

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09316

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛に対するGABA作動性抑制系を標的とした遺伝子治療の開発応用

研究課題名(英文) "Development and application of gene therapy targeting GABAergic inhibitory system for neuropathic pain "

研究代表者

神田 浩嗣 (Kanda, Hirotugu)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00550641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、痛みの遺伝子治療の臨床応用を目指し、ウイルスベクターを用いた疼痛治療の有用性とメカニズム解明に関する研究を行ってきた。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、1) 神経障害性疼痛が緩和され、そのメカニズムには、2) 脊髄後角のGAD67が増加してGABA合成が促進すること、脊髄後角のTNF- α 放出が抑制されることが関与すること、3) 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。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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試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。本研究で得られた痛みの遺伝子治療に関する知見、すなわち、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する成果は、英文誌へ報告した。本研究の成果を慢性疼痛の新しい治療法の開発と臨床応用へと繋げることによって、将来的に疼痛患者のQOL改善と国民の健康維持に寄与することが可能になると考える。

研究成果の概要(英文)：We have been conducting research on the usefulness and mechanism elucidation of pain treatment using viral vectors with the aim of clinical application of gene therapy for pain. The following three points were discovered in this study. When a viral vector expressing GAD67 is administered to a rat pain model, 1) neuropathic pain is alleviated, and the mechanism is that 2) GAD67 in the dorsal horn of the spinal cord is increased and GABA synthesis is promoted. Suppression of TNF- α release in the dorsal horn is involved, and 3) injection of GABA receptor antagonist into the sole of the foot in a pain model administered with a viral vector lowers the pain threshold and suppresses the analgesic effect.

研究分野：疼痛治療

キーワード：遺伝子治療 ウイルスベクター GABA GAD67

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、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。

2. 研究の目的

我々は、痛みの遺伝子治療の臨床応用を目指し、ウイルスベクターを用いた疼痛治療の有用性とメカニズム解明に関する研究を行ってきた。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するとともに、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舂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 週間間い、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” QHGAD67” 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、” QHGAD67” 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、” QHGAD67” 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、ビククリン (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。

次に、本研究をさらに発展させ、神経特異性のあるウイルスベクターの作成に関する下記の研究を進めた。

GABA の合成酵素である GAD67 の遺伝子 (GAD1) を発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを作成し、ラット初代培養脳細胞における GABA 産生への影響を調査した。緑色蛍光タンパク質 (GFP) もしくはグルタミン酸デカルボキシラーゼ 1 (GAD1) を、サイトメガロウイルス (CMV)、シナプシン I (SYN) または CMV エンハンサー融合 SYN (E/SYN) プロモーター制御下で発現する AAV ベクターを作成した。作成した AAV ベクターの機能評価を細胞レベルより行っていき、細胞実験に加えて動物実験レベルでの評価を行った。

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、1) 神経障害性疼痛が緩和され、そのメカニズムには、2) 脊髄後角の GAD67 が増加して GABA 合成が促進すること (図 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 (図 2)、3) 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 (図 3) を見出した。

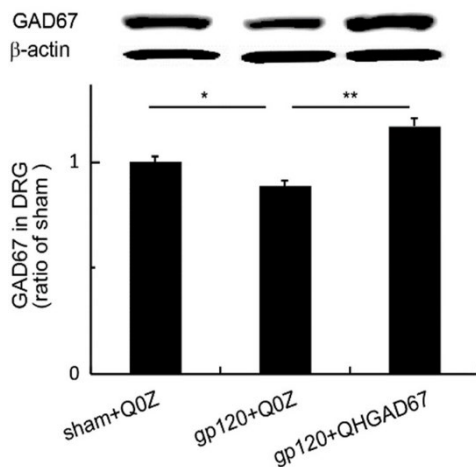


図 1. The expression of GAD67 mediated by HSV vectors in the DRG. Two weeks after HSV inoculation, L4/5 DRG were harvested for western blots. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, one-way ANOVA posthoc Fisher PLSD test, $n = 4-5$.

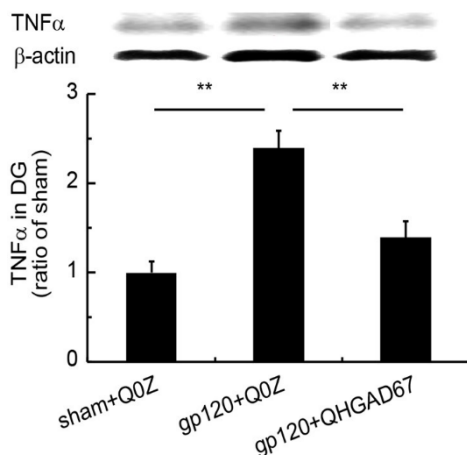


図 2. The expression of TNF- α mediated by HSV vectors in the DRG. Two weeks after HSV inoculation, L4/5 DRG were harvested for western blots. ** $P < 0.01$, one-way ANOVA posthoc Fisher PLSD test, $n = 4-5$.

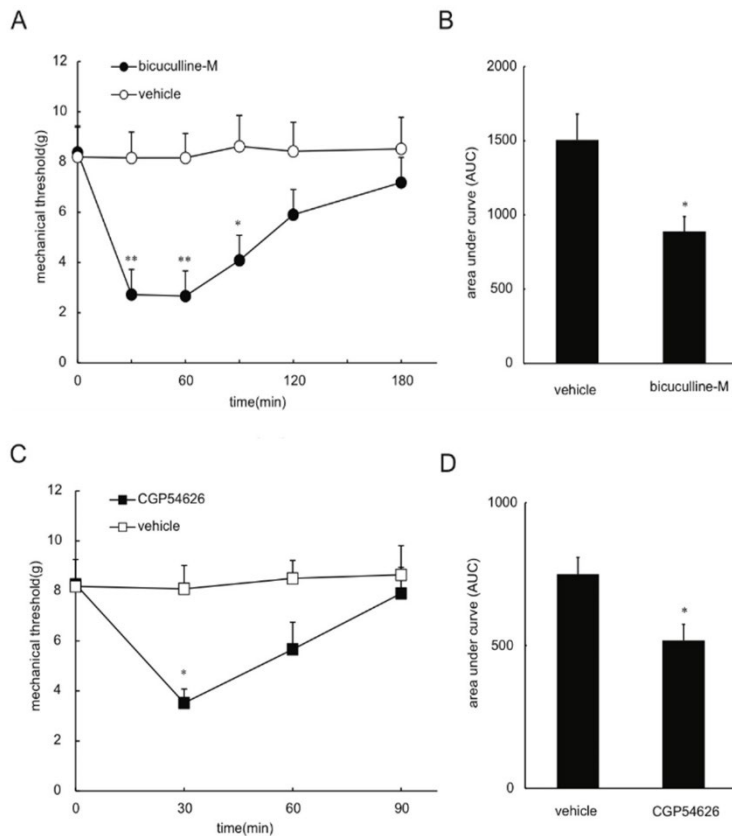


図 3. The peripheral effect of GABA antagonists on anti-allodynia produced by QHGAD in neuropathic pain. Rats received the gp120 application into the sciatic nerve. Seven days post gp120 application, rats received QHGAD. Two weeks after QHGAD, we intraplantarly injected bicuculline methiodide or CGP54626. 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, $n=6$.

以上の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て英文誌へ報告することで、その知見を開示した。

2020年度途中から2021年度には本研究をさらに進めるため、今まで我々が用いてきた病原性を有するヘルペスウイルスを用いたウイルスベクターに替え、病原性のないアデノ随伴ウイルスを用いて神経細胞で特異的にGAD67を発現するウイルスベクターの作成に取り組んだ。

SYNまたはESYNプロモーターを持ったAAVベクターは、神経細胞特異的な遺伝子発現を誘導し、ヒトGAD1の導入によってGABA産生を亢進することが明らかになった。また、*in vivo*においても、神経組織へ遺伝子導入することを明らかにした。この成果は、中間報告として2020年と2021年の日本ペインクリニック学会北海道支部会にて発表した。今後、安全で確実な遺伝子導入による痛みの治療法の確立を目指し、将来的には痛みの遺伝子治療の臨床応用に向けて引き続き本研究を進めていく。

本研究の成果を慢性疼痛の新しい治療法の開発と臨床応用へと繋げることによって、将来的に疼痛患者のQOL改善と国民の健康維持に寄与することが可能になると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanao-Kanda Megumi, Kanda Hirotsugu, Liu Shue, Roy Sabita, Toborek Michal, Hao Shuanglin	4. 巻 31
2. 論文標題 Viral Vector Mediated Gene Transfer of Glutamic Acid Decarboxylase for Chronic Pain Treatment: A Literature Review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Human Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 405 ~ 414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/hum.2019.359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神田 恵、小山恭平、河村あさみ、川田友美、川田大輔、奥田勝博、神田浩嗣
2. 発表標題 アミノ酪酸の産生を亢進させるアデノ随伴ウイルスベクターの作成
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会 第1回北海道支部学術集会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 神田 恵、小山 恭平、河村 あさみ、川田 友美、川田 大輔、奥田 勝博、中澤 瞳、神田 浩嗣
2. 発表標題 アミノ酪酸の産生を亢進させるアデノ随伴ウイルスベクターの機能評価
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会 第2回北海道支部学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	神田 恵 (Kanda Megumi) (50516820)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------