

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09384

研究課題名(和文)疾患細胞分化誘導技術を応用した線維筋痛症の疼痛機序解析と治療法の探索

研究課題名(英文) Analysis of the pain mechanism and treatment of fibromyalgia by the application of disease cell differentiation technologies

研究代表者

葛巻 直子 (Kuzumaki, Naoko)

星薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10507669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：線維筋痛症は、全身の広範囲にわたって慢性的な原因不明の激しい痛みを生じる疾患であり、身体症状や精神症状など様々な随伴症状を伴うことが知られている。本研究では、iPS細胞分化誘導技術を応用し、線維芽細胞由来 iPS細胞から知覚神経細胞あるいはドパミン神経細胞へ分化誘導し、線維筋痛症病態解析を行った結果、線維筋痛症の複合的な症状発現には、脳内における機能変容のみならず、知覚神経内変容も惹起されていることが明らかになった。以上、本研究の結果より、更なる検討は必要であるものの、激しい痛みを緩和するためには、精神症状の緩和のみならず、知覚神経の応答制御も重要である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ストレスなどの環境要因による脳内の異常応答が線維筋痛症における激しい痛みに関与すると考えられるが、実際にどのような神経が障害され、神経細胞内においてどのような変化が生じているのか、明らかとなっていない。本研究により、脳内における機能変容のみならず、知覚神経内変容も誘導されている可能性が示唆された。今後詳細な検討は必要であるが、線維筋痛症病態を緩和するためには、精神症状の制御のみならず、痛覚過敏症状への適切な対応も必要であると推察される。

研究成果の概要(英文)：Fibromyalgia is a disease that causes severe, chronic pain of unknown cause over a wide area of the body and is known to be accompanied by various concomitant symptoms such as physical and psychiatric symptoms. In this study, we applied iPS cell differentiation technology to induce differentiation from fibroblast-derived iPS cells into sensory neurons or dopamine neurons, and analyzed the pathology of fibromyalgia. We found that combined manifestations of fibromyalgia caused not only functional alterations in the brain but also sensory neuronal alterations. These results suggest that, although further investigation is necessary, control of the response of sensory nerves as well as upper centers may be important for relieving severe pain.

研究分野：幹細胞科学

キーワード：線維筋痛症 iPS細胞 知覚神経細胞 ドパミン神経細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

線維筋痛症は全身の激しい疼痛を主症状とし、疲労感、うつ症状や睡眠障害といった様々な症状が併発する疾患である。線維筋痛症の原因は不明であり、疼痛コントロールに難渋する場合も少なくない。ストレスなどの環境要因による晩発的な要素による脳内の異常応答が線維筋痛症における激しい痛みに関与すると考えられ、痛覚伝達に関わる末梢知覚神経を介した経路と痛みに伴う情動障害に関わる中脳ドパミン神経細胞を中心とした神経回路に異常を来している可能性が考えられるが、実際にどのような神経が障害され、神経細胞内においてどのような変化が生じているのか、明らかとなっていない。また、知覚神経自体に障害が認められるのか、否かについてのエビデンスも明確ではない。

2. 研究の目的

本研究では、線維筋痛症の病態を細胞生物学的に明らかにするために、線維筋痛症患者 iPS 細胞から、中脳ドパミン神経あるいは末梢知覚神経へと分化誘導し、細胞種横断的に、器質的あるいは機能的変化の網羅的比較解析を行う。さらには、同定した疾患関連分子を標的として、細胞種特異的に遺伝子組換えを行い、線維筋痛症様の行動変容について検討を行う。

3. 研究の方法

本研究課題については、星薬科大学研究倫理委員会、動物実験委員会ならびに組換え DNA 実験安全委員会の承認を得て研究を遂行している。iPS 細胞を用いた知覚神経細胞への分化誘導は、初期胚において前後軸を決定する経路や細胞増殖に関わる経路を調節する小分子 (TGF β ファミリー阻害薬、 γ セクレターゼ阻害薬ならびに GSK3 β 阻害薬等) を iPS 細胞に添加し、neural crest cell を誘導した後、nerve growth factor- β (NGF- β) 等の栄養因子を含む培地にて接着培養することにより行った(Chambers et al., Nat Biotechnol. 2012)。一方、iPS 細胞からのドパミン神経細胞への分化誘導は、iPS 細胞を中脳ドパミン神経の発生に関与する fibroblast growth factor 8b (FGF-8b) ならびに sonic hedgehog (SHH) 等を含む培地にて浮遊培養した後、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) などの神経栄養因子を含む培地で接着培養することにより行った(Suda et al., Mol Brain, 2018, Kuzumaki et al., Brain, 2019)。尚、本研究課題のヒト疾患特異的 iPS 細胞の樹立ならびにそれらを使用した病態解析に関して、九州大学 (承認番号 :2021-59) の倫理承認のもと、星薬科大学倫理委員会の承認 (承認番号 :2021-25) を得て研究を遂行した。また、線維筋痛症患者 iPS 細胞研究より抽出した標的分子の疼痛閾値ならびに情動行動への影響を検討する目的で、ドパミン神経細胞特異的 Cre 組み換え酵素を発現する Cre ドライバーマウス (dopamine transporter (DAT)-Cre) を使用し、マウスの標的脳領域に対して Cre 陽性細胞特異的に各種標的分子を発現させることの可能なアデノ随伴ウイルスベクターを腹側被蓋野領域に微量注入することで、遺伝子改変動物の作製を行い、行動変容に対する評価を行った。疼痛閾値の評価は von Frey フィラメント法に従い、不安感受性の評価は高架式十字迷路法に従い、行った。

4. 研究成果

(1) 線維筋痛症患者 iPS 細胞由来知覚神経細胞における痛覚関連分子の発現解析

皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞から知覚神経細胞への分化誘導を行ったところ、分化段階依存的な知覚神経細胞マーカーの発現が確認された。また、侵害受容器である TRPV1 や、Nav1.9 および Cav2.2 等のイオンチャネルや μ -opioid receptor (MOR) の発現も確認された。こうした条件下、皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞から誘導した知覚神経細胞において、イオンチャネルや侵害受容器等の発現について解析した結果、健常者と線維筋痛症患者間で大きな差は認められなかった。一方、慢性疼痛の発症に関与する小胞型ヌクレオチドトランスポーターの発現量について検討した結果、健常者と比較して、線維筋痛症患者 iPS 細胞由来知覚神経細胞において発現変化が認められた。

(2) 線維筋痛症患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞における痛覚関連分子の発現解析

一方、皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞からドパミン神経細胞への分化誘導を行い、ドパミンの合成と代謝に関与する因子に着目して検討した結果、健常者と比較して線維筋痛症患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞において、ドパミンの代謝酵素の発現変動が認められた。さらに、線維筋痛症患者 iPS 細胞由来ドパミン神経細胞においてドパミン代謝関連分子の発現増加が認められたことより、中脳ドパミン神経における標的分子の発現変動が痛覚過敏を惹起するか否か検討を行った。Flex-switch システムに従い、DAT-Cre マウスの腹側被蓋野領域にアデノ随伴ウイルスベクターを用いて標的のドパミン代謝関連分子を発現させ、痛覚過敏の発現の有無について検討を行った結果、疼痛閾値の変化は誘導されなかった。また、精神症状の発現と関連の深い 22q11.2 染色体に含まれている候補因子に着目して、Cre-lox システムを応用し、ドパミン神経特異的な遺伝子組換え動物の作製を行った。その結果、ドパミン神経細胞における候補一因子のみの発現制御では、疼痛閾値に大きな変化は認められなかったものの、不安感受性の亢進傾向が認められた。

(3) 線維筋痛症患者 iPS 細胞由来知覚神経細胞ならびにドパミン神経細胞の横断的比較解析

線維筋痛症の病態を細胞生物学的に明らかにするために、線維筋痛症患者 iPS 細胞より知覚神経あるいはドパミン神経細胞の分化誘導を行い、疾患の表現系について、神経サブタイプ横断的な解析を行った。iPS 細胞分化誘導技術を応用した検討より、線維筋痛症病態において、末梢知覚神経ならびに中枢ドパミン神経の器質的変容が認められた。また、知覚神経細胞あるいはドパミン神経細胞における痛覚過敏あるいは情動障害に関わる分子の抽出をより詳細に解析を行う目的で、遺伝子発現変化を網羅的に検討した結果、皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞より分化誘導した両神経サブタイプにおいて、新規標的分子を含む多くの遺伝子発現変動が認められ、また、ドパミン神経細胞と比較して、知覚神経細胞において、より多くの遺伝子発現変動が認められた (fc>4)。

(4) 総括

線維筋痛症の複合的な症状発現には、脳内における機能変容のみならず、知覚神経内変容も惹起されている可能性も考えられ、激しい痛みを緩和するためには、知覚神経の応答制御も重要である可能性が示唆された。線維筋痛症患者 iPS 細胞由来知覚神経ならびにドパミン神経細胞において特定遺伝子の発現変動が認められることは明らかにはなつたものの、中脳ドパミン神経

細胞における単一因子の制御では疼痛閾値に大きな変化は認められなかったため、今後は候補因子群の複合的な発現調節を行い、痛覚過敏ならびに精神症状への関連について検討する必要があると思われる。

[引用文献]

Chambers SM, Qi Y, Mica Y, Lee G, Zhang XJ et al., Nat Biotechnol. 2012; 30(7): 715-20.

Suda Y*, Kuzumaki N*, Sone T, Narita M, Tanaka K, Hamada Y, *et al.* Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. Mol Brain 2018; 11: 6. *equally contributed author

Kuzumaki N*, Suda Y*, Iwasawa C, Narita M, Sone T, Watanabe M, *et al.* Cell-specific overexpression of COMT in dopaminergic neurons of Parkinson's disease. Brain 2019; 142: 1675-86. *equally contributed author

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 葛巻直子、須田雪明、加藤隆弘、岡野栄之、成田 年
2. 発表標題 iPS 細胞からの分化誘導技術ならびにリバーストランスレシヨナルニューロサイエンスリサーチを応用した難治性神経疾患の解明研究
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kuzumaki N, Kagawa R, Ikeda Y, Suda Y, Iwasawa C, Kato T, Hattori N, Okano H, Narita M
2. 発表標題 Changes in the expression of opioids and opioid receptors in the sensory neurons of fibromyalgia and Parkinson's disease patients using disease-specific iPS cells
3. 学会等名 50th International narcotics research conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 葛巻直子、須田雪明、加藤隆弘、岡野栄之、成田 年
2. 発表標題 線維筋痛症病態解明を目指した疾患特異的 iPS 細胞分化誘導技術の応用
3. 学会等名 第55回日本ペインクリニック学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葛巻直子、加藤隆弘、細井昌子、成田 年
2. 発表標題 難治性疼痛への複合的神経機能変容の関与-iPS 細胞を用いた線維筋痛症の病態解析から考える
3. 学会等名 第 14 回日本運動器疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葛巻直子, 須田雪明, 石川 充, 加藤隆弘, 成田道子, 田中謙一, 濱田祐輔, 細井昌子, 岡野栄之, 成田 年
2. 発表標題 線維筋痛症の分子病態解析: 複数の疾患由来分化神経細胞を使用した統合的評価の確立
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 葛巻直子, 須田雪明, 加藤隆弘, 岡野栄之, 成田 年
2. 発表標題 難治性疼痛疾患解明に向けたヒト疾患 iPS 細胞由来神経サブタイプの横断的研究に基づいた表現系解析
3. 学会等名 第 95 回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

該当なし

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
---------	---------