

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 元 年 6 月 19 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20114

研究課題名（和文）脂肪幹細胞を用いた慢性疼痛治療の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research of the effect of adipose-derived mesenchymal stem cells for chronic pain.

研究代表者

今西 理也（Masaya, Imanishi）

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：00570376

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：脂肪由来間葉系幹細胞（ADMSC）移植による、神経因性疼痛モデルラットの自発痛改善効果を検証した。

絞扼性神経損傷（CCI）手術を、20匹のF344ラットに施行した。それらをADMSC移植グループとコントロールグループに振り分けた。CCI手術の1週間後、ADMSCを神経損傷部の神経上膜に移植した。疼痛改善効果は、自発痛関連行動回数と機械的異痛の程度によって評価した。その結果ADMSC移植により、機械的異痛は移植後7日目から、自発痛は移植後21日目から、統計的に有意な差をもって改善した。

ADMSC移植は機械的異痛だけでなく自発痛も改善することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経因性疼痛の発症率は全人口の6.9-10%程度と推定されており、その高い罹患率にも関わらず、現在治療として行われている薬物治療、理学療法、認知療法、神経ブロック等は十分な効果を上げているとは言い難い。本研究では、ADMSC移植により、神経因性疼痛モデルラットの自発痛関連行動が減少することが示された。この結果は、動物実験と臨床の間の疼痛評価方法の不一致を解消し、臨床においてADMSC移植が神経障害性疼痛の有効な治療法となる可能性を押し上げたと考える。

研究成果の概要（英文）：We verify whether adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSCs) transplantation improves spontaneous pain in a rat model of neuropathic pain.

Chronic constriction injury (CCI) model rats were created by surgical maneuver. A total of 20 F344 rats underwent surgery and were divided into 2 groups, the ADMSCs group and the control group. One week after CCI surgery, ADMSCs were transplanted into the epineurium of the damaged nerve. The effects of ADMSCs transplantation were evaluated by the number of spontaneous pain-related behaviors and the degree of mechanical allodynia. ADMSCs transplantation improved mechanical allodynia on and after 7-day post-transplantation and spontaneous pain on and after 21-day post-transplantation with the statistically significant differences.

ADMSCs transplantation improved not only mechanical allodynia but also spontaneous pain.

研究分野：形成外科学 疼痛学

キーワード：神経因性疼痛 脂肪由来間葉系幹細胞 自発痛 アロディニア 絞扼性神経損傷モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛の発症率は、人口の 6.9~10%程度と推定されている。その高い罹患率にも関わらず、現在治療として行われている、薬物治療、理学療法、認知療法、神経ブロック等は、十分な効果を上げていたとは言えない。多剤併用の薬物療法等も行われているが、その効果は限定的である。そのような現状の中、10 年程度前から、神経因性疼痛に対する間葉系幹細胞 (MSC) 移植の効果が検証されてきている。動物実験において、MSC が持つ抗炎症機能および免疫調節機能により、神経因性疼痛における刺激誘発痛が改善することが立証されている。MSC には骨髄由来間葉系幹細胞、脂肪由来間葉系幹細胞 (ADMSC)、臍帯由来間葉系幹細胞等が存在するが、ADMSC は他の種類の MSC と比較して、低侵襲かつ多量に得ることができるため、臨床応用に有利である。現在までに ADMSC 移植を用いた神経因性疼痛の治療に関する論文は複数ある。しかし、移植の効果の評価として、刺激誘発痛を測定しているが、自発痛の測定はしていない。

動物実験における刺激誘発痛を評価するために使用される方法は、臨床における刺激誘発痛、機械的異痛症を評価する方法と似ている。例えば、動物実験で用いられる von Frey filament 試験は、ヒトの機械的異痛症にも用いられている。しかし、神経因性疼痛に罹患している患者のうち、刺激誘発痛は 15~50%程度しか認めないが、対照的に自発痛はほぼ 100%認めることを考えると、動物実験における神経因性疼痛の治療効果の判定には、自発痛を評価した方がより臨床に直結した実験となる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、臨床において ADMSC 移植が神経因性疼痛に対する治療に適用できるか否か、基礎的試験を得るために、動物実験において神経因性疼痛に対する ADMSC 移植が、刺激誘発痛のみならず、自発痛も改善するかどうかを検証する。

3. 研究の方法

9 週齢、体重 180~220g の雄性 F344 ラットを実験に使用した。まず疼痛を評価するラットとは別のラットから脂肪塊を採取し、ADMSC を分離後、2~4 継代させ移植に備えた。ラットの神経因性疼痛モデルとしては、Bennett and Xie ら (Pain, 33:1988, 87-107) が提唱した chronic constriction injury (CCI) model を採用した。神経因性疼痛モデルラットとして成立していることを確認後、10 匹を ADMSC 移植群、10 匹は PBS のみを注入したコントロール群とした。ラットは、無作為に 2 つの異なる群に割り当てた。CCI 手術の 1 週間後に、ADMSC を病変部の神経上膜に移植した。ADMSC 移植直前から毎週、自発痛と刺激誘発痛の評価を行い、移植後 6 週で終了とした。以下のそれぞれの工程に関して詳細を記す。

(1) CCI 手術

殿筋と大腿二頭筋の間の筋膜を解放し、左坐骨神経を露出させた。4/0 chromic gut を 1mm 間隔で 4 本、坐骨神経の三分岐の近位に、緩く結紮した。結紮の締め具合は、神経の直径の 1/3 程度までとした。筋膜および皮膚は 4-0 ナイロン糸で閉創した。

(2) ADMSC 移植

CCI 手術の 7 日後に ADMSC を移植した。追加の神経損傷を起こさないように、前回の手術の傷を慎重に再開創し、坐骨神経を露出した。その後、50 μ l の PBS に懸濁した 1.0×10^6 個の ADMSC を、32G 針を用いて神経上膜に移植した。コントロール群には、50 μ l の PBS を神経上膜に注入した。筋膜および皮膚は 4-0 ナイロン糸で閉創した。

(3) 自発痛関連行動を含む四肢運動の自動計測による自発痛測定

げっ歯類における自発痛の評価方法には様々な方法が存在する。今回は Kawasaki ら (Eur. J. Pain, 16:2012, 1426-1436) が提唱した方法及び装置を用いた。彼らは、CCI モデルラットの患肢に小さな磁石を挿入した後、コイルが巻かれた専用のケースに入れ、自発痛関連行動回数を電磁界の変化を検出することによって測定し、自発痛を評価した。

今回の実験においては、CCI 手術と同時に、柱状磁石 (SCT-MAG-TF, Neuroscience Inc. Tokyo, Japan; 1 mm in diameter, 3 mm long) を手術肢の足背皮下に埋入した。実際の疼痛測定時は、動物を試験チャンパーに入れ、5 分間順応させた後に測定を開始した。測定は 1 日あたり 30 分間行った。CCI モデルラットは、患肢の持ち上げ、舐め等の自発痛に関連する異常行動をするが、その行動により足背に移植された磁石が移動する。磁石の動きによって引き起こされる電磁場の変化は、電圧を発生させる。電圧の量は、磁石の運動の速度や方向に依存している。コイルに発生した電圧は増幅され、インターフェースユニット (NS-SCTB16, Neuroscience Inc.) を介してデジタル化される。異常行動はスパイク波形として自動的に検出され、MicroAct® の分析ソフトウェア (NS-SC-S100, Neuroscience Inc.) でカウントされる。このように自発痛関連行動を含む四肢運動回数を計測した。

(4) von-Frey filament test による機械的異痛症の測定

機械的異痛症は、von-Frey filament を利用して Chaplan ら (Journal of Neuroscience Methods, 53:1994, 55-63) の方法に準じて逃避反応の 50%間値を up-down 法により評価した。動物を、金属メッシュの上に乗せ、プラスチックボックスに入れた後、30 分間環境に慣らした。up-down 法で使用するフィラメントは 8 本 (0.4, 0.6, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 15.0g) で、まず 2.0g のフィラメントより開始し、軽度フィラメントが屈曲する程度の力で患肢の足底に対し垂直に当て、患肢が逃避反応を示した場合を陽性反応とする。陽性反応があった場合は 1 つ下の、

反応が無かった場合は1つ上の強さのフィラメントで刺激を行う。反応が陰性から陽性へ、または陽性から陰性へと変化した時点を最初の2反応とし、その後4回連続して up-down 法により刺激を行った。合計6回の刺激に対する反応パターンを用いて、50%反応閾値を計算した。尚、陽性反応が無いまま 15.0g の刺激まで行った場合は 15.0g、陽性反応が 0.4g まで続いた場合は 0.25g をそれぞれの閾値と設定した。

(5)統計解析

自発痛関連行動を含む四肢運動回数、von-Frey filament test における反応閾値を平均 \pm SEM として表した。統計学的解析は、分割プロットデザインの分散分析により行った。また、その後の検定は、対応のない t 検定を行った。SPSS バージョン 24 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, California) をすべての解析に使用した。0.05 未満の p 値は統計的に有意であるとした。

4. 研究成果

(1)自発痛の評価

ADMSC 移植群とコントロール群の四肢運動回数は図1のとおりであった。測定は、ADMSC 移植前ならびに移植後 7、14、21、28、35、および 42 日に行った。分割プロットデザインによる分散分析を施行した結果、測定時期と群との間に交互作用を認めず、ADMSC 移植群とコントロール群の四肢運動回数に、統計的に有意な差を示した ($p=0.036$)。その後、事後検定として対応のない t 検定を行った。この分析では、移植後 21 日、28 日、および 35 日で ADMSC 移植群とコントロール群との間に有意差を示した ($p<0.05$)。これらの結果は、ADMSC 移植により、移植後 21 日以降、自発痛関連行動回数が減少したことを示唆する。

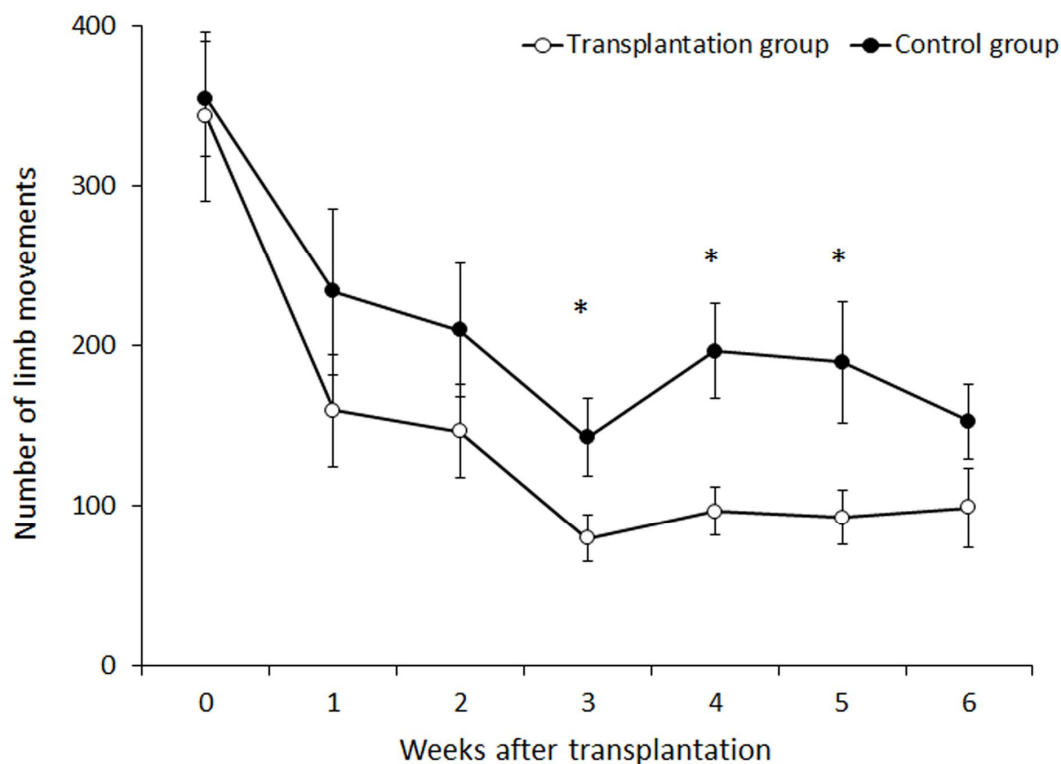


図 1

(2)機械的異痛症の評価

ADMSC 移植群とコントロール群の von-Frey filament test による反応閾値を図2に示した。反応閾値は、ADMSC 移植前ならびに移植後 7、14、21、28、35、および 42 日に評価した。分割プロットデザインによる分散分析を施行した結果、測定時期と群との間に交互作用を認めため、事後検定としての対応のない t 検定を行った。その結果、移植後 7、14、21、28、35、および 42 日目に有意差を認めた ($p<0.05$)。これらの結果は、ADMSC 移植により、移植後 7 日以降、機械的異痛症が軽減したことを示唆する。

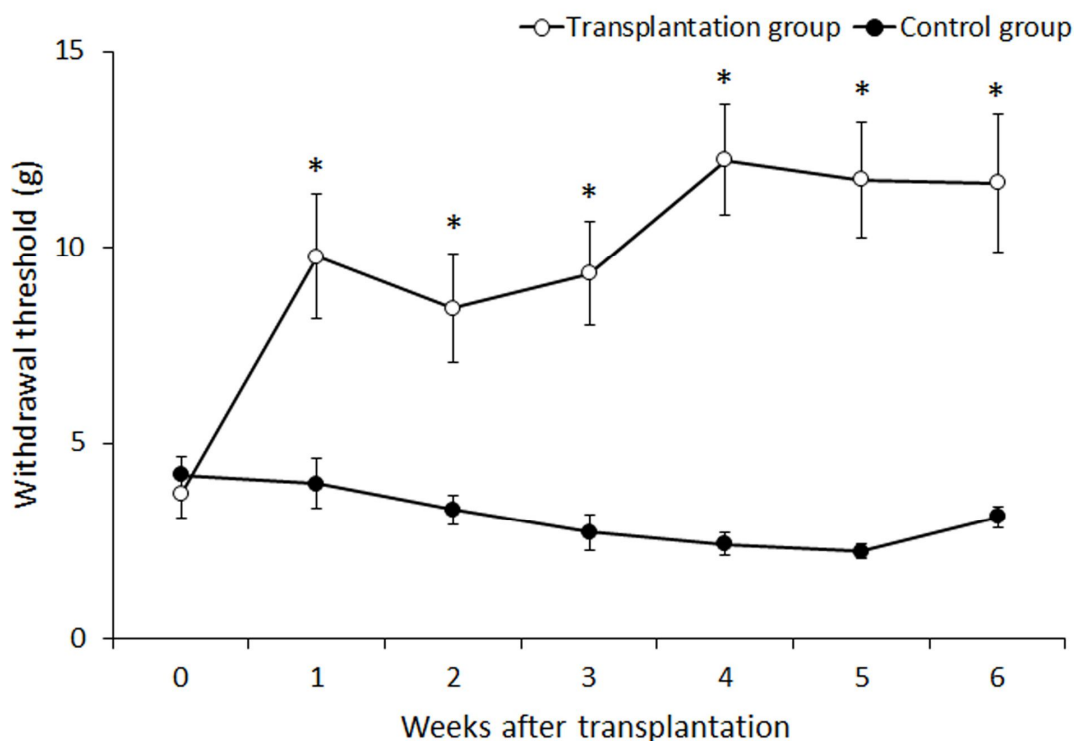


図 2

現在までに、動物モデルにおいて、ADMSC 移植により神経因性疼痛が改善することが複数報告されている。しかし、疼痛改善の評価として、刺激誘発痛を測定しているが、自発痛の測定はしていない。現在に至るまで、ラットにおける疼痛の評価は、刺激誘発痛を指標とする方法が広く用いられている。一方で、臨床現場における神経因性疼痛の評価には、VAS 等の疼痛スコアを用いた自発痛の評価が必須である。また、Murai ら (Pharmacol Biochem Behav, 141:2016, 10-17) は、ラットにおいて誘発反応と自発的な疼痛関連行動との間の薬物効力には相違があることを指摘しており、機械的に誘発された応答疼痛の尺度は、自発的な疼痛関連行動に対応していないとしている。そのため、臨床における、神経因性疼痛に対する ADMSC 移植の有効性を検証するためには、動物実験の段階から、自発痛に関して評価する必要があると考えた。

今回の研究で動物実験において、ADMSC 移植により神経因性疼痛の自発痛関連行動回数が減少することが示された。この結果は、動物実験と臨床の間の疼痛評価方法の不一致を解消する新たな証拠であり、臨床において ADMSC 移植が神経因性疼痛の有効な治療法となり得る可能性を押し上げたと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Imanishi M, Asato H, Umekawa K, Sasaki S, Terashima T. Adipose-derived mesenchymal stem cells improve both spontaneous pain and allodynia in a rat neuropathic pain model. Dokkyo Journal of Medical Sciences 2018; 45(3): 119-125. 査読 有
https://dmu.repo.nii.ac.jp/?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_detail&item_id=2102&item_no=1&page_id=28&block_id=52

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 今西理也, 朝戸裕貴, 梅川浩平, 佐々木翔一, 寺島哲二. 神経障害性疼痛モデルラットに対する同系脂肪幹細胞移植の効果. 第 26 回日本形成外科学会基礎学術集会. 2017 年 10 月 20 日. ナレッジキャピタルコングレコンベンションセンター(大阪市北区)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

なし

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。