

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25年 5月31日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592259

研究課題名（和文） 麻酔薬の末梢神経再生への関与について

研究課題名（英文） The effects of anesthetics on peripheral nerve regeneration

研究代表者

富岡 重正 (TOMIOKA SHIGEMASA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70188770

研究成果の概要（和文）：マウス骨髄間質細胞からシュワン細胞へ *in vitro* で分化誘導した。その分化誘導の培養条件において、アスコルビン酸およびグルタミン酸の添加は必須であることが示唆された。また、マウス骨髄間質細胞から分化誘導したシュワン細胞への麻酔薬の影響について調べた結果、プロポフォールおよびリドカインにはマウス骨髄間質細胞からシュワン細胞への分化誘導に対する抑制作用があることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：We differentiated murine bone marrow stromal cells (BMSCs) into Schwann cells *in vitro*. We suggests that BMSCs needs ascorbic acids and glutamic acids in the culture condition of differentiation into Schwann cells. We also examined the effects of general anesthetics and a local anesthetic on Schwann cells derived from BMSCs, which results suggest that a general anesthetic, propofol and a local anesthetic, lidocaine had the inhibitory effects on Schwann cells derived from BMSCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学・歯科麻酔学

キーワード：再生、末梢神経、麻酔薬、骨髄間質細胞、分化誘導

1. 研究開始当初の背景

口腔外科手術後には知覚麻痺や運動麻痺が生じることが多く、また歯科治療や伝達麻酔などによっても神経麻痺が生じることがある。これらの神経障害はあらゆる治療法に対して難治性のことが多く、患者の生活の質（QOL）を著しく低下させる。一方、近年再生医学の飛躍的進歩により、神経再生医療への臨床応用に大きな期待が集まっており、このような神経麻痺を末梢神経の再生治療により行う試みもなされている。

中枢神経系の再生戦略には、ES細胞を用いたもの、iPS細胞を用いたもの、組織幹細胞を用いたもの、分化した細胞の脱分化・分化転換を利用したものなどがある。その中でも、骨髄間質細胞を用いた再生医療は、患者自らの細胞を用いるため倫理的問題や免疫学的拒絶反応などの問題が生じないという大きな利点があり、将来期待されている方法である。我々もすでにマウス骨髄間質細胞を神経細胞へ分化誘導させることに成功している。

末梢神経の再生においては、シュワン細胞

胞のもつグリア環境は非常に重要な役割を担っている。つまり、シュワン細胞はニューロトロフィンをはじめ、線維芽細胞増殖因子 (FGF) などの多くの栄養因子を産生しながら、損傷した神経線維に働きかけ再生へと作用する。また、シュワン細胞はミエリンを再形成する。つまり、末梢神経再生において、骨髄間質細胞からシュワン細胞へ分化誘導し神経再生へ応用することは理想的な治療法であると言える。

一方、神経再生医療の臨床応用を考えた場合、麻酔は必要不可欠であり麻酔薬の影響は避けられない。しかしながら、神経再生医療という観点から、麻酔薬の神経細胞への影響について検討した論文は皆無に近い。局所麻酔薬 (リドカイン、テトラカイン) やエタノールは神経細胞のシナプス形成に不可欠な成長円錐の伸長を阻害することが報告されているものの、他の細胞から分化誘導されたシュワン細胞への影響については全く調べられていない。つまり、骨髄間質細胞を用いた末梢神経再生治療の臨床応用を進めていく上で、骨髄間質細胞から分化誘導したシュワン細胞に対する麻酔薬の影響について検討することは不可避であると考えられる。

2. 研究の目的

口腔外科手術後の顎顔面領域の知覚・運動麻痺、歯科治療および歯科伝達麻酔に伴う合併症である神経麻痺に対する神経再生治療を、骨髄間質細胞から分化誘導したシュワン細胞を用いておこなうことを目的とする。本研究では、骨髄間質細胞からシュワン細胞への分化誘導、分化誘導したシュワン細胞への麻酔薬の作用についての基礎的研究をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

細胞として、研究分担者である里村らが樹立した、マウス骨髄間質細胞 (以下 BMSC) を使用した。

(2) BMSC からシュワン細胞への分化誘導

Dezawaらの方法に従い、マウス多能性骨髄間質細胞からシュワン細胞へ *in vitro* にて分化誘導を行った。つまり、骨髄間質細胞 (1.25×10^3 cells/cm²) を β -メルカプトエタノール (β -ME) にて24時間前処理し、さらにその後レチノイン酸 (ATRA) を添加した培養液にて3日間前処理した後、5 mM forskolin (FSK)、10 ng/ml basic-FGF、5 ng/ml 血小板由来成長因子-AA (PDGF) および 200 ng/ml heregulin- β 1 (HRG) を同時に培地に加えることによって、骨髄間質細胞からシュ

ワン細胞へと分化誘導を行った。一方、 β -ME および ATRA による前処理を除き、FSK, basic-FGF, PDGF, heregulin- β 1により分化誘導を行い、前処置を行った分化誘導法とシュワン細胞への分化誘導効率について比較検討した。

(3) BMSCから分化誘導したシュワン細胞に対する麻酔薬の作用

BMSCから分化誘導したシュワン細胞に対して、培養下で種々の麻酔薬、全身麻酔薬としてプロポフォール(50~500 μ M)、ケタミン(10~100 μ M)、局所麻酔薬としてリドカイン(2 μ M~50 mM)を作用させシュワン細胞の増殖および形態への影響について検討した。

4. 研究成果

(1) BMSC からシュワン細胞への分化誘導

BMSC (1.25×10^3 cells/cm²) を β -ME にて24時間前処理した後、ATRA を添加し3日間培養した。その後 5 mM FSK、10 ng/ml basic-FGF、5 ng/ml PDGF および 200 ng/ml HRG を同時に培地に加えることによって、BMSC からシュワン細胞へと分化誘導を行った。その結果、分化誘導した細胞は分化誘導しなかった細胞と比較して1日目より細胞増殖が著しく抑制され、4日目にはほとんどに細胞死を認めた (図1)。

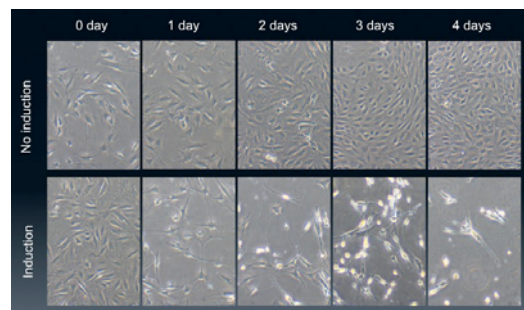


図1 β -ME および ATRA による前処理群

そこで、 β -ME および ATRA による前処理を除き、アスコルビン酸およびグルタミン酸を添加した培養液に、5 mM FSK、10 ng/ml basic-FGF、5 ng/ml PDGF および 200 ng/ml HRG を添加し分化誘導を行った。その結果、細胞の増殖に抑制は見られず、シュワン細胞の形態にきわめて類似した細胞へと誘導することができた (図2)。

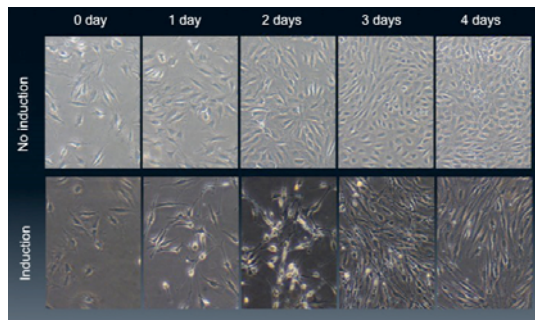


図2 β-ME および ATRA の未処理群

以上の結果から、誘導培地にアスコルビン酸およびグルタミン酸を添加することは細胞の培養および分化誘導を維持する上で重要であることが示唆された。

(2) 麻酔薬のシュワン細胞への作用

(1)の実験により得られた、BMSC から効率良くシュワン細胞へ分化誘導できる条件の下、麻酔薬を添加しその影響について検討した。

①プロポフォール

全身麻酔薬であるプロポフォールを 50 μM, 200 μM, 500 μM の濃度で誘導培地に添加した。その結果、分化誘導 24 時間後、50 μM の濃度で細胞に対する抑制作用が見られ、200 μM 以上の濃度では細胞死が見られた(図 3)。

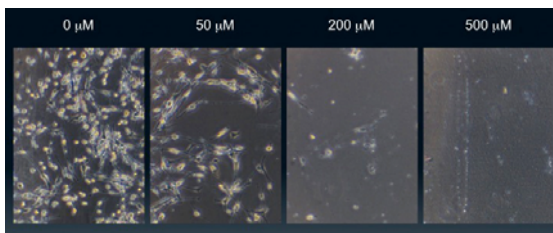


図3 プロポフォールのシュワン細胞への作用

②ケタミン

全身麻酔薬であるケタミンを 10 μM, 50 μM, 100 μM の濃度で誘導培地に添加した。その結果、分化誘導 24 時間後、すべての濃度で細胞に対する抑制作用は見られず、シュワン細胞誘導への影響は見られなかった(図 4)。

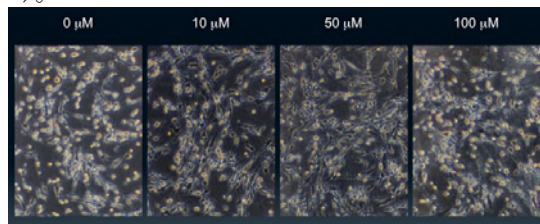


図4 ケタミンのシュワン細胞への作用

③リドカイン

局所麻酔薬であるリドカインを 2 μM ~ 50 mM の濃度で誘導培地に添加した。その結果、分化誘導 24 時間後、50 μM 以下の濃度で細胞に対する抑制作用が見られなかったが、2 mM 以上の濃度では細胞死が見られた(図 5)。

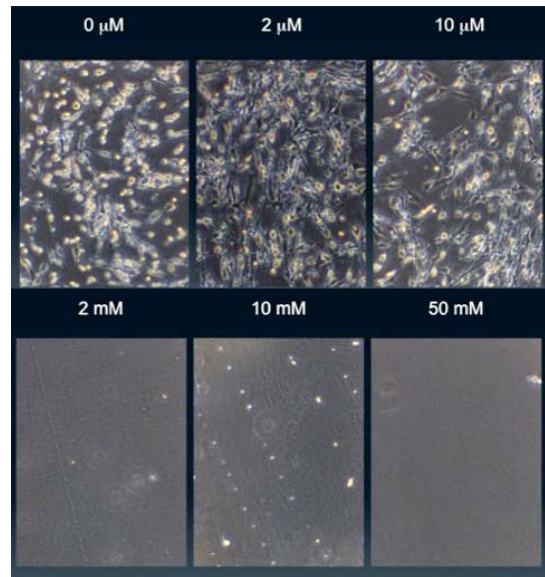


図5 リドカインのシュワン細胞への作用

以上の結果から、全身麻酔薬のプロポフォールおよび局所麻酔薬のリドカインは BMSC からシュワン細胞への分化誘導に対する抑制作用があることが示唆された。本研究ではその抑制作用のメカニズムについて明らかにできなかったが、今後 BMSC を用いた末梢神経再生治療の臨床応用を進めていく上で、麻酔薬の影響についても考慮すべきであると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Shigemasa Tomioka, Tatsumi Nagahama, Reiko Tokuyama, Seiko Tatehara, Kazuhito Satomura, Nerve growth factor increases electrical activity of neural cells derived from murine bone marrow stromal cells. *Neuroendocrinology Letters*, 査読有、33, 2012、177-182, <http://www.nel.edu/home.htm>
- ② Shigemasa Tomioka, Pentobarbital inhibits glucose uptake, but not water transport by glucose transporter type 3. *NeuroReport*, 査読有、23, 2012、687-691, doi:10.1097/WNR.0b013e328355d6fc
- ③ Shigemasa Tomioka, Water transport by glucose transporter type 3 expressed

- in *Xenopus* oocytes. NeuroReport, 査読有、23、2012、21-25、
doi:10.1097/WNR.0b013e32834da877
- ④ Mileva Ratko Karabasil, Takahiro Hasegawa, Ahmad Azlina, Nunuk Purwanti, Chenjuan Yao, Tetsuya Akamatsu, Shigemasa Tomioka, Kazuo Hosoi, Effects of naturally occurring G103D point mutation of AQP5 on its water permeability, trafficking and cellular localization in the submandibular gland of rats. Biology of the Cell, 査読有、103、2011、69-86、
doi:10.1042/BC20100086
- ⑤ Shinji Ide, Reiko Tokuyama, Purevsuren Davaadorj, Masashi Shimozuma, Shuku Kumasaka, Seiko Tatehara, Kazuhiro Satomura. Leptin and vascular endothelial growth factor regulate angiogenesis in tooth germs. Histochem Cell Biol. 査読有、135、2011、281-292, doi:10.1007/s00418-011-0789-z.
- ⑥ Masashi Shimozuma, Reiko Tokuyama, Seiko Tatehara, Hirochika Umeki, Shinji Ide, Kenji Mishima, Ichiro Saito, Kazuhiro Satomura. Expression and cellular localization of melatonin-synthesizing enzymes in rat and human salivary glands. Histochem Cell Biol. 査読有、135、2011、389-396, doi:10.1007/s00418-011-0800-8.
- ⑦ Masashi J Honda, Mari Imaizumi, Hiroyuki Suzuki, Satoshi Ohshima, Shuhei Tsuchiya, Kazuhiro Satomura. Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 査読有、111、2011、700-708, doi:10.1016/j.tripleo.2010.08.004.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 重正 (TOMIOKA SHIGEMASA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：70188770

(2) 研究分担者

里村 一人 (SATOMURA KAZUHITO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：80243715

(3) 連携研究者

()

研究者番号：