

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 21 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592009

研究課題名（和文） 脳由来神経成長因子をターゲットにした癌性疼痛の遺伝子治療

研究課題名（英文） Gene therapy of cancer pain by targeting brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

研究代表者

溝渕 知司 (MIZOBUCHI SATOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70311800

研究成果の概要（和文）：

我々はラット脛骨骨髓内にラット乳がん細胞であるMRMT-1を注入することにより骨がんモデルを作製した。RT-PCRの結果L3DRGにおいてMRMT-1群でBDNF mRNAの発現が増加しており、免疫染色ではL3DRGのsmall cellにおいてBDNFの産生が増加していた。ラット骨がんモデルにおいてもBDNFを抑制することにより疼痛を緩和することが出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We established the animal model of bone cancer pain by the injection of MRMT-1 (rat mammary gland carcinoma cells) into the tibia bone. In the MRMT-1 group, expression of total BDNF mRNA increased significantly compared to the sham group. Immunohistochemistry revealed that MRMT-1 treatment increased the proportion of small BDNF-immunoreactive neurons in the L3 DRG. The suppression of BDNF mRNA and protein may attenuate bone cancer pain in the model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：痛み、がん性痛、脳由来神経成長因子、遺伝子治療

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、癌性疼痛はいまだ完全にはコントロールできていない。癌性疼痛は、癌による炎症性の痛み、神経への浸潤による神経性疼痛、骨転移による痛み、または治療のために行われる化学療法による痛みなどがあげられる。特に骨転移の

ある癌患者の85%に耐え難い疼痛を伴うとされ (British Journal of Anaesthesia 101:87-94, 2008)、その疼痛に対する治療法も、近年の疼痛機序の解明によってオピオイド、NSAIDs、放射線療法など年々進歩しているがまだまだ十分ではない。

当グループでは疼痛の治療法の1つとして遺伝子治療の確立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)。一方、疼痛のニューロモジュレータとして脊髄の脳由来神経栄養因子(BDNF)が大きく関与していることが示唆されている(Nature 438,2005)。ラット BDNF には 11 のエクソンが存在するが、我々は疼痛に関与す BDNF エクソンがエクソン I であることを特定し、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)。またエクソン I を選択的に抑制する DNA デコイを作成し、L5 脊髄神経結紮モデルに対して脊髄腔内に投与することで BDNF の誘導を抑制し疼痛を緩和できることを確認している (Biochem Biophys Res Commun, 408:139-144, 2011)。動物モデルにおいては腫瘍自身がBDNFを産生するタイプのものがあること(Cancer Res. 65:219-25, 2005)や、BDNFの受容体である TrkBレセプターの発現の有無によって腫瘍の発育や転移による悪性度が変化していることが分かっているが(Cell. Mol. Life Sci. 63:755-9, 2006)、がん性疼痛におけるBDNFの役割を詳細に検討した報告は見られていない。

2. 研究の目的

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、BDNF を標的とした癌性疼痛治療の新たな治療法を確立することである。

具体的には

- (1) ラット脛骨にがん細胞を注入することにより骨がんモデルを作成する。
- (2) 後根神経節 (DRG; Dorsal root ganglion) をサンプリングし PCR 法、免疫染色法を用いて、BDNF の発現変化について詳細に検討する。

(3) BDNF をノックダウンすべく shRNA を開発し、ラット骨がんモデルにおける鎮痛効果・安全性を検討する。
ことであった。

3. 研究の方法

(1) 手術

雄性 Wistar ラット (6 週、170-180g) を用いた。イソフルレン麻酔下に左脛骨の膝関節より 5mm 遠位部に 23G 針を用いて穴を開け、そこから骨髄にラット乳がん細胞である MRMT-1 を 3×10^3 個注入し骨がんモデルを作製した (MRMT-1 群)。対照群として同様の手技で左脛骨骨髄内に HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) を注入した (Sham 群)。

(2) 行動評価

① Weight Bearing Test

Incapacitance tester (Linton Instrument; UK) によりラット左右後肢の荷重を同時に測定し、その比を求め検討した。

② Von Frey Test

ラット後肢の足底を von Frey filament で刺激し、その刺激に対する逃避反応を観察する。2.0g の filament から開始し up-down 法により 50% 疼痛閾値 (50% PWT) を求め検討した。

両試験とも 1 週間の訓練を行った後、手術前および手術後 2、5、7、9、12、14 日目に測定を行った。

(3) RT-PCR

ラットをエーテル麻酔下に断頭脱血し、背側より左側の第 3、第 4、第 5 腰髄後根神経節 (L3、L4、L5 DRG) を摘出した。組織は直ちにホモジナイズし、RNeasy を用いて組織中の total RNA を抽出する。その後 DNase 処理を行い、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。BDNF のプライマーはすでに所有しているものを使用し、real time PCR にて BDNF 発現量の変化を検討した。

(4) 免疫組織染色

エーテル麻酔下に、ラットの心室よりカニキュレ

ーションし、4%paraformaldehydeにて15分間灌流固定した。背側より開創し、左側のL3、L4、L5DRGを摘出し、ABC法によりBDNFを染色した。細胞の直径によりsmall(20 μ m以下)、medium(20 μ m \sim 40 μ m)、large(40 μ m以上)に分類し、それぞれのBDNF陽性ニューロンの割合をカウントし検討した。

4. 研究成果

(1) 結果

ラット脛骨での腫瘍の成長をX-Pにて確認した。術後7日目では変化がなかった。14日目では腫瘍の成長に伴う骨透亮像と骨表面のけば立ちを認め、21日目では脛骨近位部の著明な骨破壊を認めた。(図1)術後21日が経過すると骨破壊が著明に進んでおり、がん性疼痛に加え骨折の痛みも加わっていると推察されることや倫理的な問題も考慮し観察期間を術後14日までとした。

図1:ラット脛骨X-P



行動評価においてはWeight Bearing Test、Von Frey Testの双方とも術後9日目より疼痛行動を観察し得た。この疼痛行動は徐々に顕著となり、観察を終了する14日目まで観察された。(図2)(図3)

図2: Measurement of weight bearing

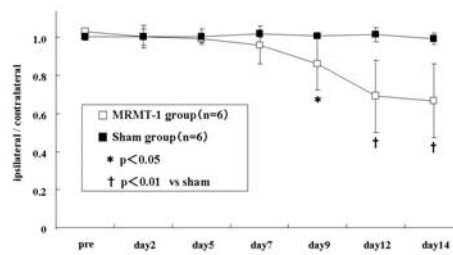
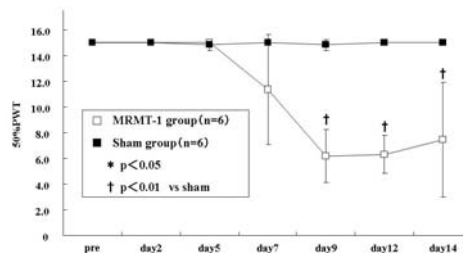
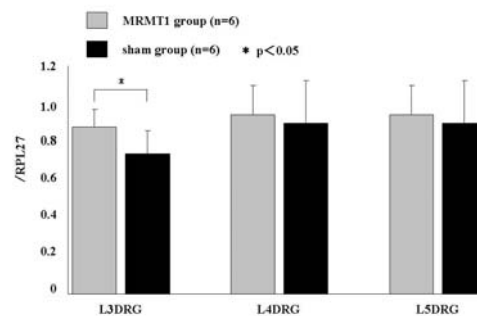


図3: von Frey test (左後肢)



RT-PCRではL3DRGにおいてsham群と比較してMRMT-1群でBDNF mRNAの発現が増加していた。L4、L5DRGにおいてはBDNF mRNAの発現に差を認めなかった。(図4)

図4: BDNF mRNAの発現



免疫組織染色ではL3DRGのsmall cellにおいてsham群と比較してMRMT-1群でBDNFの産生が増加していたが、mediumおよびlarge cellでは差を認めなかった。L4、L5DRGにおいてはすべてのcell sizeにおいてBDNFの産生に差を認めなかった。(図5)

図5:BDNF陽性神経細胞の割合(%)

	L3DRG	L4DRG	L5DRG
MRMT-1 group (n=4)			
small	35.89±2.11 *	30.01±4.77	26.65±2.14
medium	13.18±2.45	13.52±3.72	11.59±3.97
large	3.11±0.99	3.56±2.73	4.11±2.65
Sham group (n=4)			
small	26.32±1.66	26.85±1.77	25.29±2.95
medium	11.26±1.51	11.51±3.46	8.69±1.27
large	1.55±1.24	3.33±1.75	2.00±0.84

* p<0.05 vs Sham

(2) 考察

我々はラット脛骨骨髓内にラット乳がん細胞である MRMT-1 を注入することにより骨がんモデルを作製した。腫瘍は経時的な増大が観察された。Weight Bearing Test および Von Frey Test により術後9日目より疼痛行動を観察し、14日目まで疼痛の増強が観察された。

今回の研究で用いたラット骨がんモデルでは RT-PCR で L3DRG において BDNF mRNA の発現の増加を認めたが、L4、L5DRG では発現の増加を認めなかった。同様に免疫組織染色においても L3DRG では BDNF の産生の増加を認めたが L4、L5DRG では差を認めなかった。

Timothy K. Y. Kaanらはラット脛骨に tracer を注入することにより脛骨骨髓の神経支配は主に L3 レベルであることを報告している (Brain, 133: 2549-2564, 2010)。本研究における BDNF の増加は、ラット脛骨骨髓でのがんの進展に伴う炎症や神経障害に起因しているものと考えている。

我々は過去に L5 脊髄神経結紮モデルにおいて BDNF の誘導を抑制することで疼痛を緩和できることを確認している (Biochem Biophys Res Commun, 408:139-144, 2011)。今回の結果から骨がんモデルにおいても BDNF は疼痛を抑制するためのターゲットになりうると考えている。がん性疼痛と BDNF との直接的な関係を証明した報告は少なく、今回その可能性を示せたのは意義が大きかったと考えている。

しかしながら本研究では BDNF を抑制するための shRNA の開発にはいたらなかった。shRNA などの方法で BDNF を抑制し疼痛を緩和することが出来れば、現在がん性疼痛で苦しむ多くの患者の福音となるはずであり、今後の研究課題であると考えている。

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)

[学会発表] (計 3 件)

①友塚直人、小幡典彦、賀来隆治、溝渕知司、中塚秀輝※、森田潔 ※ 川崎医科大学 麻酔・集中治療医学 2 : Expression change of BDNF mRNA in tibial bone marrow of bone cancer pain model Anesthesiology2011 2011 年 10 月 20 日 米国シカゴ

②友塚直人、小幡典彦、谷口新、賀来隆治、板野義太郎、溝渕知司、市川博之※、森田潔 ※ 東北大学大学院歯学研究科口腔器官構造学分野：ラット骨がんモデルにおける後根神経節での脳由来神経栄養因子の発現 第 33 回日本疼痛学会 2011 年 7 月 23 日 愛媛県松山市

③友塚直人、小幡典彦、賀来隆治、板野義太郎、溝渕知司、森田潔：骨がんモデルにおける疼痛行動評価法の検討 日本麻酔科学会第 58 回学術集会 2011 年 5 月 19 日 兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝渕 知司 (MIZOBUCHI SATOSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：70311800

(2) 研究分担者

松三 絢弥 (MATSUMI JUNYA)

岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号：50509437

板野 義太郎 (ITANO YOSHITARO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30127542
(H21年度のみ)

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

友塚 直人 (NAOTO TOMOTSUKA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生