

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16469

研究課題名(和文)ヘルペスウイルスを用いた痛みの遺伝子治療の有用性と開発応用

研究課題名(英文)Usefulness and developmental application of gene therapy using herpes virus for pain

研究代表者

神田 恵 (Kanda, Megumi)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：50516820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：近年の医学の躍進により、遺伝子治療はさまざまな領域で注目されている。中でも、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、一部の分野において国内でも開始されている。しかしながら今のところ、神経障害性疼痛に対する遺伝子治療は確立されていない。これに対して我々は、これまでに痛みの遺伝子治療の有用性や、神経障害性疼痛の機序を解明する研究成果を報告してきた。さらに本研究では、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)67を発現させ脊髄後角のγ-アミノ酪酸(GABA)合成を促進するヘルペスウイルスベクターを用いた遺伝子治療の有用性を明らかにし、その鎮痛機序の一部を解明することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、神経障害性疼痛に対するヘルペスウイルスベクターの有用性と鎮痛機序を明らかにすることが出来た。今後、さらに本研究で得られた成果を発展させて神経障害性疼痛のメカニズムを明らかにし、ウイルスベクターを用いた痛みの遺伝子治療の有用性と安全性を証明していくことは、新たな痛みの治療法の開発と臨床応用に繋がっていくであろう。従来の薬物療法や神経ブロックによる治療とは異なる遺伝子治療という新たな治療戦略を社会にもたらすことは、国民の多くが患っている難治性疼痛の痛みの改善と、患者のQOL(生活の質)の改善に大いに貢献すると考えている。

研究成果の概要(英文)：With the recent breakthrough in medical science, gene therapy has been attracting treatment in various fields. Among them, gene therapy using viral vectors has been started in Japan in some fields. However, gene therapy for neuropathic pain has not been established. Regarding this fact, we have reported the results of pain research to clarify the usefulness of gene therapy for pain and the mechanism of neuropathic pain. Furthermore, in this study, we demonstrated the usefulness of gene therapy using herpes simplex virus vectors that express glutamate decarboxylase (GAD) 67 and promotes γ-aminobutyric acid (GABA) synthesis in the dorsal horn of the spinal cord. In addition, we were able to clarify some of the analgesic mechanisms.

研究分野：ペインクリニック

キーワード：慢性疼痛 遺伝子治療 ウイルスベクター ヘルペスウイルス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の医学の躍進により、遺伝子治療はさまざまな領域で注目されている。中でも、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療は、がん治療、代謝疾患、神経疾患などの分野での臨床治験が国内でも開始されている。しかしながら今のところ、神経障害性疼痛に対する遺伝子治療は確立されていない。

これに対して我々はこれまで、痛みの遺伝子治療の有用性や、神経障害性疼痛の機序を解明する研究成果を報告してきた。

2. 研究の目的

本研究では、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (GAD) 67 を発現させ脊髄後角の γ -アミノ酪酸 (GABA) 合成を促進するヘルペスウイルスベクターを用いた遺伝子治療の有用性を明らかにし、その鎮痛機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルの作成と動物行動評価

神経障害性疼痛モデルとして gp120-HIV 疼痛モデルラットを用い、機械刺激性アロディニアの経時的変化を明らかにした。

アロディニアの刺激閾値は、von Frey フィラメントを使用して測定した。底面が網目となった透明な容器にラットを入れ、30 分以上かけて環境順化させた。疼痛陽性反応は、フィラメントによって後肢測定に刺激を受けた際に、足をひっこめる動作もしくは足を舐める動作が見られた場合とした。常に陽性反応が見られた場合、次はより小さいフィラメントによる刺激を適用し、常に陰性反応の場合は、反対に一段階大きい力による刺激を与えた。15.1g の刺激によっても反応がない場合、それをカットオフ値とした。計測は疼痛モデル作成からウイルスベクター投与後 8 週間行い、その経時的変化を明らかにした。

(2) ウイルスベクターを用いた GAD67 を標的とする遺伝子治療

疼痛モデルラット作成から 1 週間後に、ウイルスベクター "QHGA67" もしくは、コントロールベクター "Q0ZHG" を 1.0×10^9 pfu 含む 30 μ l を足底部へ皮下注射した。機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏反応を経時的に計測し、"QHGA67" の治療効果を検討した。経時的計測により、治療効果が最大となる時点と治療持続期間が明らかとなった。足底部にウイルスベクターを注入すると、ベクターは皮下から 1 次ニューロンに移行し、神経線維を上行して後根神経節の 1 次ニューロンに形質導入を行う。本研究で用いるウイルスベクターは、単純ヘルペスウイルスベクターのひとつであり、"QHGA67" は GAD67 遺伝子をコードする。GAD67 遺伝子はシナプス前神経における GABA 合成に重要な酵素である GAD67 をコードしている。

(3) GAD67 を標的とした遺伝子治療による GABA 合成への影響

GAD67 を標的としたウイルスベクター投与により、後根神経節の 1 次ニューロンで形質導入された GAD67 遺伝子をもとに GAD67 タンパク質の発現が DRG において促進することを確認した。GAD67 の発現は、Western Blot 法を用いて評価した。ウイルスベクターの治療効果が最大と考えられる時点で、第 4-5 腰神経が起始する脊髄後角を採取した。組織のホモジネートを遠心分離後、上澄みを収集して蛋白定量を行った。30 μ g ずつ蛋白を分注し、Laemmli buffer を加え、95°C で 5 分間、蛋白変性させた。蛋白を電気泳動により展開後、PVDF メンブレンに転写した。メンブレンはスキムミルクを用いてブロッキングし、一次抗体を含んだ溶液中に摂氏 4°C で一晩振盪させた。一次抗体は mouse anti-GAD67 と mouse anti- β -actin を使用した。得られたバンドは、ImageJ を用いて解析した。

(4) ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の免疫関連因子/炎症性メディエーターへの影響

DRG および脊髄後角をサンプルとし Western Blot 法を用い、痛みの慢性化に関わる活性化免疫系細胞から放出される炎症性メディエーターの TNF- α の発現を調査し、この蛋白発現にウイルスベクターが与える影響を明らかにした。

(5) GABA 受容体アンタゴニストの末梢投与による疼痛閾値への影響

GABA 受容体アンタゴニストの投与が及ぼす機械刺激性アロディニアへの影響を明らかにした。GABA 受容体アンタゴニストは、ピククリン (GABA-A 受容体拮抗薬) 及び CGP35348 (GABA-B 受容体拮抗薬) を使用し、ウイルスベクター投与から 2 週間後の時点で、皮下へ投与を行った。皮下投与後、30、60、90、120、180、300 分後に Von Frey テストを行い、機械刺激性アロディニアの経時的変化を明らかにした。

4. 研究成果

本研究により、ラット疼痛モデルに GAD67 を発現するウイルスベクターを投与すると、神経障害性疼痛が緩和され、そのメカニズムには、脊髄後角/DRG の GAD67 が増加して GABA 合成が促進すること (Figure 1)、脊髄後角の TNF- α 放出が抑制されることが関与すること (Figure 2)、ウイルスベクターを投与した疼痛モデルに GABA 受容体アンタゴニストを足底部に注入すると、疼痛閾値が低下し鎮痛効果が抑制されることを見出した (Figure 3)。

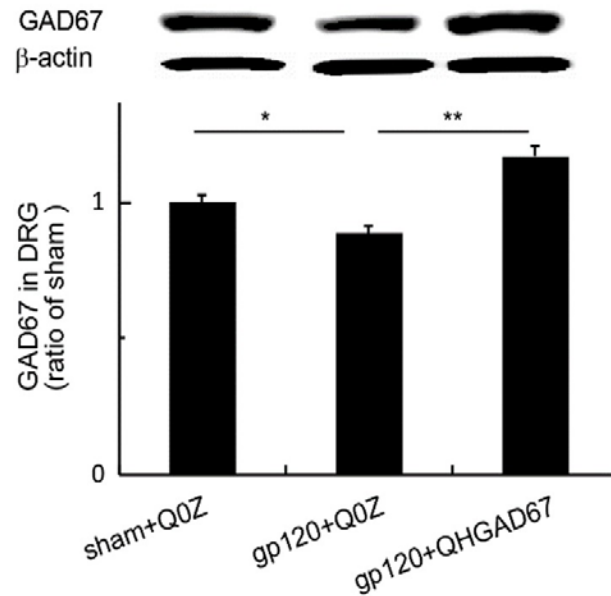


Figure 1. The expression of GAD67 mediated by HSV vectors in the DRG. Two weeks after HSV inoculation, L4/5 DRG were harvested for western blots. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA posthoc Fisher PLSD test, $n = 4-5$.

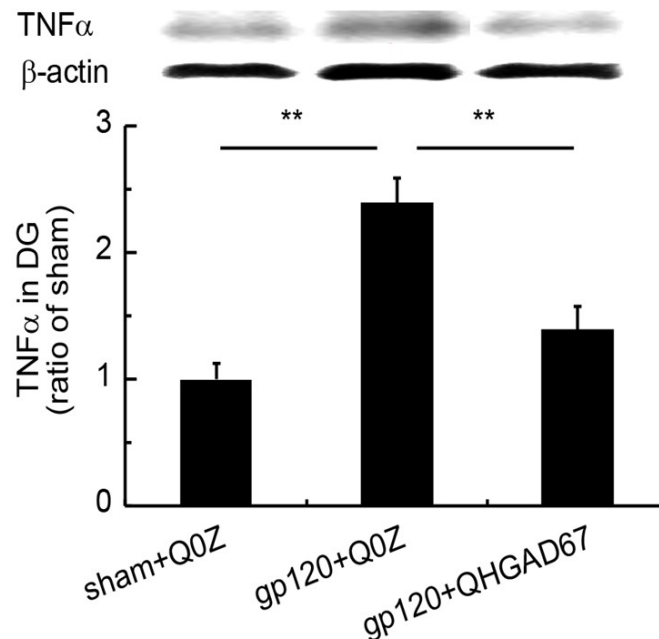


Figure 2. The expression of TNF- α mediated by HSV vectors in the DRG. Two weeks after HSV inoculation, L4/5 DRG were harvested for western blots. ** $P < 0.01$, one-way ANOVA posthoc Fisher PLSD test, $n = 4-5$.

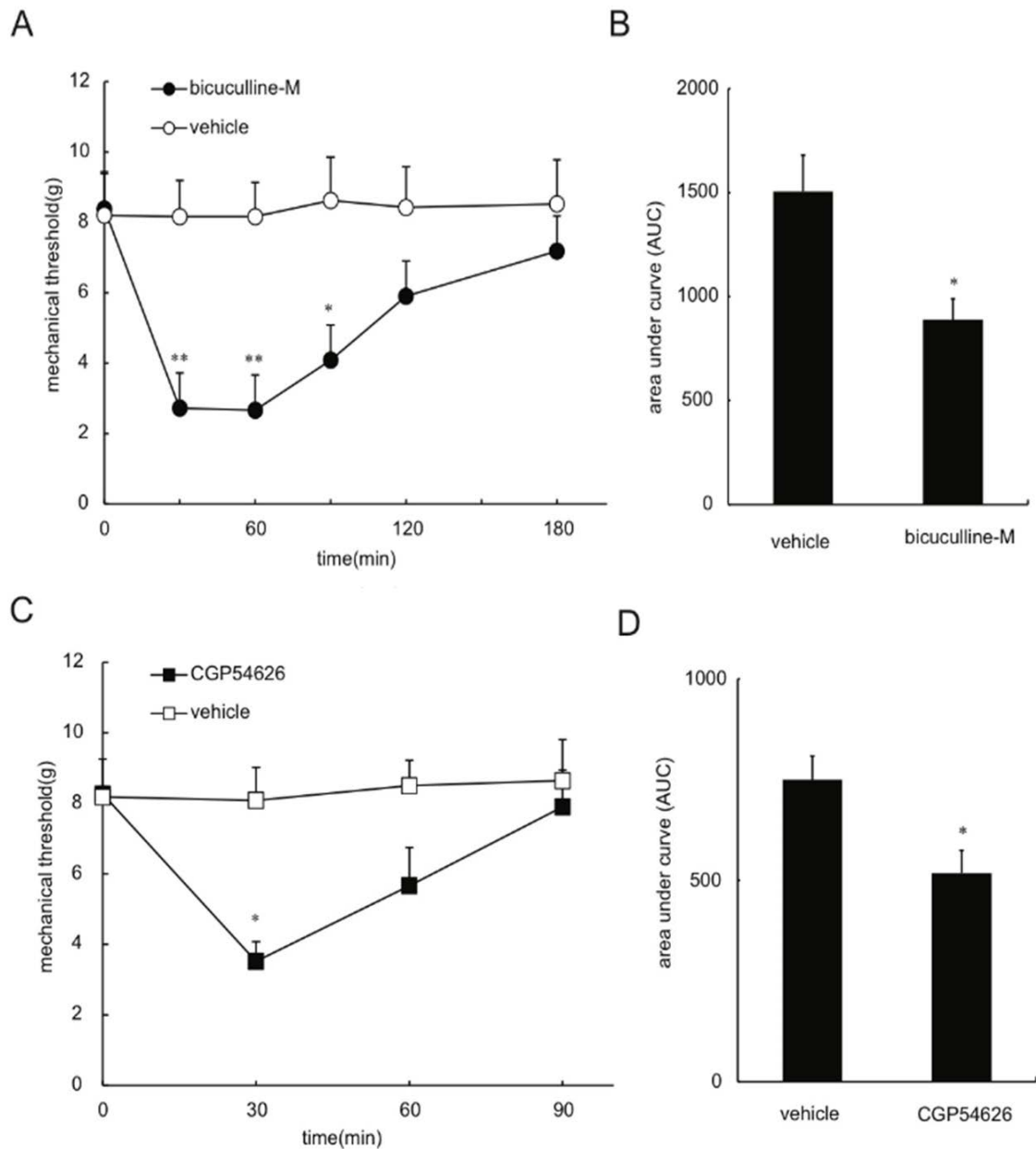


Figure 3. The peripheral effect of GABA antagonists on anti-allodynia produced by QHGAD in neuropathic pain. Rats received the gp120 application into the sciatic nerve. Seven days post gp120 application, rats received QHGAD. Two weeks after QHGAD, we intraplantarly injected bicuculline methiodide or CGP54626. The time courses of bicuculline methiodide (bicuculline-M) (A) or CGP54626(C) were shown, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. vehicle, t test, $n=6$. The AUC in the bicuculline-M (B) or CGP54626 (D) was significantly lower than that in vehicle group, * $P < 0.05$ vs. vehicle, t test, $n=6$.

本研究によって、神経障害性疼痛に対するヘルペスウイルスベクターの有用性と鎮痛機序の一部を明らかにすることが出来た。今後も本研究の成果を踏まえてさらに発展させて進めていき、神経障害性疼痛のメカニズムの解明も併せて行っていくことで、ウイルスベクターを用いた新しい痛みの遺伝子治療の開発と臨床応用に繋げることが可能になると考える。

従来の薬物療法や神経ブロックによる治療とは異なる遺伝子治療という新たな治療戦略を社会にもたらすことは、難治性疼痛患者の疼痛改善と QOL 改善に大いに貢献することが出来るとともに、国民の健康維持に寄与することが可能になると考えている。

◆本研究の研究成果の開示◆

神経障害性疼痛を緩和するウイルスベクターを用いた遺伝子治療の効果とそのメカニズム解明に関して、本研究により得られた成果と、我々が今まで得た一連の成果を併せ、以下に示す英文誌への論文掲載によって知見を開示した。

Kanao-Kanda M, Kanda H, Liu S, Roy S, Toborek M, Hao S.

Viral Vector-Mediated Gene Transfer of Glutamic Acid Decarboxylase for Chronic Pain Treatment: A Literature Review.

Human Gene Therapy. 2020 Feb 11. doi: 10.1089/hum.2019.359. PMID:32041431

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Megumi Kanda
2. 発表標題 Peripheral role of anti-allodynia produced by HSV vectors mediating GAD67 in HIV-related neuropathic pain in rats
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologists annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----