

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591794

研究課題名（和文）

ミクログリアより放出の脳由来神経栄養因子エクソン合成阻害による鎮痛法の開発

研究課題名（英文）

Development of analgesic method by inhibition of synthesis of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) exon released from microglia

研究代表者

横山 正尚 (YOKOYAMA MASATAKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20158380

研究の概要：

本研究の主眼は神経因性疼痛におけるミクログリアより放出される脳由来神経栄養因子 (BDNF) のエクソンに注目し、BDNFの中でも特異的なエクソン合成抑制による疼痛治療の基礎を確立することを目指した。疼痛モデルで特異的に過剰発現するのはエクソン-1であることを特定した。疼痛モデルにおいて脊髄内にエクソン-1に対するsiRNAを投与し、ミクログリアとニューロンにおけるBDNF合成阻害を観察し、鎮痛効果を検討した。しかし、鎮痛効果は有意ではなく、次の段階としてDNAデコイを作成することとした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
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：神経因性疼痛、脳由来神経栄養因子、ミクログリア、エクソン、siRNA

1. 研究開始当初の背景

疼痛の機序解明が近年飛躍的に進歩しているが、臨床的には癌性疼痛や帯状疱疹後神経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（緩和医療 10:113-6, 2002, 神経治療学 20:551-5, 2003, Anesth Analg 98:1093-8, 2004, Neurology 63:398-9, 2004）。

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)、効果は十分とは言えない。

一方、ごく最近神経因性疼痛の成立にニューロンのみでなく脊髄ミクログリアが関与し(Nature 424, 2003)、特にミクログリアからのBDNFの放出が疼痛発生に大きく関与することが示唆されている(Nature 438, 2005)。BDNFには5つのエクソンが存在するが、各エクソンがいかにかに生理的な役割を果たしているかは明らかではなく、疼痛に関するBDNFの各エクソンの役割はほとんど解明されていない。特に、ミクログリアより放出のBDNFのエクソンに注目し、難治性疼痛を治療しようとした試みは今までになく、我々の培った技術をもとに上述の研究目的を発想することに至った。

2. 研究の目的

本研究の主眼は神経因性疼痛におけるミクログリアより放出される脳由来神経栄養因子(BDNF)のエクソンに注目し、BDNFの中でも特異的なエクソン合成抑制による疼痛治療の基礎を確立することである。

具体的には、1) 培養細胞におけるミクログリア活性由来のBDNFの各エクソンの変化を測定し、特異的に過剰発現するエクソンを特定する。2) 疼痛時に過剰発現するBDNFのエクソンを選択的に抑制するために、疼痛モデルにおいて脊髄内に特定BDNFエクソンに対する阻害薬(抗体、siRNAなど)を投与し、ミクログリアとニューロンにおけるBDNF合成阻害を観察し、鎮痛効果を検討する。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19年度】

- (1) 脊髄ミクログリアの培養
- (2) 培養脊髄ミクログリアの活性化
- (3) 活性ミクログリアの抑制
- (2) で得られた活性ミクログリアに対して抑制剤を加えて、ミクログリアの活性化を抑える。
- (4) BDNFエクソンmRNAの定量、解析
無処置、活性および活性抑制ミクログリア各培養細胞からRNAを精製する。
- (5) ターゲットBDNFエクソンの特定
- (4) の結果をうけて、ターゲットとなるBDNFエクソンを特定する。

【平成20年度】

- (1) 培養活性ミクログリアにおける特定BDNFエクソン合成阻害による効果の確認
- (2) 神経因性疼痛モデルでのターゲットBDNFエクソン合成阻害の確認
神経因性疼痛モデル(2週目)の髄腔内へターゲットBDNFエクソンのsiRNAを投与。
- (4) BDNFエクソン合成阻害の鎮痛効果の確認
- (5) BDNFエクソン合成阻害の分子生物学的、組織学的検討

4. 研究成果

神経因性疼痛において、脊髄レベルでBDNFが重要な役割をなしているが、その機序として疼痛に特徴的に増加しているエクソンを初めて特定した。これにより、今後難治性疼痛の治療方法の一つとして、我々が特定したエクソン1をターゲットとする戦略が新しく開発されることが期待される。脊髄内へのBDNFエクソン1のsiRNAの投与は鎮痛効果が弱かったが、今後はデコイDNAを使用したノックダウンを目指している。その鎮痛効果が確認されれば、遺伝子治療を応用した難治性疼痛

への戦略として期待が持たれる。

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 5 件)

(1) Kobayashi H, Yokoyama M, Matsuoka Y, Omori M, Itano Y, Kaku R, Kiyoshi M, Ichikawa H. Expression changes of multiple brain-derived neurotrophic factor transcripts in selective spinal nerve ligation model and complete Freund's adjuvant model. Brain Res 1206: 13-9, 2008. 査読有り.

(2) Omori M, Yokoyama M, Matsuoka Y, Kobayashi H, Mizobuchi S, Itano Y, Morita K, Ichikawa H. Effects of selective spinal nerve ligation on acetic acid-induced nociceptive responses and ASIC3 immunoreactivity in the rat dorsal root ganglion. Brain Res 1219: 26-31, 2008. 査読有り.

(3) 松崎孝、西江宏行、森松博史、石川慎一、佐藤健治、溝渕知司、中塚秀輝、松三昌樹、横山正尚、森田 潔. 高用量フェンタニルパッチによる癌性疼痛の 1 症例. 日本ペインクリニック学会誌 15: 150-152, 2008. 査読有り.

(4) 横山正尚. 硬膜外血腫. 日本臨床麻酔学会誌 8: 134-142, 2008. 査読有り.

(5) 横山正尚. 硬膜外麻酔 適応と禁忌. 日本臨床麻酔学会誌 2008. 査読有り.

[学会発表] (計 8 件)

1) 横山正尚、中塚秀輝、佐藤健治、西江宏行. IV PCA・持続注入法による術後鎮痛：モルヒネ IV PCA. 第 28 回日本臨床麻酔学会：2008. 11. 20-22, 京都.

2) Yokoyama M, Omori M, Matsuoka K, Itano Y, Morita K. Effects of Selective Spinal Nerve Ligation on Acetic Acid-induced Nociceptive Responses. American Society of Anesthesiologists: 2008, 10, 18-22, Orlando.

3) Matsuoka K, Omori M, Itano Y, Yokoyama M, Morita K. Effects of NGF on Expression of ASIC3 and TRPV1 in Cultured Rat DRG Neurons. American Society of Anesthesiologists : 2008, 10, 18-22, Orlando.

4) Matsuoka K, Omori M, Itano Y, Yokoyama M. Expression of ASIC3 and TRPV1 in cultured rat DRG nervous stimulated with NGF. 12th World Congress on Pain: 2008, 8, 17-22, Glasgow.

5) Yokoyama M, Omori M, Matsuoka K, Itano Y. Effects OF selective spinal nerve ligation on acetic acid-induced nociceptive responses and ASIC3 immunoreactivity in the rat dorsal root ganglion. 12th World Congress on Pain: 2008, 8, 17-22, Glasgow.

6) Ishikawa S, Tomotsuka N, Mizobuchi S, Sato K, Moriyama E, Yokoyama M, Morita K. Incidence of traumatic cerebrospinal fluid leak following whiplash associated disorders. 12th World Congress on Pain: 2008, 8, 17-22, Glasgow.

7) 大森恵、小林浩之、松岡義和、板野義太郎、横山正尚. 脊髄神経傑作が酢酸刺激による疼痛行動に及ぼす変化に関する研究. 第 30 回日本疼痛学会：2008. 7. 19-20. 福岡.

8) 松岡和義、大森恵、板野義太郎、横山正尚. 培養DRGニューロンにおけるNGF刺激下でのASIC3およびTRPV1mRNAの発現変化. 第30回日

本疼痛学会：2008.7.19-20, 福岡.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横山 正尚 (YOKOYAMA MASATAKA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授

研究者番号：20158380

(2) 研究分担者

板野 義太郎 (ITANO YOSHITAROU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助
教

研究者番号：30127542

(3) 連携研究者

なし