

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791432

研究課題名（和文）神経再生と神経分化制御因子を用いた神経障害性疼痛治療法の開発

研究課題名（英文）Development of neuropathic pain cure using a nerve regeneration and a neurodifferentiate factor

## 研究代表者

関本 研一（SEKIMOTO KENICHI）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：90515090

研究成果の概要（和文）：マウス小脳神経前駆細胞の主要な成長因子である EGF (epidermal growth factor) の存在の有無にかかわらず、この細胞に Notch 1 と Jagged 1 は発現している事が確認された。また、この細胞に Notch 細胞内ドメイン (NICD) を過剰発現させると HERP1, 2 と HES 1 では標的遺伝子の発現量に差は認められなかったが、HES5 は NICD を過剰発現させた細胞で遺伝子の発現量が増加している事が確認できた。

研究成果の概要（英文）：In cultures with or without EGF (epidermal growth factor) which are main growth factors with a neural stem/progenitor cells in the postnatal cerebellum, Notch 1 and Jagged 1 express into these cells. When Notch signaling activated in these cells by overexpression of Notch intracellular domein (NICD), in HERP1, and 2 and HES1, the difference was not observed in the amount of revelation of the target gene. But Activation of Notch signaling increased HES5 in these cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

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：神経障害性疼痛、Notch signal

## 1. 研究開始当初の背景

持続的に続く、あるいは突発的な痛みが頻回に繰り返されるような慢性疼痛は罹病者にとって苦痛だけでなく、生活レベルそのもの

を著しく低下させる。特に、神経線維や神経細胞そのものが障害されることによって引き起こされる神経障害性疼痛は、通常の鎮痛薬

ではその効果が少なく、治療に難渋することも少なくない。このため、侵襲性の高い手術や外傷、神経障害が起りやすい疾患などでは、いかにして神経の障害を軽度にとどめ、神経障害性疼痛に移行させないようにするかが、以前より重要な研究領域である。しかし、臨床の現場においては、予防的な対策がとれる場合は限定的であり、一度確立した神経障害やそれに起因する慢性疼痛に対しては、リハビリなどの保存的治療や、その障害を薬物で修飾することにより疼痛を抑えることが治療の中心であった。これらは、残存した神経細胞の機能維持、機能補填や修飾に依るものであり、積極的な神経再生を促進させることによる治療法に関しては手付かずの状態であった。

近年、成熟脳やその他の成熟神経組織においても未分化な細胞があり、神経障害後など神経組織の修復が必要な状況では、活性化され再生促進に寄与する可能性が示唆されている。また、いくつかの制御因子は細胞の分化能を制御する機能を持っていることが明らかにされている。

Notchシグナルは発生過程の神経細胞を原始的な状態に留める働きがあると言われている。側方抑制と言われる代表的な働きでは、ある1つの細胞が神経細胞へ分化すると同時にNotch ligandを発現し、周囲の細胞にレセプターを介してシグナルを伝達する。シグナルを受けた周囲の細胞は未分化な状態を保つと考えられている。また各神経細胞系統に注目すると、Notchシグナルは神経細胞が分化するのを抑制し、その増殖能を保つと言われている。さらにグリア系の細胞はその分化を促進しつつ増殖能も保つと考えられている。しかしながら、対象とする神経細胞の由来や時期により、相反するような結果も出ており、研究対象として新規性を期待できると考える。

神経障害性疼痛では障害後のグリア系細胞の増殖が疼痛発生の原因の1つとして考えられているため、グリア系細胞の分化制御ができるならば疼痛治療への応用も期待できると考える。

## 2. 研究の目的

低酸素暴露に依る神経障害モデルにおいてNotch ligandおよびその拮抗物質を段階的に用いることにより、gliosisを予防しつつ、神経回路網再構築促進を図れる可能性がある。今回の研究では、まず神経細胞系ならびにグリア系の細胞を共培養し、Notchシグナル制御物質に対する経時的な反応を観察する。同時にin vitroでの低酸素暴露後に両細胞系がどう反応するかを観察し、細胞系統別の低酸素暴露後の特徴を同定する。次に時間、空間限定的にNotch ligandおよびそのantagonistを順次作用させ、gliaの増殖を抑えつつ、神経細胞の先祖帰りならびにその後の成熟を促進させる条件を決定する。

## 3. 研究の方法

Notchシグナルの神経系細胞共培養下での働きを調べる目的で、Notchシグナルを作用させることで、神経細胞やグリア細胞マーカー(Tuj1、NeuN、MAP2やGFAP、S100b)の分布や出現頻度に変化するのかどうかを免疫蛍光染色により解析する。また、同様にBrdUの取り込みを観察し各細胞種の分裂能に変化が起こるのかどうか明らかにする。また、これらの変化がNotchシグナルの作用を阻害する物質により修飾されるのかどうかを解析する。マウス胎児時期から成熟時期までの中枢神経系から採取した神経系細胞を標的とする。

Notchシグナルの作用方法は、Notch細胞内ドメイン(Notch intracellular domain: NICD)遺伝子を導入したAdeno virusを神経系細胞に感染させ、NICDを過剰発現させて直接作用

させる方法と、Jagged1やDelta like ligand4を発現したマウスfibroblastと神経系細胞を共培養させて細胞接触作用させる方法で行なう。

#### 4. 研究成果

Notch signalが神経系の細胞にどのように作用しているかを解明する一端として、マウス小脳の神経前駆細胞にNotch signalを過剰発現させた細胞に対する栄養因子の効果を検討した。まず、マウス小脳の神経前駆細胞にNotch receptorが発現しているかどうかを確認するためにNotch ligandの一種であるNotch 1とNotch receptorの一種であるJagged 1が発現しているかどうかをPCR法により確認した。結果、マウス小脳神経前駆細胞の主要な成長因子であるEGF(epidermal growth factor)の存在の有無にかかわらず、Notch 1とJagged 1は発現している事が確認された。(図1)



図1

また、マウス小脳神経前駆細胞にNotch細胞内ドメイン (NICD) を発現したAdeno virusを感染させる事によりNICDを過剰発現させた細胞がNotch signalの標的遺伝子を発現させているかどうかをGFP発現Adeno virusを感染させた細胞と比較してRT-PCRにより確認した。その結果、HERP1, 2とHES 1 では標的遺伝子の発現量に差は認められなかった。(図2)

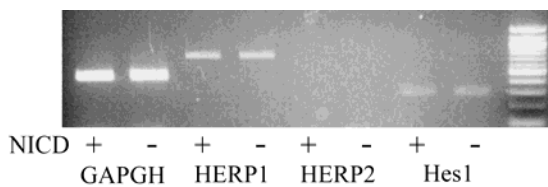


図2

またHES5はNICDを過剰発現させた細胞で遺伝子の発現量が増加している事が確認できた。(図3)

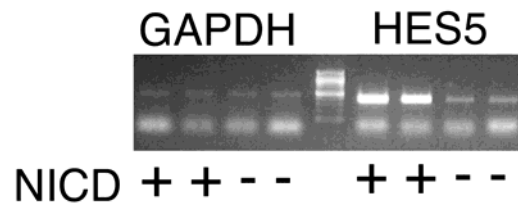


図3

以上より、マウス小脳神経前駆細胞にはNotch ligandが発現しており、その標的遺伝子はHES 5が主でHES 1はほとんど標的になっていない事がわかった。他の神経細胞ではHES 1は主要な標的遺伝子であるが、これが発現していない事によりマウス小脳神経前駆細胞ではNotch signalの効果が他と違う物である可能性が示唆された。

Notchシグナルの神経系細胞共培養下での働きを調べる目的で、Notchシグナルを作用させることで、神経細胞やグリア細胞マーカー (Tuj1、NeuN、MAP2やGFAP、S100b) の分布や出現頻度が増えるのかどうかを免疫蛍光染色により解析することを予定した。しかし、Notchシグナルの作用により細胞の中期 (3-4日) の生存性に影響がある可能性があることがわかり、マウス小脳神経前駆細胞のNotchシグナル過剰発現に伴う生存性を確認した。確実にNotchシグナルの発現するAdeno virus感染量は前年度の成果よりはっきりしていたが、マーカー発現の確認をするためにはRT-PCRによりリガンドを確認するよりも約47-72時間程度余計に培養細胞を維持する必要があり細胞の中期生存に必要な条件を模索した。EGFの濃度やAdeno virusの添加量、添加時期を幾つかの条件を変えて確認したが、マーカーの発現量と培養期間の双方を満足に満たす条件は現在のところ見つかっていない。結果、Notchシグナルの過剰発現量を調整する

事によりマウス小脳前駆細胞の生存性はある程度維持される事が確認できた。

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 関本研一 他、当病院麻酔科蘇生科外来におけるガバペンチン使用症例の検討、日本ペインクリニック学会第43回学術集会、2009.7.18、名古屋国際会議場(名古屋)
- ② 関本研一 他、当院緩和ケアチーム介入症例におけるガバペンチン使用症例の検討、第14回日本緩和医療学会学術集会、2009,6,19、大阪国際会議場(大阪)

[図書] (計2件)

- ① 関本研一 (分担執筆)、齊藤繁、肥塚史郎編、真興交易(株)医書出版部、CTガイド下神経ブロック、2011、34-43
- ② 関本研一 (分担執筆)、大瀬戸清茂編、医学書院、透視下神経ブロック法(Gasser神経節ブロック)、2009、199-200

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

関本 研一 (SEKIMOTO KENICHI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：90515090