

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10937

研究課題名(和文) 脱神経皮弁における神経再生の機序の解明 -皮膚からのシグナルに着目して-

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of the sensory recovery in the denervated skin flap
-Attention to a signal from keratinocyte -

研究代表者

森 弘樹 (MORI, Hiroki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80345305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：痛みを感じる分子装置TRPV1 (VR1)、P2X3、神経成長因子(NGF) 軸索反発因子(semaphorin)は知覚脱失領域でも発現した。TRPV1、NGFは切断領域の真皮において増加する傾向を認め、semaphorinは切断領域の真皮において低下した。ケラチノサイト・神経細胞共培養モデルを確立し、共培養モデルにおける接触・非接触によるNGF、BDNFの定量を行い、NGFにおいて接触群で増加する傾向を認めた。神経細胞と表皮細胞の接触が重要であることが示唆され、無知覚皮弁における神経再生の方向は皮下から表皮に向かう方向よりも、皮膚内を走る横方向が重要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：TRPV1 (VR1), P2X3, nerve growth factor (NGF), and semaphorin were detected in denervated skin flap. TRPV1, and NGF tended to increase in the dermis of denervated skin, and semaphorin decreased there. I established cocultivation model of keratinocyte and dorsal-root-ganglion-derived cells. Contact coculture and non-contact coculture were compared by NGF, and BDNF Elisa. NGF in contact group tended to increase.

研究分野：形成外科学

キーワード：無知覚皮弁 神経再生 共培養 角化細胞 神経細胞

1. 研究開始当初の背景

皮弁移植後の知覚低下は臨床上しばしば問題となるが、脱神経された領域が神経吻合を行わずとも、年を経て知覚回復することはしばしば経験される(Shaw WW, et al. *Plast Reconstr Surg* 1997) (Place MJ, et al. *Ann Plast Surg* 1997) (Liew S, et al. *Br J Plast Surg* 1996)。これらの考察では周囲皮膚や移植床からの神経再生という推測がなされ、神経吻合をすればより良い知覚回復が得られるが、正常範囲までは回復しないことが一般的である (Mori H, et al. *Microsurgery* 2011.)。いずれも、正常皮膚皮下組織からの「神経の順行性回復」として議論されてきた。

一方、末梢神経で痛みを感じる分子装置が1990年代後半に発見され、一つはTRPV1 (VR1)と呼ばれるタンパク質であり、唐辛子の辛み成分であるcapsaicinや、43度以上の高熱、及びpH6.6以下の酸で活性化される (Caterina MJ, et al. *Nature* 1997)。もう一つはP2X3というATPの受容体 (Souslova V, et al. *Nature*. 2000)である。これらの物質が表皮ケラチノサイトにも存在することが示された (Denda M, et al. *BBRC* 2001) (Denda M, et al. *J Invest Dermatol.* 2002)。TRPV1 (VR1)は刺激により活性化し、細胞内にCaイオンなどが入り、ケラチノサイト膜の電気的変化を引き起こし、それが表皮最深部にある神経末梢に伝わる。ATPは神経系で情報伝達物質としても作用するが、ケラチノサイトも外部からの刺激に対してATPを放出するとされ、同様に細胞内Ca濃度が上昇し、細胞膜電位変化、放出が起こる (小泉修一, ほか. *PAIN RESEARCH* 2006)。細胞膜電位の変化は隣接する細胞に感受され、やがて神経末梢に到達し、表皮で放出されたATPは真皮まで拡散する。

神経反発力因子の一つであるsemaphorinはアトピー性皮膚炎の研究で最近注目され、アトピー性皮膚炎患者ではこのsemaphorinが表皮に少なく、NGFが多いことで表皮内に神経が伸びることが推測されている (Tominaga M. *J Dermatology* 2014)。そしてsemaphorin阻害剤によって末梢神経再生が加速することが報告された (Omoto M. *PLoS One*. 2012)。一方、神経の回復は神経成長因子と神経反発力因子のバランスによって決定する。ケラチノサイトに存在する神経成長因子にはnerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic growth factor (BDNF), neurotrophin-3, neurotrophin-4がある (Borroni RG, et al. *Actas Dermosifiliogr.* 2009)。

しかしながら皮弁移植後の知覚低下の機序について、TRPV1 (VR1)、P2X3の発現状態や神経成長因子、semaphorinなど軸索反発因子との関連性に関しては国内外とも報告が為されていない。

本研究は「脱神経皮弁での神経再生には無知覚皮膚からの逆行性のシグナルが大きな

要因となる」という申請者らの独自の仮説のもと、動物実験、培養実験によって脱神経皮膚におけるTRPV1 (VR1)、P2X3の発現状態と神経成長因子、semaphorinなどの軸索反発因子との関連性を詳細に検討し、皮弁移植後の神経回復の機序を世界に先駆けて解明することを目的としている。なお、ケラチノサイトと神経細胞の共培養はRoggenkampら (*Journal of Investigative Dermatology*. 2013)、Kumamotoら (*Experimental Dermatology*, 2014)、Radtkeら (*Annals of Plastic Surgery* 2013)らによって報告され、技術的な確立が既に為されている。

2. 研究の目的

このような背景のもと、今回我々は動物実験において脱神経皮膚におけるTRPV1 (VR1)、P2X3の発現状態とNGFなどの神経成長因子、semaphorinなどの軸索反発因子の関連を調べ、反発因子が増強している場合には軸索反発因子阻害剤の効果を検討し、保存治療の新たな可能性を探りたい。

またケラチノサイト/神経共培養モデルを接触環境、非接触環境とすることで、正常皮膚と脱神経皮弁皮膚の比較モデルとする。これによりケラチノサイト・神経細胞の相互関係をin vitroで評価し、ケラチノサイトからの上記因子に差があるかを定量的に評価することを目的とする。

すなわち本研究により

TRPV1 (VR1)、P2X3は知覚脱失領域でも発現するのか。時期による変化はあるか。

神経成長因子(NGF)は知覚脱失皮膚で発現が増加するか。時期による変化はあるか。

軸索反発因子(semaphorin)は知覚脱失皮膚で発現するのか。時期による変化はあるか。

神経再生の方向は皮下から表皮に向かう方向か、皮膚内を走る横方向か。

軸索反発因子阻害剤やcapsaicinを局所投与することで神経再生が促進されるか。

ケラチノサイト・神経細胞共培養モデルの確立とTRPV1 (VR1)、P2X3の定量

共培養モデルにおける接触・非接触によるNGF, semaphorinなどの定量

共培養モデルにおけるcapsaicin投与でのNGF, semaphorinなどの変化

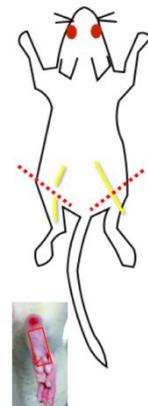
を明らかにすることを目的とする

3. 研究の方法

《研究1》

「脱知覚皮弁皮膚におけるTRPV1 (VR1)、P2X3と末梢神経の相互作用の検討」

7~9週齢のwister系ラット(平均263.5g)を使用した。後脚の基部に全周性の皮膚切開。左は坐骨神経・大腿神経を切断し1cm



足底皮膚を採取

長の神経欠損、脱神経群とした。右は皮膚切開のみの対照群とした(図1)。

施術1週後(n=5)、4週後(n=5)に足底皮膚を採取し、VR1, P2X3, NGF, semaphorin3a (SEMA3A)各抗体で染色、200倍視野で陽性細胞数を数えた。

[トレーサー実験]:ラット坐骨神経・大腿神経切断モデルにおいて末梢切断端から脂溶性カルボシアニン色素(DID)を注射し、7日後と14日後にIn vivo 発光蛍光イメージングシステム(IVIS)にて撮影した。

《研究2》

「ケラチノサイト、神経細胞共培養下での各種因子の検討」

ポリ-D-リシン/ラミニンでコーティングした24ウェルプレートを用いてラット後根神経節細胞を培養し、8日目にヒト新生児包皮表皮角化細胞を播種した。非接触培養群では24ウェル用インサート(0.4µm孔)内に播種した。培地は神経細胞用培地と角化細胞用培地を1:1になるように調整し使用した。共培養開始後5日目に上清を採取し、NGF, BDNF, neurotrophin3 (NT3)について、ELISAキットを用いて測定した。ELISAの結果は培地の値を基準とした割合で示した(図2)。

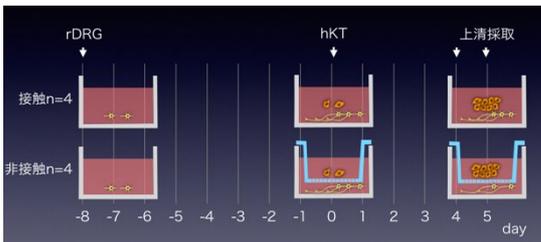


図2

《研究3》

「ケラチノサイトモデルにおけるカプサイシン添加の検討」

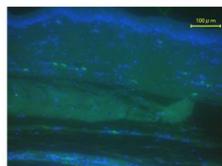
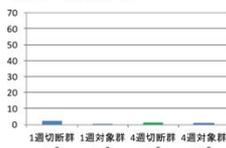
ケラチノサイト側に1, 10, 50, 100µMに調整したカプサイシンを添加しケラチノサイトに対する影響を評価した。

4. 研究成果

《研究1》

VR1について表皮内の陽性細胞数は少なかった。真皮・皮下では1週、4週ともに切断群で陽性細胞が多い傾向を認めたが有意差を認めなかった(図3)。

VR1 表皮内



4週切断群 緑色蛍光が陽性細胞を示す

VR1 真皮・皮下

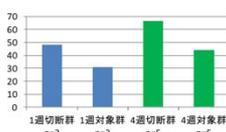
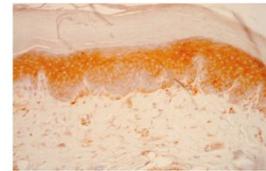
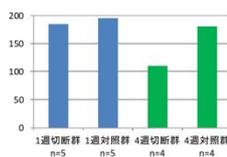


図3

P2X3は表皮において、4週切断群で陽性細胞が少ない傾向を認めたが有意差を認めなかった(図4)。

P2X3 表皮内



1週切断群 茶色が陽性細胞を示す

P2X3 真皮・皮下

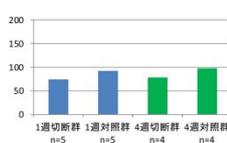
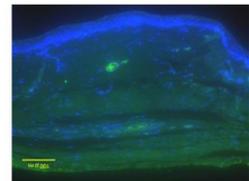
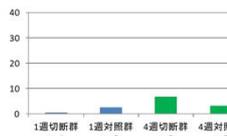


図4

NGFは表皮内の陽性細胞数は少なかった。真皮・皮下では4週切断群で陽性細胞が多い傾向を認めたが有意差を認めなかった(図5)。

NGF 表皮内



1週切断群 緑色蛍光が陽性細胞を示す

NGF 真皮・皮下

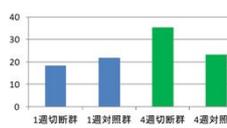
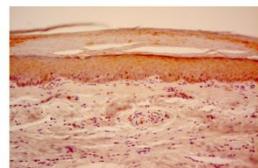
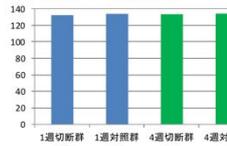


図5

SEMA3Aは表皮では全体的に陽性となった。真皮・皮下では切断群で少ない傾向を認め、4週群で有意差を認めた(図6)。

SEMA3A 表皮内



1週切断群 茶色が陽性細胞を示す

SEMA3A 真皮・皮下

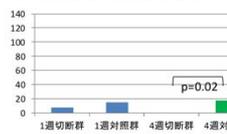


図6

[トレーサー実験]: 足底注射では拡がりが見られず、坐骨神経注射では足底皮膚までは光らなかったが、足根骨付近にも蛍光を確認し、末梢神経の神経追跡にもある程度使用できることが示唆された(図7)。

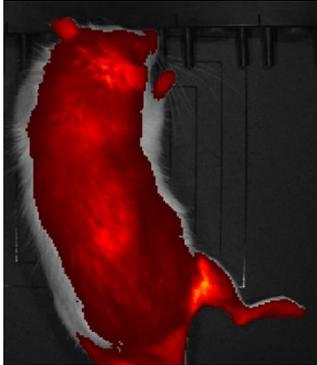


図7

《結論》

VR1、P2X3、NGF、SEMA3Aは脱神経皮膚においても発現した。表皮内において、各因子の切断有無による変化は明らかでなかった。真皮・皮下において、SEMA3Aの4週群での減少は神経の再生を示唆し、VR1、NGFの切断群における変化は4週での皮膚における神経再生の動きを示唆した。

《研究2》

共培養4日目(図8)と5日目(図9)の様子を示す。

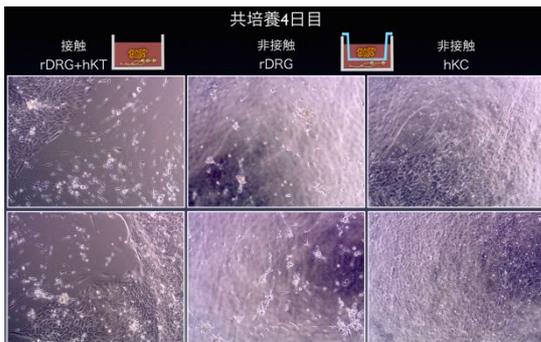


図8

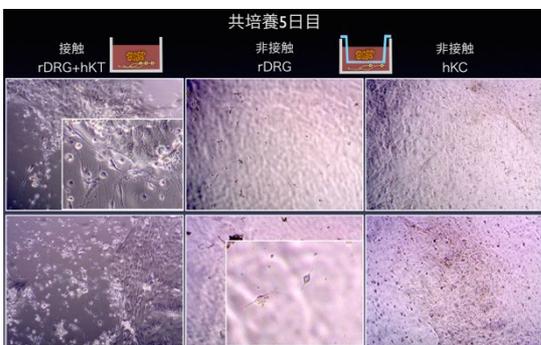


図9

NGFについては接触培養群(n=4)で116%(SD 94)、非接触培養群(n=4)で38%(SD 31)と接触培養で亢進していたが有意差は認めなかった(図10)。

BDNFについては接触培養群(n=4)で61%(SD 30)、非接触培養群(n=4)で49%(SD 19)と増加を認めなかった(図11)。

NT3についても有意差を認めなかった。

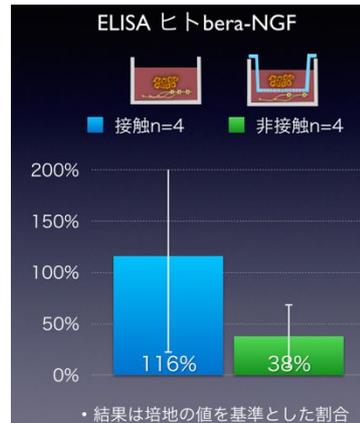


図10

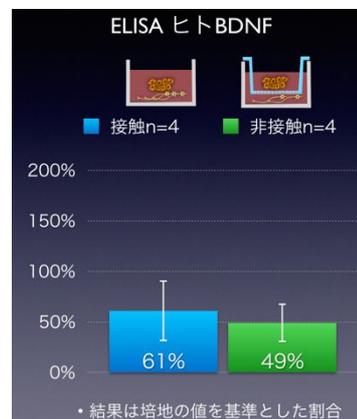


図11

《結論》

角化細胞と神経細胞の共培養を接触と非接触で比較し、接触ではより多くのNGFを発現した。非接触ではNGF発現が少なく、神経細胞自体の数も減少していた。以上より双方の接触が重要であることが示唆された。

《研究3》

カプサイシン 100μMでケラチノサイトの減少をきたしたが、その他の濃度では差を認めなかった。カプサイシンでの共培養モデルでの検討はうまくいかず、また semaphorinでの検討は薬剤の価格が200万程度と予算規模を超えたため実現できなかった。

《本研究からの結論》

TRPV1 (VR1), P2X3は知覚脱失領域でも発現した。TRPV1は切断領域の真皮において増加する傾向を認めた。

神経成長因子(NGF)は知覚脱失皮膚で発現し、切断領域の真皮において増加する傾向を認めた。

軸索反発因子(semaphorin)は知覚脱失皮膚で発現し、切断領域の真皮において低下し

た。

神経細胞と表皮細胞の接触が重要であることが示唆され、神経再生の方向は皮下から表皮に向かう方向よりも、皮膚内を走る横方向が重要であると考えられた。

軸索反発因子阻害剤や capsaicin を局所投与することで神経再生が促進されるかは未達成である。

ケラチノサイト・神経細胞共培養モデルの確立が達成できたが、TRPV1 (VR1), P2X3 の定量は未達成である。

共培養モデルにおける接触・非接触による NGF, BDNF, NT3 の定量し NGF において接触群で増加する傾向を認めた。

共培養モデルにおける capsaicin 投与での NGF, semaphorin などの変化は未達成である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

森 弘樹, 植村法子, 浜永真由子, 末貞信子, 本間 勉, 岡崎 睦. 接触型と非接触型の角化細胞・後根神経節細胞共培養での神経栄養因子の発見. 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会. 大阪市, 2017 年 10 月 20 日

末貞伸子, 森 弘樹, 田中顕太郎, 植村法子, 本間 勉, 岡崎 睦. 脱神経皮膚における神経関連因子発現の検討. 第 25 回日本形成外科学会基礎学術集会総会. 大阪市, 2016 年 9 月 15 日

〔図書〕(計 0 件)

〔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

森 弘樹 (MORI, Hiroki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：80345305

(2) 研究分担者

岡崎 睦 (OKAZAKI, Mutsumi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：50311618

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()