

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10559

研究課題名(和文) 侵害受容性、神経障害性、がん性の痛みに対する多角的治療の効果

研究課題名(英文) Development of a new therapy for different incurable pain by combination multiple pain suppression mechanisms

研究代表者

溝淵 知司 (Mizobuchi, Satoshi)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70311800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、異なる難治性疼痛動物モデルに対し、複数の疼痛抑制機構を組み合わせさせて作用させることにより難治性疼痛の新しい治療法を開発することを目指して研究を行った。動物モデルとしては、本研究期間では炎症性、足底切開、神経結紮モデルを作成し行動評価にて妥当なモデルが完成されていることを確認するとともに、特に培養細胞においてはBDNFの発現をより効率的に抑制させるsiRNAを作成したこと、およびエンドルフィンの効率的な発現方法の開発を目指した研究を行った。分泌型のエンドルフィン産生細胞を作成するためにNGF遺伝子とのハイブリッド遺伝子を作成し培養細胞でELISAにて発現を確認した。

研究成果の概要(英文)：In this project, we studied it for developing a new therapy of incurable neuropathic pain by performing of combination multiple pain suppression mechanisms for different severe neuropathic pain animal models. We made inflammatory animal models, plantar incision models and nerve ligation models in this study periods. We confirmed that a proper model was finished by a behavior evaluation and performed the study that aimed at the development of the effective expression method of having made siRNA which made expression of the BDNF inhibited more effectively and the endorphin in the cultured cell in particular. We also made the hybrid gene with the NGF gene to make beta endorphine productive cells of the secretor and confirmed expression by ELISA in a cultured cell.

研究分野：麻酔科学

キーワード：痛み 難治性疼痛 多角的治療

1. 研究開始当初の背景

近年、痛みの研究が盛んに行われ多くのことが解明されてきている。しかし、臨床的にがん性痛や神経障害性痛などの難治性の痛みに効果的な治療法は開発されていない。その理由として、痛みは原因が多様であること、痛みの伝達機構は多くの修飾因子が存在すること、使用する鎮痛薬で副作用が発現すること等が挙げられる。ヒトは元々内因性疼痛抑制系という機能を保持しており、抑制系を賦活させることによる痛みの治療は、外因的な薬物投与や処置よりもより生理的であると考えられる。

本研究代表者は、以前より”痛みからの解放”を目指して基礎研究を行っており、侵害刺激性痛モデル(炎症性、術後痛モデル)、神経障害性痛モデル、がん性痛モデルのすべてを作成し、異なった痛みの病態解明と治療に関し結果を報告している(Sun X. et al: Anesth Analg 98:1093-8, 2004, Kaku R. et al: Anesth Analg 104:936-43, 2007, Obata N. et al: BBRC 408: 139-144, 2011 ほか)。がんの痛みや難治性の痛みは一つの分子にターゲットを絞っても、よい治療効果は得られない。これらを背景に我々は、まだ解決されていないこれら難治性疼痛の新たな治療を開発することを目指して、多角的方面からの痛みの治療法を組み合わせ複数のモデルを使ってその効果を検証する研究を行うことを考えた。

2. 研究の目的

痛みの原因が異なる動物モデルを用いて、我々がこれまで研究してきた疼痛抑制機構を複合して制御することで、がん性痛などの難治性疼痛の新しい治療法を開発することを目的として研究を行う。

研究は、これまで我々が行ってきた成果を基盤に以下の3つのサブテーマを複合させるものである。具体的には、DNA デコイを用いた脳神経由来神経成長因子(BDNF)の発現抑制、Hyperpolarization-activated

Cyclic Nucleotide-gated(HCN)チャネルの機能抑制による自発活動電位抑制による疼痛抑制、 α -エンドルフィンの過剰発現による疼痛抑制を考えた。これらは言い換えると、疼痛惹起物質の発現を抑制し、神経自体の活動性を抑え、内因性疼痛抑制物質を増加させるという、多角的な視点からの疼痛抑制により、難治性の疼痛を治療しようとする方法である。これらの方法を統合することによって、最も鎮痛効果が高く、しかも副作用のない安全な今までにない鎮痛法の開発を目指した。

3. 研究の方法

1) 動物疼痛モデルの作成

1) ラット神経障害性痛モデルの作成

生後6週のSDラットに対して、ペントバルビタール麻酔下に、背部の皮膚を切開し、L4~L6の椎弓を露出する。L5の横突起周囲を剥離後切断し、L5神経を同定、5-0絹糸にて2重結紮する。

2) ラットがん性骨疼痛モデルの作成

注入する腫瘍細胞にはラット rat gland carcinoma(walker256)を用いる。事前に199培地にて10%胎児牛血清を加えた状態で培養しておく。生後6週のSDラットに対して、ペントバルビタール麻酔下に、脛骨上の皮膚を切開する。周囲の血管、筋肉など組織を出来るだけ傷つけないように脛骨近位骨端部を露出させる。23ゲージ針にて骨に穴を開け、0.5mmのドリルで刺入口を形成する。5 μ lのハミルトンシリンジを用いて3 μ lの199培地に浮遊させた 3×10^3 個のwalker256細胞を注入する。リークを防ぐため注入口を骨蠟で塞ぎ、生理食塩水で洗浄後、クリップにて閉創する。術後創部はポビドンヨードにて消毒し、抗生物質を皮下に投与する。

3) ラット急性炎症性疼痛モデルの作成

生後6週のSDラットに対して、ペントバルビタールによる麻酔下に後肢の足底の皮膚を消毒し、足底部に5%ホルマリン50 μ lを

注射する。さらに、別のラットを用い、ラット足底にフロインドアジュバンドを注射しその後の炎症性疼痛行動を観察する。

) 疼痛行動評価

評価 20 分前にラットをケージに移動させて慣らしておく。まず 10 分間、患側の足を舐めたりする自発痛による疼痛行動を観察した後、機械刺激によるアロディニアを測定する。これには von Frey filament を用いて両側ラット足底を刺激し、その逃避反応から up down 法により 50% 反応閾値を測定する。術翌日から、術後 14 日目まで連日行う。以下に述べる遺伝子治療群にも同様に行う。

) BDNF に対するデコイの作成と培養細胞での効果確認

我々が現在まで行ってきた研究の結果を参考にして、10 種類程度のデザインを行い、プライマーを作成し PCR にて制限酵素サイトのついた DNA を作成する。その後 CMV、U6 などのプロモーターを持ったプラスミドにサブクローニングを行い、まず PC12 細胞にて、その効果を確認する。もっとも効率のよいものを選択して動物での実験に用いる。

) 遺伝子治療用ベクターの注入

内因性疼痛抑制物質の過剰発現による疼痛抑制に関する検討

神経因性疼痛モデル、ガン性疼痛モデルに対して、術後 2 日目より、くも膜下カテーテルより、 β -エンドルフィン発現アデノウイルスベクターを注入する。

神経伝達物質発現抑制による疼痛抑制に関する検討

神経因性疼痛モデル、ガン性疼痛モデルには、術後 2 日目より、くも膜下カテーテルより、BDNF に対する DNA デコイおよび shRNA を投与する。

神経興奮性の抑制による疼痛抑制に関する検討

神経障害性痛モデルに対し、術中に神経結紮部位に直接、遺伝子多型チャンネル発現ベ

クターを投与する。術後痛モデルに対して、術中に術野に直接ベクターを投与する。

) 脊髄および脊髄後根神経節のサンプリング

1) Real time PCR 用、2) ウエスタンブロット用、3) 免疫染色用

4. 研究成果

本研究課題では研究期間中、炎症性、足底切開、神経結紮モデルを作成した。一方、多角的治療としては異なる疼痛抑制機能の複合的な賦活を行うこと、すなわち、脳神経由来成長因子 (BDNF) の発現抑制による疼痛抑制、内因性疼痛抑制物質 エンドルフィンの過剰発現による疼痛抑制、HCN チャネル機能抑制による疼痛抑制を計画し、本期間中には、および に関する領域の研究となった。

具体的には、動物モデルを作成し行動評価にて妥当なモデルが完成できていることを確認するとともに、特に培養細胞においては BDNF の発現をより効率的に抑制させる siRNA を作成したこと、および エンドルフィンの効率的な発現方法の開発を目指した研究を行ったことが実績として挙げられる。特にに関して分泌型の エンドルフィン産生細胞を作成するために NGF 遺伝子とのハイブリッド遺伝子を作成し培養細胞で ELISA にて発現を確認した。さらに、エンドルフィン産生アデノ随伴ウイルスの作成のため AAV2 プラスミドへの入れ替えを行い エンドルフィン遺伝子発現を確認した。検討項目として研究課題で掲げた組織学的検討、RNA、蛋白レベルでの変化に関しては、主に RNA レベルで結果を得ている。治療への応用に関しては、動物への投与への検討は十分にできておらず、その原因として、発現が弱いこと、AAV 自体の細胞障害性もしくは NGF 共発現による影響が考えられた。

多角的方面からの難治性疼痛治療を目指

しているが、BDNF の発現抑制および エンドルフィンの過剰発現に関しては検討されているものの、HCN チャネル機能抑制による疼痛抑制についてはまだ検討の段階に入っていない。また、がん性疼痛モデルの作成ではがん細胞の入手まで至らなかった。具体的に 16 週齢ラット雌の視床下部より、エンドルフィン (bEP) をクローニングした。本来、エンドルフィンは大脳皮質前駆物質であるプロオピオメラノコルチン (POMC) に由来する。生体内では何らかのストレス下で POMC から切り出されて下垂体前葉から エンドルフィンが分泌される。本研究では エンドルフィンをクローニングするにあたり、細胞外に分泌しやすいシグナルを付与する必要があると考え、神経成長因子 (Nerve Growth Factor : NGF) を融合した遺伝子の作成を試みた。同じくラット視床下部より NGF をクローニングし、NGF と bEP 遺伝子の間には切断認識配列を挿入した、NGF-bEP 融合遺伝子を作成した。細胞への遺伝子導入はタンデムに発現する蛍光タンパク質 zsGreen を顕微鏡下に確認し、細胞外に分泌された エンドルフィンは ELISA によって確認した。さらにアデノ随伴ウイルスベクターを作成し、細胞への感染により発現を確認したが、mRNA レベルでは確認ができたもののタンパク質レベルでの発現が検出限界を下回り、より精製度の高いウイルスベクターの作成が必要と考えられた。

エンドルフィン産生アデノ随伴ウイルス作製 (結果図あり)

ラット エンドルフィン遺伝子のクローニング;ラット下垂体、視床下部より エンドルフィン遺伝子および NGF 遺伝子を抽出

エンドルフィン遺伝子のプラスミドベクターへの挿入;分泌型の エンドルフィンを作成するために NGF 遺伝子とのハイブリッド遺伝子を作成した。

HEK293 細胞における発現確認 (ELISA)
トランスフェクション後 48 時間の培養上清で エンドルフィンの発現を確認

pIRES プラスミドベクターから AAV2 プラスミドベクターへの入れ替え

AAV2 作製

抽出した AAV2 の遺伝子発現確認

ELISA

EP 発現 AAV の HEK293 細胞への感染後 24 時間後の培養上清中に エンドルフィンを確認した。しかし、Dox なしでも発現を認めることから、リークが多いことが分かった。Dox on/off のコントロールは困難。

NGF-bEP 発現 AAV-2 の感染実験

- HEK293 細胞への感染実験 細胞障害が認められ、細胞内に ZsGreen の発現を認める
- rtPCR でも エンドルフィン遺伝子発現を確認
- C6 細胞への感染実験 明らかな細胞傷害を認め、生存細胞はわずか。b-Endorphin の発現は弱い。

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 0 件)
- [図書](計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝淵 知司 (MIZOBUCHI, Satoshi)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 70311800

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

野村有紀 (NOMURA, Yuki)