

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591829

研究課題名 (和文) デコイ型核酸の遺伝子導入による神経因性疼痛の病態解明と治療法の開発

研究課題名 (英文) Involvement of spinal cord nuclear factor kappaB activation in rat models of proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation.

研究代表者 阪上 学 (SAKAUE GAKU)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70379254

研究成果の概要 (和文)：

慢性疼痛動物モデルに L5 脊髄神経絞扼ラットを用い、HVJ-liposome 法を利用してデコイ型核酸 NF-kB を脊髄腔内に投与し、マイクログリア、アストロサイト等の活性化メカニズムと痛覚過敏との関与を検討する。脊髄レベルでの蛋白質の変化、温熱刺激や機械的刺激に対する疼痛反応を観察することで慢性疼痛における NF-kB の役割を明らかにする。

研究成果の概要 (英文) : Pro-inflammatory cytokines, generated from microglia or astrocyte, have been shown to be involved in the genesis, persistence, and severity of neuropathic pain following nerve injury. The transcription factor, NF-kappaB, plays a pivotal role in regulating pro-inflammatory cytokine gene expression. To elucidate the role of NF-kappaB in the pathogenesis of neuropathic pain, using a gene-based approach of NF-kappaB decoy, we tested whether the activated NF-kappaB affected pain behavior via the expression of inflammatory mediators.

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

(金額単位：円)

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：神経障害性疼痛、グリア

## 1. 研究開始当初の背景

帯状疱疹後神経痛、反射性交感神経性ジストロフィー、幻肢痛などの神経因性疼痛は慢性痛の代表的なもので、非常に難治性である。これらの神経因性疼痛の病態解明は最近急速に進みつつあるが、根本的な治療法に結び

ついた研究は依然として進んでいない。近年神経系と免疫系とのネットワークが注目されてきており免疫細胞やグリア細胞が産生するサイトカイン、炎症性メディエーターが病的疼痛の起因分子の一つであるという報告が増加している。本研究では炎症性サイト

カイン、接着分子などが共通に利用するシグナル伝達分子 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) に焦点をあて、NF- $\kappa$ B を阻害する事で神経因性疼痛の病態解明並びに臨床的治療を試みる。近年、リウマチ性関節炎やアトピー性皮膚炎等の病態形成にシグナル伝達分子 NF- $\kappa$ B が関与している事が明らかになってきている。慢性疼痛動物モデルに於いても神経障害後、局所で NF- $\kappa$ B の活性化が報告されている。そこで NF- $\kappa$ B 活性化を効果的に制御することができれば急性痛のみならず神経因性疼痛の治療薬の一つとなる可能性がある。本研究では NF- $\kappa$ B の結合部位に特異的な 2 本鎖 DNA を合成し、HVJ-liposome 法を用いてデコイ型核酸として神経系に遺伝子導入することで神経損傷後の局所の NF- $\kappa$ B 活性化を競合的に阻害することを試みる。活性化 NF- $\kappa$ B 抑制が炎症機転を抑制し、痛覚過敏行動に与える影響を検討する。さらに NF- $\kappa$ B 抑制の影響を免疫学的手法により解析する。これまでに我々は L5 脊髄神経絞扼ラットの脊髄神経節レベルにデコイ型 NF- $\kappa$ B 遺伝子導入することで温熱刺激に対する痛覚過敏を抑制することを確認 (Sakaue et al. Neuroreport 2001) している。末梢神経損傷後に脊髄後角でマイクログリア、アストロサイト等のグリア細胞が活性化することが知られているが、グリア細胞の活性化と慢性疼痛の発症機序解明を目的として本研究を行う。

## 2. 研究の目的

本研究では慢性疼痛動物モデルに L5 脊髄神経絞扼ラット (Chung model) を用い HVJ-liposome 法を利用してデコイ型核酸 NF- $\kappa$ B を神経系に遺伝子導入後、温熱刺激や機械的刺激に対する疼痛反応を観察することで慢性疼痛における NF- $\kappa$ B の役割を明らか

にする。これまでに我々は L5 脊髄神経絞扼ラットの脊髄神経節レベルに遺伝子導入することで温熱刺激に対する痛覚過敏を抑制することを確認 (Sakaue et al. Neuroreport 2001) してきた、脊髄腔内にデコイ型 NF- $\kappa$ B を投与し、マイクログリア、アストロサイト等の活性化メカニズムと痛覚過敏との関与を検討する。

## 3. 研究の方法

これまでに我々は L5 脊髄神経絞扼ラットの脊髄神経節レベルにデコイ型 NF- $\kappa$ B 遺伝子導入することで温熱刺激に対する痛覚過敏を抑制することを確認 (Sakaue et al. Neuroreport 2001) している。末梢神経損傷後に脊髄後角でマイクログリア、アストロサイト等のグリア細胞が活性化することが知られているが、グリア細胞の活性化と慢性疼痛の発症機序解明を目的として本研究を行う。次の項目についての検索を行う。

- (1) 神経因性疼痛動物モデルの作製及び疼痛反応実験の遂行
- (2) デコイ型核酸を内包した HVJ-liposome の作製及び遺伝子導入の遂行
- (3) 組織化学的検索。導入遺伝子の分布、グリア細胞活性化とデコイ法による活性化抑制を組織科学的に証明する。
- (4) サイトカイン特異的 mRNA の定量
- (5) 遺伝子-蛋白相互作用の解析

## 4. 研究成果

- (1) 神経因性疼痛動物モデルの作製及び疼痛反応実験の遂行

6 週齢の SD ラットを用い、第 5 脊髄神経を絹糸で結紮することにより神経因性疼痛動物モデルを作製する。疼痛の評価は温熱刺激に対する逃避反応と機械的刺激に対する逃避反応の 2 項目について疼痛の定量化を行った。

(2) デコイ型核酸を内包した HVJ-liposome の作製及び遺伝子導入の遂行

大阪大学の金田らによって開発された HVJ-liposome 法 (Saeki et al. Cell Biology 1998) は Liposome に不活化センダイウィルスの膜融合タンパクを装飾し細胞への遺伝子導入効率を高めたベクターである。不活化ウィルスを使用しているためベクターに対する抗原性は低く、また導入細胞遺伝子への Integration を起こすこともないという利点を有する。しかし遺伝子の発現は一過性で約2週間とされている。このベクターを利用し NF- $\kappa$ B デコイと Scramble デコイ (control) 型核酸をラット神経因性疼痛モデルの脊髄腔内に導入し2群間で温熱刺激、機械的刺激に対する疼痛過敏反応を遺伝子導入後2週間にわたり評価を行った。

(3) 組織化学的検索。導入遺伝子の分布、グリア細胞活性化とデコイ法による活性化抑制を組織科学的に証明する。

導入した遺伝子の分布を検索するために神経因性疼痛モデルの神経系に蛍光標識をした核酸を HVJ-liposome 法を用いて導入する。神経標本を採取し、固定し薄切標本を作製後、蛍光顕微鏡を用いて分布範囲を観察する。また、グリア細胞活性の指標としてグリア細胞特異的なマーカー (OX42:microglia, GFAP:astrocyte) を免疫組織科学的方法で検索する。NF- $\kappa$ B デコイ型核酸導入前後での検索を行った。

(4) サイトカイン特異的 mRNA の定量

ラット神経因性疼痛モデルの脊髄において、局所で産生されるサイトカインを

NF- $\kappa$ B デコイと Scramble デコイ群の2群で蛍光標識ハイブリダイゼーションプローブを用いた定量 PCR ライトサイクラー<sup>™</sup>を用いて定量する。TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等のサイトカイン、グリア細胞活性化に関与するとされる P2X4 受容体、TLR-2 (Toll-like receptor2) についても定量を行った。

(5) 遺伝子-蛋白相互作用の解析

デコイ型核酸による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制を検索するためにゲルシフトアッセイを行う。ラット神経因性疼痛モデルの脊髄から採取したサンプルより蛋白抽出液を調製しラベルしたプローブ DNA 断片と結合させて非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。形成された DNA-蛋白複合体の移動度よりデコイ群、スクランブル群において活性化 NF- $\kappa$ B の解析を行った。

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3件)

(1) 阪上 学、CRPSの診断とその対処法、日本医師会雑誌、査読無し、138 (12)、2010、2540-2541

(2) 植松 弘進、井上 隆弥、阪上 学、当院における脊髄障害性疼痛症例の検討、PAIN RESEARCH、査読有り、25 (1)、2010、19-25

(3) 柴田 政彦、阪上 学、難治性疼痛、とくにCRPSの診断と治療、自律神経、査読無し、47 (1)、2010、24-46

[学会発表] (計3件)

(1) 阪上 学、経過観察中の過剰な訴えがさ病によるものと判明したCRPSの一症例、日本ペインクリニック学会 (招聘講演)、2010. 7. 2、京都府京都市

(2) 阪上 学、大阪大学医学部附属病院 疼痛医療センターこれまでの歩み、日本ペインクリニック学会、2009. 7. 18、愛知県名古屋市

(3) 阪上 学、当科に紹介された小児CRPS3症例の検討、日本ペインクリニック学会、2009. 7. 17、愛知県名古屋市

〔図書〕（計 2 件）

(1) 阪上 学、克誠堂出版株式会社、神経障害性疼痛 複合性局所疼痛症候群（CRPS）、2011

(2) 阪上 学、真興交易株式会社医書出版部、複合性局所疼痛症候群 CRPS(Complex Regional Pain Syndrome)、2009、250

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/anes/www/pain/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阪上 学 (SAKAUE GAKU)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70379254

### (2) 研究分担者

井上 隆弥 (INOUE TAKAYA)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：00335358