

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 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21700400

研究課題名（和文）水痘带状疱疹ウイルスタンパク IE62 に対する免疫応答が起こす痛覚増強機序の解明.

研究課題名（英文）Investigation of the mechanisms by which antibody to VZV IE62 protein augments mechanical allodynia.

研究代表者

高崎 一郎（TAKASAKI ICHIRO）

富山大学・生命科学先端研究センター・助教

研究者番号：00397176

研究成果の概要（和文）：

带状疱疹痛および带状疱疹後神経痛は難治性の神経因性疼痛疾患である。疼痛のメカニズムは未だ不明であり、また既存の鎮痛薬に抵抗性を示すため、新規鎮痛薬の開発が急務となっている。申請者はこれまでの研究で、当該疾患の原因ウイルスである水痘・带状疱疹ウイルスのタンパク IE62 に対する免疫応答が、BDNF の生物活性を上昇すること、末梢神経損傷モデルマウスの疼痛反応を増強することを見出した。本研究の成果より、带状疱疹痛モデルマウスの疼痛反応を IE62 抗体が増強すること、带状疱疹後神経痛への移行率を増大させることを明らかにした。また、網羅的遺伝子発現解析の結果、Galectin-3 の遺伝子発現が脊髄後角において増大し、この分子が疼痛に密接にかかわっていることを明らかにした。しかしながら、抗 IE62 抗体による痛覚増強機序には Galectin-3 が関与していないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Acute herpetic pain and postherpetic neuralgia are intractable neurogenic pain, however the mechanisms of the pain are still unknown. We previously found that immunoreaction to antibody to IE62, one of immediate early protein produced by varicella zoster virus, augment mechanical allodynia in mice with peripheral nerve injury via activation of BDNF activity. In this research, we found that antibody to IE62 augment the acute herpetic pain and increase the transition to postherpetic neuralgia in mice. Using global gene expression analysis, we revealed that spinal galectin-3 is involved in the acute herpetic allodynia. However, we found that galectin-3 is not involved in the anti-IE62 antibody-mediated augmentation of mechanical allodynia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経化学・神経薬理学

科研費の分科・細目：中枢・末梢神経薬理学

キーワード：带状疱疹痛，带状疱疹後神経痛，IE62

1. 研究開始当初の背景

(1) 帯状疱疹痛および帯状疱疹後神経痛

痛みは生体の防御反応としての重要な役割を担っているが、疾病に伴い慢性化した痛みは社会生活を極めて困難にし、生活の質を著しく低下させる。末梢神経および中枢神経系の機能障害の結果生じる神経因性疼痛は、臨床上、慢性疼痛の多くを占め、一般的に難治性でモルヒネのような強力な鎮痛薬でも十分に疼痛がコントロールできないものが多い。

神経因性疼痛の中で、腰痛、有痛性糖尿病性ニューロパチーに次いで多いのが、帯状疱疹痛および帯状疱疹後神経痛 (PHN) である。この疾患は感覚神経節に潜伏感染していた水痘・帯状疱疹ウイルス (VZV) の再活性化により発症する。わが国では年間 50 万人が帯状疱疹を発症し、そのうち 10-15%程度が PHN に移行すると推定される。発症率はストレス負荷や加齢とともに高くなり、ストレス社会が蔓延し高齢化が急速に進むわが国や先進国では、ますます帯状疱疹および PHN の患者数が増加すると予想される。これらの疼痛も、モルヒネなどの強力な鎮痛薬に抵抗性を示すことが知られている。そのため有用な治療薬の開発が望まれているが、いまだ実現には至っていない。かかる医薬品の実現にとって、帯状疱疹痛および PHN と同様の臨床症状を示す動物モデルが不可欠である。しかしながら VZV は種特異性が高く、ヒト以外の動物に実験的に感染し、ヒトと同様の臨床症状を示したという報告はない。

(2) 帯状疱疹痛および帯状疱疹後神経痛の動物モデル

一方、VZV と同様、ヘルペスウイルス科に属する単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) は VZV と同様に、一次感覚神経に感染し、感覚神経節に潜伏感染する特徴を有する。HSV-1 は種特異性が低く、ウサギ、モルモット、ラット、マウスなどに感染させることが可能であり、マウスを用いた動物実験において HSV-1 を経皮接種すると、帯状疱疹様の皮膚病変を発症する。申請者は、この HSV-1 を感染させたマウスにおいて疼痛反応 (アロディニアと痛覚過敏) が誘発されることを見出し、帯状疱疹痛モデルマウスを確立・報告した。さらに申請者は、HSV-1 感染による皮膚病変の治癒・消失後も長期間にわたり疼痛反応が残存することを見出し、PHN モデルマウスの作出を世界に先駆けて報告した。現在までに、これらのモデルマウスを使用して、疼痛発症メカニズムに関する研究および新規化合物の評価を行ってきた。しかしながら、ヒトの帯状疱疹の原因ウイルスが VZV である

のに対し、本モデルマウスは HSV-1 の感染により生じるという点で、本モデルマウスの疼痛反応がヒトの疼痛の本質を捉えているかについては未だ疑問点として残る。

(3) 帯状疱疹痛および帯状疱疹後神経痛と BDNF

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、発達段階および成人において、神経の生存、分化、シナプス可塑性などに重要な役割を果たす、神経栄養因子ファミリーのメンバーである。BDNF cDNA は 247 アミノ酸残基からなる前駆体タンパク質をコードしており、切断されて 119 アミノ酸残基の成熟 BDNF が生成する。BDNF は強力な疎水性相互作用によりホモ二量体 (27 kDa) を形成し、生物活性を発揮する。BDNF がシナプスの長期増強、学習および記憶等の頻度依存性可塑性メカニズムに関与していることは良く知られている。疼痛と神経可塑性との関連性から、申請者は BDNF に着目し、以下の研究を行なった。

① 帯状疱疹痛と BDNF

平成 17-18 年度・科学研究費補助金・若手研究 (B) 「急性帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の発症におよぼす神経栄養因子の役割」に関する研究を遂行し、HSV-1 接種による帯状疱疹痛マウスの後根神経節および脊髄後角において BDNF mRNA の発現が増大することを見出した。さらに抗 BDNF 抗体、抗 trkB 抗体、trkB/Fc キメラタンパク質の脊髄くも膜下腔内への投与は、帯状疱疹痛を有意に緩和することを見出した。これは帯状疱疹の痛みが脊髄における BDNF が強く関与していることを示唆する。

② 帯状疱疹から PHN への移行における BDNF の関与

平成 19-20 年度・科学研究費補助金・若手研究 (B) 「帯状疱疹後神経痛への移行における BDNF/trkB シグナリングの関与」に関する研究を遂行し、HSV-1 接種による帯状疱疹痛マウスへの抗 BDNF 抗体、抗 trkB 抗体、trkB/Fc キメラタンパク質の脊髄くも膜下腔内への投与は、PHN への移行を有意に抑制することなどを見出した。これは、帯状疱疹後神経痛の発症に BDNF/trkB シグナリングが関与していることを示すものである。

(4) VZV 前初期タンパク質 IE62 と BDNF および疼痛

VZV は潜伏感染した神経節細胞で遺伝子 IE4, 21, 29, 62 および 63 を発現し、中でも前初期タンパク質 IE62 が感染中にウイルス遺伝子の転写活性化に中心的役割を果たす。申請者は、これらタンパク質が臨床症状における疼痛に関与しているという仮説を立てた。さらには、前述したように BDNF が急性帯状

疱疹痛や PHN 発症の原因となる可能性を見出していたので、VZV タンパクと BDNF との免疫学的関連性に着目し、以下のような結果を得た。

①PHN 患者を含む水痘回復期患者の血清は、ウェスタンブロット解析において IE62 および BDNF を認識した。

②IE62 と BDNF との免疫学的関係を調べ、これらの間に免疫学的交差反応性を見出した。

③BDNF と交差する抗 IE62 抗体は、BDNF の生物活性を促進（初代培養神経細胞における BDNF による遺伝子発現の増強）することを見出した。

④マウスにおいて末梢神経損傷により誘発される疼痛関連反応を、抗 IE62 抗体の脊髄くも膜下腔内投与が増強することを明らかにした。

2. 研究の目的

以上の研究成果から、带状疱疹および PHN 患者においては、VZV が産生する IE62 タンパクに対する抗体が体内で産生され、この抗体（IE62 抗体）が脊髄後角において BDNF の生物活性増強を介して疼痛の発症に関与している可能性が示唆された。すなわち、带状疱疹患者の IE62 に対する免疫応答が当該疾患の痛みならびに PHN への移行に関与している可能性がある。本研究ではこの仮説を立証し、疼痛発症メカニズムを解明するため、以下について明らかにする目的で研究を遂行した。

① 抗 IE62 抗体の投与がマウス HSV-1 感染による带状疱疹痛を増強するかどうか、PHN への移行を増大させるかどうかを明らかにする。

② 抗 IE62 抗体による痛覚増強メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 疼痛関連反応の評価

Von Frey filamentを用いて後肢足蹠へ触刺激を与え、そのときの逃避反応や足振り動作などを指標に疼痛関連反応（アロディニアと痛覚過敏）を評価する。

(2) 急性带状疱疹痛モデルマウスの作製
マウス (C57BL/6J strain, 雌, 実験開始時6週齢) をペントバルビタール麻酔下でバリカンと除毛クリームを用いて右腹部から後肢を除毛した。後肢の表皮に乱切を加え、単純ヘルペスウイルス I 型 (herpes simplex virus type-1, HSV-1) を経皮接種した。接種 4-5 日目にかけてヒトの带状疱疹に

類似した皮疹が出現し、疼痛反応も同時期より出現してくる。すべてのマウスに安定した疼痛反応が観察される接種6日目を急性带状疱疹痛マウスとして使用した。

(3) 带状疱疹後神経痛マウスの作製

HSV-1接種マウスに発症した带状疱疹は、接種5~8日目にかけて徐々に悪化するが、接種後10日目あたりから痂皮が剥れ始め接種15日目までにはほぼ完全に治癒する。一部のマウスは皮疹の治癒とともに疼痛反応も消失するが、半数以上においては皮疹治癒後も疼痛関連反応が持続する。後者のマウスを带状疱疹後神経痛モデルマウスとして使用した。

(4) 带状疱疹後神経痛への移行率

1群24匹として実験を行った。全 HSV-1 接種マウスのうち、接種後 35-40 日目において疼痛関連反応の持続するマウスの匹数を带状疱疹後神経痛移行率 (%) として算出した。

(5) RNA の抽出

ペントバルビタール深麻酔下にマウスより脊髄腰膨大部を摘出した。摘出した組織は速やかに液体窒素にて凍結し、実験に用いるまで -80°C にて保存した。RNA は Trizol 試薬 (Invitrogen) と RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。

(6) GeneChip 解析

Affymetrix 社のプロトコルにしたがい、抽出した RNA から逆転写酵素反応により cDNA を作製し、in vitro 転写反応によりビオチン標識した RNA を合成した。合成 RNA をマウス遺伝子発現解析用チップ Mouse Genome 430 2.0 Array にハイブリさせ、洗浄・染色後、スキャナーにより、各遺伝子の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) 带状疱疹痛と带状疱疹後神経痛の発症

マウス後肢に HSV-1 を経皮接種すると、接種 5 日目より接種部位と同神経支配領域に皮疹が出現し、6-8 においてはヒト带状疱疹と類似の帯状の皮膚病変を発症した。皮疹の出現と同時期より、後肢の触刺激に対する反応性が増大し、带状疱疹痛を発症した。皮膚病変は、HSV-1 接種後 10 日目より治癒に移行し、接種 15 日目までには皮疹はほぼ完全に消失した。50% のマウスは皮疹の治癒とともに疼痛反応も消失したが、残り 50% のマウスにおいては皮疹の治癒後も持続的に疼痛反応が見られた。したがって HSV-1 を接種したマウスの約半数で带状疱疹後神経痛を発症することが分かった。

(2) IE62 抗体は HSV-1 感染によるマウス帯状疱疹痛を増強するか？

マウスに HSV-1 を接種する 2 時間前に、抗 IE62 抗体を脊髄くも膜下腔内に投与した。コントロールとして正常 IgG を投与した。抗 IE62 投与群においてコントロールと比較してアロディニア反応の増強が見られた。

(3) IE62 抗体は帯状疱疹後神経痛への移行率を増大するか？

HSV-1 感染マウスは、ヒト帯状疱疹様の皮膚病変を発症し、皮疹が治癒しても一部のマウスにおいては疼痛反応が残存することから、帯状疱疹後神経痛のモデルマウスとして研究代表者は確立している。そこで帯状疱疹後神経痛への発症率を調べたところ、抗 IE62 投与群ではコントロールと比較して有意に発症率が増大していた。以上の結果から、ヒト帯状疱疹および帯状疱疹後神経痛患者において、VZV が産生する IE62 タンパクに対する抗体が体内で産生され、この抗体(抗 IE62 抗体)が疼痛の発症に強く関与していることが示唆された。

(4) GeneChip システムを用いた網羅的遺伝子発現解析

HSV-1 感染により痛覚の伝達に重要な部位である脊髄後角においてどのような遺伝子の発現が変化しているのかを調べる目的で、GeneChip システムを用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、接種側の脊髄後角で 139 個の遺伝子の発現が増大していることが明らかとなった。その中でも、発現量が 17 倍に増大した galectin-3 (以下 Gal-3) についての詳細な解析を行った。Gal-3 は、脊髄後角表層のマクローファージ/マイクログリアに発現しており、神経細胞、アストロサイト、T-細胞には認められなかった。Gal-3 欠損マウスにおいて HSV-1 誘発の疼痛反応は減弱し、Gal-3 リコンビナントタンパクを脊髄くも膜下腔内に投与すると、アロディニアを誘発した。以上の結果は、Gal-3 が HSV-1 誘発の疼痛反応に関与することを示すものである。

(5) Gal-3 は抗 IE62 抗体による痛覚増強機序に関与するか？

IE62 抗体を投与したマウスの脊髄後角における Gal-3 発現量は、Normal IgG 投与群と比較して有意な差は認められなかった。以上の結果より、帯状疱疹痛には脊髄後角における Gal-3 が関与していることが示唆されたが、IE62 抗体による痛覚増強メカニズムには Gal-3 は関与しない可能性が示唆された。

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 2 件)

(1) Takasaki I., Taniguchi K, Komatsu F, Sasaki A, Andoh T, Nojima H, Shiraki K, Hsu DK, Liu FT, Kato I, Hiraga K, Kuraishi Y. Contribution of spinal galectin-3 to acute herpetic allodynia in mice. *Pain*, 2012 153: 585-592. 査読有

(2) Hama Y, Shiraki K, Yoshida Y, Maruyama A, Yasuda M, Tsuda M, Honda M, Takahashi M, Higuchi H, Takasaki I., Daikoku T, and Tsumoto T: Antibody to Varicella-Zoster Virus Immediate Early 62 Augments Allodynia in Zoster via Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF). *J Virol*, 2010, 84: 1616-1624. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

(1) 高崎一朗, 佐々木淳, 安東嗣修, 倉石泰: 帯状疱疹痛における脊髄 galectin-3 の関与. 第 34 回日本神経科学大会, 2011, 9, 14-17, 横浜.

(2) Takasaki I.: Contribution of spinal galectin-3 to acute herpetic allodynia in mice. The 6th International Conference of Neurons and Brain Diseases, 2011, 8, 3-5, Toyama.

(3) Takasaki I., Hama Y., Yoshida Y., Daikoku T., Tsuda M., Tsumoto T., Shiraki K.: Antibody to varicella-zoster virus protein IE62 augments neuropathic allodynia via BDNF activity in mice. The 40th Annual Meeting of Neuroscience (Neuroscience2010), 2010, 11, 12-19, San Diego, USA.

(4) Takasaki I., Hama Y., Yoshida Y., Daikoku T., Tsuda M., Tsumoto T., Shiraki K.: Antibody to varicella-zoster virus immediate-early protein IE62 interacts with BDNF and enhances neuropathic allodynia. 第 33 回日本神経科学学会, 2010, 9, 2-4, 神戸.

(5) 高崎一朗: 帯状疱疹痛と帯状疱疹後神経痛の動物モデルの開発及びアロディニアの発生と抑制作用の機序の解明. 奨励賞受賞講演, 日本薬学会第 139 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高崎 一郎 (TAKASAKI ICHIRO)
富山大学・生命科学先端研究センター・
助教
研究者番号 : 00397176

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし