

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25861357

研究課題名(和文) 神経分化因子を用いた神経再生制御による神経障害性疼痛治療方法の開発

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・医学部附属病院・助教

研究者番号：90515090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Notch signalを過剰発現する事で細胞の中期(3-4日間)の生存率に影響が出るが、CNTFやEGFやBDNFで生存率の向上は現時点では認められなかった。低酸素暴露による生存率の向上を目指し、18%、15%での低酸素環境下での細胞生存率についてさらなる検討を行ったが上記低酸素環境における細胞生存率の向上は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Overexpression of Notch signal reduce the survival rate of the middle stage (3-4 days) of the cells, but improvement of the survival rate by CNTF, EGF and BDNF was not recognized at the present time. We aimed to improve the survival rate by exposure to hypoxia and further investigated the cell viability in low oxygen environment at 18% and 15%, but improvement of cell viability in the hypoxic environment was observed There was not.

研究分野：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出現、慢性疼痛は非常に多くの罹患者が存在する。慢性痛自体の苦痛は相当に強く、その背景には症状自体が一日を通じて持続的に存在する、あるいは突発的ではあるが疼痛の出現が頻回に繰り返されることが大きく関係している。更にこのような症状出現状況を伴う慢性疼痛は、罹患者にとって苦痛だけでなく、日常生活、ひいては人生そのものの質を著しく低下させる。特に、神経障害性疼痛と呼ばれる疼痛は、神経組織（神経線維や神経細胞そのもの、周囲の神経グリア細胞）の障害が原因のため、日常的に使用される消炎鎮痛薬の類いでは効果が少ない。効果的な治療方法が限られるために、神経障害疼痛は治療が難しい疾患の一つとして知られている。このため、外科手術でも侵襲性の高い手技はもちろん、単純な外傷や疾病でも神経障害が起りやすい受傷場所や疾患などでは、どのようにして神経組織の障害を最小限に抑え、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。だが、日常臨床では効果のある予防的な対策がとれる状況は限られた症例においてであり、神経障害が確立してしまった症例や神経障害に起因する慢性疼痛に対しての治療は、リハビリなどの保存的治療や認知行動療法を主とした社会心理的治療、神経障害による異常を薬物で修飾することにより疼痛を抑える薬物治療が治療の中心であった。これらは、残存した神経組織の機能維持、補填や神経信号の異常伝達の修飾を治療の拠り所にしたものであり、積極的な神経再生を促進させ神経組織の再構築を目指す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、一度分化した神経組織である成熟脳やその他の成熟神経組織にも未分化細胞

が存在しており、何らかの原因で神経が障害された後など神経組織の修復が必要な状況では、その未分化神経細胞が活性化され神経組織の再生を促す方向に働く可能性が示唆されている。また、いくつかの神経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。

さて、Notchシグナルは発生過程の神経組織中で未分化な神経細胞をその状態に留める働きがあると言われている。代表的な働きである側方抑制と呼ばれる機能は、組織中のある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Notchレセプターを介してNotch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維持すると考えられている。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。だが、対象とする神経細胞の由来や時期により、相反する結果も出ており、研究対象として新規性を期待できると考えた。さらに神経障害性疼痛では障害後の神経グリア系細胞の増殖が疼痛発生のメカニズムの1つと考えられている。このため、グリア系細胞の分化制御により、神経障害が起こった後の早い時期の治療方法の一つとして神経障害性疼痛の移行を防ぐ意味での疼痛治療への応用も期待できると考えた。

2. 研究の目的

低酸素状態を維持するで神経障害モデルを作製する事ができる。この神経障害モデルを用いて、Notch ligand およびその拮抗物質を段階的に用いることにより、グリア系細胞の増殖を予防しつつ、神経組織としての機能を再構築できる可能性がある。今回の研究では、神経細胞系とグリア系の細胞を同時に培養し、Notchシグナル制御物

質それぞれの組織にどのような反応を惹起するか観察する。また 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神経障害の組織的特徴を確認する。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、グリア系細胞組織変化を抑制すると同時に、神経細胞の未分化維持ならびにその後の成熟を方向づけさせる条件を決定する。培養細胞での実験結果が確定した後は、ラットモデルを用いて in vivo での神経機能評価を行う。動物ではオスモティックポンプおよびポリ乳酸徐放粒子を用いて検定物質を局所において持続的に作用させる。当教室では脳虚血後の神経機能温存に関して揮発性麻酔薬の存在意義を報告してきた。また、神経障害後の再生促進に関しては、高濃度局所麻酔薬の作用、ならびに、暴露後の神経栄養因子による神経突起伸長促進を報告している。

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) の分布や出現頻度が変化するかどうかを免疫蛍光染色により解析する。さらに Notch signal を過剰発現する事で細胞の中期 (3-4 日間) の生存率に影響が出る事がわかっている。細胞マーカーの変化を観察するにあたっては、この時期の生存率を向上させる必要があり、まずは生存率向上のための神経成長因子の同定が必要であると考え。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。

脳虚血後の神経系細胞の反応を知る目的で、低酸素暴露後の回復過程で神経系細胞の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変化するかどうかを細胞系統ごとに解析する。また、BrdUの取り込みを観察し各細胞系統の分裂能に変化が起こるのかどうか明らかにする。さらに、Notch シグナル関連物質 (NICDやHes1など) の分布や出現頻度に変化が起きるのかどうかを明らかにする。

Notch シグナルの過剰発現による生存率の向上がはかれない場合は、低酸素暴露によりその生存率に変化がある可能性があるため低酸素暴露による神経細胞の変化を優先的に確認する予定である。また、ガバペンチン、プレギャバリンの低酸素暴露後の回復過程における神経系細胞への影響やその効果等も同様の細胞を使用して行なう。

低酸素暴露後の神経系細胞に対する Notchシグナルの役割の解明

前年度までに得られた研究成果を基にして、低酸素暴露後の回復過程にNotchシグナルやその拮抗物質を作用させ、それぞれの神経系細胞がどのような反応を起こすのかを解析する。その過程で神経系前駆細胞の誘導とその後の成熟、glia細胞の増殖コントロールなど神経回路網を再構築するのに必要な各細胞系統間のバランスをとるのに必要な条件を明らかにする。

まずは、残存細胞からの神経系前駆細胞

への先祖帰りと成熟神経細胞への誘導を Notchシグナルやその拮抗物質の時間的な調整によりなし得るかを検討する。さらに、神経系の回復過程で問題となるgliaの増殖を抑えられるかを明らかにする。神経前駆細胞やグリア細胞などの共培養下でそれぞれの作用を空間的に限定して発現できるかどうかを検討する。

4. 研究成果

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変化する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。細胞マーカーの変化を観察するにあたっては、この時期の生存率を向上させる必要があり、まずは生存率向上のための神経成長因子の同定が必要であると考え、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かどうかを引き続き CNTF にて実験を繰り返したが、生存率の向上は認められなかった。また、EGF や BDNF にても同様の実験を行なったが生存率の向上は現時点では認められなかった。低酸素暴露による生存率の向上を目指し、18%、15%での低酸素環境下での細胞生存率についてさらなる検討を行ったが上記低酸素環境における細胞生存率の向上は以前、認められなかった。また、幼若脳神経細胞に対する麻酔薬の影響を再検討し、総説として論文投稿するとともに、神経障害性疼痛治療の一方法である硬膜外カテーテルのトラブルへの対処方法について検討し、執筆した。

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1件)

Kenichi Sekimoto, Masaru Tobe, Sigeru Saito, Local anesthetic toxicity: acute and chronic management, Acute Medicine & Surgery 2017 DOI 10.1002/ams2.265 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

関本研一, 三枝里江, 齋藤繁 群馬大学医学部緩和ケアチームにおけるプレガバリン使用症例の検討 日本麻酔科学会第60回学術集会 2013.5.24 ロイトン札幌(札幌市)

〔図書〕(計1件)

関本研一, 齋藤繁, (稲田英一 編) 麻酔科医のための困った時の3分コンサルタント: 硬膜外カテーテル切断時 克誠堂出版株式会社 2017 192-194

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔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・医学部附属病院・助教
研究者番号: 9515090