

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592211

研究課題名(和文)がん性疼痛機序解明研究と内因性モルヒネ遺伝子導入による新しい鎮痛法の開発

研究課題名(英文)Gene transfection with endogenous opioid in the intractable pain models and cancer pain models.

研究代表者

男澤 朝行(OZAWA, TOMOYUKI)

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：60375706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：難治性疼痛へと推移することが多い神経障害性疼痛やがん性疼痛がモルヒネ抵抗性である機序を明らかにし、将来的に新たな鎮痛方法を確立する手がかりとすることを目標に考えた。さらに副作用なく強力な鎮痛作用を長期に得ることを目的とし、エンドルフィンの前駆体proopiomelanocortin (POMC)を体外衝撃波RSWの使用により遺伝子導入を試みた。神経障害性疼痛モデルがん性疼痛モデルを作成、POMCの筋注と同部位へRSWを照射し遺伝子導入を行った。

研究成果の概要(英文)：We established the new cancer pain model in rats to investigate new treatment for the cancer pain. Furthermore, this study evaluated the effects of POMC (proopiomelanocortin, the precursor for μ -endorphin, an endogenous opioid) gene transfection using radial shock waves (RSWs). We used mainly two models; neuropathic pain model, cancer pain model. POMC gene transfection suppressed CGRP expression in the DRGs, microglial activation in the dorsal horn of the spinal cord, and pain behavior. These findings suggest the effectiveness of POMC gene transfection using RSWs for the treatment of neuropathic pain, and cancer pain, without side effects for a long time.

研究分野：医歯薬学

キーワード：難治性疼痛 内因性オピオイド 体外衝撃波 遺伝子導入 神経障害性疼痛 椎間板性腰痛 proopiomelanocortin 炎症性疼痛

1. 研究開始当初の背景

痛みは病の徴候・愁訴として最も多く、古くより医療の原点とされている。2003年の米国での痛みによる労働生産力損失推計額は年間約9兆円と試算され、米国議会では2001年からの10年間を痛みの10年とし痛みをめぐる問題に国家レベルで取り組んでいる。近年、我が国でも高齢化の進行に伴い変性疾患が増加しており、慢性化し難治性疼痛となる症例も多くなっている。近年の腰痛関節痛の生涯罹患率は85-90%とされ、また日本の総人口のうち約13%がなんらかの慢性痛を持つと報告されている。特にがんの転移性脊椎腫瘍など神経浸潤の場合は原疾患の治療が難しい場合もあり、このような痛みは臨床の場において治療に難渋することが多い。

慢性疼痛には通常の鎮痛薬はあまり有効でないこととされ、そのような難治性疼痛や癌性疼痛に対してはモルヒネなどのオピオイドが広く使用される。しかし骨転移による癌性疼痛ではモルヒネ鎮痛効果は低下するとされており、また神経障害性疼痛でも炎症性疼痛に比べモルヒネ抵抗性とされている(Kohno T et al. Pain 2005)。しかし癌性疼痛や神経障害性疼痛がモルヒネ抵抗性となる詳細な機序は未だ不明である(Kawamata T et al. Neuroscience 2008)。さらにモルヒネは強力な鎮痛作用を持つ一方、実際の治療では依存性・耐性や呼吸抑制などの重篤な副作用が懸念される。モルヒネの主な受容体である μ オピオイド受容体には遺伝子多型が存在するため個体により発現・分布・サブタイプが異なり、このため効果や副作用の有無に個人差が生じると考えられている。モルヒネ抵抗性のため使用量が増えることが副作用リスクの増大の一因と考えられる。近年ではオピオイド貼付剤も発売され以前に比べると使用しやすくなっているが、特に高齢者においてやはり副作用が問題となっている。一方、脳内モルヒネとして知られている内因性オピオイドペプチドは、ランナーズハイなどの作用で一般的にも有名である。その中でもエンドルフィン β はモルヒネの20倍ともいわれる強力な鎮痛作用を持ち、内因性であるため副作用は全くないが、しかし生体での代謝が早いために実際には臨床応用はされていない。そこで、 β エンドルフィンを生体内に遺伝子導入することができれば、副作用なく、強力な鎮痛作用を、長期間得ることができるのではないかと考えた。われわれは以前より椎間板性腰痛を中心とした運動期疼痛に関連した研究を行っている。また腰痛・関節痛・神経痛機序の基礎実験として、椎間板穿刺による椎間板傷害モデル、

坐骨神経傷害モデル、足底炎症性モデル、坐骨神経への髄核留置による神経根性疼痛モデル、腰部脊柱管狭窄による馬尾神経障害モデルと様々な病態における疼痛機序の検討と薬物の効果を検討してきた。坐骨神経傷害や腰椎椎間板ヘルニアによる神経根傷害は患側足底の痛覚過敏やアロディニアを呈する(Murata Y et al. Neurosci Lett. 2005, Spine. 2005, Spine. 2006, Ohtori S et al. J pain 2004)。腰部脊柱管狭窄症による馬尾損傷モデルでは神経傷害による運動障害をもたらすが痛覚鈍麻の現象を示す(Ito T et al, Spine 2007)。疼痛部位局所の痛みの発生や感覚神経においてその疼痛伝達を誘導する因子は後根神経節内の疼痛伝達ペプチドであるP物質やCGRPであり、神経栄養因子NGFやTNF alpha、脊髄でのTNF alphaやCOX-2などのサイトカインが複雑に関与することなどを見出した(Ohtori S et al.1999-2007)。これまでに積み上げてきたこれらの基礎的研究の手法と痛みのメカニズムの研究を元に、上記の問題に着眼し研究計画を検討した。

2. 研究の目的

まず、難治性疼痛へと推移することが多い神経障害性疼痛やがん性疼痛がモルヒネ抵抗性である機序を明らかにし、将来的に新たな鎮痛方法を確立する手がかりとすることを目標に考えた。さらにこれまでに報告の無い脊椎転移による神経障害性疼痛のモデルを作成し、これらをもとにし最終的に内因性オピオイドの遺伝子導入へ発展させることを計画した。

3. 研究の方法

(1) モルヒネ抵抗性の機序解明

難治性疼痛へと推移することが多い神経障害性疼痛やがん性疼痛がモルヒネ抵抗性である機序を明らかにするために、神経障害モデルや骨がんモデルを作成し μ オピオイド受容体の発現を調査する予定である。また両モデルの疼痛因子の検討や感覚神経系の特性を免疫組織化学染色やELISA法による定量を用いて検討する。この詳細な機序を明らかにすることによって、臨床での有効な鎮痛効果の獲得を目指すことを目的とした。マウス、ラットに対し腹腔麻酔下、還流固定を行った後、椎間板、馬尾神経、後根神経節、硬膜を摘出する。クラリオスタットで10 μ mの凍結切片作製、スキムミルクでブロッキングを行った後、抗 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体抗体(1:1,000、ケミコン社)を用いて免疫組織化学染色を行う。さらに椎間板や周辺組織を支配する後根神経節細胞を

決定するために還流固定 10 日前に神経トレーサーである Fluoro-gold (2 crystals: Fluorochrom 社) を椎間板や周辺組織に注射しておく。それらの組織を支配している後根神経節細胞群に関する抗 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体抗体 (1:1,000、ケミコン社) を用いて免疫組織化学染色を行う。蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡で観察予定である。発現量に関しては各サンプルを用い、抗 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体抗体を用いた Western blotting、キットを用いた ELISA で検討を行う。

また Adeno-Virus を用い、マウス、ラット、ヒトの椎間板細胞や後根神経節細胞を用い、*in vitro* での遺伝子導入を行う。ラット、マウス腰椎椎間板を腹腔麻酔下で採取する。ヒト椎間板は手術時に採取する。それぞれを酵素処理後、単層培養を行う。すでに、ラット腰椎椎間板線維輪の培養とヒト椎間板培養は成功している。また、神経細胞として新生児ラット(P7)の後根神経節を摘出、単離させた後根神経節を使用する。体外衝撃波を用いた遺伝子導入は過去の報告に従い行う。マウス、ラット、ヒトの培養椎間板細胞や培養軟骨組織に約 100 倍の効率で遺伝子導入できることは確認済みである。*In vivo* での導入方法を示す。筋肉内には 10 μ l の直接注入を行う。椎間板や硬膜、後根神経節へは露出後、同様に 10 μ l のマイクロシリンジを使用して注入する。注入後、放射型体外衝撃波の装置 (EMS 社、ドイツ) で照射を行う。導入遺伝子から実際にタンパクが作製されているかは以下の方法を用いる。培養細胞は導入後 1 週間の細胞を用いる。生体内の組織は還流固定後、椎間板、周辺組織、馬尾神経、後根神経節のクラリオスタットで 10 μ m の凍結切片を作製する。発現様式は Lac-Z、Endomorphin (1:1,000、ケミコン社) は免疫化学的手法を用い調べる。定量は ELISA キットを用いる。

神経傷害モデルにはラット椎間板ヘルニアモデル、坐骨神経圧挫モデル、腰部脊柱管狭窄症モデルを用いる。腹腔内麻酔 (ネプタール: 0.20ml) で麻酔後、坐骨神経傷害は鑷子で 2 秒間坐骨神経をピンチする。椎間板ヘルニアモデルは尾椎髄核を摘出し、L5 神経根上に留置後同様に鑷子で 2 秒間ピンチする。腰部脊柱管狭窄症モデルは L4/5 高位に厚さ 1 mm のシリコンシートを挿入する。現時点でこれら 3 種類のモデルで 1 ヶ月以上にわたり疼痛過敏や、運動障害が個体により生じることは報告済みであり、十分準備段階は整っていると考える。

疼痛行動評価は熱刺激と圧刺激で評価する。ともに主観的要素が入らないように自動測定器を用いる (UGO Basile; Italy)。生体内の組織は還流固定後、後根神経節と脊髄を摘出後、免疫組織学的手法を用いる。疼痛関連因子の検討としては早期反応性で、痛みとの関

連性が高いとされている抗 Map Kinase (P38, JUNK, 1:200、サンタクルーズ社) 抗体を、慢性的な反応である神経ペプチドの抗 substance P、CGRP 抗体 (1:2,000、ケミコン社) の増加、神経細胞内やシュワン細胞内の TNF alpha (1:100、ケミコン社) の増減を検討する。定量はキットを用い ELISA で行う。

(2) 脊椎転移による神経浸潤モデルの作成

さらに、脊椎における腫瘍の神経浸潤による痛みの機序については過去に全く報告が無い。本研究ではマウス脊椎に腫瘍細胞を移植することにより脊椎腫瘍の神経浸潤疼痛モデルを作成することにより、神経浸潤による神経障害性疼痛の詳細な疼痛発生機序とその伝達機序を明らかにする。現在までに下肢骨転移モデルに対して内因性オピオイド遺伝子導入を行いその鎮痛効果を検討しており、将来的には癌神経浸潤に対して本法による新たな鎮痛方法を開発することも目的の一つである。

(3) 内因性オピオイド前駆物質の体外衝撃波による遺伝子導入

エンドルフィンの前駆物質であるプロオピオメラノコルチン Proopiomelanocortin (POMC) の遺伝子を作成し、まずは *in vitro* で培養細胞への体外衝撃波による導入効果、導入効率を調査する。さらに神経組織やその周囲に遺伝子導入を行い、筋線維内や血中におけるそのタンパクとしての発現を確認する。またこれまでの基礎研究を基盤としてこれらの痛みの評価を行う。つまり後根神経節細胞の疼痛因子の発現、脊髄後角でのグリア活性、これらの感覚神経系における炎症性サイトカインの定量、また von Frey test による痛覚閾値や CatWalk system による歩行解析などの行動学的評価などである。

4. 研究成果

神経障害性疼痛モデルには、坐骨神経拘扼モデルを用いた (Bennett GJ et al. Pain 19)。このモデルは、坐骨神経の部分損傷により、機械的アロディニアが強く表れることが特徴である。また癌性疼痛モデルとしては、腫瘍細胞を脛骨へ移植した転移性骨腫瘍モデルと、腰椎椎体へ移植し腫瘍浸潤による神経障害性疼痛モデルを使用した。癌性疼痛モデルに関しては、骨との親和性が確認されているラット前立腺がん細胞とマウス線維芽細胞を既に購入し、以前より培養、継代を行ってきた。この細胞は動物生体内に投与することにより増殖することが報告されており、本研究においても使用可能であると考えた。神経障害性疼痛や癌性疼痛がモルヒネ抵抗性である機序を明らか

にするために、これらのモデルと炎症性疼痛モデルでの μ オピオイド受容体の発現の変化を調査した。また両モデルの疼痛因子の検討や感覚神経系の特性を免疫組織化学染色やELISA法による定量を用いて検討した。この機序を詳細に明らかにすることによって、臨床での有効な鎮痛効果の獲得に向けて有効な足がかりとなり得ると考えている。

脊椎転移モデルの確立のために実験を行った。マウスを正中切開により開腹し経腹膜的に前方より腰椎を展開。マウス線維芽肉腫細胞を、椎体の骨皮質に骨孔を作成し海綿骨内へ注射した。脊椎に腫瘍細胞を移植することにより脊椎腫瘍の神経浸潤疼痛モデルの作成を行った。今後、マイクロCTやMRIによる画像評価も予定している。大腿骨脛骨髄内注射による下腿骨腫瘍モデルは多数報告されているが、脊椎腫瘍の神経浸潤による痛みの研究については皆無である。

我々は以前にAdeno-associated virusを用いて逆行性に腰椎椎間板、神経根、脊髄に、Lac Z遺伝子を導入可能であることを報告した (Watanabe T, et al. J Orthop Sci 2005)。また、ウサギの軟骨細胞においてin vitroで体外衝撃波により遺伝子導入が可能であることを確認し、同研究において、導入効率の良い照射条件を調査済みである。内因性オピオイド遺伝子については、ラットcDNAライブラリーより、目的とするPOMC遺伝子を作成しプラスミドのインサートの配列をシーケンスにより確認し内因性オピオイド遺伝子と配列が同じであることを確認済みである。これを大腸菌のグリセロールストックとして保存している。まずin vitroでSDラット筋線維細胞を作り、POMCを添加、放射状体外衝撃波(RSW)照射により遺伝子導入を行った。その結果、比較的効率よく遺伝子導入が可能であることと有効な照射条件が見出された。さらに、そのうえでin vivoにおいて足底へComplete Freund's Adjuvantを注入した炎症性疼痛モデルラットに対して脳内オピオイドの遺伝子導入を行い、有効な鎮痛効果が得られることを確認した (Yamashita M, et al. SPINE 2009)。

次に同様にin vivoで左腓腹筋にPOMCを筋注、同部位にRSWを照射し遺伝子導入を行った。導入局所の筋線維において エンドルフィンの発現を認め、また、心臓血採血により血液中エンドルフィン濃度をELISA法で定量したところ有意な上昇を認めた。前駆物質であるPOMCの投与とRSW照射によってin

vivoでのエンドルフィンの発現が確認された。

上記を踏まえ以下の実験を計画した。ラット足背にComplete Freund's Adjuvant (CFA)を皮下注射した炎症性疼痛モデル、またラット坐骨神経にchronic constriction injury model (CCI)を用い部分神経損傷を作成した神経障害性疼痛モデル、さらにラット腰椎椎間板を穿刺した腰椎椎間板障害モデルを作成した。モデル作成後、von Frey testとCatwalkを用いて行動学的評価を行った。さらに灌流固定のち後根神経節と脊髄腰膨大部を採取し、疼痛ペプチドのマーカーCGRP、マイクログリアのマーカーIba-1、アストロサイトのマーカーGFAPで免疫組織化学染色を行った。また、飲水量、食事量、排便量を測定し、便秘等の副作用の有無を調べた。

行動学的評価ではラットの疼痛行動が抑制され、後根神経節でのCGRP陽性細胞は有意に減少した。神経損傷によってグリアは活性化し、POMC導入群ではこれらのグリア活性の有意な抑制を認めた。飲水量、食事量、排便量には各群、いずれの期間においても有意な変化は認めず便秘等の明らかな合併症は認められなかった。しかし内因性オピオイドの実用に向けて、予想される課題のうち最も懸念されるものは副作用についてである。この副作用の評価のため、前駆物質プロオピオメラノコルチンにより産生されることが予測される エンドルフィン、ACTH (副腎皮質刺激ホルモン)、MSH (メラニン刺激ホルモン)の血中濃度を測定する予定である。ACTH過剰による症状として、コルチゾールの測定、血圧と血糖値の測定を行う必要性も検討している。

これらの結果よりPOMCの遺伝子導入により、長期間にわたり重大な副作用なく強力な鎮痛作用が得られる可能性が示唆された。現在我が国の高齢化に伴い慢性腰痛などの難治性疼痛患者は増加していると考えられ、今後の新たな治療法となりうると考えている。将来的な臨床応用を目指してさらに基礎実験を重ねていく予定である。

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) 査読有

査読中論文2本

Tetsuhiro Ishikawa, Masayuki Miyagi, Masaomi Yamashita, Hiroto Kamoda, Yawara Eguchi, Gen Arai, Miyako Suzuki, Yoshihiro Sakuma, Yasuhiro Oikawa, Sumihisa Orita, Gen Inoue, Tomoyuki Ozawa, Yasuchika Aoki, Tomooaki Toyone, Kazuhisa Takahashi, Atsushi Yamaguchi,

Seiji Ohtori. In vitro transfection of proopiomelanocortin gene, precursor of endogenous endorphin, by radial shock waves alleviates neuropathic pain. Journal of Orthopaedic Science. Jul; 18(4):636-45. 2013.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔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

男澤 朝行 (OZAWA TOMOYUKI)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：60375706

(2) 研究分担者

豊根 知明 (TOYONE TOMOAKI)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：10407918

大鳥 精司 (OOTORI SEIJI)
千葉大学・医学部付属病院・助教
研究者番号：40361430