

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390411

研究課題名（和文）栄養因子の双方向性制御による神経再生促進法の開発：新規DDSとsiRNA

研究課題名（英文）Bidirectional approach with neurotrophic factors for the acceleration of neuro-regeneration.

研究代表者

齋藤 繁 (SAITO SHIGERU)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40251110

研究成果の概要（和文）：神経再生の環境設定と複数栄養因子同時投与の可能性について研究を進展させた。血糖コントロールと組織再生に関する解析は一定の成果が得られ、神経の正常な再生に最適な組織液環境としては正常の血糖濃度域が最適で、多くても少なくても不適であることが証明された。DDS (drug delivery system) に関して、シート体の徐放形態を開発し、その効果を判定した。現在、臨床への応用に向かって準備を進行中である。

研究成果の概要（英文）：For the better recovery of damaged neurons, cellular environment seems to be crucial. In the present study, the authors assessed effects of neurotrophic factors in various settings. As the results, it was revealed that normo-glycemia is the best condition for the neuro-regeneration. Newly developed drug delivery system was identified as effective for gradual release of nerve activity controlling drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,300,000	2,190,000	9,490,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	9,000,000	2,700,000	11,700,000

研究分野：麻酔・蘇生学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛管理学、再生医学、栄養因子

1. 研究開始当初の背景

神経栄養因子を用いた再生医学的検討は既に整形外科、脳神経外科、神経内科領域などで検討されているが、麻酔科学的見地からの神経障害性癒痛発症予防などに関する研究はこれまで極めて少なかった。最近、NT-3投与による神経障害性疼痛時の熱過敏性回復、GDNFによる神経傷害性癒痛モデルでの機能回復、BDNFによる脊髄ノルアドレナリンニ

ューロン発芽誘導によるクロニジン鎮痛促進などが相次いで報告されており、神経障害後の不完全な神経回路網再生に伴う感覚障害への効果を更に詳細に検討すべき段階と考えられた。特に、NGFやBDNFなどは、過剰産生が異常な再生を誘導し、障害を悪化させる要因とも疑われるので、単純に過剰投与するのではなく、時間的空間的に発現量を調節する手法が必要と考えられる。今回の研究

では、京都大学で開発されたゼラチンハイドロゲルによる徐放化システムを応用し、栄養因子の長時間徐放法の意義も検討した。また、慢性痛発症に関与するとされる、NGF、BDNF など、その他の栄養因子についても順次検討を加えた。尚、FGF-2-siRNA 用いた基礎研究は腫瘍発育や gliosis に関して開始されており、慢性痛発生機序解明についても研究を開始する適期と考えられた。

麻酔薬の細胞増殖や神経発芽への影響についてはこれまでも焦点が当てられたことがあったが、機能的な神経回路網構築に対する麻酔薬の影響については、これまでほとんど研究されていなかった。局所麻酔薬による背側神経核での発芽抑制、原始的な神経組織を用いた研究、GFP-actin を発現するトランスジェニックマウスの海馬ニューロンを用いた研究、PKC の酵素活性を測定した我々の研究程度に止まっていた。そこで今回、麻酔薬の神経回路再生過程への影響に関する研究を企画した。

2. 研究の目的

虚血や低酸素、外傷などによって傷害された神経が完全に再生されないために生ずる、運動機能障害や感覚傷害、慢性痛などは罹病者の苦痛はもとより、社会に多大な経済的損失を与えている。神経組織が機能を果たすためには、神経細胞が正しく回路網を形成し、相互に情報伝達を行わなければならない。単なる細胞の増殖や分化だけではこうした機能的な組織は形成されず、発生及び再生の過程において精緻な制御機構が働いていると考えられる。今回の研究においては、これまでの技術・知識の集積を生かして、複数の神経細胞による神経回路網構築の過程に対して、各種の神経栄養因子 (NGF, BDNF, GDNF, NT-3) や細胞増殖因子 (bFGF, VEGF, HGF, PDGF) はどのように影響を与えるのか、時相・部位特異的に作用させることに依って損傷後の組織修復に寄与するのか(ある部位では作用を抑え、別の部位では作用を強化することで正常な回復を促進するか)、麻酔や神経ブロックに使用される薬は正常および異常な発生・再生過程をどのように修飾するのか、最新の細胞培養システムを用いた基礎実験、行動実験、および臨床データをもとに明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

再生神経細胞突起の細胞骨格と情報伝達機構に関する細胞生物学的研究
細胞の成長過程、細胞突起間認識をリアルタイムで顕微鏡下に観察する研究

(1) 自動焦点補正タイムラップスビデオシス

テムを用いて成長円錐部の形態変化を観察する。

A. 胎生 8 日目 chickDRG を採取→BPE 添加 F12 培地で 20 時間培養→局所麻酔薬、揮発性麻酔薬 or 溶媒のみ添加→アクチン繊維の動態の継続的観察→濃度依存性、暴露時間依存性等の解析

B. 胎生 10 日目 chick sympathetic chain と DRG を採取→BPE 添加 F12 培地で 20 時間共培養→成長円錐部の反発現象観察→局所麻酔薬、揮発性麻酔薬 or 溶媒のみ添加→反発頻度、成長円錐崩壊頻度の計測→濃度依存性、暴露時間依存性等の解析

(2) 細胞間認識機構での細胞内 Ca²⁺の役割と麻酔薬の影響を解明する。

胎生 10 日目 chick sympathetic chain と DRG を採取→BPE 添加 F12 培地で 20 時間共培養→蛍光 Ca²⁺指示薬 Fura-2/AM 負荷→成長円錐 filopodia が相手ニューロンの突起と接触した際の Ca²⁺濃度測定→時間的空間的变化の解析 (Aquacosmos) →局所麻酔薬、栄養因子 or 溶媒のみ添加→filopodia 退縮時の局所 Ca²⁺濃度測定→濃度依存性等の解析

徐放化栄養因子の神経再生に及ぼす影響に関する研究

神経傷害後の回復に及ぼす各種栄養因子の影響を、高濃度の局所麻酔薬による神経傷害をモデルとして検討する研究

(1) 培養細胞を細胞死 (アポトーシスを含む) を誘発する濃度の局所麻酔薬に暴露し、暴露後の回復過程で栄養因子もしくは発現阻害物質を存在させた場合に培養細胞の回復率が高まるか、分化が進むか観察する。

局所麻酔薬暴露 → washout → BDNF, NT-3, GDNF (5-20ng/ml) または FGF-2, VEGF (1-10ng/ml) 添加培地で 24-48 時
A. 初代培養細胞を血清加 MEM 培地で 4 日間培養→テトラカイン添加 (1μM <) 10 時間→固定→死細胞、アポトーシス細胞のカウント
B. 初代培養細胞を 4 日間培養→テトラカイン添加 (1μM <) 10 時間→テトラカイン間回復→固定→死細胞、アポトーシス細胞のカウント (FGF-2, VEGF をゼラチンハイドロゲル徐放化法で培養液中に供給した場合の効果も同様に検討)。

C. 胎生 8 日目 chick DRG を採取→BPE 添加 F12 培地で 20 時間培養→テトラカイン (1μM >) 添加 20 時間→growth cone collapse assay→テトラカイン washout → BDNF, NT-3, GDNF (5-20ng/ml) または FGF-2, VEGF (1-10ng/ml) 添加培地で 24-48 時間回復→growth cone collapse assay

疼痛回避行動を指標とした行動学的研究

疼痛回避行動を指標とした神経機能異常の評価

(1)慢性癒痛モデルラットにおいて徐放化した栄養因子が行動異常を予防または回復させるか検討する。逆に、各因子の発現を抑制することが発症を促進または予防するののかも検討する。

Chung モデル・肋間神経結紮モデル→閉創時に神経傷害部位に徐放製剤化したリドカインを埋没→経時的な慢性痛の評価(ホットプレートテスト、フォンレイフィラメントテスト等)

(2)正常な発生過程での麻酔薬への暴露が、疼痛回避行動を変化させるか検討する。

A. 中枢神経系のシナプス形成が完了する前のラット脳・脊髄スライス→揮発性麻酔薬暴露(イソフルラン、セボフルラン 0.5-3MAC)、あるいは静脈麻酔薬(プロポフォール)→電気生理学的な検討

B. 経時的な行動学的発育の評価(startle reflex, righting reflex, ホットプレートテスト、フォンレイフィラメントテスト、等)

臨床医学的研究の準備

(1)徐放化した各種薬剤の慢性痛の発症予防、もしくは発症後の治療に関する臨床試験の予備試験

対象:脊柱管狭窄症、帯状疱疹後神経痛、CRPSなどの慢性痛患者を想定して患者層をアセスメントした。

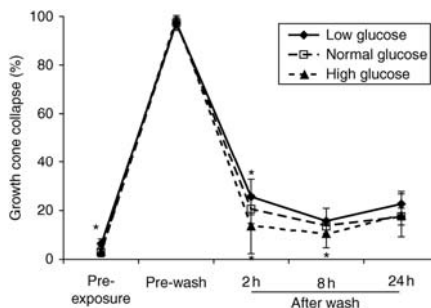
評価:経時的な visual analogue scale、罹患関節の可動域(ROM)、ADL

副作用評価をシミュレーションした。

(2)痛みとその他の背景因子の関係について、甘みをモデルとして fMRI をもちいた臨床研究を行った。

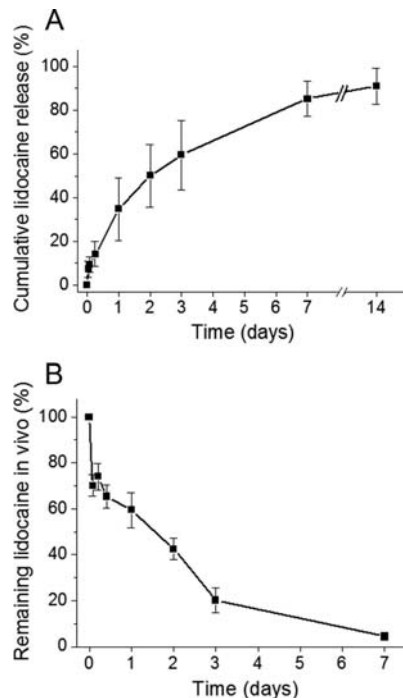
4. 研究成果

神経再生の環境設定と複数栄養因子同時投与の可能性について研究を進展させた。血糖コントロールと組織再生に関する解析は一定の成果が得られ、神経の正常な再生に最適な組織液環境としては正常の血糖濃度域が最適で、多くても少なくても不適であることが証明された。(図1)



(図1) 糖濃度と神経細胞の回復 (本研究結果 Br J Anaesth. 2010 Apr;104(4):482-6 より引用)

神経細胞の回路網構築の過程に対して、各種の神経栄養因子や細胞増殖因子がどのように影響を与えるのか、時相・部位特異的に作用させることに依って損傷後の組織修復に寄与するのか(ある部位では作用を抑え、別の部位では作用を強化することで正常な回復を促進するか)、麻酔や神経ブロックに使用される薬は正常および異常な発生・再生過程をどのように修飾するのか、最新の細胞培養システムを用いた基礎実験、行動実験、および臨床データをもとに明らかにする計画では、生体内であり得る複数因子の相互作用に突いて検討した。初年度、2年時の研究では前年からの継続研究である、線維芽細胞増殖因子の局所筋肉内注入による血管新生作用の臨床データを集積することにより、その応用可能性を考察したが、今回は人間への投与は行わなかった。また、神経に正確に薬剤を到達させる技術を確認するために、CTスキャンガイドの神経ブロック法は臨床例において開発を進め、正確な針刺入へのリスクファクターを画像解剖学的に評価した。DDS(drug delivery system)に関して、シート体の徐放形態を開発し、その効果を判定した。現在、臨床への応用に向かって準備を進行中である(図2)。



(図2) リドカイン徐放シートの特性 (本研究結果 Anesthesiology. 2010 Jun;112(6):1473-81. より引用)

具体的には、NGF、BDNF、NT-3、GDNF など神経栄養因子の機能と局在、神経障害後の時間的発現過程などは少しずつ明らかになりつつあるが、これらの分子の発現を制御して

神経障害や慢性痛を治療する方法は十分に検討されていない。神経系幹細胞を用いた再生医学的検討は未だ端緒に付いたばかりである。また、神経発生・再生と麻酔に関するこれまでの研究は非常に限定的なものであり、単一細胞の活動(細胞分裂など)に対する麻酔薬の影響、ないしは個体発生全体と麻酔薬の影響(催奇形性)に関するもののみである。麻酔薬は神経系の情報伝達に影響を与えることが知られているにもかかわらず、発生・再生過程の神経細胞間の相互作用に対する麻酔の影響は全くと言え程研究されていない。今回の研究の成果は今後増加することが予想される、神経再生治療に際して最善の麻酔法、鎮痛法を確立させるためにも有用な情報を提供するものと思われた。また、周術期の神経機能低下は、高齢者や合併症を持つ患者に対する麻酔、鎮痛処置が増加しつつある現代医療の重要な問題である。高次の神経回路網を温存する管理法、あるいは一度傷害された回路網を素早く回復させる手段を確立するためにも本研究の成果は有用と考えられる。

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15件)

- ①Obata H, Sakurazawa S, Kimura M, Saito S. Activation of astrocytes in the spinal cord contributes to the development of bilateral allodynia after peripheral nerve injury in rats. *Brain Res.* 査読有 2010 Dec 2;1363:72-80.
- ②Koizuka S, Saito S, Tobe M, Sekimoto K, Obata H, Koyama Y. Technical communication: percutaneous radiofrequency mandibular nerve rhizotomy guided by high-speed real-time computed tomography fluoroscopy. *Anesth Analg.* 査読有 2010 Sep;111(3):763-7.
- ③Obata H, Kimura M, Nakajima K, Tobe M, Nishikawa K, Saito S. Monoamine-dependent, opioid-independent antihypersensitivity effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a postoperative pain model in rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 査読有 2010 Sep 1;334(3):1059-65.
- ④ Ito N, Obata H, Saito S. Spinal microglial expression and mechanical hypersensitivity in a postoperative pain model: comparison with a neuropathic pain model. *Anesthesiology.* 査読有 2009 Sep;111(3):640-8.
- ⑤ Al-Jahdari WS, Suzuki Y, Yoshida Y,

Hamada N, Shirai K, Noda SE, Funayama T, Sakashita T, Kobayashi Y, Saito S, Goto F, Nakano T.

The radiobiological effectiveness of carbon-ion beams on growing neurons. *Int J Radiat Biol.* 査読有 2009 Aug;85(8):700-9.

⑥Nakajima K, Obata H, Ito N, Goto F, Saito S. The nociceptive mechanism of 5-hydroxytryptamine released into the peripheral tissue in acute inflammatory pain in rats. *Eur J Pain.* 査読有 2009 May;13(5):441-7.

⑦Ito N, Saito S, Yamada MH, Koizuka S, Obata H, Nishikawa K, Tabata Y. A novel bFGF-GH injection therapy for two patients with severe ischemic limb pain. *J Anesth.* 査読有 2008;22(4):449-52.

[学会発表] (計3件)

①Kimura M, Antihypersensitivity effects of tramadol hydrochloride in a rat model of postoperative pain
Society for Neuroscience Annual Meeting 2010, 2010. 11. 14 San Diego, USA

②木村雅文、塩酸トラマドールの鎮痛作用機序 -ラット術後痛モデルとマイクロダイアリシスでの検討-
第32回日本疼痛学会、2010. 7. 3、国立京都国際会館(京都市)

③中島 邦枝、ミルナシプランおよびパロキセチンの鎮痛メカニズム
日本麻酔科学会第57回学術集会、2010. 6. 4 福岡国際会議場(福岡市)

[図書] (計1件)

①齋藤 繁、他、真興交易(株) 医書出版部、CTガイド下神経ブロック、2011、50-56, 123-127, 138-143, 166-167

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 繁 (SAITO SHIGERU)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40251110

(2) 研究分担者

荻野 祐一 (OGINO YUICHI)
群馬大学・医学部・助教
研究者番号：20420094

田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO)
京都大学・再生医科学研究所・教授
研究者番号：50211371