

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20077

研究課題名(和文) 難治性疼痛に対する新しい遺伝子治療法の基礎的検討

研究課題名(英文) Molecular biological study of novel gene therapy for pain that is difficult to treatment.

研究代表者

神田 恵 (KANDA, Megumi)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：50516820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：HIVに関連した神経障害性疼痛に関するメカニズムは、いまだ解明されていない。また、近年がん治療などで臨床応用が採用され始めているウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、痛みの治療に対しては効果が不明である。我々の研究結果より、HIV関連神経障害性疼痛モデルラットにおいて、脊髄TNFを抑制するウイルスベクターが有用であることを示し、その機序を一部解明することが出来た。本研究で予想される結果は、ウイルスベクターを用いた疼痛管理の臨床的有益性に大いに貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：While effective antiretroviral treatment makes human immunodeficiency virus (HIV)-related death decreased dramatically, neuropathic pain becomes one of the most common complications in patients with HIV/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The exact mechanisms of HIV-related neuropathic pain are not well understood yet, and no effective therapy is for HIV-pain. Evidence has shown that proinflammatory factors (e.g., tumor necrosis factor alpha (TNF- α)) released from glia, are critical to contributing to chronic pain. Preclinical studies have demonstrated that non-replicating herpes simplex virus (HSV)-based vector expressing human enkephalin reduces inflammatory pain, neuropathic pain, or cancer pain in animal models. In this study, we describe recent advances in the use of HSV-based gene transfer for the treatment of HIV pain, with a special focus on the use of HSV-mediated soluble TNF receptor I (neutralizing TNF- α in function) in HIV neuropathic pain model.

研究分野：疼痛、ペインクリニック、麻酔

キーワード：遺伝子治療 ウイルスベクター 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、種々の疾患の原因、病態における活性酸素の役割が明らかになりつつある。活性酸素は生体膜、核酸、蛋白、生体内活性因子などに種々の障害を与え、膜脂質の過酸化反応、酸化的 DNA 損傷、蛋白変性などを引き起こすだけでなく、多くの生命現象の情報伝達の制御因子としても作用している。活性酸素は神経障害性疼痛の持続に関連することが報告されており (J Neurosci 2009;29:159-68.)、様々な疼痛モデルにおいて、活性酸素の蓄積の大部分が脊髄後角ミトコンドリアで認められている (Behav Brain Res 2006;166:159-65. Pain 1999;79:31-7. J Neurotrauma 2004;21:805-16. Pain 2004;111:116-24.)。申請者は、神経障害性疼痛モデルラットにおいて脊髄後角神経細胞内の活性酸素が有意に増加することを報告した (Kanao M, et al. Anesth and Analg 2015;120: 1394-404.)。

(2) Drp1 (dynamin-related protein 1) は、GTPase であり、ミトコンドリアの fission を触媒する。ミトコンドリアの fission は、活性酸素の効果と産生の機序の核を担っており、神経障害性疼痛において重要な役割を果たしている。Levine らは、HIV 治療薬投与または抗がん剤による化学療法によって引き起こされたラットの神経障害性疼痛が、Drp1 アンチセンスの投与によって有意に抑制されたことを報告している (J Neuroscience 2011. 31:11404-11410.)。

(3) 神経障害性疼痛には、炎症性サイトカインが関連している (J Intern Med 2005;257:139-55. Neuroscientist 2004;10:40-52)。サイトカインの一つである TNF α は、活性化マクロファージやリンパ球と同様に中枢神経系の活性化グリア細胞で発現する (Nat Rev Neurosci 2009;10:23-36. Curr Neuropharmacol 2013;11:499-512.)。過去には、脊髄損傷モデル (Ann Neurol 2006;59:843-51.)、脊髄神経結紮モデル (Gene Ther 2007;14:1010-6. Brain Behav Immun 2008;22:114-23.)、ラットの後足踵部にホルマリンを注射した神経障害性疼痛モデル (Gene Ther 2008;15:183-90. J Biol Chem 2008;283:20186-97.) で、脊髄の TNF α が増加することが報告されている。

(4) 本研究では過去の報告と我々のこれまでの研究成果を進展させ、神経障害性疼痛モデルラットへのアンチセンス法を用いた遺伝子治療による鎮痛効果を行動解析ならびに分子生物学的に検討を行うこととしていた。しかしながら、当初予定していたアンチ

センス投与による遺伝子治療の効果が安定しなかったため、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療に変更し、ウイルスベクターの有用性とメカニズムを解明する研究を進めることとした。

2. 研究の目的

現在、臨床における神経障害性疼痛の有効な治療法は確立されていない。活性酸素が神経障害性疼痛の持続に関連することが報告されているが、その機序の詳細は明らかになっていない。本研究の目的は、神経障害性疼痛モデルに対し、炎症性サイトカインの一種である TNF α を脊髄レベルで抑制するウイルスベクターを用いて behavior test および脊髄後根での分子生物学的検討を行い、その鎮痛発現の機序解明と治療の有用性を検討することである。

本研究では、動物行動解析において良好な安定性を示した HIV 関連神経障害性疼痛モデルラットを疼痛モデルに用いることとした。

3. 研究の方法

神経障害性疼痛における TNF α を標的としたウイルスベクターによる遺伝子治療の有効性とそのメカニズム解明のために、次に示す3つの研究を行う。本研究では、動物行動解析において良好な安定性を示した HIV 関連神経障害性疼痛モデルラットを疼痛モデルに用いた。

(1) 神経障害性疼痛モデルの作成

ラットを用いて HIV 関連神経障害性疼痛モデルを作成し、機械刺激性アロディニアの経時的変化を明らかにする。

(2) ウイルスベクターを用いた遺伝子治療による脊髄 TNF α の抑制

TNF α を抑制する HSV ベクター (T0TNFSR) とコントロールベクター (T0Z) をラットに投与し、機械刺激性アロディニアの経時的変化と脊髄後角における TNF α の発現を Western blot 法を用いて検討する。

(3) TNF α を標的とした遺伝子治療と関連因子の検討

TNF α を標的とした遺伝子治療を行うことにより、脊髄後角における活性酸素、下流シグナルと考えられている Wnt5a, pC/EBP β (phosphorylation CCAAT/enhancer binding protein) の発現を検討し、鎮痛機序を解明する。

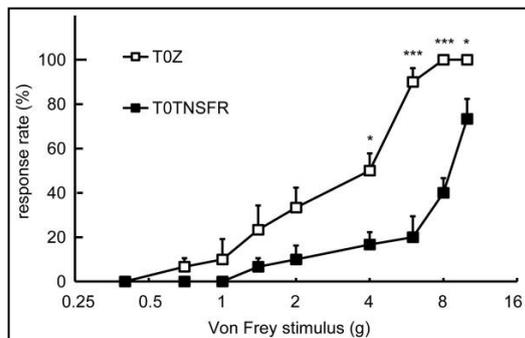
4. 研究成果

(1) HIV 関連神経障害性疼痛モデルラットを作成し、von Frey test により疼痛閾値が減

少し、機械的アロディニアを発症することを示した。

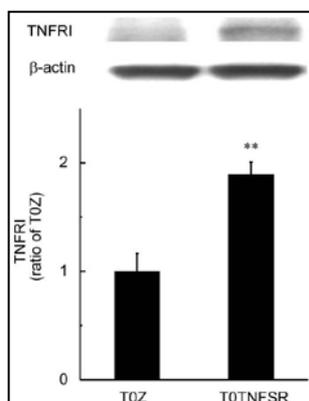
(2) TNF- α を標的としたウイルスベクター‘TOTNFSR’を投与すると、HIV 関連神経障害性疼痛モデルラットのアロディニアが改善されることを示した (図 1)。

図 1 : 動物行動解析



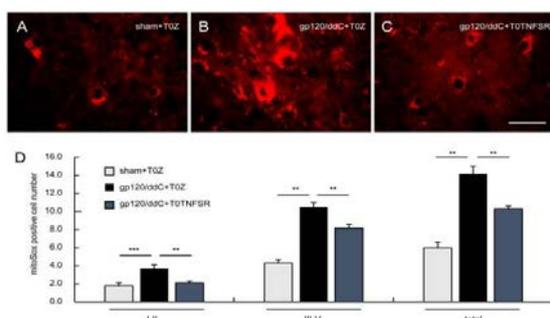
(3) Western blot 法を用いて、TNF- α を標的としたウイルスベクター‘TOTNFSR’を投与すると、脊髄 TNFR1 が増加することを示した (図 2)。

図 2 : ウェスタンブロット法



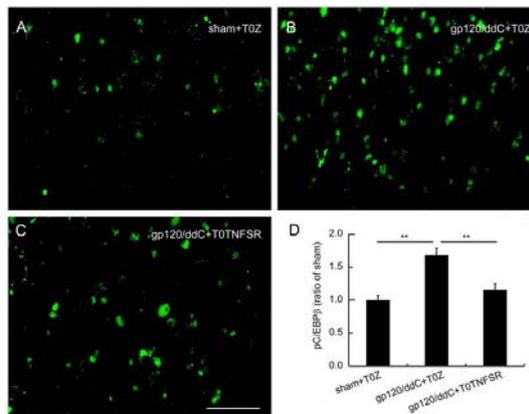
(4) 免疫染色法を用い、疼痛モデルで増加した脊髄の活性酸素が、ウイルスベクター‘TOTNFSR’を投与することにより抑制されることを示した (図 3)。

図 3 : 免疫染色法による活性酸素の評価



(5) 同じく、免疫染色法を用いて、疼痛モデルで増加した脊髄の Wnt5a と pC/EBP β がウイルスベクター‘TOTNFSR’を投与することにより抑制されることを示した (図 4)。

図 4 : 免疫染色法による関連因子の評価



HIV の後に感染または活性化されたグリアは、TNF α のような前炎症性因子を放出する。TNF α -TNF 受容体シグナルは、HIV 関連神経障害性疼痛のモデルにおいて複雑な経路を介して活性酸素または C/EBP β を誘導する。TNF 可溶性受容体の遺伝子をコードするウイルスベクターを用いた遺伝子導入は、動物実験における神経障害性疼痛を減少させ、HIV 関連疼痛の有効な治療のためのさらなる潜在的アプローチを提供する。

<引用文献>

① [Kanao M, Kanda H, Huang W, Liu S, Yi H, Candiotti KA, Lubarsky DA, Levitt RC, Hao S. Gene transfer of glutamic acid decarboxylase 67 by HSV vectors suppresses neuropathic pain induced by HIV gp120 combined with ddC in rats. Anesthesia & Analgesia 2015 120\(6\):1394-1404](#)

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 2 件)

① [Hirotsugu Kanda, Shue Liu, Megumi Kanao, Hyun Yi, Takafumi Iida, Wan Huang, Takayuki Kunisawa, David Lubarsky, Shuanglin Hao. Gene therapy with HSV encoding p55TNFR gene for HIV neuropathic pain: an evidence-based mini-review. Perioperative and Pain Medicine 2017,2\(4\):24-32. 査読有](#)

- ② Onodera Y, Kanao-Kanda M, Kanda H, Sasakawa T, Iwasaki H, Kunisawa T. Pregnancy suppresses neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rats through the inhibition of TNF- α . Journal of Pain Research. 査読有. 10, 2017, 567-574
DOI: 10.2147/JPR.S121810

[学会発表] (計 3 件)

- ① Yoshiko Onodera, Megumi Kanao-Kanda, Hirotugu Kanda, Chie Asakura, Hiroshi Iwasaki, Takayuki Kunisawa. Pregnancy suppresses mechanical allodynia by reducing GFAP in the spinal dorsal horn in the chronic constriction injury rat model. ANESTHESIOLOGY 2016 annual meeting. 2016.10.23. Chicago(USA)
- ② Chinami Takahashi, Megumi Kanao-Kanda, Hirotugu Kanda, Yoshiko Onodera, Izumi Sato, Takafumi Iida, Hiroshi Iwasaki, Takayuki Kunisawa. Pregnancy Attenuates the Expression of TLR4 and Drp1 in the Spinal Cord of Rats With Neuropathic Pain. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting Anesthesiology 2017. 2017.10.23. Boston(U.S.A)
- ③ Megumi Kanao-Kanda, Izumi Sato, Yoshiko Onodera, Hirotugu Kanda, Takafumi Iida, Hiroshi Iwasaki, Takayuki Kunisawa. Pregnancy suppresses mechanical allodynia by reversing the loss of GAD67 in the spinal dorsal horn in the chronic constriction injury rat model. American Society of Anesthesiologists Annual Meeting Anesthesiology 2017. 2017.10.22. Boston(U.S.A)

6. 研究組織

(1)研究代表者

神田 恵 (KANDA, Megumi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：50516820

(2)研究協力者

神田 浩嗣 (KANDA, Hirotugu)
旭川医科大学・医学部・講師
研究者番号：00550641

飯田 高史 (IIDA, Takafumi)
旭川医科大学・医学部・助教
研究者番号：40468442

Hao Shuanglin (HAO, Shuanglin)
Professor and Director for Preclinical and Basic Research Department of Anesthesiology, University of Miami, Miami, USA,