

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861309

研究課題名(和文) TNF- α を分子標的とした神経修復型 Drug Delivery System の開発

研究課題名(英文) Development of drug delivery system for nerve repair

研究代表者

岩月 克之 (Iwatsuki, Katsuyuki)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90635567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：新たな Drug delivery system として可能性を秘めている、(Carboxymethylcellulose-Phosphatidylethanolamine) CMC-PEゲルの有効性について絞扼性神経障害で検証した。シリコンチューブでラットの坐骨神経を3か月間絞扼し、チューブ除去後1、2及び3か月時点で、運動神経伝導速度検査、前脛骨筋筋湿重量、組織学的解析及び、引っ張り強度試験をおこなった。ゲル群はCONTROL群に比べ有意に神経機能の回復を示していた。また、遺伝子発現検査で、炎症性サイトカインを抑える可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop a novel drug delivery system for nerve repair. We have developed a novel sodium carboxymethylcellulose (CMC)-derived hydrogel in which phosphatidylethanolamine (PE) was introduced into the carboxyl groups of CMC. We used a rat model of chronic nerve compression with silicon tube in sciatic nerve. Biomechanical analysis to assess perineural adhesion, electrophysiological evaluation of motor nerve conduction velocity (MCV), wet muscle weight measurements (tibialis anterior), and histological evaluation, morphometric analysis were performed at 1, 2 and 3 months after removal of silicone tube. These results suggest that the gel enhanced axonal recovery after chronic nerve compression. The result of real time PCR showed that the gel reduced expression of inflammatory cytokines. The gel may become the useful material for the drug delivery system.

研究分野：整形外科学

キーワード：CMC-PE TNF- α nerve pain

1. 研究開始当初の背景

日本の全人口の 20%が慢性疼痛を訴え、その中で治療に満足している人は約 4 分の 1 に留まるとの実態が明らかとなり、慢性疼痛への対処が大きな社会問題として浮上してきた。慢性疼痛は神経障害性疼痛と侵害受容性疼痛が複雑に絡み合う病態を呈するが、特に神経障害性疼痛は難治である。アメリカの統計では神経障害性疼痛患者が約 200 万人も存在し、疼痛に対する経済的、社会的損失は極めて大きいとされる。従来慢性疼痛患者に対しては主に投薬や神経ブロックなどの保存治療が適用されてきたが、近年神経に対する外科的介入も急速に拡大している。しかし、神経縫合術、神経剥離術、神経除圧術と行った外科治療は適切に行っても手術後にも愁訴が残存することが稀ならず見られ、治療効果を高める何らかの補助療法の必要性が指摘されている。

2. 研究の目的

carboxymethylcellulose

-phosphatidylethanolamine (CPC-PE)ゲル (図1) にTNF阻害剤を加えることで、神経障害の直接修復に加え、神経障害性疼痛発生予防効果が期待できる。本材は局所投与により用いるため、副作用を心配することなく神経剥離や除圧手術 (外傷後、手根管症候群、肘部管症候群、腰部脊柱管狭窄症、椎間板ヘルニアなど) に十分量を適用可能であり、とりわけ脊髄腫瘍、末梢神経腫瘍など神経内に操作が及ぶ際には有用が高いと考えられる。このような局所の神経修復剤としての可能性を探る。

3. 研究の方法

雄のルイスラット、初回手術時生後 8 週 (体重 200-250 g) を用い、SHAM 群、CONTROL 群、CMC-PE 群の 3 群を作製した。

SHAM 群は初回、初回から 3 か月後の手術の 2 回とも、右坐骨神経までの展開を行った。残りの 2 群は初回手術時に内径 1.3mm、長さ 1cm のシリコンチューブを右坐骨神経に巻きつけ、4-0 ナイロン 2 本で固定した。3 か月後にシリコンチューブの除去を行い、CMC-PE ゲルを使用しない CONTROL 群、使用する CMC-PE 群とした。CMC-PE ゲルは、1.0wt% を 0.5mL/個体で用いた。

CMC-PEゲルの癒着防止効果及び神経機能回復効果を評価するため、除圧後1、2及び3か月後の右坐骨神経を用いて、運動神経伝導速度検査、引っ張り強度試験及び筋湿重量(前脛骨筋、腓腹筋)検査を実施した。

加えて、右坐骨組織を採取し、Hematoxylin Eosin (HE)染色、Masson trichrome 染色及びトルイジンブルー染色による脱髄の評価を行った。神経機能改善効果の組織学的評価としてエポン包埋標本のトルイジンブルー染色を行った。絞扼性神経障害の影響を受けやすい神経の外側、神経上膜に接する直径 100 μ m の円の内側に含まれる有髄線維の軸索数及び軸索面積を ImageJ を用いて定量的に評価した。

炎症性サイトカインの遺伝子発現解析のため、除圧後の右坐骨神経から RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を使用し mRNA を抽出し、cDNA は High-Capacity RNA to cDNA master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) で合成した。TNF- α 、IL-6 及び IL1- β について real time RT-PCR で測定した。サンプルは 50 μ L、95 $^{\circ}$ C 10 分の後、95 $^{\circ}$ C 15 秒、60 $^{\circ}$ C 1 分を 40 サイクル行った。内因性コントロールとして β -Actin を使用し、 2^{-Ct} 法で計算した。

3 群間の比較は ANOVA を用い検定を、2 群間の比較は Student's t 検定を行った。

4. 研究成果

除圧後 2 及び 3 か月で、CONTROL 群に対して、CMC-PE 群で有意に運動神経伝導速度の改善がみられた。除圧後、CONTROL 群に比べ、CMC-PE 群は有意に引っ張り強度が低く、癒着を抑えていた。前脛骨筋筋湿重量は除圧後、CONTROL 群に対して、CMC-PE 群で有意に前脛骨筋の筋湿重量の低下を抑えていた。

Hematoxylin Eosin (HE) 染色、Masson trichrome 染色では癒着形成をおさえていた (図 2)。一般に絞扼性神経障害を受けた際に神経細胞は辺縁より小型化、脱髄を起こす。今回は神経線維の面積を測定し小型化からの回復を確認した。2 か月時での面積は CMC-PE 群が CONTROL 群と比較し有意差をもって大きかった。3 か月時点では CONTROL 群も改善を認めており CMC-PE 群との有意差を認めなくなっていた。軸索数は 1 か月時をのぞき 2 群間に有意差をみとめなかった。軸索面積は術後 1 か月時点では約二倍の差を認め、有意差は 2 か月まで維持されていた。3 か月時点では Control 群も改善しており有意差を認めなくなっていた (図 3)。

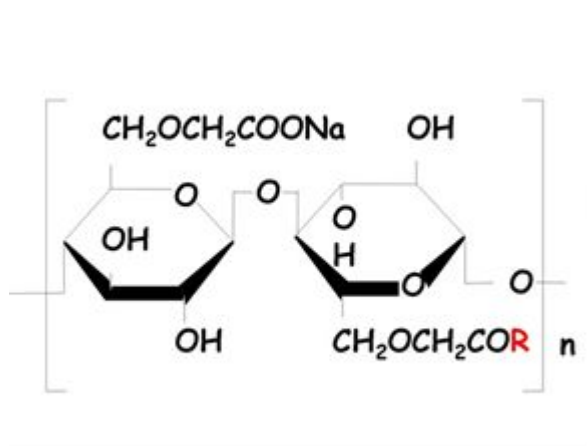
生化学的検査では 1 か月時点では 2 群間の比較において、IL-6 は CMC-PE 群で有意差を認めて低かった。また IL-1 も $P=0.06$ と統計学的有意差は無いが発現量は低下傾向であった。

ラット坐骨神経絞扼モデルに対し検証を行い、除圧後、運動神経伝導速度検査、前脛骨筋筋湿重量で CMC-PE ゲルは CONTROL 群に比べ有意に神経機能の回復を示していた。また、組織学的解析や引っ張り強度試験から

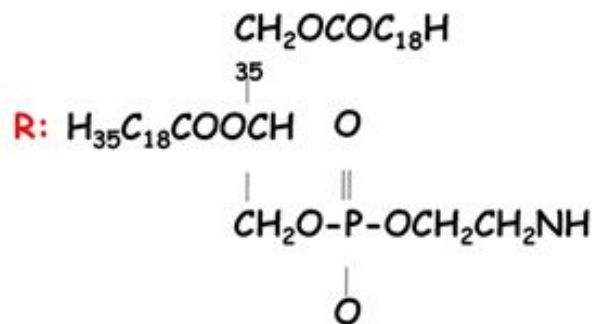
CMC-PE ゲルの癒着防止効果が示すことができ、神経機能の回復が促進された可能性が考えられる。また、遺伝子発現検査で、炎症性サイトカインを抑える可能性も示唆され有用な drug delivery の薬剤となりうる。

図 1

carboxymethylcellulose
-phosphatidylethanolamine ゲルの構造



sodium carboxymethylcellulose



phosphatidylethanolamine

図 2

除圧後 3 か月での
Hematoxylin Eosin 染色(左列)
Masson trichrome 染色(右列)

SHAM 群 (1 段目)
CONTROL 群 (2 段目)
CMC-PE 群 (3 段目)

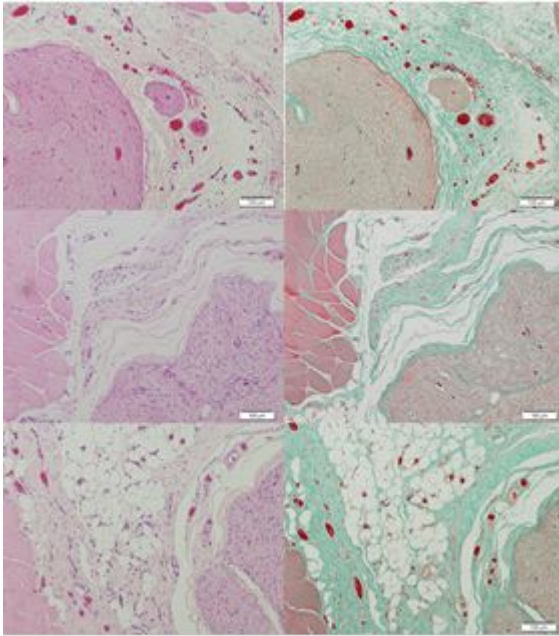
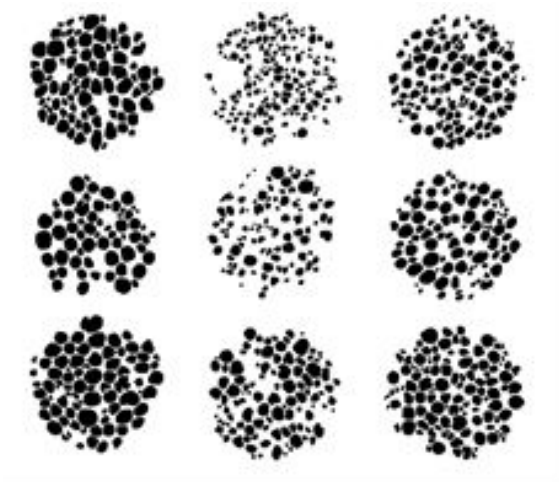


図 3
 神経線維面積の測定
 SHAM 群 (左列)
 CONTROL 群 (中央列)
 CMC-PE 群 (右列)

1 段目 除圧後 1 か月
 2 段目 除圧後 2 か月
 3 段目 除圧後 3 か月



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 6 件)

Hideki Urano, Ryogo Nakamura, Katsuyuki Iwatsuki, Michiro Yamamoto, Shigeru Kurimoto, Hitoshi Hirata
 Novel anti-adhesive CMC-PE hydrogel significantly enhanced functional recovery after surgical decompression in an animal model of entrapment neuropathy
 6th Combined Meeting of American Society for Surgery of the Hand and Japanese Society for Surgery of the Hand Lahaina, USA 2015, 3, 29- 4, 1

岩月克之 浦野秀樹 遠藤信幸 中野智則 石井久雄 大西哲朗 西塚隆伸 倉橋俊和 水島秀幸 栗本秀 山本美知郎 平田仁
 癒着防止による神経機能の回復
 第 41 回日本マイクロサージャリ 学会 京都テルサ (京都府、京都市) 2014 年 12 月 4 日 5 日

浦野秀樹 岩月克之 山本美知郎 大西哲朗 栗本秀 平田仁 遠藤伸幸
 癒着防止剤 C M C - P E ゲルは絞扼神経障害除圧後の神経修復を早める
 第 29 回日本整形外科基礎学術集会 城山観光ホテル (鹿児島県、鹿児島市) 2014 年 10 月 9 日 -10 日

Katsuyuki Iwatsuki, Hideki Urano, Tetsuro Ohnisi, Michiro Yamamoto, Nobuyuki Endo, Hitoshi Hirata
 Prevention of perineural adhesion makes functional recovery of the chronic nerve compression syndrome
 69th American Society for Surgery of the Hand Annual Meeting Boston, USA
 2014,9,18-20

浦野秀樹 岩月克之 山本美知郎 平田
仁 遠藤信幸

CMC-PE ゲルの絞扼性神経障害に対する術後
早期の機能回復効果
第 57 回日本手外科学会 沖縄コンベンショ
ンセンター(沖縄県、西原町) 2014 年 4 月
17 日-18 日

Tetsuro Ohnisi, Hideki Urano, Katsuyuki
Iwatsuki, Nobuyuki Endo, Michiro Yamamoto,
Hitoshi Hirata

Functional recovery of the chronic
compressed nerve and Prevention of
perineurial adhesions using novel
polysaccharide derived hydrogel.
2nd International Symposium on Peripheral
Nerve Regeneration Torino, Italy
2014, 1, 24-25

6 . 研究組織

(1)研究代表者

岩月 克之 (Iwatsuki Katsuyuki)
名古屋大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90635567

(2)研究分担者

なし