

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17826

研究課題名(和文) 誘導ヒトシュワン様細胞移植を用いた難治性神経障害性痛に対する根治的治療法の開発

研究課題名(英文) Radical Therapy for neuropathic pain by fibroblast-derived induced Schwann cells

研究代表者

村上 徹 (Murakami, Toru)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：90756248

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：以前我々が開発した神経障害性痛の動物モデルである、坐骨神経圧迫損傷モデルラットを作成し3群に分け、それぞれヒト線維芽細胞由来の誘導シュワン細胞、ラットシュワン細胞、細胞移植を行わない群とし、行動評価神経圧迫損傷を受けたすべてのラットは1-2週間後に機械的アロディニア及び熱性痛覚過敏を認めたと、誘導シュワン細胞およびラットシュワン細胞を投与した群では、細胞移植を行わなかった群と比較し、損傷6週間後に改善傾向であった。次に神経周囲に投与した細胞の動態を解析するため、レンチウイルスを用いてAcGFPをヒト線維芽細胞に感染させ、最適な条件を検討した。その結果、ほぼすべての細胞でGFP陽性となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は従来対症療法のみであった神経障害性痛治療に対して、新たな選択肢となる治療法の確率を目指している。神経障害性痛の動物モデルである、坐骨神経圧迫損傷モデルラットを用い、ヒト皮膚由来誘導シュワン細胞やラットシュワン細胞のいずれも治療効果を持つことを示した。

研究成果の概要(英文)：Sciatic nerve compression injury model rats were divided into three groups by transplanted cells: induced Schwann cells derived from human fibroblasts, rat Schwann cells, and no cell transplantation. All rats with nerve compression injuries showed mechanical allodynia and thermal hyperalgesia after 1-2 weeks, but those treated with induced Schwann cells or rat Schwann cells showed a trend toward improvement 6 weeks after injury compared to the group without cell transplantation. Next, to analyze the kinetics of cells administered in the perineurium, we used lentivirus to infect human fibroblasts with AcGFP and examined the optimal conditions. The results showed that almost all cells were positive for GFP.

研究分野：神経障害性痛

キーワード：神経障害性痛 シュワン細胞

1. 研究開始当初の背景

神経障害性痛は「体性感覚神経系の病変や疾患によって引き起こされる痛み」と定義され、多彩な疾患に伴う末梢および中枢神経の物理的・機能的な障害による慢性疼痛症候群である。先進国では1~7%の罹患率、本邦でも約600万人以上と推定されている。治療法について、薬物、神経ブロック、電気刺激、心理的アプローチ、リハビリテーションを含むガイドラインも存在するが、効果は限定的で根治療法がなく、主体となる症状が痛みという外部からは認識し難い症状であるための苦悩もあり、著しい生活の質低下が長期間持続することが多く、医療経済的負担が大きく、経済にも悪影響を与える疾患として学術的、社会的に近年問題となっている。

現存する治療として、三環系抗うつ薬、セトロニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬、カルシウムチャネルリガンド、および麻薬性鎮痛薬などの薬物療法、神経ブロック、種々の電気刺激療法などが行われているが、必ずしも十分な鎮痛は得られず、以下に示すようないくつかの問題点を避けられない。薬物療法は患者への侵襲が少ないという利点があるが対症療法である点是否めず、治療効果が一時的であるという点が問題となる。神経ブロックは永続的なブロックができれば根治療法となりうるが、痛みに関与する神経線維のみをブロックすることは難しく、運動麻痺などの副作用を来す可能性がある。

治療による副作用を極力減らし、根治的な治療を目指すためには、対症療法ではなく、障害を受けた神経そのものの組織レベル、細胞レベルでの再生が理想であると考えられる。

そこで本研究では、末梢神経再生に主要な役割を担っている、シュワン細胞に着目した。シュワン細胞は末梢神経組織に存在するグリア細胞であり、通常末梢神経の軸索においてミエリンを形成しており跳躍伝導に関与しているが、ひとたび軸索が障害を受けると脱分化を経て増殖し、神経成長因子に加えて成長軸索の足場となる細胞外基質を分泌し、さらに再生した軸索を再ミエリン化することにより、神経再生に寄与していることが知られているため、神経障害性疼痛においても治療効果を期待できる細胞である。

しかしながら、末梢神経障害を持つ患者からシュワン細胞を得るためには患者自身の末梢神経組織を採取しなければならず、侵襲を伴う手術を必要とし、有痛性神経異栄養症などの合併症の可能性もある。また、シュワン細胞の純粋培養は容易ではない。したがって、患者自身のシュワン細胞そのものを治療に使用することは現実的ではないと考えられる。以上の背景から、他の細胞種から内在性シュワン細胞に相当する細胞を誘導する研究、2001年出澤らによって骨髄間葉系細胞からのシュワン細胞誘導が報告されて以来、脂肪由来幹細胞(2007年、Kinghamら)や臍帯間葉系細胞(2010年、松瀬ら)、メラニン産生細胞(2011年、Chiら)において報告されてきた。

これらの背景から、申請者は直近に所属していた研究室において、すでに報告されている誘導方法に小変更を加えることで、患者の皮膚由来の結合組織からより容易に採取できる、ヒト皮膚線維芽細胞からシュワン様細胞が効率的に誘導されることを見いだした。線維芽細胞は生体内に豊富に存在し、増殖力も高く、最小限の侵襲で皮膚生検から細胞を得ることができるという特徴を有しており、生体の中で最も採取しやすい細胞の1つである。また、生体由来の細胞であるため、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)で問題となる腫瘍形成性が認められないことから、臨床応用に際して安全性が期待できる。ヒト皮膚線維芽細胞から誘導によって得られたシュワン様細胞は、もともと末梢神経に存在する内在性シュワン細胞と同様の遺伝子、タンパク発現を示し、*in vitro*および*in vivo*でミエリン形成能を持ち、ラット坐骨神経切断モデルにおける運動機能の改善、軸索再生促進作用、脱神経によって生じた神経筋接合部の再形成促進作用を示した。

以前の研究で、免疫電子顕微鏡法によるミエリン形成能の評価では、移植したGFP陽性細胞がミエリンを形成していることを確認した。

さらに、*in vivo*におけるミエリン形成能について、移植片において移植細胞の細胞体とミエリン発現が確実に一致することを確認するため、ミエリンタンパクであるP0とGFPによる二重免疫染色を行い、3次元画像を取得、ミエリン構築と移植細胞の細胞体が3次元的に一致していることを確認した。

神経障害性痛モデルでは坐骨神経を糸で結紮するモデルが一般的に用いられている。本研究期間で、既存の神経障害性痛モデルと違い、クリップにより神経に短時間一定の圧力を加えることで神経障害を起こすモデルを新たに作成した。結紮系が残存しないモデルは細胞移植治療の研究にも応用できる優れたモデルである。この新しい坐骨神経クリップモデルを行動評価、免疫組織学的手法を用い評価した。

von Frey filamentの刺激に対する反応では、10分、5分、1分のいずれの群でもモデル作成後4、7、21日目において疼痛閾値が偽手術群より有意に低くなった。また、10分、5分群では14日目においても疼痛域値の低下が認められた。

以上の結果から、新しい坐骨神経クリップモデルは疼痛閾値の低下を示し、脊髄後角でのミクログリア増生を認め、神経障害性痛モデルラットとしての特性を持つことが示された。単純で簡便な手技により作成できるモデルであり、今後様々な神経障害性痛の研究に応用されることが期待できる。

2．研究の目的

例えばケガ(外傷)の場合、治癒までの痛みの総和を減らし早期に社会復帰するためには、単に治るまで痛み止めを使い続ける(=対症療法)だけでなく、受傷組織を早く元通りに治す(=根治療法)ことを行うが、神経障害性痛においてはこれまで神経組織を治す有効な手段がなかった。一方、神経組織障害は軸索損傷と脱髄に大別されるが、末梢神経唯一のグリア細胞であるシュワン細胞はその両方の再生において中心的な役割を担っている。したがって痛みの原因となっている神経組織をもとの形態・機能に修復するために、本研究ではシュワン細胞による修復機転を利用する。

3．研究の方法

ヒト線維芽細胞から誘導したシュワン様細胞をラット坐骨神経クリップモデルに移植し、疼痛関連行動について評価した。免疫拒絶を予防し細胞の生着を促進するために免疫抑制剤を連日投与した。von Frey 試験で機械的アロディニアを、Hargreaves 試験で熱性痛覚過敏を評価した。次に、投与した細胞の動態、いずれの組織に生着し、神経再生に関わるサイトカインの mRNA やタンパクの発現上昇が認められるかの確認が必要である。そのために、投与細胞を蛍光タンパクでラベルする必要があった。本研究ではレンチウイルスの系を用いて投与細胞に AcGFP を導入した。まず市販より購入した pLVSIN-EF1 -AcGFP1-C1 Vector を大腸菌 DH5 にトランスフォーメーションし、大量培養、精製し、実験に使用するプラスミドを調整した。その後 293T 細胞にパッケージングプラスミドと共にコトランスフェクション、48 時間後に回収。その後凍結融解の有無、ポリブレン添加の有無、様々なウイルス液の希釈倍率によりヒト線維芽細胞に感染させ、最適な条件を検討した。

4．研究成果

坐骨神経圧迫損傷を受けたすべてのラットは 1~2 週間後に機械的アロディニア及び熱性痛覚過敏を認めたが、誘導シュワン細胞およびラットシュワン細胞を投与した群では、細胞移植を行わなかった群と比較し、損傷 6 週間後にいずれも改善傾向であった。GFP ウイルス作成実験では、凍結融解による明らかな力価低下は認められなかった。ポリブレン添加による明らかな細胞障害も求めず、GFP 陽性細胞は著明に増加した。ウイルス液:新鮮培地の割合を 1:9 以上とした場合、ほぼ 100%の細胞で GFP 陽性となった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------