

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09189

研究課題名（和文）神経組織へ特異的に発現させるベクターシステムを利用した痛みの遺伝子治療の開発

研究課題名（英文）Viral vector-mediated gene therapy with neuron-specific promoters for chronic pain treatment

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）：本研究によって以下の1)～3)に示す研究成果を得た。1) GABA産生の促進のためGAD67を導入するアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを作成した。作成したAAVベクターには、神経細胞特異的に標的遺伝子を発現させるためのプロモーターを装備させ神経組織でのみGABA産生が促進する機能を付加させた。2) 初代培養神経細胞を用いて、作成したAAVベクターの機能評価を行った。3) 実験動物（ラット）を用いて、作成したAAVベクターの機能評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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応用が国内で開始されている。しかしながら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。本研究では神経障害性疼痛を緩和するウイルスベクターを作成し細胞実験及び動物実験で用いて得られた成果を国内学会および英文誌へ報告した。本研究の成果は慢性疼痛の新しい治療法の開発と臨床応用へと繋がるものであり、将来的には疼痛患者のQOL改善と国民の健康維持に寄与すると考える。

研究成果の概要（英文）： The research results shown in 1) to 3) below were obtained through this research. 1) An adeno-associated virus (AAV) vector introducing GAD67 was constructed to promote GABA production. The constructed AAV vector was equipped with a promoter to express the target gene in a neuronal cell-specific manner, and added a function to promote GABA production only in neuronal tissue. 2) Functional evaluation of the prepared AAV vectors was performed using primary cultured neurons. 3) Functional evaluation of the prepared AAV vectors was performed using experimental animals (rats).

研究分野：ペインクリニック

キーワード：疼痛治療 遺伝子治療 ウイルスベクター GABA

1. 研究開始当初の背景

本邦では 2000 万人以上が慢性疼痛を患っていると推定され、今後も高齢化に伴って患者数はさらに増加し続けることが懸念されている。臨床では慢性疼痛が既存の薬物治療や神経ブロックに抵抗性を示し、疼痛コントロールに難渋することが少なくない。一方、医学の発展によって様々な分野で遺伝子治療が臨床応用され始めているが、ペインクリニック分野において痛みの遺伝子治療は実用化に至っていない。

このような背景から、我々はウイルスベクターを用いた遺伝子治療が神経障害性疼痛に有効であり、その鎮痛メカニズムを解明する下記 1)~5)の研究成果を今までに報告した。

- 1) ウイルスベクターによる遺伝子治療の鎮痛機序に末梢側神経終末の GABA が関与している可能性を示した(Kanao-Kanda M, et al. Human Gene Ther. 2020; 31(7-8):405-414.)。
- 2) 脊髄後角の TNF- α を抑制するウイルスベクターを使用した遺伝子治療によってラットの疼痛閾値が改善することを示し、その鎮痛機序を解明した (Kanda H, Kanao-Kanda M, et al. **Transl Perioper Pain Med.** 2017; 2(4):24-32.)。
- 3) 神経障害性疼痛モデルにおいて妊娠によりラットの疼痛閾値が改善することを示し、その鎮痛機序を明らかにした (Onodera Y, Kanao-Kanda M, et al. J Pain Res. 2017; 8:10:567-574.)。
- 4) ウイルスベクターを用いた遺伝子治療によって、HIV 関連疼痛モデルラットの機械的アロディニアが抑制されることを示し、活性酸素と Wnt5a の抑制が関与することを証明した (Kanda H, Kanao-Kanda M, et al. Gene Therapy. 2016; 23(4):340-348.)
- 5) HIV 関連疼痛モデルにおいて GABA 作動性抑制系が減弱しており、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入によって GABA 作動性抑制系が回復し、疼痛閾値が改善することを示した (Kanao M, et al. Anesth Analg. 2015; 120(6): 1394-1404.)

2. 研究の目的

我々は神経障害性疼痛の病態において抑制性神経伝達物質の一つである γ アミノ酪酸(GABA)が減少していることに着目し、GABA を回復させる遺伝子導入を用いた疼痛治療の有用性を検討してきた。本研究は、これまでの我々の研究を発展させ、神経組織で特異的に GABA を産生させるウイルスベクターを作成し、作成したベクターが組織選択性をもって GABA を産生する目的を果たしているかどうかの機能評価を行い、さらにベクターを用いた遺伝子治療が疼痛モデルへ及ぼす影響と鎮痛機メカニズムを調べることを目的としている。

本研究は以下 1) ~ 3) により構成された。

1) AAV ベクターの作成

GABA 産生の促進のため GAD67 を導入するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを作成する。作成した AAV ベクターには、神経細胞特異的に標的遺伝子を発現させるためのプロモーターを装備させ神経組織でのみ GABA 産生が促進する機能を付加させる。

2) 細胞を用いた AAV ベクターの機能評価

初代培養神経細胞を用いて 1) で作成した AAV ベクターの機能評価を行う。

3) 実験動物を用いた AAV ベクターの機能評価

ラットを用いて 1) で作成した AAV ベクターの機能評価を行う。

3. 研究の方法

1) AAV ベクターの作成

本研究で用いる AAV ベクターを以下の ~ の手順によって作成した。

トランスファープラスミド、ヘルパープラスミド、AAV パッキングプラスミドを共に HEK293 細胞株に導入し、AAV ベクターを産生する。トランスファープラスミドには、GABA の産生に必須である酵素グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)のひとつである GAD67 の cDNA、神経細胞に特異的な遺伝子のプロモーターであるシナプシン (SYN)、レポーター遺伝子の緑色蛍光タンパク質 (GFP) を含む。

培養液中で HEK293 細胞を破壊し、AAV ベクターを回収する。

回収したベクターは PEG 沈降を行い、CsCl₂ 密度勾配遠心法で濃縮する。

ウイルスゲノム数を qPCR 法によって定量し、ウイルス濃度(タイター)を測定する。

2) 細胞を用いた AAV ベクターの機能評価

本研究 1) で作成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 ベクターを用いた。

妊娠 17 日目のラット胎児から脳細胞の初代培養を確立し、免疫染色により神経細胞の純度を確認した。次に、AAV ベクターをラット初代培養脳細胞に投与し、48 時間後に導入遺伝子の発現を qPCR で、培養液へ含まれる GABA 量を質量分析法により定量した。

3) 実験動物を用いた AAV ベクターの機能評価

本研究 1) で作成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 ベクターを用いた。作成した AAV ベクターをラットに髄注し、ラット脊髄を取り出した。脊髄での導入遺伝子の発現を qPCR 及び免疫染色で、GABA 産生量は質量分析法を用いて定量した。2 種の AAV ベクターをラットに髄注し、PCR 法及び免疫染色法を用いて脊髄における導入遺伝子の発現を調べた。

本研究は、当施設の動物実験に関する規程と遺伝子組換え実験安全管理規程に基づき、動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

1) AAV ベクターの作成

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。

2) 細胞を用いた AAV ベクターの機能評価

ラット初代培養脳細胞において、神経細胞の純度 (TuJ-1 陽性細胞率) は 86.9% であった。GAD1 を発現する AAV ベクター (AAV-CMV-GAD1、AAV-SYN-GAD1、AAV-E/SYN-GAD1) の投与は、コントロールベクター (AAV-GFP-CMV) と比較してラット初代培養脳細胞における GAD1 遺伝子発現を優位に増加させた。また、培養液中に含まれる GABA 量はコントロールのものと比較して著しく上昇していた。この結果によって、AAV ベクターを用いた GAD1 遺伝子の導入は、ラット初代培養脳細胞の GABA 産生を促進する機能を装備していることが明らかになった。

3) 実験動物を用いた AAV ベクターの機能評価

PCR 法において、CMV-AAV ベクター投与群および SYN-AAV ベクター投与群の両群で、ラット脊髄での GFP 発現が誘導された。免疫染色法では、SYN-AAV ベクター投与群で神経細胞に特異的な GFP 発現が認められた。一方、CMV-AAV ベクター投与群では神経細胞に加えて神経細胞以外の細胞においても GFP 発現が認められた。本研究により、SYN プロモーターを持つ AAV ベクターは、ラット脊髄の神経細胞へ特異的に標的遺伝子を導入する性質を持つことが明らかになった。ラットへの AAV ベクターの髄注により、神経細胞への遺伝子導入およびヒト GAD1 遺伝子の発現が認められた。

1) ~ 3) の結果より、本研究で作成した SYN または ESYN プロモーターを持った AAV ベクターはラット初代培養脳細胞において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。加えてラットを用いた動物実験においても、神経組織へ特異的に遺伝子導入する機能を持つことが明らかになった。

本研究によって得られた結果は以下のように報告した。

学会報告

佐藤 遥¹、神田 恵¹、川田大輔^{1,2}、神田浩嗣¹

(¹ 旭川医科大学麻酔・蘇生学講座、² 旭川医科大学救急医学講座)

神経細胞特異的に標的遺伝子を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターの機能評価
日本麻酔科学会第 69 回学術集会, 2022 年 6 月 16 日 ~ 6 月 18 日

神田 恵¹、小山恭平²、河村あさみ¹、川田友美³、川田大輔¹、奥田勝博⁴、中澤 瞳⁵、神田浩嗣¹
(¹ 旭川医科大学麻酔・蘇生学講座、² 旭川医科大学外科学講座心臓大血管外科学分野、³ 旭川医科大学先端医科学講座、⁴ 旭川医科大学法医学講座、⁵ 旭川医科大学解剖学講座機能形態学分野)

γ 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
日本ペインクリニック学会第2回北海道支部学術集会, 2021年09月

神田 恵¹、小山恭平²、河村あさみ¹、川田友美¹、川田大輔³、奥田勝博⁴、神田浩嗣¹

(¹ 旭川医科大学麻酔・蘇生学講座、² 旭川医科大学外科学講座心臓大血管外科学分野、³ 旭川医科大学救急医学講座、⁴ 旭川医科大学法医学講座)

γ 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
日本ペインクリニック学会 第1回北海道支部学術集会, 2020年12月~2021年03月

痛みの遺伝子治療に関連する総説を英文誌に投稿・報告した。臨床においては痛み治療に関連する症例報告を報告した。

総説

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.
Hum Gene Ther., 31 (7-8) (405 - 414), 2020

症例報告

Kanao-Kanda M, Kanda H, Iida T, Kikuchi S, Azuma N.
Clinical Application of Laser Speckle Flowgraphy to Assess Changes in Blood Flow to the Foot After a Lumbar Sympathetic Ganglion Block: A Case Report
J Pain Res. 2021; (14):1451-1456.

腰部交感神経節ブロック効果判定に対するレーザースペックル法の有用性の報告

Kanao-Kanda M, Hiroshima H, Sato I, Nagabuchi R, Kanda H.
Epidural Blood Patch Using a Racz Catheter for Spontaneous Intracranial Hypotension With Unclear Leak Points.
Cureus. 2022; 28;14(3): e23559.

Racz カテーテルを用いたブラッドパッチ治療の有用性に関する報告

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Megumi Kanao-Kanda, Hirotsugu Kanda, Shue Liu, Sabita Roy, Michal Toborek, Shuanglin Hao	4. 巻 31(7-8)
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 Review Hum Gene Ther	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 該当する

1. 著者名 Megumi Kanao-Kanda, Satoru Hiroshima, Izumi Sato, Ririko Nagabuchi, Hirotsugu Kanda	4. 巻 14(3)
2. 論文標題 Epidural Blood Patch Using a Racz Catheter for Spontaneous Intracranial Hypotension With Unclear Leak Points	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 e23559
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.23559.	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 Megumi Kanao-Kanda, Hirotsugu Kanda, Takafumi Iida, Shinsuke Kikuchi, Nobuyoshi Azuma	4. 巻 14
2. 論文標題 Clinical Application of Laser Speckle Flowgraphy to Assess Changes in Blood Flow to the Foot After a Lumbar Sympathetic Ganglion Block: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Pain Res.	6. 最初と最後の頁 1451 - 1456
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/JPR.S305543	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3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、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

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

1. 発表者名 佐藤遥、神田恵、川田大輔、神田浩嗣
2. 発表標題 神経細胞特異的に標的遺伝子を発現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 第69回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2022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 浩嗣 (Kanda Hirotsugu) (00550641)	旭川医科大学・医学部・准教授 (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
---------	---------