

令和元年6月11日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16713

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛に対するTNF- $\alpha$  を標的とした遺伝子治療の開発応用

研究課題名(英文) Gene therapy with HSV encoding p55TNFR gene for HIV neuropathic pain

研究代表者

神田 浩嗣 (Kanda, Hirotugu)

旭川医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00550641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛におけるTNF- $\alpha$  を標的とした遺伝子治療の有効性とそのメカニズムを解明した。

TNF- $\alpha$  を標的とした遺伝子治療により、活性酸素とpC/EBP $\beta$  の発現の抑制を介して、鎮痛効果が得られることが明らかとなった。活性酸素とpC/EBP $\beta$  の発現は遺伝子治療により有意に減少した。これらの知見は、TNF- $\alpha$  を標的とした遺伝子治療が効果的であることを意味し、今後のさらなる研究により臨床応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、神経障害性疼痛に対する遺伝子治療の開発につながるものである。遺伝子治療の臨床応用が実現すれば、難治性疼痛に苦しむ患者のQOLを上昇させることができる。また、現在使用されている麻薬性鎮痛薬の使用量を軽減させることが可能となる。

研究成果の概要(英文)：While effective antiretroviral treatment makes human immunodeficiency virus (HIV)-related death decreased dramatically, neuropathic pain becomes one of the most common complications in patients with HIV/acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The exact mechanisms of HIV-related neuropathic pain are not well understood yet, and no effective therapy is for HIV-pain. Evidence has shown that proinflammatory factors (e.g., tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ )) released from glia, are critical to contributing to chronic pain. Preclinical studies have demonstrated that non-replicating herpes simplex virus (HSV)-based vector expressing human enkephalin reduces inflammatory pain, neuropathic pain, or cancer pain in animal models. In this review, we describe recent advances in the use of HSV-based gene transfer for the treatment of HIV pain, with a special focus on the use of HSV-mediated soluble TNF receptor I (neutralizing TNF- $\alpha$  in function) in HIV neuropathic pain model.

研究分野：疼痛管理学

キーワード：神経障害性疼痛 TNF- $\alpha$  遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 国内外における研究動向および位置づけ

本邦の高齢化と生活習慣病の増加に伴い、神経障害性疼痛の発症率が増加している。QOLを著しく低下させることが問題となっているが、その発症のメカニズムはいまだ明らかにされておらず、有効な治療法も確立されていない。

近年、ウイルスベクターを用いた遺伝子治療はさまざまな領域で注目されており、がん治療、代謝性疾患、神経疾患等での治験が国内でも始まっている。また、特定の m-RNA と相補的に結合しそのはたらきを失活させるアンチセンス法を用いた動物実験が、神経障害性疼痛のメカニズムを解明するために行われている。

これまでの研究で神経障害性疼痛発症に関するいくつかの pathway が証明されているが、これらの因子に対して遺伝子治療が有効であるかは明らかにされていない。

### (2) 神経障害性疼痛発症における TNF- $\alpha$

TNF(Tumor Necrosis Factor)- $\alpha$  は、多彩な生理活性を有する炎症性のサイトカインである。活性化されたマクロファージや T-cell から産生され、炎症反応、脂質代謝、血液凝固カスケード、アポトース等を介して、生体の恒常性維持に役立つと考えられている。我々の研究チームは、神経膠細胞のひとつであるミクログリアから産生された TNF- $\alpha$  が脊髄後角における二次ニューロンを活性化させ、神経障害性疼痛を発症していることを明らかにした。また、神経障害性疼痛が、妊娠による TNF- $\alpha$  の減少を介して抑制されることを報告した(Onodera Y, Kanda H, et al. J Pain Res. 2017 8;10:567-574)。

## 2. 研究の目的

### (1) 本研究の特色・独創的な点

本研究の特色は、HSV ベクターとアンチセンス法を用いた TNF- $\alpha$  を標的とした遺伝子治療により神経障害性疼痛を緩和できるかを調べる点である。また、その治療効果を脊髄後角における活性酸素あるいは神経可塑性に関わる Wnt5a, pCEBP $\beta$  の発現という観点から検討し、そのメカニズムを明らかにすることが独創的な点である。

### (2) 予想される結果と意義

TNF- $\alpha$  を標的とした遺伝子治療で神経障害性疼痛モデルラットの疼痛閾値が改善されることが予測される。脊髄後角の TNF- $\alpha$  が疼痛発症のメカニズムに大きく関わっていることが再確認され、治療のターゲットとすることが可能になる。また、TNF- $\alpha$  の抑制と活性酸素、Wnt5a と pC/EBP $\beta$  の関与が証明されれば、神経障害性疼痛発症のメカニズムを明らかにしたと言っても過言ではない。本研究で予想される結果により、遺伝子導入を用いた慢性疼痛治療への臨床応用が期待できる。慢性疼痛患者が多数存在する本邦において意義が大きい。

### 3. 研究の方法

(1) TNF- $\alpha$  を標的とした HSV ベクターあるいはアンチセンス遺伝子導入を用いた遺伝子治療の有効性とそのメカニズムを解明するために以下の4つの研究を計画する。① 神経障害性モデルを作成し機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏反応の経時的变化を明らかにする。② 脊髄後角の TNF- $\alpha$  の発現が HSV ベクターあるいはアンチセンス法で抑制されるかを Western blot 法で評価する。③ モデルラットに TNF- $\alpha$  を標的とした遺伝子治療を行い、機械刺激性アロディニアあるいは温熱性痛覚過敏反応の経時的变化と TNF- $\alpha$  の発現を評価する。④ TNF- $\alpha$  を標的とした遺伝子治療に伴う、神経障害性疼痛の発症にかかわると考えられている活性酸素, Wnt5a, pC/EBP $\beta$  の発現を免疫染色法あるいは Western blot 法を用いて解析する。

(2) 本研究を遂行する上での具体的な工夫

申請者は HSV ベクターとアンチセンス法を用いた遺伝子治療に関する研究をいくつも報告している。HSV ベクターとアンチセンスオリゴの取り扱い、動物行動評価、Western Blot 法、免疫染色法に関する技術的な問題は少ないと考えられる。本研究では 2 種類の遺伝子治療を用いることで、万一、ひとつの治療における研究が計画通りに進まない場合でも研究を継続することが可能である。HSV ベクターは、共同研究者の留学先であるミシガン大学から購入あるいは譲渡を受けることが確約されている。アンチセンスオリゴは塩基配列を指定し民間会社より購入することが可能である。絞扼性神経損傷モデルで安定した疼痛閾値が得られない場合は、他の神経障害性疼痛モデルを使用することとする。

### 4. 研究成果

(1) 神経障害モデルにおける機械刺激性アロディニア

神経障害性モデルラットに TNF- $\alpha$  の効果を抑制する T0TNSFR を発現するウイルスベクターを投与すると、コントロールベクター(T0Z)を投与した群と比較して、3.6, 5.5, 8.5, 11.8g での刺激に対する反応が有意に減少した。これは、T0TNSFR を発現するウイルスベクターは神経障害性モデルラットの疼痛閾値を上昇させたことを意味し、鎮痛作用があることが明らかとなった。

(2) ウイルスベクターと活性酸素

コントロールラットに T0Z を投与しても脊髄後角における活性酸素の発現に変化はなかったが、神経障害性モデルラットでは活性酸素が有意に上昇していた。神経障害性モデルラットに TNF- $\alpha$  の効果を抑制する T0TNSFR を発現するウイルスベクターを投与すると、活性酸素は有意に減少した(図1)。これらの結果から、活性酸素は神経障害性疼痛に深く関わっており、TNF- $\alpha$  の作用を減弱すると活性酸素が減少することが明らかとなった。

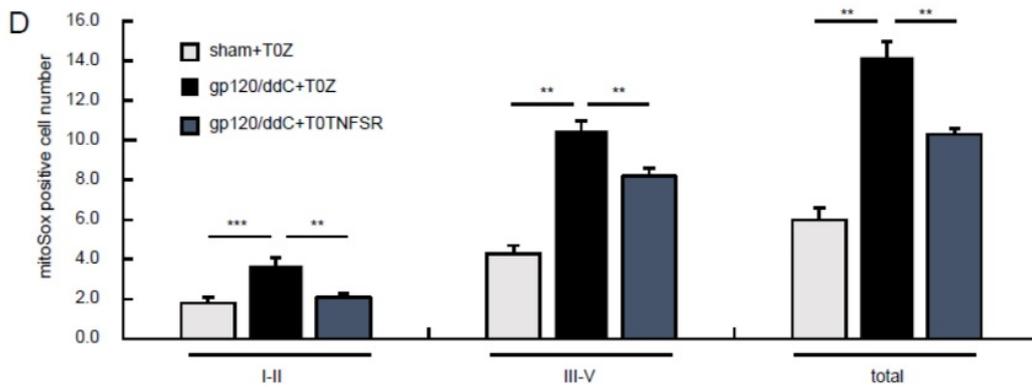
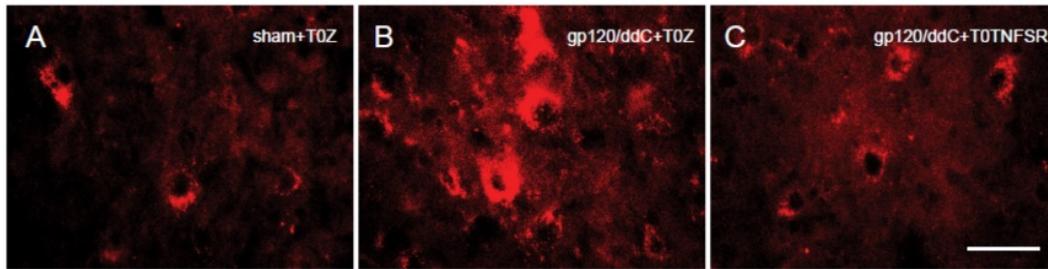


図1 神経障害性疼痛モデルにおけるウイルスベクターと活性酸素

### (3) ウイルスベクターと pC/EBP $\beta$

ウイルスベクター投与により脊髄後角における pC/EBP  $\beta$  の発現も活性酸素と同様の結果となった。pC/EBP  $\beta$  は神経障害性疼痛に深く関わっており、TNF- $\alpha$  の作用を減弱すると pC/EBP  $\beta$  が減少することが明らかとなった。

以上の知見より、TNF  $\alpha$  を標的とした遺伝子治療が効果的であることを意味し、今後のさらなる研究により臨床応用が期待できる。

### <引用文献>

Onodera Y, Kanao-Kanda M, Kanda H, Pregnancy suppresses neuropathic pain induced by chronic constriction injury in rats through the inhibition of TNF- $\alpha$ . J Pain Res. 2017 Mar 8;10:567-574.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- ① Kanda H, Liu S, Kanao M, Yi H, Iida T, Gene therapy with HSV encoding p55TNFR gene for HIV neuropathic pain: an evidence-based mini-review. Transl Perioper Pain Med. 査読有, 2017;2(4):24-32

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：神田 恵

ローマ字氏名：(KANDA, Megumi)