

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592421

研究課題名(和文) 疼痛治療用ヘルペスウイルスの作製

研究課題名(英文) A novel genetically-engineered HSV-1 for treatment of chronic pain

研究代表者

福原 浩 (Fukuhara, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20292948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の趣旨は、ヘルペスウイルス(HSV-1)を用いて、間質性膀胱炎や癌性疼痛など難治性疼痛の治療を行うことである。神経節に潜伏感染するという、HSV-1が本来有する特徴に着目し、潜伏感染時もモルヒネ様分子を持続的に発現させて難治性疼痛を緩和させるウイルスを作製することを研究目的としている。

まず、モルヒネ様物質を発現するウイルスT3-Xを作製した。マウス足底にウイルスを注射してホルマリンテストを行ったところ、その行動実験では、モルヒネ様物質の発現群が対照群と比較して有意に疼痛を減弱させていた。さらに、その神経後根でRT-PCRにてモルヒネ様物質の発現の有無を確認した。

研究成果の概要(英文)：Chronic pain is a serious medical condition. We constructed a novel genetically-engineered Herpes Simplex virus-1 (HSV-1) for treatment of chronic pain. The new virus, T3-X, expresses the morphine-like molecule even at latency. We tested the efficacy of T3-X in a mouse model of chronic neuropathic pain. Gene transfer and expression by HSV-1 may be suitable for developing treatments for chronic pain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：遺伝子治療 疼痛 ヘルペスウイルス 間質性膀胱炎

1. 研究開始当初の背景

間質性膀胱炎や癌性疼痛などの慢性疼痛は、従来の鎮痛薬に対してしばしば抵抗性となり、治療上難渋することが多い。疼痛関連の経路を対象とした小分子を同定し、選択的に抑制もしくは増強するアプローチが取られることが多く、イオンチャンネル、神経伝達物質、およびその受容体などがよく研究されてきたが、実用化はこれまで困難であった。例えば、疼痛関連の受容体を選択的に阻害する抗体や薬剤を発見しても、全身投与のために高熱を発するなどの副作用が出現し、臨床試験継続不可能となるケースが続いている。遺伝子導入の面でも、ベクター等の導入効率は低く、恒常的に遺伝子を発現させ続けることは困難であり、しかも一過性であった。ウイルスでの遺伝子導入は効率が良好であったが、発現はやはり一過性であり、一方、宿主細胞に組み込まれるレトロウイルスは安全面で問題がある。その点、ヘルペスウイルス(HSV-1)は神経節に潜伏感染可能であること、ウイルスゲノムが大きいため DNA サイズが大きい遺伝子も発現が可能であること、などから疼痛に対する治療に適していると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヘルペスウイルス(HSV-1)を用いて、間質性膀胱炎や癌性疼痛など難治性疼痛の治療を行うことである。神経節に潜伏感染するという、HSV-1 が本来有する特徴に着目し、潜伏感染時もモルヒネ様分子を持続的に発現させて難治性疼痛を緩和させるウイルスを作製することを主な目的としている。治療のイメージとしては、疼痛部位にウイルスを注射すると、ウイルス自身が軸索を逆行性に後根神経節まで伝達していき、そこで潜伏感染して LAT プロモータ下にモルヒネ様物質が持続的に発現し、疼痛の緩和を図る、というものである。具体的には、上記の目的に合う HSV-1 を作製し、マウスを使用した動物実験の疼痛モデルでの検証を行う予定である。

3. 研究の方法

今回の研究では、潜伏感染状態でも有効な LAT (latent) プロモータ下にモルヒネ様分子を発現する T3-X ウイルスをまず作製する。ヘルペスの潜伏感染については、詳細に調べられており、HSV-1 についても LAT プロモータがウイルスの活動を停止した状態でも蛋白を発現することが知られている。同時に、陰性コントロールとして、T-03 (発現分子なし) ウイルスを作製し、陽性コントロールとして、CMV プロモータ下にモルヒネ様分子を発現する T1-X ウイルスを作製する。次に、マウス足底に注射して、その神経後根で HSV-1 抗体にて感染の有無を、ELISA にてモルヒネ様分子の発現の有無を確認する。その後で、マウスで疼痛の評価を行う。マウス

足底にホルマリンを注射して化学刺激による自発痛を評価するモデルや、坐骨神経部分損傷モデル、CFA(Complete Freund adjuvant)による炎症性疼痛モデル、足底筋層を持ち上げた後に筋を縫合する術後痛モデル等にて疼痛の評価を行う。

4. 研究成果

平成 24 年度には、既存の T-BAC システムを改変して、潜伏感染 LAT プロモータ下にモルヒネ様物質を発現するウイルス T3-X を作製した。平成 25 年度には、新たに作製された T3-X の動物実験における疼痛の評価を様々な方法で行った。

最終年度である平成 26 年度には、これまでの実験結果から適切なモデルを選択し、行動実験を進めた。具体的には、マウス足底にウイルスを注射して、右足底皮下に 30G 針を用いて 5%ホルマリン溶液を投与し、右後肢への licking time の持続時間を測定するホルマリンテストを行った。その行動実験では、モルヒネ様物質の発現群が対照群と比較して有意に疼痛を減弱させていた。さらに、その神経後根で RT-PCR にてモルヒネ様物質の発現の有無を確認した。これは、神経後根でのモルヒネ様物質の発現が疼痛を減弱させることを証明し、さらに、モルヒネ様物質を発現する疼痛ウイルスの作製に成功したことを示している。

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 22 件)

1. Matsushita H, Enomoto Y, Kume H, Nakagawa T, Fukuhara H, Suzuki M, Fujimura T, Homma Y, Kakimi K. A pilot study of autologous tumor lysate-loaded dendritic cell vaccination combined with sunitinib for metastatic renal cell carcinoma. J Immunother Cancer. 2014, in press.
2. Kume H, Kawai T, Nagata M, Azuma T, Miyazaki H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Fukuhara H, Homma Y. Intermittent docetaxel chemotherapy is feasible for castration-resistant prostate cancer. Molecular and Clinical Oncology. 2014, in press.
3. Fujimura T, Yamada Y, Sugihara T, Azuma T, Suzuki M, Fukuhara H, Nakagawa T, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Nocturia in

- men is a chaotic condition dominated by nocturnal polyuria. *Int J Urol*. 2015, in press.
4. Taguchi S, Fukuhara H, Kakutani S, Takeshima Y, Miyazaki H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Igawa Y, Kume H, Homma Y. Risk factors for clinical metastasis in men undergoing radical prostatectomy and immediate adjuvant androgen deprivation therapy. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(24):10729-33.
 5. Kanatani A, Nakagawa T, Kawai T, Naito A, Sato Y, Yoshida K, Nozaki K, Nagata M, Yamada Y, Azuma T, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Adjuvant Chemotherapy Is Possibly Beneficial for Locally Advanced or Node-Positive Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2014, in press.
 6. Ito H, Aizawa N, Fujita Y, Suzuki M, Fukuhara H, Homma Y, Kubota Y, Ito M, Andersson KE, Igawa Y. Long-term caloric restriction in rats may prevent age-related impairment of in vitro bladder function. *J Urol*. 2014, in press.
 7. Kakutani S, Fukuhara H, Taguchi S, Nagata M, Niimi A, Hattori M, Miyazaki H, Fujimura T, Nakagawa T, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Combination of docetaxel, ifosfamide and cisplatin (DIP) as a potential salvage chemotherapy for metastatic urothelial carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2014, in press.
 8. Taguchi S, Fukuhara H, Azuma T, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Ishikawa A, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Ultra-early versus early salvage androgen deprivation therapy for post-prostatectomy biochemical recurrence in pT2-4N0M0 prostate cancer. *BMC Urol*. 14, 81-86, 2014.
 9. Yamada D, Matsushita H, Azuma T, Nakagawa T, Nagata M, Yamada Y, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Kume H, Homma Y, Kakimi K. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor as a predictor of the response of metastatic renal cell carcinoma to tyrosine kinase inhibitor therapy. *Mol Clin Oncol*. 2, 1023-1027, 2014.
 10. Aizawa N, Ito H, Sugiyama R, Fujimura T, Suzuki M, Fukuhara H, Homma Y, Igawa Y. Selective inhibitory effect of imidafenacin and 5-hydroxymethyl tolterodine on capsaicin-sensitive C-fibers of the primary bladder mechanosensitive afferent nerves in the rat. *J Urol*. 2014, in press.
 11. Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Matsui H, Fujimura T, Nishimatsu H, Fukuhara H, Kume H, Yu C, Kattan MW, Kiyohide F, Homma Y. Robot-assisted versus other types of radical prostatectomy: population-based safety and cost comparison in Japan, 2012-2013. *Cancer Sci*. 105, 1421-1426, 2014.
 12. Nishimatsu H, Kitamura Y, Yamada D, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Nakagawa T, Enomoto Y, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Improvement of symptoms of aging in males by a preparation LEOPIN ROYAL containing aged garlic extract and other five of natural medicines - comparison with traditional herbal medicines (Kampo). *Aging Male*. 17, 112-116, 2014.
 13. Sato YT, Fukuhara H, Suzuki M, Fujimura T, Nakagawa T, Nishimatsu H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M,

- Homma Y. Long-term results of radical prostatectomy with immediate adjuvant androgen deprivation therapy for pT3N0 prostate cancer. *BMC Urol.* 14, 13-18, 2014.
14. Kamei J, Nishimatsu H, Nakagawa T, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Igawa Y, Kume H, Homma Y. Risk factors for septic shock in acute obstructive pyelonephritis requiring emergency drainage of the upper urinary tract. *Int Urol Nephrol.* 46, 493-497; 2014.
15. Taguchi S, Nakagawa T, Hattori M, Niimi A, Nagata M, Kawai T, Fukuhara H, Nishimatsu H, Ishikawa A, Kume H, Homma Y. Prognostic Factors for Metastatic Urothelial Carcinoma Undergoing Cisplatin-based Salvage Chemotherapy. *Jpn J Clin Oncol.* 43, 923-928, 2013.
16. Nishimatsu H, Suzuki E, Nomiya A, Niimi A, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Homma Y. Adrenomedullin and Angiopoietin-1 Additively Restore Erectile Function in Diabetic Rats: Comparison with the Combination Therapy of Vascular Endothelial Growth Factor and Angiopoietin-1. *J Sex Med.* 10, 1707-1709, 2013.
17. Yamada D, Nishimatsu H, Kumano S, Hirano Y, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Enomoto Y, Kume H, Homma Y. Reduction of prostate cancer incidence by naftopidil, an $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonist and transforming growth factor- β signaling inhibitor. *Int J Urol.* 20, 1220-1227, 2013.
18. Miyazaki H, Kume H, Suzuki M, Fujimura T, Fukuhara H, Enomoto Y, Nishimatsu H, Homma Y. Leukopenia as a risk factor for osteonecrosis of the jaw in metastatic prostate cancer receiving zoledronic acid and docetaxel. *BJU Int.* 110, E520-525, 2012.
19. Nakamura M, Fujimura T, Nagata M, Hosoda C, Suzuki M, Fukuhara H, Enomoto Y, Nishimatsu H, Kume H, Igawa Y, Homma Y. Association between lower urinary tract symptoms and sexual dysfunction assessed using the core lower urinary tract symptom score and International index of erectile function-5 questionnaires. *Aging Male.* 15, 111-114, 2012.
20. Sugihara T, Yasunaga H, Horiguchi H, Nishimatsu H, Fukuhara H, Enomoto Y, Kume H, Ohe K, Matsuda S, Homma Y. Management trends, angioembolization performance and multiorgan injury indicators of renal trauma from Japanese administrative claims database. *Int J Urol.* 19, 559-563, 2012.
21. Fujimura T, Kume H, Nishimatsu H, Sugihara T, Nomiya A, Tsurumaki Y, Miyazaki H, Suzuki M, Fukuhara H, Enomoto Y, Homma Y. Assessment of lower urinary tract symptoms in men by international prostate symptom score and core lower urinary tract symptom score. *BJU Int.* 109, 1512-1516, 2012.
22. Nagata M, Sakurai-Yageta M, Yamada D, Goto A, Ito A, Fukuhara H, Kume H, Morikawa T, Fukayama M, Homma Y, Murakami Y. Aberrations of a cell adhesion molecule CADM4 in renal clear cell carcinoma. *Int J Cancer* 130, 1329-1337, 2012.

〔学会発表〕(計 12 件)

〔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：
出願年月日：
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

福原 浩(FUKUHARA HIROSHI)
東京大学、医学部附属病院、准教授
研究者番号：20292948

(2) 研究分担者

伊藤 伸子(ITOU NOBUKO)
東京大学、医学部附属病院、講師
研究者番号：80332609

(3) 連携研究者

なし