

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659706

研究課題名(和文)脳由来神経栄養因子を標的とした癌性疼痛の遺伝子治療

研究課題名(英文)Gene therapy in cancer-induced bone pain using a blockade of brain derived neurotrophic factor

研究代表者

中塚 秀輝 (NAKATSUKA, HIDEKI)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70263580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：1. BDNFはニューロモデュレーターとして疼痛伝達に重要な役割を果たしている。疼痛時に後根神経節(DRG)で発現するBDNFexon1は、神経障害性疼痛モデル(Chungモデル)ではL4とL5で著しく増加していたが、癌性疼痛モデルではL3 DRGで増加が見られたのみであった。これはがん細胞を移植した脛骨の支配領域がL3であり、脛骨を介して癌性疼痛が発現していることを示している。

2. 神経障害性疼痛モデル(Chungモデル)で鎮痛効果が認められたBDNFexon1のデコイは癌性疼痛モデルではそれほど有効ではなかったことから、神経障害性疼痛と癌性疼痛の機序は異なっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) plays an important role in the pathological pain state in some pain models including bone cancer pain. Changes in BDNF in dorsal root ganglia (DRG) were studied in a rat bone cancer pain model. BDNF was increased in L3 DRG after intra-tibial inoculation of MRMT-1 rat breast cancer cells.

2. Decoy DNAs for BDNF exon1 not effective for pain relief derived from cancer. These results suggested that development of cancer pain were different mechanisms from neuropathic pain.

研究分野：麻酔・集中治療医学

キーワード：骨転移癌性疼痛モデル 後根神経節 BDNF DNAデコイ

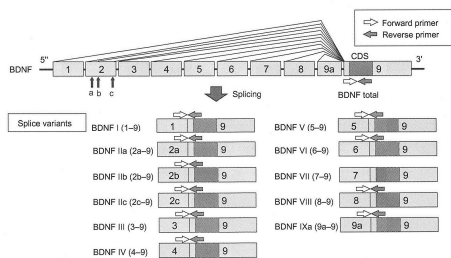
1. 研究開始当初の背景

(1) 癌性疼痛は神経障害性疼痛と並んで疼痛治療がきわめて困難で治療に難渋している。有効な治療法がない中、疼痛関連遺伝子の検索が進められ、そのなかで神経系の初期発生に関わっているいくつかの神経栄養因子(NGF、BDNF など)が注目されてきた。

我々はまず神経障害性疼痛モデルとして Chang モデルを作成し、末梢からの疼痛伝達の中継組織として後根神経節(DRG)に注目し、DRG での疼痛伝達に神経栄養因子がいかなる形で関与しているのか調べた。

(2) 脳由来神経栄養因子(Brain derived neurotrophic factor; BDNF)は特徴的な遺伝子構造をしており、共通の翻訳領域の前に 9 つの exon variant を持っている(Timmusk et al, Neuron,1993)。

BDNF の遺伝子構造



神経障害性疼痛時にどの exon が痛み増幅に関与しているのかを調べた結果、疼痛時に exon1 が著しく増加することを見出した(Kobayashi et al, Brain Res,2008)。我々は Exon1 の発現調節領域に注目し Exon1 の上流部の配列に注目し、ルシフェラーゼアッセイを行って exon1 の発現を調節している領域(約 35bp)を特定した。この配列に対応する DNA(35bp)を合成し、これをデコイとして脊髄くも膜下腔に投与することで神経障害性疼痛時に増加する exon1 のみを抑制し、鎮痛を実現することができた。(Obata et al, BBRC, 2011)。

なお決定したデコイ配列は、

ACCGGTTCCCTGTGGGCAACTAGTGGCTCGCCCGGG

である。

2. 研究の目的

癌による疼痛には複雑な要因が絡んでおり、神経系による疼痛の伝達以外に増幅因子、抑制因子、サイトカインが関与しており単一の因子によるとは限らない。BDNF 遺伝子を完全に抑制すると鎮痛は可能であるが、記憶、学習、情動などの中枢活動が抑制されさらに神経変性疾患を引き起こす恐れがある。神経障害性疼痛の実験結果から、全ての BDNF を抑制する方法よりも、exon1 のみの増加を抑制することで鎮痛を可能にすることができると考えてデコイ DNA を脊髄くも膜下腔に投与してみた。

3. 研究の方法

(1) ラットの脛骨近位端の骨髓腔にラット乳がん細胞(MRMT-1) 3×10^3 cells を移植し、von Frey テストで疼痛行動を調べた。観察は 2 週間続け最初の 1 週間目に CT スキャンで脛骨を観察し、癌細胞の増殖を確認した後、7 日目、8 日目、9 日目と 3 回に分けて脊髄くも膜下腔にデコイ DNA を投与した。その後も疼痛行動を観察し、1 週間後に DRG および脊髄から RNA を抽出し、定量 PCR 法で BDNF mRNA の発現をみた。

(2) BDNF mRNA の定量は NCBI のデータベースにアクセスして、BDNF exon1 と翻訳領域の配列から、forward primer と reverse primer の配列を決定し、さらに standard を作成し、検量線とした。さらに House keeping gene としてリボゾームタンパク RPL27 遺伝子を選び内部標準とした。

Primer 配列(5' 3'):

BDNF exon I (Amplicon size:159bp)

Forward: TGTGGGGAGACGAGATTTT

Reverse: CGTGGACGTTTGTCTCTTTC

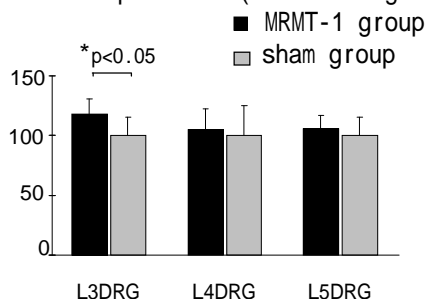
RPL27(Amplicon size:230bp)

Forward: GAATTGACCGCTATCCCAGA

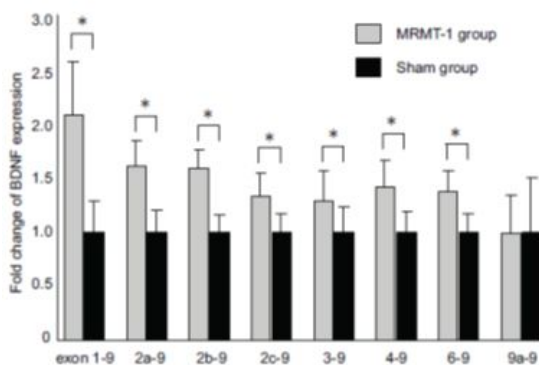
Reverse: TCGCTCCTCAAACCTTGACCT

後根神経節での BDNF の変化は L4、L5 では見られず、L3 で観察された。これは脛骨からの知覚神経が経由する後根神経節は L3 である報告と一致している (T.K.Y.Kaan et al, Brain, 2010)。

BDNF mRNA expression (% of sham group)



乳癌細胞を投与したラットの L3 DRG で増加した BDNF の variant exon の内訳は variant 9a 以外の全ての variant で有意な増加が見られた。



4. 研究成果

癌性疼痛ラットの鎮痛治療を目的とした脊髄くも膜下腔へのデコイ DNA 投与は、神経障害性疼痛モデルラットに比較して、有意な鎮痛効果は得られなかった。

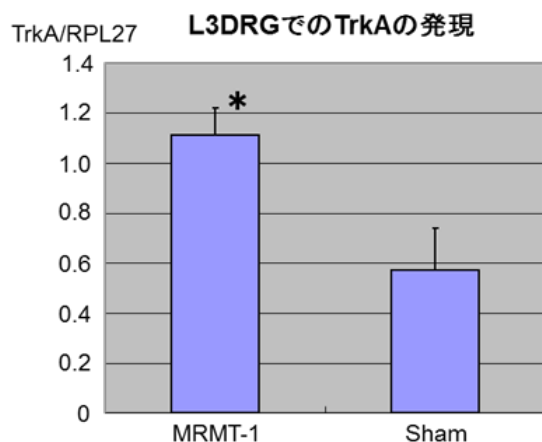
この原因の 1 つは痛覚を伝達する知覚神経は BDNF 以外にも NGF, NT-3 などの神経栄養因子が単独あるいはネットワークによってコントロールされていることによると思われる。癌性疼痛モデルは癌細胞が分泌する種々のメディエーターが関与しており、神経障害性疼痛よりもさらに複雑な因子が絡んでいると思われた。とくに個々の神経栄養因子に対応した個々の受容体 (NGF の受容体である TrkA, BDNF の受容体である TrkB, NT-3 の受容体である TrkC) の発現パターンを同時に解析することで、痛み伝達における神経栄養因子と受容体発現が果たす autocrine 的な役割が明らかになれば、このカスケードを断ち切ることによって、鎮痛効果を発揮できると考えている。がん細胞自身が合成している BDNF を人工的に合成した TrkB isoform2 発現ベクター (細胞内リン酸化ドメインのない発現ベクター) によってトラップできれば、このベクターを脊髄くも膜下腔で発現させ鎮痛効果を得ることができる。

なお作成した TrkB 発現ベクターの構造は

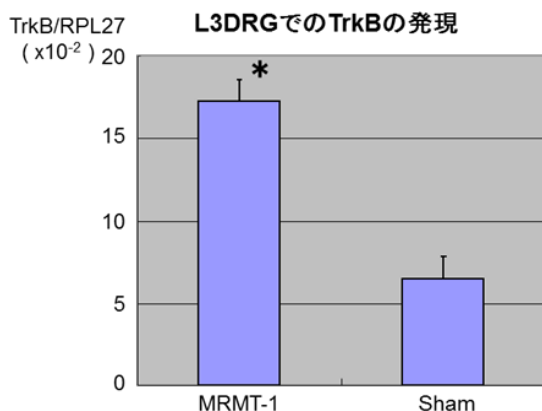
CMVprq - TrkB(2) - TM - EGFP - PolyA signal
である。

L3DRG での神経栄養因子の各受容体を分析した結果 TrkA (NGF の受容体)、TrkB (BDNF の受容体) とともに増加していることから、autocrine 様のメカニズムが働いていると思われる。がん細胞の in vitro と in vivo での発現パターンが異なっていることを検証する必要がある。

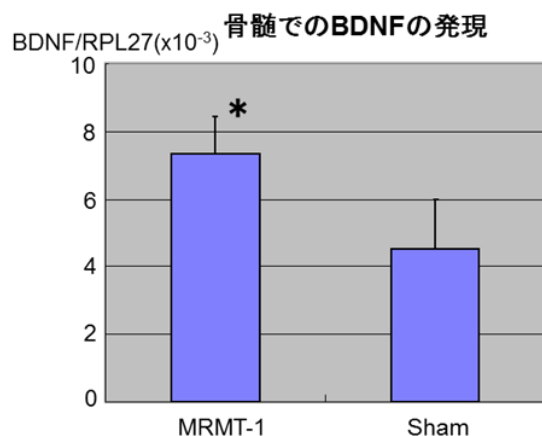
MRMT-1 がん細胞をラット脛骨に投与 2 週間後の L3DRG 内の TrkA



MRMT-1 がん細胞をラット脛骨に投与 2 週間後の L3DRG 内の TrkB



MRMT-1 がん細胞をラット脛骨に投与 2 週間後の脛骨骨髄における BDNF



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)

[学会発表](計 0 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

中塚 秀輝 (NAKATSUKA, Hideki)
川崎医科大学・麻酔・集中治療医学 2
・教授
研究者番号： 70263580

(2)研究分担者

前島 亨一郎 (MAESHIMA, Kyoichiro)
川崎医科大学・麻酔・集中治療医学 2
・講師
研究者番号： 20549852

(3)研究協力者

板野 義太郎 (ITANO, Yoshitaro)
柘植 雅嗣 (TUGE, Masatsugu)