面積をラット1匹あたり5枚の切片で計測し、その平均値を用いて3群間の比較を行った。統計学的検討にはstudent T testを用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

免疫電子顕微鏡法によるミエリン形成能の評価では、移植したGFP陽性細胞がミエリンを形成していることを確認した。

さらに、in vivoにおけるミエリン形成能について、移植片において移植細胞の細胞体とミエリン発現が確実に一致することを確認するため、ミエリンタンパクであるP0とGFPによる二重免疫染色を行い、3次元画像を取得、ミエリン構築と移植細胞の細胞体が3次元的に一致していることを確認した。

神経障害性痛モデルでは坐骨神経を糸で結紮するモデルが一般的に用いられている。

本研究期間で、既存の神経障害性痛モデルと違い、クリップにより神経に短時間一定の圧力を加えることで神経障害を起こすモデルを新たに作成した。結紮系が残存しないモデルは細胞移植治療の研究にも応用できる優れたモデルである。この新しい坐骨神経クリップモデルを行動評価、免疫組織学的手法を用い評価した。

Von Frey filament の刺激に対する反応では、10分、5分、1分のいずれの群でもモデル作成後4、7、21日目において疼痛閾値が偽手術群より有意に低くなった。また、10分、5分群では14日目においても疼痛域値の低下が認められた。

単位面積当たりのIba1陽性の面積は分群で有意に増加していた。

以上の結果から、新しい坐骨神経クリップモデルは疼痛閾値の低下を示し、脊髄後角でのミクログリア増生を認め、神経障害性痛モデルラットとしての特性を持つことが示された。単純で簡便な手技により作成できるモデルであり、今後様々な神経障害性痛の研究に応用されることが期待できる。

## 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)

[学会発表](計2件)

1. The Anesthesiology 2016 Annual Meeting, 22-26 Oct. 2016, McCormick Place, Chicago, US

Murakami T, Kitada M, Wakao S, Yamauchi M,

Dezawa M: Cell transplantation therapy with Schwann-like cells induced from fibroblasts for rat sciatic nerve injury models.

2. 日本ペインクリニック学会第50回大会  
2016.7.7-9 (パシフィコ横浜, 横浜市)

村上 徹, 北田容章, 若尾昌平, 出澤真理:  
神経障害性疼痛に対する細胞移植治療に向けたヒト線維芽細胞由来シュワン様細胞の誘導.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 徹 (MURAKAMI, Toru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号: 90756248