

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 5 月 10 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592008

研究課題名（和文） 脳由来神経栄養因子に対する DNA デコイによる疼痛制御の基礎的研究

研究課題名（英文） Basic research of pain control by DNA decoy for brain-derived neurotrophic factor

研究代表者

横山 正尚（YOKOYAMA MASATAKA）

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号：20158380

研究成果の概要（和文）：神経障害性痛モデルの脊髄レベルで、特異的に過剰に発現する脳由来神経栄養因子(BDNF)のエクソン-1 に対する DNA デコイを作成した。疼痛モデルの脊髄レベルにおいて BDNF エクソン-1 をノックダウンするために、作成した DNA デコイを脊髄内投与し、炎症痛モデルおよび神経障害性痛モデルで痛み反応の減弱を確認した。

研究成果の概要（英文）：We made DNA decoy for brain-derived neurotrophic factor (BDNF) exon-1 that is increased significantly in the spinal level of neuropathic pain model. We administered DNA decoy intrathecally to knock-down BDNF exon-1 in pain model rats, and confirmed that pain response was decreased by DNA decoy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：神経障害性痛、脳由来神経栄養因子、エクソン、DNA デコイ、遺伝子療法

1. 研究開始当初の背景

疼痛の基礎的研究は最近飛躍的に発展したが、臨床的には神経因性疼痛などいわゆる難治性疼痛で多数の患者が苦しんでいるのが現状である。当グループでは根治的療法として疼痛の遺伝子療法を目指し成果を報告してきた（*Anesth Analg* 98:1093-8, 2004. *Anesth Analg* 104:936-43, 2007. *Brain Res* 1219:26-31, 2008）。特に脊髄の後根神経節ニューロンでの疼痛関連遺伝子の抑制をここ

数年研究してきたが（基盤研究 C:平成 14 年度, 神経栄養因子アンチセンス RNA の脊髄腔内投与による難治性疼痛治療）（基盤研究 C:平成 17 年度, 難治性疼痛に対する siRNA を用いた遺伝子療法の基礎的研究）、効果は十分ではない。

一方、最近神経因性疼痛の成立にニューロモジュレーターとしての脊髄の BDNF が大きく関与していることが示唆されている（*Nature* 438, 2005）。BDNF には 11 のエクソンが存在するが、疼痛に関与する BDNF エクソンを我々

は最近特定し、世界に先駆けて報告した (Biochem Biophys Res Commun 362: 682-8, 2007. Brain Res 1206: 13-9, 2008)。特定 BDNF エクソンをノックダウンして難治性疼痛を治療した試みはなく、今までに培った技術をもとに、新規の試みとして BDNF の DNA デコイを作成し、上述の研究目的を発想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の主眼は疼痛のニューロモジュレータとして機能する脳由来神経栄養因子 (BDNF) のエクソンに注目し、エクソンの転写を抑制するデコイを作成し、難治性疼痛治療の基礎を確立することである。

具体的には、(1) 疼痛モデルの脊髄後根神経節 (DRG) で過剰発現するエクソンの転写調節領域を特定し、転写を抑制する DNA 配列 (DNA デコイ) を作成する。(2) 疼痛モデルにおいて脊髄内に作成した DNA デコイを投与し、BDNF 合成阻害を観察し、鎮痛効果を検討する。(3) 最終的には安全性を確認し、臨床における治療法開発への道を探ることである。

3. 研究の方法

【平成 21 年度】

(1) BDNF エクソン 1 の転写調節領域の特定

エクソン 1 とその上流領域を 3 つの領域 (短、中、長) に分割し、転写に関係している重要部分の大方の検索を実施する。それぞれの領域を持つフラグメントを組み込んだプロモーターアッセイ用プラスミドをセンス、アンチセンスの方向で作成し、C6 細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定し、最も反応の強い部分を特定する。

(2) DNA デコイ候補のデザイン

特定した領域をさらに幾つかのフラグメントに分割し (シエマは 35bp ずつ 7 つに分割した例)、転写を効率よく抑制するための DNA 配列 (DNA デコイ候補) をデザインする。

【平成 22 年度】

(1) DNA デコイ候補による転写活性の抑制効果の測定およびデコイの決定

前年度作成した幾つかに切り分けたフラグメントを組み込んだ DNA デコイ候補を用い、*in vitro* でラット BDNF プロモーター部の転写活性の抑制を測定する。

最も転写活性を抑制したフラグメント、あるいは著明に抑制する数種類のフラグメントを組み合わせたものを本研究のデコイとして使用する。

(2) DNA デコイの作成

(1) の結果を受けて、フラグメントをプラスミドに組み込み、PCR により増幅、精製、調整する。

【平成 23 年度】

(1) *in vivo* でのデコイの鎮痛効果確認

① 炎症性疼痛モデル (CFA 測定投与モデル) に対する効果

炎症性疼痛モデルのラット脊髄内に DNA デコイを投与し、鎮痛効果を確認する。投与の量、投与回数を数種類施行し、最も効果のある投与方法を検討する。対照群としてはビークルの投与群を作成する。

② 神経因性疼痛モデル (L5 脊髄神経結紮モデル) に対する効果

炎症性疼痛モデルと同様に観察する。

(2) DNA デコイの安全性の確認

デコイ投与による副作用の有無を組織学的および行動学的に検証し、将来の臨床応用の道を目指す。

4. 研究成果

(1) BDNF エクソン 1 をターゲットとし、DNA デコイを作成した。

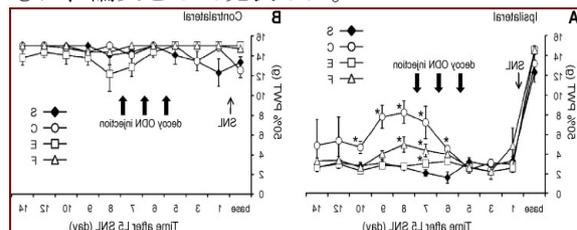
(2) DNA デコイの鎮痛効果を炎症性疼痛モデルにおいて脊髄内投与で確認した。

(3) DNA デコイの鎮痛効果を神経障害性疼痛モデルにおいて脊髄内投与で確認した。

(4) DNA デコイの鎮痛効果は高容量で最も強く数回の投与で効果が増強した。

(5) DNA デコイの投与は障害のない反対側には副作用を示さなかった。

上記の成果を国内外の学会で報告するとともに、論文として発表した。



しかし、その効果持続は短く、効果の限界

もみられた。BDNFのノックダウンは痛みの遺伝子療法のターゲットとなる可能性は示したが、さらなる研究が必要であることも明らかとなった。

神経障害性痛の治療は各種薬剤の開発や侵襲的治療をもってしても未だ満足できるものではなく、われわれの目指した遺伝子療法を応用した鎮痛法がブレイクスルーとして、今後の難治性疼痛の治療法として基礎的な方向性を示した。

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 8 件)

① Obata N, Mizobuchi S, Yokoyama M, et al : Decoy strategy targeting the brain-derived neurotrophic factor exon I to attenuate tactile allodynia in the neuropathic pain model of rats, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, vol 408, 2011, 139-144.

② Kawano T, Yokoyama M : Role of the neurosteroid allopregnanolone in the hyperalgesic behavior induced by painful nerve injury in rats, *J Anesth*, 査読有, vol 25, 2011, 942-945.

③ Kawano T, Yokoyama M: The validation of pin-evoked hyperalgesia-like behavior as a measure of pain in rats, *Pain Res*, 査読有, vol 26, 2011, 223-227

④ Kawano T, Yokoyama M : The involvement of the neurosteroid allopregnanolone in the anti-hyperalgesic effect of paroxetine in a rat model of neuropathic pain, *Neuroreport*, 査読有, vol 22, 2011, 984-988.

⑤ Sato K, Fukumori S, Yokoyama M, et al: Nonimmersive Virtual Reality Mirror Visual Feedback Therapy and Its Application for the Treatment of Complex Regional Pain Syndrome: An Open-Label Pilot Study, *Pain Med*, 査読有, vol 11, 2010, 622-629.

⑥ 横山正尚: 麻酔・神経ブロックと免疫・予後, *臨床麻酔*, 査読有, 34巻, 2010, 799 - 807.

⑦ 横山正尚: モルヒネ IVPCA, *日本臨床麻酔*

学会誌, 査読有, 11 巻, 2009, 13-22.

⑧ 横山正尚: 全身麻酔下に硬膜外麻酔を行って良いか? *LISA*, 査読有, 16巻, 2009, 196-200.

[学会発表] (計 9 件)

① Maeda Y, Yokoyama M, et al.: Anti-Hyperalgesic Effects of the Neurosteroid Allopregnanolone in Neuropathic Rats, *American Society of Anesthesiologists 2011*, 2011.10.15, Chicago (USA).

② 河野崇, 横山正尚: 神経障害性疼痛モデルラットの痛覚過敏行動に及ぼす神経ステロイド Allopregnanolone の効果, 第 33 回日本疼痛学会, 2011・7・22, 愛媛県民文化会館(松山市).

③ 廣橋美穂, 河野崇, 横山正尚: 術後痛に対して NK1 受容体拮抗薬アプレピタントは有効か? 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 2011・5・19, 神戸国際会議場(神戸市)

④ 福永賀予, 河野崇, 横山正尚, 他: von Frey filament 刺激による逃避行動は神経障害モデル動物で侵害刺激反応であるか?, 日本麻酔科学会第 58 回学術集会, 2011・5・19, 神戸国際会議場(神戸市).

⑤ 神元裕子, 穴山玲子, 横山正尚: 直腸癌の仙骨転移による疼痛の緩和に脊髄刺激療法が有効であった 1 症例, 第 20 回日本ペインクリニック学会中国・四国合同地方会, 2010・5・15, 広島大学キャンパス広仁会館(広島市)

⑥ 横山正尚: 術後鎮痛の上手な選び方、使い方「IV-PCA による術後鎮痛」, 第 29 回日本臨床麻酔学会, 2009・10・29, 浜松コンベンションセンター(浜松市).

⑦ Obata N, Yokoyama M, et al: Anti-Nociceptive Effect of Decoy ODN Inhibiting BDNF in Rat Inflammatory Pain Model, *American Society of Anesthesiologists 2009*, 2009・10・17, New Orleans (USA).

⑧ 横山正尚: 侵襲とストレス・疼痛反応 - 臨床研究と基礎研究より -, 第 46 回日本麻酔科学会中国四国地方会, 2009・9・26, 川崎医科大学(倉敷市).

⑨ 小幡典彦, 横山正尚, 他: ラット炎症性疼痛モデルにおける BDNF ノックダウンデコ

イの疼痛抑制効果, 第 31 回日本疼痛学会,
2009・7・17, 名古屋国際会議場(名古屋市).

[その他]

ホームページ等

http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_ansth/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 正尚 (YOKOYAMA MASATAKA)

高知大学・教育研究部医療学系・教授

研究者番号: 20158380

(2) 研究協力者

小幡 典彦 (OBATA NORIHIKO)

岡山大学病院・助教

松岡 義和 (MATSUOKA YOSHIKAZU)

岡山大学病院・助教