

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08842

研究課題名（和文）エビデンスに基づいた幹細胞移植による神経障害性疼痛の新たな治療戦略

研究課題名（英文）Evidence-based strategies to treat neuropathic pain with stem cell transplantations

研究代表者

白石 成二（Shiraishi, Seiji）

広島大学・病院（医）・寄附講座教授

研究者番号：90216177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：神経障害性疼痛モデル動物に対して脂肪由来の幹細胞を移植することにより、痛覚過敏やアロディニアなどの症状を改善し、神経障害部位を修復することを報告した。本研究の目的は、脂肪由来幹細胞移植により神経障害性疼痛の症状を改善し、さらに障害された神経を修復するメカニズムを解明することである。ラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清のミクログリアやシュワン細胞に対する効果を検討した。ラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清はミクログリアやシュワン細胞に効果をもとめたが、幹細胞専用の培養液のみでも効果があった。さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の研究が神経障害性疼痛の発症メカニズムに基づいた症状の治療のみであったが、本研究で行う幹細胞移植による神経障害性疼痛の治療は症状のみでなく、原因となった障害神経部位の再生修復という根本的な治療にも注目する点で、これまでに無かった新たな治療戦略となると期待される。

研究成果の概要（英文）：We reported that transplantation of adipose-derived stem cells into neuropathic pain model animals improved symptoms such as hyperalgesia and allodynia, and repaired neuropathy sites. The purpose of this study is to elucidate the mechanism by which adipose-derived stem cell transplantation improves the symptoms of neuropathic pain and repairs damaged nerves. We investigated the effects of the culture supernatant of rat subcutaneous adipose-derived stem cells on microglia and Schwann cells. The culture supernatant was found to be effective on microglia and Schwann cells, but the stem cell culture medium alone was also effective. Further investigation is required regarding the components of the culture supernatant.

研究分野：疼痛学

キーワード：神経障害性疼痛 脂肪由来幹細胞 ミクログリア シュワン細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本における慢性疼痛患者は1,700万人にのぼり、神経障害性疼痛患者は全人口の3%に達するとの予測が報告されている。神経障害性疼痛は、難治性であり患者のQOLを著しく低下させ、既存の鎮痛薬とは異なった新規の作用機序による治療法・鎮痛薬の開発が望まれている。これまで神経障害性疼痛動物モデルを用いて血小板活性化因子受容体阻害薬やグリシントランスポーター阻害薬による治療が症状の改善に非常に効果的であることを報告してきた。しかし、これらは痛覚過敏やアロディニアなどの症状を改善するのみであり、その原因となった神経障害部位の治療には注目して来なかった。

近年、幹細胞を用いた再生医療が臨床に応用されるようになり、難治性疼痛の治療にも試みられている。しかし、これまでの研究は、幹細胞移植による神経障害性疼痛の症状を改善する報告のみであった。一方、幹細胞移植による治療は、脊髄損傷や脳梗塞など障害された神経の再生修復にも応用されている。そこで、難治性疼痛治療において幹細胞移植による再生医療という新たな視点から、神経障害性疼痛患者の障害された神経部位に対する幹細胞の治療効果にも注目することにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脂肪由来幹細胞を移植することにより神経障害性疼痛の症状を改善し、さらに障害された神経を修復するメカニズムを解明し、新たな疼痛治療戦略の臨床応用への橋渡しをすることである。

最近、神経障害性疼痛動物モデルに対して脂肪由来の幹細胞を移植することにより、痛覚過敏やアロディニアなどの症状を改善できるだけでなく、神経の障害部位の脱髄の修復も促進することを報告した。

本研究では、神経障害性疼痛動物モデルに対して脂肪由来幹細胞移植による以下のメカニズムを明らかにする。

- (1) 痛覚過敏やアロディニアなどの症状を改善するメカニズム
- (2) 障害神経部位を再生修復するメカニズム

3. 研究の方法

- (1) 痛覚過敏やアロディニアなどの症状を改善

イソフルラン麻酔下にSeltzerらの方法で坐骨神経部分結紮による神経障害性疼痛モデルラット(PSNL)を作製し、4日後にラット皮下脂肪由来幹細胞(2×10^5 cells/ml)を尾静脈から1ml投与した。疼痛閾値の変化をvon Frey testとDynamic Weight Bearing testで評価した。ラット皮下脂肪由来幹細胞移植により疼痛閾値の改善を認めた。

- (2) 坐骨神経障害部位の脱髄の抑制

PSNLラット後根神経節の免疫組織化学染色により炎症性マーカーのIba-1陽性細胞は、ラット脂肪由来幹細胞移植で有意に減少していた。ラット坐骨神経の結紮部位に組織学的にミエリン変性や脱髄が観察されたが、脂肪由来幹細胞移植ラットではこの脱髄が抑制された。

以上からラット脂肪由来幹細胞移植により、PSNLラットの痛覚過敏やアロディニアなどの症状が改善し坐骨神経の障害も抑制されることがわかった。

脂肪由来幹細胞移植による治療のメカニズムとして幹細胞からの分泌物質(exosome)が注目されていることからラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清について検討した。

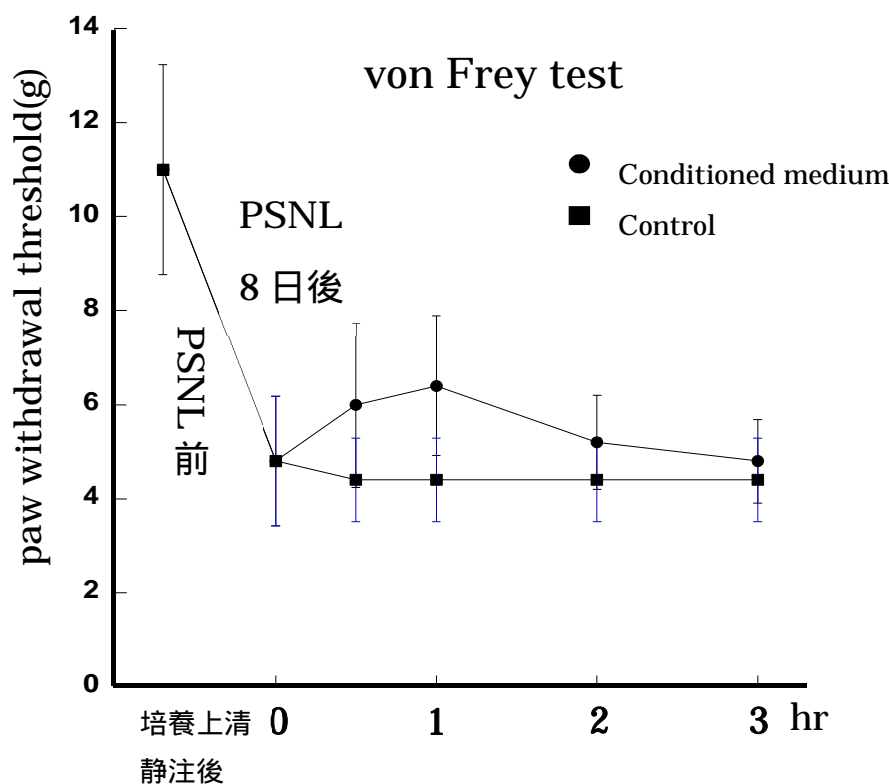
4. 研究成果

(1) 痛覚過敏やアロディニアなどの症状を改善するメカニズムについて

ラット皮下脂肪由来幹細胞移植により数日持続する疼痛閾値の改善を認めた。

脂肪由来幹細胞には、免疫系に対して抑制的に作用するB7-H1があり、このB7-H1受容体はミクログリアに存在する。神経障害性疼痛の症状発現にはミクログリアの活性化が注目されており、B7-H1がミクログリアに対して抑制的に作用し、神経障害性疼痛動物の痛覚過敏やアロディニアなどの症状を改善するかラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清を用いて検討した。

ラット皮下脂肪由来幹細胞(1×10^6 cells/ml)を24時間培養した培養上清(conditioned medium) 1mlをPSNLラット坐骨神経結紮後8日目に静脈投与したが、脂肪由来幹細胞移植と比較して疼痛閾値の改善は軽度で短時間であった。



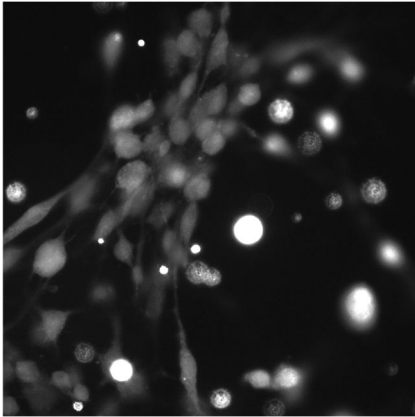
このラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清中のB7-H1をELISA法にて測定した。

24時間培養上清： 3.12 ± 1.07 ng/ml 48時間培養上清： 3.37 ± 1.14 ng/ml

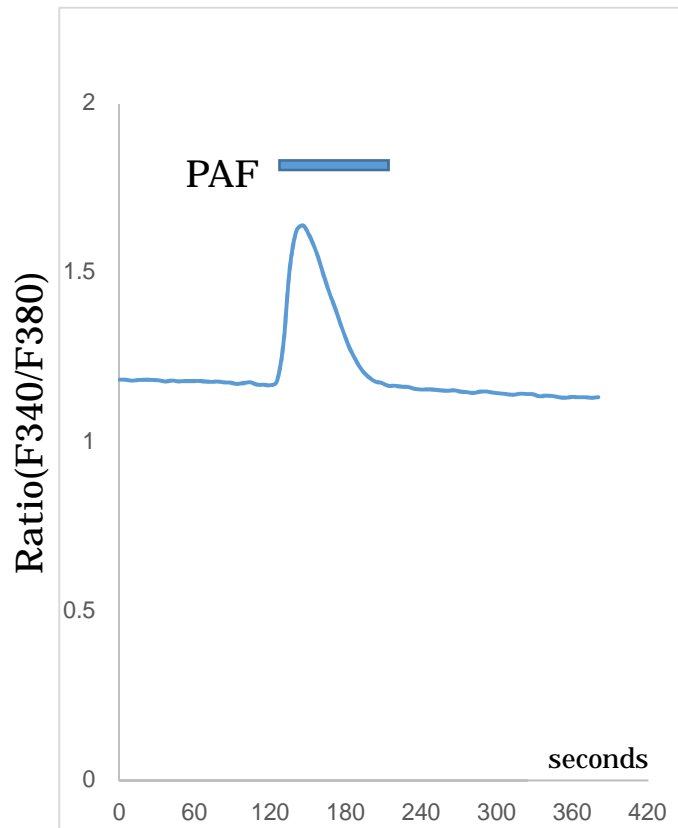
脂肪由来幹細胞をIFN γ で刺激するとB7-H1が著明に増加することが報告されており、脂肪由来幹細胞を炎症メディエータなどで刺激することが培養上清による治療には必要であると考えられる。

ラット皮下脂肪由来幹細胞の刺激法を細胞内Ca $^{2+}$ の変化で検討した。

ラット皮下脂肪由来幹細胞をHanks bufferにfura-2/AMを添加し1時間処置後、340/380波長比を測定し細胞内Ca $^{2+}$ の変化を検討した。ラット皮下脂肪由来幹細胞を血小板活性化因子(platelet-activating factor :PAF) (10^{-7} M)で刺激すると細胞内Ca $^{2+}$ が上昇した。

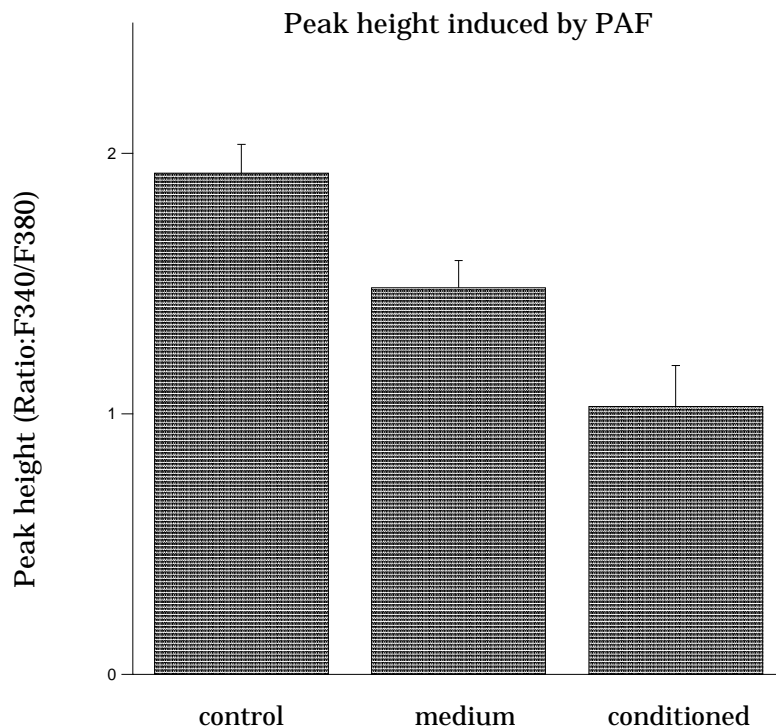


ラット皮下脂肪由来幹細胞



ラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清のミクログリアに対する効果を検討した。

ラット培養ミクログリア細胞株を炎症性メディエータであるPAFで刺激すると細胞内Ca²⁺が上昇する。ラット培養ミクログリア細胞株をHanks bufferにfura-2/AMを添加し40分間処置した後、PAF(10⁻⁹ M)刺激による細胞内Ca²⁺の変化をラット皮下脂肪由来幹細胞(1x10⁶ cells/ml)の培養上清存在下に測定した。



ラット皮下脂肪由来幹細胞(1×10^6 cells/ml)の培養上清(conditioned medium)は、PAF刺激によるラットミクログリア細胞株の細胞内 Ca^{2+} 増加をcontrolの47%抑制したが、幹細胞専用培養液(medium)のみでも23%抑制した。ラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清はラットミクログリアの活性化を抑制することが推測される。

(2) 坐骨神経障害部位を修復するメカニズムについて

脂肪由来幹細胞にはBDNFなどの神経増殖因子が存在することが報告されており、障害神経を修復する液性因子として作用することが考えられる。PSNLラットに脂肪由来幹細胞を移植すると坐骨神経障害部位の脱髄を抑制したことから、末梢神経の髄鞘形成に重要なシュワン細胞に対するラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清の影響を検討した。

ラット皮下脂肪由来幹細胞(1×10^6 cells/ml)を24時間培養したconditioned medium、幹細胞専用培養液(medium)のみとcontrolとして一般的なDMEM+FBSでラットシュワン細胞株を48時間培養し形態変化を観察した。

controlと比較してmediumのみとconditioned mediumは、ラットシュワン細胞株の突起を伸張したが、両者間に有意な差は見られなかった。このことから幹細胞専用培養液とラット皮下脂肪由来幹細胞培養上清にはシュワン細胞に対する効果が推測されるが、その成分について比較検討が必要である。

Limitation

本研究に用いたのは、市販のラット皮下脂肪由来幹細胞とその幹細胞専用の培養液である。ラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清は、PAF刺激によるミクログリア活性化の細胞内カルシウム増加を抑制したが、幹細胞専用の培養液のみでも効果を認めた。また、幹細胞専用培養液のみとラット皮下脂肪由来幹細胞の培養上清は、ラットシュワン細胞株の突起を伸張した。

この幹細胞専用培養液に含まれている成分については明らかではないことから、今回の脂肪由来幹細胞の培養上清の効果は条件が限定されたものと考えられる。種々の培養条件での脂肪由来幹細胞についてさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanao Miyano, Minoru Ikehata, Kaori Ohshima, Yuki Yoshida, Yasuhiro Nose, Sei-ichi Yoshihara, Katsuyuki Oki, Seiji Shiraiishi, Miaki Uzu, Miki Nonaka, Yoshikazu Higami, Yasuhito Uezono	4. 巻 17
2. 論文標題 Intravenous administration of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and umbilical cord improves neuropathic pain via suppression of neuronal damage and anti-inflammatory actions in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PloS ONE	6. 最初と最後の頁 e0262892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0262892	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮野 加奈子、池畑 農、大島 佳織、吉田 有輝、能勢 泰寛、吉原 誠一、隠岐 勝幸、白石 成二、宇津 美秋、野中 美希、樋上 賀一、成田 年、上園 保仁
2. 発表標題 脂肪および臍帯由来間葉系幹細胞は炎症および脱髄を改善し神経障害性疼痛を緩和させる
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
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
---------	---------