

令和 4 年 4 月 10 日現在

機関番号：74302

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21592

研究課題名(和文) eRNA-CAGE法による全身性疼痛責任分子同定とDNAワクチン疼痛治療研究

研究課題名(英文) Identification of key molecules in generalized chronic pain disease by use of eRNA-CAGE method toward DNA vaccine treatments

研究代表者

植田 弘師 (UEDA, HIROSHI)

一般財団法人生産開発科学研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：00145674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：FM様AcGPモデルマウスでは性腺摘出手術により雄のみ疼痛過敏が消失した。雄のみ脳内ミクログリア活性化が慢性疼痛に関与した。FM様IPGPモデルの視床下部はLPA産生酵素PLA2G3遺伝子発現上昇を示した。AcGPマウスの脾臓細胞注射は雄雌ともに疼痛過敏を示すが、雄のみミクログリア阻害剤の脳内投与により疼痛消失させた。特定のサイトカインの組み換え遺伝子の筋肉内遺伝子導入によるDNAワクチンはAcGPを抑制した。以上、疼痛メモリーは雄では脳から脾臓に、雌では脳のミクログリア活性化を介さない機構で脾臓に情報伝達する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年抗体医薬を中心とした生物学製剤が疾患治療に劇的な効果を有する事が報告され、数多く臨床開発されているが医療保険制度の破綻に対する危惧もあり、生産コストの低減が期待できる遺伝子ワクチン開発への期待が高まりつつある。本研究は難治性の線維筋痛症モデルについてワクチン療法という挑戦的萌芽研究を試み、特定のサイトカインについて有意な治療効果を見いだすことに成功した。この発見は線維筋痛症に限らず多くの慢性疾患に対する重要な可能性を示すこととなった。

研究成果の概要(英文)：Fibromyalgia (FM)-like repeated muscular acid injection-induced generalized pain (AcGP) mice showed female predominant generalized pain after gonadectomy. Microglia activation is only involved in male mice. Hypothalamus of FM-like intermittent psychological stress-induced generalized pain (IPGP) mice showed increased expression of a type of phospholipase A2, PLA2G3, which is an LPA synthesizing enzyme. Splenocytes derived from AcGP male mice caused pain, in a brain microglia inhibitor-reversible manner, but female splenocytes did not. Cytokine DNA vaccine partially blocked the AcGP pain.

研究分野：創薬薬理学

キーワード：線維筋痛症 免疫細胞治療 サイトカイン DAMPs PLA2G3 ミクログリア AcGP

1. 研究開始当初の背景

近年抗体医薬を中心とした生物学製剤が疾患治療に劇的な効果を有する事が報告され、数多く臨床開発されているが医療保険制度の破綻に対する危惧もあり、生産コストの低減が期待できる遺伝子ワクチン開発への期待が高まりつつある。慢性疼痛について考えたとき、その主な作用機序は中枢神経系で有り、ワクチンの有効性において十分な裏付けはなかった。実際、申請者は脳・脊髄内のリゾホスファチジン酸(LPA)受容体シグナルのフィードフォワード機構がほとんど慢性疼痛モデルの形成と維持を担っていることを証明してきている。ところが、神経障害性疼痛など末梢神経が傷害を受けた場合では、局所におけるマクロファージが集積し、Damage Associated Molecular Patterns (DAMPs)などが放出され、末梢神経を持続的に障害するという報告が数多くなされている。申請者は、こうした国内外の研究情報を踏まえて、神経障害性疼痛モデルでは、障害局所における神経炎症と中枢におけるLPA受容体シグナリングが相まって、慢性疼痛の形成と持続に貢献しているという概念を提出している。ところが、中枢に対するストレスがその主な原因とされる線維筋痛症などにおいては、そのような末梢免疫機構との関連は明らかではない。

2. 研究の目的

こうした背景のもと、線維筋痛症モデルにおいて末梢免疫機構が疼痛維持に関与する可能性を明らかにし、成功した場合は関連するサイトカイン等の分子に対する遺伝子ワクチンを作製し、疼痛抑制効果を検討するというのが研究の目的である。

3. 研究の方法

研究方法の手がかりは、神経障害性疼痛モデルにおいて見いだされている中枢におけるミクログリアの疼痛過敏機構における性差の事実にある。具体的には Sorge らの研究では (Nature Neurosci. 18:1081-1083, 2015) では神経障害性疼痛モデルにおける疼痛過敏に脳内ミクログリアは雌雄ともに関与しているが、雌では末梢免疫機構が優位に働き、ミクログリア阻害剤による疼痛抑制効果を示さない結果となっていることが示されている。この仕組みが線維筋痛症モデルでも成立するかどうかを検証することから開始することにした。

3-1 AcGP の性差の性格付け

このモデルは Sluka 等により報告された方法 (Muscle and Nerve 24:37-46, 2001) で pH4.0 の酸性食塩水を左腓腹筋内へ 5 日あけて 2 回投与することによった。その結果両側性に疼痛過敏が 28 日以上持続する全身性疼痛モデルということで、repeated muscular injection of acid saline-induced generalized pain (AcGP) と名付けた。性差を調べるためには雄雌の動物における疼痛過敏の相違を見るのみならず、性腺摘出手術を行うことでその相違を際立たせることとした。この手術を終えて 3 週間に AcGP モデル作製するという計画をとった。筆者等はこの手法で雌性優位な疼痛過敏を他の線維筋痛症モデルでも確認している。それは intermittent cold stress-induced generalized pain (ICGP) であり、もう一つは intermittent psychological stress-induced generalized pain (IPGP) である。それぞれ、ICGP モデルは (Mol Pain 4:52, 2008) と IPGP モデルは (Neurobiol Pain 1:16-25, 2017) において性腺摘出手術による雌性優位な疼痛過敏を報告している。

3-2 脳内炎症の事実と性差

この課題は脳内のミクログリアの働きを知るためにその阻害剤ミノサイクリンを脳室内に連続投与する方法で役割を解析する。連続投与は1回目の Acid 投与時から2回目 Acid 投与までを(1st stage)、2回目 Acid 前日から4日後(2nd stage)と5日後から11日後まで(3rd stage)と変えて連続投与する実験をおこなった。このことにより、慢性疼痛に対するミクログリアの働きが疼痛形成に関与するか、維持に関与するかの情報が得られる。

3-3 eRNA CAGE を用いた脳内責任遺伝子探索

AcGP は末梢性の組織傷害にもとづく全身性疼痛モデルであるが、心理学的ストレスによる IPGP モデルは脳機能の障害が原因となることが予想されるので良い対照実験となる。実際 LPAR-1 KO マウスが AcGP、IPGP ならびに ICGP モデルのいずれでも過敏性疼痛を消失させるばかりではなく IPGP モデルでは LPAR1 拮抗薬を脳室内に連続投与することにより、すでに確立した疼痛を解除する治療効果も証明している。従って、一つの試みとして IPGP モデルの視床下部における遺伝子解析を eRNA CAGE 法を用いて解析することとした。この手法は病態後の解析時間を変えることにより、遺伝子発現制御を行うエンハンサーやプロモーター遺伝子配列を明らかにすることが出来るので、将来シグナル解析技術を駆使することにより遺伝子発現制御を示す上流の責任分子を同定できる可能性がある。この解析はダナファーム社へ依頼解析による。

3-4 末梢免疫機構の関与

予備実験において広く免疫機能を抑制することで知られる FK-506 を前投与することにより、AcGP が顕著に抑制できるという結果を得ていることから、AcGP モデル(ドナー)マウスの脾臓を摘出し、脾臓細胞を調製し、さらには Miltenyi 社の抗体磁気ビーズを用いた細胞分画法により、免疫細胞を分画したものをナイーブ(レシピエント)マウスに静脈内投与を行うことで疼痛過敏誘発性を検証する。脳機能、免疫機能と性差の関連を知るためにミクログリア阻害剤であるミノサイクリンを投与することと雌雄ごとの相違を観察する計画を加える。

3-5 DNA ワクチン作製と治療効果検証

AcGP モデルの脾臓細胞や Miltenyi 社の抗体磁気ビーズを用いた細胞分画した T 細胞を realtime PCR 解析することや RNAseq 解析することにより AcGP において特異的に発現上昇する一連のサイトカインについて DNA ワクチンを作製する計画を試みる。この方法では、exosome に特異的に発現する CD63 蛋白質遺伝子にサイトカイン遺伝子をつないだリコンビナントサイトカインを大腿筋肉内に electroporation 法(NEPA21VIVO)にて導入する。実際に exosome として分泌されることを確認するために HEK293 細胞に遺伝子導入して exosome 分画に見いだされることを western blot 法で確認する。この遺伝子を週に1度3週間筋肉内注射を行うことによりワクチン形成を確認する。その目的のためには導入動物の脾臓細胞培養をおこない、リコンビナントサイトカインを添加することでインターフェロンの発現上昇を確認することによった。AcGP 疼痛に対する効果を検討するためには4週目に AcGP モデルを作製し、その後2週間継続して疼痛過敏に対する抑制効果を観察することと

した。

4. 研究成果

4-1. AcGP の性差

AcGP モデルは広く線維筋痛症様あるいは全身性疼痛病態を示すことが知られているが、性差について雄と雌の C57BL マウスを用いて疼痛解析を行った (Front Neurosci. 14:600166, 2020)。左腓腹筋内に Acid 2 回投与後 4 時間から 21 日まで digital von Frey 装置による機械的疼痛閾値は「左右」とも正常時 10 g から 6g まで低下し、28 日後でも 6.5g 程度と持続性の疼痛閾値を示した。ところが Acid 投与に先立つ 3 週間前に雌雄とも性腺摘出手術を行ったとき、雄では 2 回目 Acid 投与 4 時間から 1 日の時点でも手術無し群と比較して疼痛過敏の程度はすでに減弱され 3 日から 14 日後までの期間はほぼ完全に疼痛過敏が消失した。一方雌マウスでの同様な性腺摘出手術は疼痛過敏に全く影響を示さなかった。性腺摘出による顕著な性差の事実は ICGP モデル (Mol Pain 4:52, 2008) でも IPGP モデル (Neurobiol Pain 1:16-25, 2017) でも観察されており、こうした全身性疼痛モデルに共通することが示唆された。

4-2. 脳内炎症の事実と性差

臨床研究や PET 研究において線維筋痛症と脳内炎症との関連が示唆されていることから、ミクログリアの関与を想定し、脳内にミクログリア阻害剤であるミノサイクリン (Mino) を投与期間について 1 回目の Acid 投与前から 2 回目 Acid の前まで (1st stage)、2 回目 Acid 前日から 4 日後 (2nd stage) と 5 日後から 11 日後まで (3rd stage) と変えて連続投与する実験をおこなった。1st Stage の Mino は雌雄とも疼痛過敏に対して何ら影響を示さなかったが、2nd Stage の投与と 3rd stage 投与のいずれも雄のみ疼痛過敏の消失を示した。この事実から雄の AcGP モデルにおける疼痛過敏は脳内機構、とくにミクログリア活性化に見られる脳内炎症が慢性疼痛形成と維持に重要な役割をもつことが示唆された。しかし、雌では Mino 投与による影響は観察されなかったことから未知の疼痛過敏応答の存在が想定された。

4-3. eRNA CAGE を用いた脳内責任遺伝子探索

過去の研究 (Neurobiol Pain 1:16-25, 2017) では LPAR1-KO マウスのみならず疼痛病態形成後から連続して LPAR1 拮抗薬 AM966 の脳内投与を行ったとき、疼痛は顕著に抑制されたことから、脳内における LPA 機構の関与も示唆された。そのことを受け、病態時の遺伝子変化ならびにエンハンサーやプロモーター制御環境を検索できる eRNA CAGE 解析を IPGP モデルマウスの視床下部領域を用いて行ったところ LPA 産生酵素の一つである PLA2G3 遺伝子発現上昇を観察できた。PLA2G3 は分泌型 PLA2 で LPA 生合成の前駆物質リゾホスファチジルコリン (LPC) 産生に関与する酵素であり、部分的坐骨神経損傷による神経障害性疼痛モデル (partial sciatic nerve ligation/pSNL) モデルにおいて LPA 産生とともにその重要性が明らかになっている (BBRC 568: 167-173, 2021)。この酵素活性化の脳内責任局在が明らかになったとき、病態後時間や薬物処置による時間を変更することにより、詳細なエンハンサー、プロモーター情報ならびにそこから得られる PLA2G3 遺伝子発現上昇に関与する細胞外シグナル情報を解析する準備が出来た。

4-4. 末梢免疫機構の関与

Sorge らの研究では(Nature Neurosci. 18:1081-1083, 2015)では神経障害性疼痛モデルにおける疼痛過敏に脳内ミクログリアは雌雄ともに関与しているが、雌では末梢免疫機構が優位に働き、ミクログリア阻害剤による疼痛抑制効果を示さない結果となっていることが示されている。この研究報告を受けて AcGP モデルにおいて末梢免疫機構の役割を解析するために AcGP マウス (ドナー) 脾臓を摘出し、調製した脾臓細胞をナীবマウス(レシピエント)に注射したとき、雄雌ともに疼痛過敏を検出することが出来た(Front Neurosci. 14:600166, 2020)。Mino を 2nd stage に投与した時、AcGP による疼痛過敏を消失させた雄ドナーマウスの脾臓細胞によるレシピエントにおける疼痛過敏は観察されなかったが、同様の Mino 処置を行った雌ドナーマウス脾臓細胞による疼痛過敏作用は Mino 投与無しの場合と同様に観察された。この事実から、AcGP モデルでは疼痛メモリーは雄マウスにおいて脾臓に移行しているが脳におけるミクログリア活性化を介する疼痛情報が直接の原因であると考えられ、一方雌マウスでは脳におけるミクログリアの関与は乏しく、むしろ疼痛メモリーは直接に脾臓に移行したものと示唆された。雄 AcGP モデルマウス脾臓における疼痛メモリーを担当するサブセット T 細胞について解析を試みたとき、Miltenyi 社の抗体磁気ビーズを用いた分画により CD4 陽性細胞にその痛み誘発作用が確認された。

4-5. DNA ワクチン作製と治療効果検証

脾臓免疫細胞におけるサイトカイン、ケモカインの発現を予備的に RNAseq 解析を「おこなったところ、特定のサイトカイン X の遺伝子発現上昇が見いだされ、別途調製した AcGP 由来脾臓細胞および CD4 陽性細胞試料を用いた realtime PCR を行ったところ、サイトカイン X の遺伝子発現上昇は確認された。そこでそのサイトカインの疼痛発現における寄与を検証するために DNA ワクチン作製を試みた。その原理は exosome に特異的に発現する CD63 にこのサイトカイン遺伝子をつないだリコンビナント遺伝子を in vivo electroporation 法 (NEPA21 vivo) により筋肉内への週に一度 3 週間遺伝子導入を行った。4 週目に入り脾臓細胞を調製し、リコンビナントサイトカイン X を適用したときに認められる免疫応答としてのインターフェロン γ の発現上昇を確認し、その時点で AcGP モデルを作製した。DNA ワクチン処置動物では AcGP は完全ではないが統計的有意差をもって抑制されることが観察された。

以上の成績から、今回の挑戦的萌芽研究目的は十分に達成することが出来、多くの発展的研究課題が明らかになったことから今後、より大型の研究計画につなげる必要があることを確信した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ueda Hiroshi, Dozono Naoki, Tanaka Keigo, Kaneko Shuji, Neyama Hiroyuki, Uchida Hitoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Allodynia by Splenocytes From Mice With Acid-Induced Fibromyalgia-Like Generalized Pain and Its Sexual Dimorphic Regulation by Brain Microglia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2020.600166	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 -
1. 著者名 Ueda Hiroshi	4. 巻 81
2. 論文標題 Pathogenic mechanisms of lipid mediator lysophosphatidic acid in chronic pain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Progress in Lipid Research	6. 最初と最後の頁 101079 ~ 101079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.plipres.2020.101079	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 -
1. 著者名 Ueda Hiroshi, Neyama Hiroyuki, Matsushita Yosuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Lysophosphatidic Acid Receptor 1- and 3-Mediated Hyperalgesia and Hypoalgesia in Diabetic Neuropathic Pain Models in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1906 ~ 1906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9081906	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 -
1. 著者名 Ueda Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 LPA receptor signaling as a therapeutic target for radical treatment of neuropathic pain and fibromyalgia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pain Management	6. 最初と最後の頁 43 ~ 53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/pmt-2019-0036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Hiroshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Systems Pathology of Neuropathic Pain and Fibromyalgia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1773 ~ 1782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b19-00535	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 -

1. 著者名 Tanaka Keigo, Dozono Naoki, Neyama Hiroyuki, Nagai Jun, Tsukahara Ryoko, Nagayasu Kazuki, Kaneko Shuji, Ueda Hiroshi	4. 巻 588
2. 論文標題 Secreted PLA2-III is a possible therapeutic target to treat neuropathic pain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 167 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.06.058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nasseef Md Taufiq, Ma Weiya, Singh Jai Puneet, Dozono Naoki, Lan?on Kevin, S?gu?la Philippe, Darcq Emmanuel, Ueda Hiroshi, Kieffer Brigitte L.	4. 巻 15
2. 論文標題 Chronic generalized pain disrupts whole brain functional connectivity in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Imaging and Behavior	6. 最初と最後の頁 2406 ~ 2416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11682-020-00438-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Neyama Hiroyuki, Dozono Naoki, Uchida Hitoshi, Ueda Hiroshi	4. 巻 375
2. 論文標題 Mirtazapine, an <i> </i>2 Antagonist-Type Antidepressant, Reverses Pain and Lack of Morphine Analgesia in Fibromyalgia-Like Mouse Models	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.120.265942	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Neyama Hiroyuki、Dozono Naoki、Ueda Hiroshi	4. 巻 373
2. 論文標題 NR2A-NMDA Receptor Blockade Reverses the Lack of Morphine Analgesia Without Affecting Chronic Pain Status in a Fibromyalgia-Like Mouse Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 103 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.119.262642	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gazerani Parisa、Aloisi Anna Maria、Ueda Hiroshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Editorial: Differences in Pain Biology, Perception, and Coping Strategies: Towards Sex and Gender Specific Treatments	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 697285-697285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnins.2021.697285	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------