

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月9日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591906

研究課題名（和文） 難治性疼痛に対する生体モルヒネ遺伝子導入に関する研究

研究課題名（英文） Gene transfection with endogenous opioid in the intractable pain models

研究代表者

男澤 朝行（OZAWA TOMOYUKI）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：60375706

研究成果の概要（和文）： β エンドルフィンの前駆体proopiomelanocortin（POMC）を体外衝撃波（RSW）を使用する事により遺伝子導入を行い、長期間にわたり副作用なく強力な鎮痛作用を得ることを目的とした。炎症性疼痛モデル、神経障害性疼痛モデル、腰椎椎間板障害モデルを作成、POMCの筋注と同部位へRSWを照射し遺伝子導入を行った。von Frey testとCatwalkを用いた行動学的評価ではラットの疼痛行動が抑制され、後根神経節でのCGRP陽性細胞と脊髄後角のグリア活性は有意に減少した。POMCの遺伝子導入により、長期間にわたり副作用なく強力な鎮痛作用が得られる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the effects of POMC (proopiomelanocortin, the precursor for β -endorphin, an endogenous opioid) gene transfection using radial shock waves (RSWs). We used three models; inflammatory pain model, neuropathic pain model, and discogenic low back pain model. POMC gene transfection suppressed CGRP expression in the DRGs, microglial activation in the dorsal horn of the spinal cord, and pain behavior. These findings suggest the effectiveness of POMC gene transfection using RSWs for the treatment of inflammatory pain, neuropathic pain, and discogenic low back pain, without side effects for a long time.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：難治性疼痛、内因性オピオイド、体外衝撃波、遺伝子導入、神経障害性疼痛、椎間板性腰痛、proopiomelanocortin、炎症性疼痛

1. 研究開始当初の背景

痛みは病の徴候・愁訴として最も多く、医療の原点とされている。特に我が国では、高齢化社会に伴い徐々に社会的なニーズが高

まりつつあり、世界的に注目されているといえる。米国議会では2001年からの10年間を、痛みの10年とし、痛みをめぐる問題に国家レベルで取り組んでいる。また、2003年の米

国での痛みによる労働生産力損失の推計額は年間約9兆円とも試算されている。日本においても痛みは大きな社会的問題となっており、平成19年に行われた厚生労働省の国民生活基礎調査の結果によると、男性の一位が腰痛、二位が肩こり、女性の一位が肩こり、二位が腰痛、三位が関節痛となっており、実際に腰痛関節痛などの運動器の痛みが我が国の国民愁訴の上位をほとんどしめている結果となっている。

近年、我が国における高齢化は急激に進行しており、世界の中でも超高齢化社会であるといえる。これに伴い加齢による変性が進むことによる腰痛、関節痛、患者が増加しており、その中には慢性化し難治性疼痛となっている症例も少なからず存在する。日本の総人口のうち約13%がなんらかの慢性痛を持っているとの報告もされている。特に転移性脊椎腫瘍など、神経浸潤による神経障害性疼痛などの場合は治療が難しく、このような痛みは臨床の場において治療に難渋する。

このような慢性疼痛にはNSAIDsなどの通常の鎮痛薬はあまり有効でないことが多く、場合により局所麻酔薬や抗てんかん薬、抗うつ薬などが選択されるが、一般的に現在のところ特効薬は存在しないとされている。これらの難治性疼痛や癌性疼痛に対してはしばしばモルヒネなどのオピオイドが使用されているが、モルヒネは強力な鎮痛作用を持つ一方、実際の治療では依存性・耐性や呼吸抑制などの重篤な副作用が懸念される。近年ではフェンタニルパッチなどのオピオイドの貼付剤も発売され、以前に比べるとより使用しやすくなっているが、特に高齢者においてやはり副作用が問題となっている。

一方、脳内モルヒネとして知られている内因性オピオイドペプチドは、ランナーズハイなどで走っても辛くない、または、試合中の痛みはあまり痛く感じないなどの作用で一般的にも有名である。中でも内因性オピオイドであるエンドルフィンにはモルヒネの20倍ともいわれる強力な鎮痛作用を持っており副作用は全くないが、しかし、生体での代謝が早いために実際には臨床応用はされていない。そこで、内因性オピオイドであるβエンドルフィンを生体内に遺伝子導入することができれば、副作用なく、強力な鎮痛作用を、長期間得ることができるのではないかと考えた。本研究で使用するのは、内因性オピオイドであるβエンドルフィンの前駆物質であるプロオピオメラノコルチンPOMCである。この前駆物質を体外衝撃波を用いて遺伝子導入することにより、エンドルフィンの長期の発現を得ることを目的とした。

体外衝撃波を用いて内因性オピオイドの遺伝子導入を試みたという報告は国内外を通して皆無である。内因性オピオイドをウイル

スや遺伝子銃などの別の方法を用いて遺伝子導入することにより鎮痛作用を調査している研究は数例報告されているが、体外衝撃波を使用した報告は無い。

現在基礎実験で使用されている遺伝子導入法には様々なものがあるが、大きくウイルス法と非ウイルス法に分類される。ウイルス法は導入効率が良く広く使用されているが、その一方、悪性化や感染などが問題となっている。また、遺伝子銃や超音波などの非ウイルス法に分類される物理的手法は、簡便で安全であるとされているが、ウイルス法と比較すると導入効率が低いという欠点が指摘されている。

体外衝撃波による遺伝子導入法はこれらの物理的手法の中では導入効率が良いとされ、また、ウイルス法と異なり感染や悪性化の心配がない。

さらに今回の実験では、運動器の痛みの評価を行うために我々の教室で以前より行われ確立されている逆行性神経トレーサーの手法を使用する。これは、局所に投与した特殊な物質が感覚神経をトレースし、局所を支配する神経細胞を標識する手技である。免疫組織化学染色の手法と組み合わせることにより、支配神経細胞の特性を調査することができる。これまでにさまざまな疼痛疾患の支配神経の調査のために我々が使用してきた手法であり、多くの英語原著論文として報告されている。

2. 研究の目的

内因性オピオイドの一種であるβエンドルフィンの前駆体 proopiomelanocortin (POMC) を体外衝撃波 (RSW) を使用する事により遺伝子導入を行い、長期間にわたり副作用なく強力な鎮痛作用を得ることを目的とした。最も重要な点は Endomorphin の前駆体である Preproopiomelanocortin, POMC の遺伝子を作製し、神経組織やその近傍に導入、さらにタンパクとしての発現を確認し、除痛効果を確認することである。

3. 研究の方法

マウス、ラットに対し腹腔麻酔下、還流固定を行った後、椎間板、馬尾神経、後根神経節、硬膜を摘出する。クラリオスタットで10μmの凍結切片作製、スキムミルクでブロッキングを行った後、抗μ、δ、κオピオイド受容体抗体(1:1,000、ケミコン社)を用いて免疫組織化学染色を行う。さらに椎間板や周辺組織を支配する後根神経節細胞を決定するために還流固定10日前に神経トレーサーである Fluoro-gold (2 crystals: Fluorochrom 社) を椎間板や周辺組織に注射しておく。それらの組織を支配している後根

神経節細胞群に関しても抗 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体抗体 (1:1,000、ケミコン社) を用いて免疫組織化学染色を行う。蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡で観察予定である。発現量に関しては各サンプルを用い、抗 μ 、 δ 、 κ オピオイド受容体抗体を用いた Western blotting、キットを用いた ELISA で検討を行う。

また Adeno-Virus を用い、マウス、ラット、ヒトの椎間板細胞や後根神経節細胞を用い、*in vitro* での遺伝子導入を行う。ラット、マウス腰椎椎間板を腹腔麻酔下で採取する。ヒト椎間板は手術時に採取する。それぞれを酵素処理後、単層培養を行う。すでに、ラット腰椎椎間板線維輪の培養とヒト椎間板培養は成功している。また、神経細胞として新生児ラット(P7)の後根神経節を摘出、単離させた後根神経節を使用する。体外衝撃波を用いた遺伝子導入は過去の報告に従い行う。マウス、ラット、ヒトの培養椎間板細胞や培養軟骨組織に約 100 倍の効率で遺伝子導入できることは確認済みである。*In vivo* での導入方法を示す。筋肉内には $10\mu\text{l}$ の直接注入を行う。椎間板や硬膜、後根神経節へは露出後、同様に $10\mu\text{l}$ のマイクロシリンジを使用して注入する。注入後、放射型体外衝撃波の装置 (EMS 社、ドイツ) で照射を行う。導入遺伝子から実際にタンパクが作製されているかは以下の方法を用いる。培養細胞は導入後 1 週間の細胞を用いる。生体内の組織は還流固定後、椎間板、周辺組織、馬尾神経、後根神経節のクラリオスタットで $10\mu\text{m}$ の凍結切片を作製する。発現様式は Lac-Z、Endomorphin (1:1,000、ケミコン社) は免疫化学的手法を用い調べる。定量は ELISA キットを用いる。

神経傷害モデルにはラット椎間板ヘルニアモデル、坐骨神経圧挫モデル、腰部脊柱管狭窄症モデルを用いる。腹腔内麻酔 (ネプタール: 0.20ml) で麻酔後、坐骨神経傷害は鑷子で 2 秒間坐骨神経をピンチする。椎間板ヘルニアモデルは尾椎髄核を摘出し、L5 神経根上に留置後同様に鑷子で 2 秒間ピンチする。腰部脊柱管狭窄症モデルは L4/5 高位に厚さ 1mm のシリコンシートを挿入する。現時点でこれら 3 種類のモデルで 1 ヶ月以上にわたり疼痛過敏や、運動障害が個体により生じることは報告済みであり、十分準備段階は整っていると考える。

疼痛行動評価は熱刺激と圧刺激で評価する。ともに主観的要素が入らないように自動測定器を用いる (UGO Basile; Italy)。生体内の組織は還流固定後、後根神経節と脊髄を摘出後、免疫組織学的手法を用いる。疼痛関連因子の検討としては早期反応性で、痛みとの関連性が高いとされている抗 Map Kinase (P38, JUNK, 1:200、サンタクルーズ社) 抗

体を、慢性的な反応である神経ペプチドの抗 substance P、CGRP 抗体 (1:2,000、ケミコン社) の増加、神経細胞内やシュワン細胞内の TNF alpha (1:100、ケミコン社) の増減を検討する。定量はキットを用い ELISA で行う。

4. 研究成果

我々は以前に Adeno-associated virus を用いて逆行性に腰椎椎間板、神経根、脊髄に、Lac Z 遺伝子を導入可能であることを報告した (Watanabe T, et al. J Orthop Sci 2005)。また、ウサギの軟骨細胞において *in vitro* で体外衝撃波により遺伝子導入が可能であることを確認し、同研究において、導入効率の良い照射条件を調査済みである。内因性オピオイド遺伝子については、ラット cDNA ライブラリーより、目的とする POMC 遺伝子を作成しプラスミドのインサートの配列をシーケンスにより確認し内因性オピオイド遺伝子と配列が同じであることを確認済みである。これを大腸菌のグリセロールストックとして保存している。まず *in vitro* で SD ラット筋線維細胞を作り、POMC を添加、放射型体外衝撃波 (RSW) 照射により遺伝子導入を行った。その結果、比較的効率よく遺伝子導入が可能であることと有効な照射条件が見出された。さらに、そのうえで *in vivo* において足底へ Complete Freund's Adjuvant を注入した炎症性疼痛モデルラットに対して脳内オピオイドの遺伝子導入を行い、有効な鎮痛効果が得られることを確認した (Yamashita M, et al. SPINE 2009)。

次に同様に *in vivo* で左腓腹筋に POMC を筋注、同部位に RSW を照射し遺伝子導入を行った。導入局所の筋線維において β エンドルフィンの発現を認め、また、心臓血採血により血液中エンドルフィン濃度を ELISA 法で定量したところ有意な上昇を認めた。前駆物質である POMC の投与と RSW 照射によって *in vivo* でのエンドルフィンの発現が確認された。

上記を踏まえ以下の実験を計画した。ラット足背に Complete Freund's Adjuvant (CFA) を皮下注した炎症性疼痛モデル、またラット坐骨神経に chronic constriction injury model (CCI) を用い部分神経損傷を作成した神経障害性疼痛モデル、さらにラット腰椎椎間板を穿刺した腰椎椎間板障害モデルを作成した。モデル作成後、von Frey test と Catwalk を用いて行動学的評価を行った。さらに灌流固定のち後根神経節と脊髄腰膨大部を採取し、疼痛ペプチドのマーカー CGRP、マイクログリアのマーカー Iba-1、アストロサイトのマーカー GFAP で免疫組織化学染色を行った。また、

飲水量、食事量、排便量を測定し、便秘等の副作用の有無を調べた。

行動学的評価ではラットの疼痛行動が抑制され、後根神経節での CGRP 陽性細胞は有意に減少した。神経損傷によってグリアは活性化し、POMC 導入群ではこれらのグリア活性の有意な抑制を認めた。飲水量、食事量、排便量には各群、いずれの期間においても有意な変化は認めず便秘等の明らかな合併症は認められなかった。しかし内因性オピオイドの実用に向けて、予想される課題のうち最も懸念されるものは副作用についてである。この副作用の評価のため、前駆物質プロオピオメラノコルチンにより産生されることが予測されるβエンドルフィン、ACTH（副腎皮質刺激ホルモン）、MSH（メラニン刺激ホルモン）の血中濃度を測定する予定である。ACTH 過剰による症状として、コルチゾールの測定、血圧と血糖値の測定を行う必要性も検討している。

これらの結果より POMC の遺伝子導入により、長期間にわたり重大な副作用なく強力な鎮痛作用が得られる可能性が示唆された。現在我が国の高齢化に伴い慢性腰痛などの難治性疼痛患者は増加していると考えられ、今後の新たな治療法となりうると考えている。将来的な臨床応用を目指してさらに基礎実験を重ねていく予定である。

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 0 件）査読中論文 2 本

〔学会発表〕（計 8 件）

1. 佐久間詳浩、石川哲大、宮城正行、大鳥精司、井上玄、鴨田博人、新井玄、鈴木都、及川泰宏、高橋和久「脳内モルヒネであるエンドルフィンの遺伝子導入により神経障害性疼痛が抑制される」第 4 回日本運動器疼痛学会、4、ライフサイエンスセンタービル、大阪、2011 年 11 月
2. Ishikawa T, Hashimoto M, Kamoda H, Miyagi M, Arai G, Murakami K, Suzuki M, Sakuma Y, Oikawa Y, Inoue G, Ohtori S, Takahashi K. In vivo transfection of proopiomelanocortin gene by radial shock waves alleviates neuropathic pain. Neuroscience 2011, Washington D. C., USA, November, 2011.
3. Tetsuhiro Ishikawa. Gene transfection of mouse cells with precursor of endogenous endorphin in mouse cancer pain model. IMUST/RCAST-Chiba University Global COE Joint Retreat 2011. "Toward new era in the basic and clinical immunology", Oiso Prince

Hotel, Sep, 2011.

4. Tetsuhiro Ishikawa, Seiji Ohtori, Masayuki Miyagi, Hiroto Kamoda, Gen Inoue, Kazuhisa Takahashi. Transfection of rat cells with proopiomelanocortin gene using radial shock waves alleviates neuropathic pain. 66th Annual Meeting of the American Society for Surgery of the Hand. Las Vegas, USA, September, 2011.
5. Ishikawa T, Yamashita M, Miyagi M, Ohtori S, Inoue G, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Suzuki M, Kubota G, Sakuma Y, Oikawa Y, Takahashi K. Transfection of rat cells with proopiomelanocortin gene using radial shock waves alleviates neuropathic pain. 38th International Society for the Study of the Lumbar Spine. 2121502. Gothenburg, Sweden, June, 2011.
6. Ishikawa T, Yamashita M, Miyagi M, Ohtori S, Inoue G, Eguchi Y, Kamoda H, Arai G, Suzuki M, Kubota G, Sakuma Y, Oikawa Y, Takahashi K. Transfection of rat cells with proopiomelanocortin gene using radial shock waves alleviates neuropathic pain. The 8th Combined Congress of the Spine and Pediatric Sections, Asia Pacific Orthopaedic Association. Gifu, Japan, June, 2011.
7. 石川哲大、山下正臣、宮城正行、大鳥精司、井上玄、折田純久、江口和、鴨田博人、新井玄、鈴木都、久保田剛、佐久間詳浩、及川泰宏、高橋和久「内因性オピオイド前駆物質プロオピオメラノコルチン遺伝子の体外衝撃波による遺伝子導入はラット神経障害性疼痛を抑制する」第 40 回日本脊椎脊髄病学会、2-5-F30-6、京王プラザホテル東京、2011 年 4 月
8. 及川泰宏、石川哲大、山下正臣、大鳥精司、井上玄、江口和、鴨田博人、宮城正行、新井玄、鈴木都、久保田剛、佐久間詳浩、高橋和久「腰椎椎間板傷害モデルに対する内因性エンドルフィン前駆物質遺伝子導入による鎮痛効果の検討」第 40 回日本脊椎脊髄病学会、3-ST1-ST1-3、京王プラザホテル東京、2011 年 4 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

男澤 朝行 (OZAWA TOMOYUKI)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：60375706

(2) 研究分担者

豊根 知明 (TOYONE TOMOAKI)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：10407918

大鳥 精司 (OOTORI SEIJI)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40361430