

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 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21600006

研究課題名（和文） ラット in vivo RNA 干渉による侵害受容遺伝子の制御と疼痛治療への応用

研究課題名（英文） Modulation of nociceptive genes by in vivo RNA interference in rats and application to pain treatment

研究代表者

戸田 一雄（TODA KAZUO）

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80134708

研究成果の概要（和文）：

難治性疼痛は、原因が特定できずペインクリニックでの治療にも抵抗する慢性の痛みである。疼痛発生に直接関わる特定の遺伝子発現を人為的に制御することにより、新しい鎮痛法の開発につながる可能性が期待される。本研究では、痛み発生に関わる遺伝子の関与に関して、基礎的実験を行なった。トランスフェクションラットでは対照ラットと比較して疼痛閾値が有意に上昇した。本研究で難治性疼痛のメカニズムの一部が分子レベルで初めて明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Neuropathic pain can be very difficult to treat. It may be associated with abnormal sensations called dysesthesia, and pain is produced by normally non-noxious stimuli (allodynia). Recently, it is reported that nociceptive-genes are strongly concerned with producing neuropathic pain and inhibition of nociceptive-gene expression is one of the tools to treat neuropathic pain. This study revealed that inhibition of nociceptive-genes by in vivo RNA interference elevated threshold value to mechanical noxious stimuli.

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	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
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：境界医学・疼痛学

キーワード：眼窩下神経結紮モデル、三叉神経脊髄路核、トランスフェクション、RNA干渉、フォンプライ毛、外界電位、逃避反射、ラット

1. 研究開始当初の背景

難治性疼痛は、原因が特定できずペインクリニックでの治療にも抵抗する慢性の痛みである。通常の鎮痛薬が無効の場合も多く、

患者は痛みそのもののために苦しむことになり、情動面に対する影響も計り知れない。このような難治性疼痛は三叉神経領域にもしばしば見られ、代表的なものに、神経因性

疼痛とされる非定型顔面痛、ヘルペス後神経痛、舌痛症などがある。これらの疼痛の中には舌痛症などのように比較的女性に多いなど性別や年齢、その他環境因子などによる発症率の違いも臨床的に報告されている。しかし、詳細な病因は不明のままである。最近、プロラクチンが雌ラットの三叉神経節ニューロンのカプサイシン受容体 (TRPV1) を介して侵害受容性応答を亢進させることが報告され、さらに、三叉神経節ニューロンにおける特定物質の遺伝子発現が三叉神経領域の疼痛に関与し、加えて神経成長因子 NGF がこの痛みを助長するという報告も見られるようになった。これらの報告は、痛み特定の遺伝子発現が関与し、痛み発生機構の上流で、それらの遺伝子の発現を制御することによって痛みをコントロールできることの可能性を示唆するものである。そこで、疼痛発生に直接関わる特定の遺伝子発現を人為的に制御することにより、新しい鎮痛法の開発につながる可能性が期待される。本研究では、痛み発生に関わる遺伝子の関与に関して、基礎的実験を行なった。

2. 研究の目的

本研究は以下の仮説のもとに行った研究である。【仮説】三叉神経領域の神経因性疼痛モデルラットを用い、疼痛発生に関連する主要な遺伝子 (カプサイシン受容体、TRPチャンネルスーパーファミリー遺伝子、あるいはこれらの上流遺伝子) の21塩基対二本鎖siRNAを三叉神経節へ直接注入すると、RNA干渉効果が引き起こされ、注入した二本鎖RNAと相補的な配列を持つmRNAが特異的に分解されることにより、同配列を持つ遺伝子の発現が特異的に抑制されるジーンサイレンシングが生じる。疼痛発生に深く関与する遺伝子を標的遺伝子とし、*in vivo* RNA干渉を行えば、個体レベルでの疼痛閾値上昇 (鎮痛効果) となって現れる。

3. 研究の方法

次のステップで一連の実験を行った。

1. Wistar 系ラット (雄 10 週齢) をバルビ

タール麻酔下で安楽死させ、三叉神経節を含む Coronal 脳スライス標本 (厚さ 0.2mm) を作製し直径 10cm 培養用プラスチックシャーレで神経細胞用培地 (Sigma 社製) を用いて培養する。高い RNA 干渉効果が期待される siRNA を脳スライス培養標本に添加し、12 時間インキュベートし、トランスフェクションする。GFP 蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いてトランスフェクション効率 (70~80%以上) を確認する。トランスフェクション処理した脳スライスを、通常培地に交換し、さらに 8 日間培養を継続する。培養した脳スライス上で、該当するニューロンの自発放電活動を記録し、ニューロンの壊死あるいはアポトーシスがないことを確認した。ニューロンの vitality を確認した培養脳スライス標本を液体窒素で瞬時凍結し、全 RNA を抽出精製する。RNA を鋳型にして cDNA を合成し、Light Cycler (Roche 社製) を用いて Real-time RT-PCR を行い、カプサイシン受容体あるいは TRP チャンネルスーパーファミリー遺伝子の mRNA を定量的に求め、添加した siRNA の効果を確認した。

2. 通法に従って眼窩下神経結紮モデル (IO-CCI) を作成し、麻酔下で脳定位ステレオ装置に標準固定し、脳図譜に従って (Stereotaxic Coordinates, Paxinos & Watson, 1998)、歯科用マイクロドリルで頭蓋に微小穴を設け、カニューレを介してマイクロシリンジポンプ (Harvard 社製) を用い、 $0.2 \mu\text{l}/\text{min}$ の速度で三叉神経節にカプサイシン受容体あるいは TRP チャンネルスーパーファミリー遺伝子の siRNA を 5~50 μg を含有するトランスフェクション導入試薬 1~2 μl を注入した。注入後は歯科用セメントで固定・封鎖した。対照ラットとしては、無処置ラットを用いた。痛覚感受性試験として投与後 1, 2, 4, 8 日目に機械的刺激に対する逃避反射の閾値を測定した。すなわち、フォンフライ毛による機械的刺激を三叉神経支配領域である両側前額部、顔面頬部、下顎部の計 6 箇所に与え、行動学的に見た鎮痛効果の経日的変化を解析した。

3. 電気生理学的記録として、フォンフライ毛刺激と有鉤鉗子によるピンチ刺激、および電気刺激に対する誘発スパイクを三叉神経脊髄路核ニューロン活動を記録する。

4. 別ラットを用いて siRNA 投与後 1, 2, 4, 8 日目にそれぞれラットを屠殺し、脳灌流固定後、三叉神経節スライス標本作製する。In situ ハイブリダイゼーションにより、カプサイシン受容体あるいは TRP チャンネルスーパーファミリー遺伝子の mRNA 発現を観察し、免疫組織化学的観察により同受容体の局在を調べた。

4. 研究成果

1) IO-CCI モデルにおける逃避反射閾値

IO-CCI ラットでは顔面皮膚に対するフォンフライ刺激で逃避反射の閾値の低下が、手術後 1 日目から観察され、4 日目以降は処置していない対照ラットとの間に有意な差が見られた。(図 1)

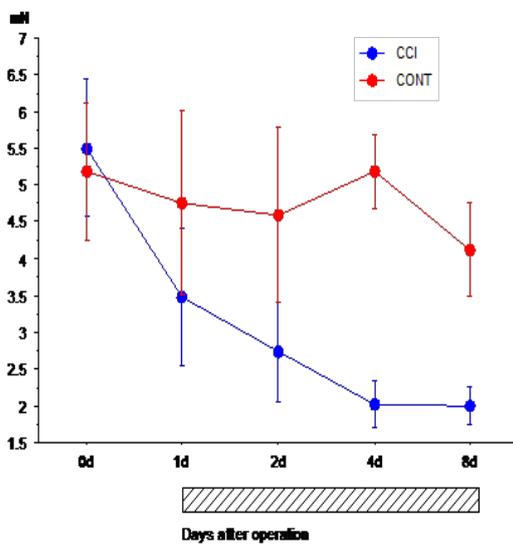


図 1

2) そこで、結紮後 4 日目にトランスフェクションし、その後 7 日間にわたり行動学的閾値変動を記録した。すなわち、IO-CCI モデルにおいてトランスフェクションラット (TR-rat, IO-CCI + siRNA) では行動学的にトランスフェクション 1 日目から対照ラット

(C-rat, IO-CCI + Saline) と比較してフォンフライ毛刺激に対する閾値の上昇が観察され、その効果は少なくとも 7 日間持続した。(図 2)

3) TR-rat と C-rat において顔面皮膚に与えた電気刺激に対する三叉神経脊髄路核における侵害受容性応答を記録した。図 3 に示すように、外界電位をタングステン微小電極を用いて記録し、陰性電位 (下方) の振幅を測定した。個体によるバラつき、刺激および記録電極の位置による変動を考慮して、閾値の 2 倍の刺激強さの電気刺激によって誘発される振幅をトランスフェクションラットと対照ラット (C-rat, IO-CCI + Saline) とで比較した。

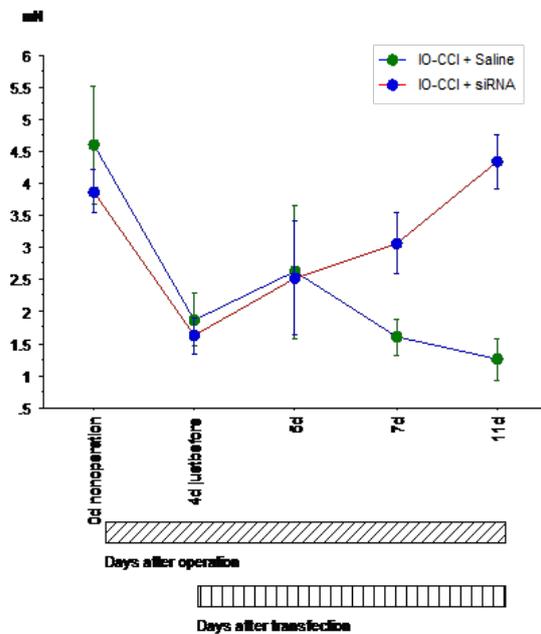


図 2

典型的な外界電位の例を図 3 に示す。反応の開始は潜伏時間 1.2-2.3 ms で記録できた。最初の下向きの振れが陰性電位であり、侵害刺激によって生じた細胞活動の集合電位をとらえたものと解釈できる。

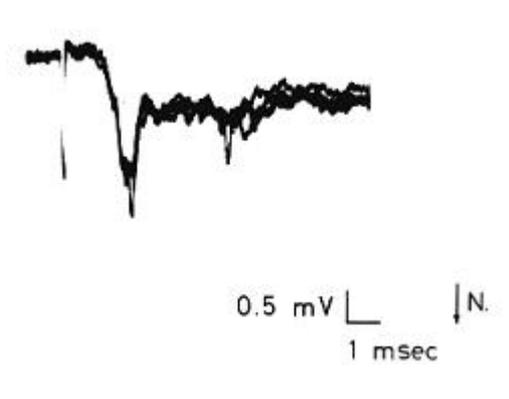


図 3

この陰性電位の振幅を比較すると、TR-rat ではC-rat にくらべて有意に減弱されていた。(図 4)

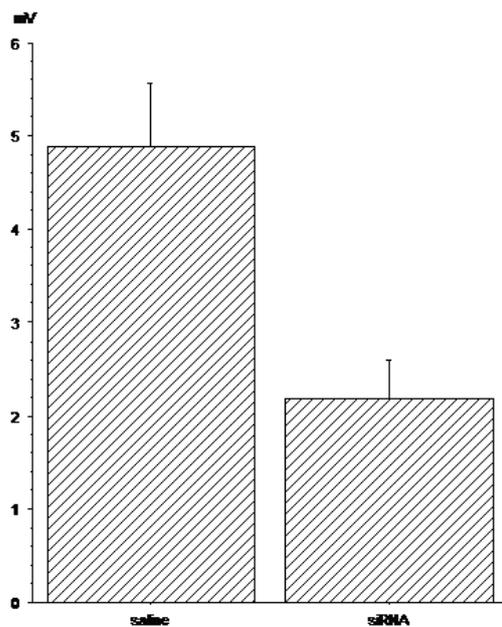


図 4

以上の結果をまとめると、1) TR-rat では行動学的にトランスフェクション1日目から対照ラット(C-Rat)と比較して閾値の上昇が観察され、その効果は少なくとも7日間持続した。2) トランスフェクション7日目における三叉神経脊髄路核での Field Potential (外界電位) の振幅は TR-Rat では C-Rat と比較してその陰性成分が減弱された。

本研究は、三叉神経領域の難治性疼痛と関係の深い中枢性および末梢性組織に着目し、最新の *in vivo*での RNA 干渉技術を利用して、疼痛発生に直接関わる特定の遺伝子発現を人為的に制御する初めての試みであった。その影響について行動学的な個体レベルでの鎮痛作用、細胞レベルでのニューロン興奮性の変化など各階層における多元指標による系統的な解析を行った研究であった。

難治性疼痛は現在でも詳しい病因が不明とされており、臨床的にも対処法が困難な場合が多く見られる。本研究で難治性疼痛のメカニズムの一部が分子レベルで初めて明らかになり、特に三叉神経領域の神経因性疼痛の原因解明と効果的な予防・治療法の開発に少なからず貢献することが期待される。ペインクリニックで痛みを分子制御する基盤となる研究である。

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 3 件)

Kimoto M, Zeredo JL, Toda K. Hypergravity conditioning on ileal movements in rats, *Aviation, Space and Environmental Medicine*, 2012, in press

Kimoto M, Zeredo JL, Toda K. Irritant-drinking Behaviour can be Modified by gravity-stress loaded in developing but not in adult rats. *Stress and Health* 27: 34-41 (2011)

Moritaka K, Zeredo JL, Kimoto M, Nasution FH, Hirano T, Toda K. Response properties of nucleus reticularis lateralis neurons after electroacupuncture stimulation in rats. *Am J Chin Med*. 2010;38(5):869-80.

[学会発表] (計 6 件)

Toda K, Zeredo JL, Moritaka K, Yamashita H, Kaida K, Kimoto M: Antinociceptive effects induced by gravity stress in rats: Sex differences. 43rd Meeting of the European Brain and Behavior Society (EBBS), Seville, Spain, September 9-12, 2011

Kimoto M, Ikezaki M, Kato M, Kohata A, Takashima K, Takeuchi M, Nemoto S, Zeredo JL, Toda K: Comparison of stress-induced modulation of smooth muscle activities between small and large intestine in adult rats. 43rd Meeting of the European Brain and Behavior Society (EBBS), Seville, Spain, September 9-12, 2011

Okada Y, Miyazaki T, Hotokezaka H, Fujiyama R, Toda K: Signaling pathway in extracellular calcium sensing of frog parathyroid cells. ICCPB2011, Nagoya, Japan, May 31-June 5, 2011

Kimoto M, Kumei Y, Zeredo JL, Toda K: Stress-induced modulation of ileal peristaltic movement in rats, 7th World Congress on Stress, Leiden, The Netherlands, August 25-27, 2010

Kimoto M, Zeredo JL, Kumei Y, Toda K: Trigeminal irritant-induced behavior can be modified by gravity stress in younger rats, EFIC-conferences, "Pain in Europe VI", Lisbon, Portugal, September 9-12, 2009

Ishida, T, Zeredo JL, Yabushita T, Seki S, Fusejima Y, Fukushima G, Toda K, Kumei Y: Nociceptive behaviors in rats at low gravity conditions, EFIC-conferences, "Pain in Europe VI", Lisbon, Portugal, September 9-12, 2009

[図書] (計 2 件)

戸田一雄, 木本万里: 基礎解剖生理学 第3版. おうふう出版, 東京, pp. 1-449, 2011

植田弘師, 戸田一雄: はじめての痛み学. おうふう出版, 東京 pp. 1-170, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

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

戸田 一雄 (TODA KAZUO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 80134708

(2) 研究分担者

木本 万里 (KIMOTO MARI)

日本女子大学・家政学部・准教授

研究者番号: 60101565

(3) 連携研究者

なし