

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791487

研究課題名 (和文) ナノバブルを用いた超選択的疼痛管理法の開発

研究課題名 (英文) Super selective pain treatment using nano bubble

研究代表者

城戸 幹太 (KIDO KANTA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40343032

研究成果の概要 (和文)：本研究は、ナノバブルおよび超音波エコーを用いて非ウィルスの的に疼痛関連遺伝子をリンパ球を含む免疫系細胞に導入し、超局所的に鎮痛物質を発現させることによって、全身性副作用の少ない疼痛管理法を開発することを目的とした。現段階においては物理的手法による免疫細胞系への遺伝子導入は導入効率および施行後細胞生存率の点で問題があり、動物実験において治療効果に有意差が認められなかった。このため新たに培養リンパ球を用いた活性化自己リンパ球移入法を応用し、同様の治療効果を狙った。現段階ではまだ最終的結論には至っていないが、今後条件設定をさらに検討することで非常に有効な治療法となりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of this project is to develop a method that transfer pain killer genes to immune cells using both ultrasound and echo-contrast microbubbles and ease the pain superselectively without systemic side effect. However we still haven't solved some problems about the less transduction efficiency or low cell survival rate. Therefore, we have been trying other methods, "adoptive immunotherapy". Now a day we are getting some good data.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：リンパ球、疼痛管理、 β endorphin

1. 研究開始当初の背景

近年、痛みやストレスに対する生体の防御反応の一つとして下垂体より分泌される内因性オピオイド（主に β -endorphin）が、白血球を主体とする末梢免疫細胞内にも発現し、末梢組織で鎮痛に関する重要な役割を担っていることが報告され、注目を浴びている。この機序に関して我々もマウスエンドトキシショックやアナフィラキシーショックモデルを用いて末梢白血球や脾臓、リンパ節などの免疫担当組織における β -endorphinの発現動態を検討し、種々の興味深い結果を得た。

一方、我々は新たな疼痛治療法として特に安全・非侵襲的かつ簡便で繰り返し行えるものを条件に検討を進めた結果、最近その有用性が報告されている微小気泡 nanobubble と超音波照射を組み合わせる手法にたどり着いた。この方法は、超音波診断用増感剤として広く臨床的に使われているナノバブルが超音波によって破碎された時に生じる衝撃波によって標的細胞に可逆的に孔を開け、そこから細胞内に高分子を送り込む手法であり、我々はこの手法を用いていかに非侵襲的、かつ効率的に標的部位に鎮痛関連物質や遺伝子を導入し、治療効果をあげることができるかを検討しており、特に脊髄に関して一定の成果を得つつある。この方法をさらに押し進め、より効果的な侵襲の少ない疼痛管理法がないかと考えた。

2. 研究の目的

現代のオーダーメイド医療への期待と必要性を鑑みると、患者の病態やニーズに合わせたよりきめの細かい治療法の開発が求められている。我々のこれまでの研究結果を考

え合わせた時、一つの画期的な疼痛治療法を検討するに至った。すなわち、疼痛（特に炎症に伴う疼痛）に苦しむ患者に対して(i)白血球を採取・培養し、(ii)内因性オピオイドである β -endorphin またはその前駆体 POMC をナノバブルを用いて細胞内に導入、(iii)体内に戻す ことで炎症発痛部位に白血球が遊走、 β -endorphin を超局所で放出することで鎮痛を得る というものである。言わば白血球と言う爆撃機に鎮痛爆弾を大量に持たせ、疼痛部位を極めて限局的にピンポイント爆撃するというイメージである。悪性腫瘍の免疫強化療法としてこの概念は一部で応用されているが、安全性（ウィルスベクターを用いないなど）・低侵襲性に関しては全く異なるものと考ええる。

この新しい疼痛制御法が実現できれば、より安全、効率的、低侵襲、長期間、繰り返し施行可能 というメリットが得られ、患者の薬剤による副作用も大幅に軽減できる可能性があると考ええる。また従来 of 疼痛管理では管理しきれなかったもの（ある種の癌性疼痛や神経因性疼痛）に関しても効果がある可能性を秘めている。これらに関して有用性を総合的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

平成20年度：リンパ球への遺伝子またはタンパク導入および体内での動態の観察

リンパ球（主にT cell）に効率よく遺伝子またはタンパクを導入する各種条件（プラスミドの種類および濃度、アルブミンバブルおよび超音波照射条件）設定とタンパクの発現量および時期を定量化し、体内に戻すのに最もよいタイミングを決定する。後に施行後リンパ球がどのような動態を取るかを観察す

る。

(1) マウスより末梢血液を採取、リンパ球分離溶液を用いてリンパ球を回収、培養増殖する。

(2) Reporter gene をナノバブルおよび超音波照射により培養リンパ球に導入する。ナノバブルの条件や照射条件は予備実験で得られた値から試行してみる。経時的に細胞の生存率、導入効率、発現時期、発現量を蛍光顕微鏡、リアルタイムイメージング装置やウェスタンブロットングにて確認し、至適条件を検討する。現在進めている予備実験では導入されるものかなり効率が悪く、細胞が死滅することが多い。時間をかけて導入法を検討する。ここで導入が上手く行かない場合は、他の方法や細胞への切り替え（単球やマクロファージなど）も考えており、これらにおいても十分意義はあるものと思われる。

(3) (2) の条件の下、細胞が体内でどのような動態をたどるか検討する。Complete Freund's adjuvant モデルにて炎症を誘導し、リンパ球が炎症巣にどのように集簇するかをイメージング装置や病理組織学的に観察する。これも各種条件を検討し、もっとも効果があると思われる条件を決定する。

平成21年度：鎮痛効果の評価

前年度で良好な結果が得られた場合、治療として実験を進めていく。

(1) β -endorphin の前駆体である POMC と GFP を併せ持ったプラスミドを使用する。このプラスミドにあった導入条件設定を行う。

(2) 確認後、通法通り疼痛行動評価を行う。熱刺激、痛覚刺激にて疼痛閾値が上昇しているかどうかを経時的に確認する。

(3) 閾値の上昇が認められなかった場合、または経時的に変化した場合それぞれを病理組織学的にタンパク発現を調べ、考察する。

(4) 長期間、繰り返しリンパ球を体に戻した場合の副作用や寿命などについても検討する。

(5) 時間が許せばアジュバントモデルのみならず、すでに手元にある癌転移モデルや慢性関節リウマチモデルに対しても効果を検討する。

4. 研究成果

平成20年度：リンパ球などの培養免疫系細胞への高分子導入は、細胞の死滅や導入効率が芳しくないことなどにより、現段階では実現が難しいことが分かった。目的はリンパ球に β endorphin を積極的に発現させ、それを集中的に炎症疼痛部位に集簇させて鎮痛を図ることである。であるならば、予め炎症を生じているモデルからリンパ球を採取し、培養・活性化した後体内に戻せば、炎症部位を特異的に標的としたリンパ球が大量に同部位に集簇し、鎮痛効果を発揮するであろうと仮説を立てた。そこで、マウス足アジュバントモデルにおいて所属リンパ節の β エンドルフィン活性を PCR で確認したところ、健側には認められなかった POMC 遺伝子 (β エンドルフィン前駆体) の発現が患側には強く認められ、炎症部位においてリンパ球を通じた β endorphin の発現があることが強く示唆された。このことから、癌治療において応用されている活性化自己リンパ球移入療法を疼痛治療に応用できる可能性が強く期待できた。

平成21年度：前年度から引き続き、活性化したリンパ球を所属リンパ節、脾臓から採取濃縮した後、別個体のアジュバント疼痛モデルに静脈内投与した。コントロール群には生理食塩水のみ投与した。投与後、1日、2日、4日、7日後の疼痛評価 (von Frey Test

および赤外線熱刺激)を行ったところ、リンパ球投与群において疼痛閾値の上昇傾向が見られたが、有意差は認められなかった。アジュバント投与のタイミング、リンパ球移入のタイミング、細胞数などの条件設定をさらに考慮することで有意差が得られると思われる、現在も鋭意継続中である。今後は術後痛モデルを用いて、より急性期の炎症に対するリンパ球の動態についても検討していきたい。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

城戸 幹太 (KIDO KANTA)

東北大学・病院・助教

研究者番号：40343032

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：