

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462436

研究課題名(和文) 遺伝子多型ペースメーカーチャンネルによる細胞内伝達抑制を用いた慢性痛遺伝子治療

研究課題名(英文) Gene Therapy for Chronic pain by modulating the SNPs of pacemaker ion channels.

研究代表者

賀来 隆治 (Ryuji, Kaku)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：50444659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：急性痛から慢性痛への移行機序として、神経障害部位へのペースメーカーチャンネルの集積が報告されている。遺伝子多型ペースメーカーチャンネルは細胞膜に存在しても電流を流さないため、神経障害部位に強発現させることにより、異所性放電を抑制できる可能性がある。本研究では、細胞内サイクリックAMPを制御することにより、細胞膜へのペースメーカーチャンネル発現を抑制し、それが疼痛行動抑制につながることを明らかにした。本現症と同様の働きをもつ遺伝子多型チャンネルの障害部位への導入が痛みを与える影響については今後の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：The pace maker ion channels play a major role on regulating the neuropathic pain, especially it work as modulator at the shift state from acute pain to chronic pain. It is also reported that the SNPs of that ion channels do not pass the current, but it exist on the cell surface. We investigated that cyclic AMP can reduce the expression that ion channels to the cell membrane, and it also can decrease the pain behavior of rat spinal nerve ligation (SNL) model. It suggests that over expression of SNPs ion channels can reduce the pain current, and may inhibit the shift from acute pain to chronic pain.

研究分野：痛みの遺伝子治療

キーワード：慢性痛 遺伝子治療 ペースメーカーチャンネル

1. 研究開始当初の背景

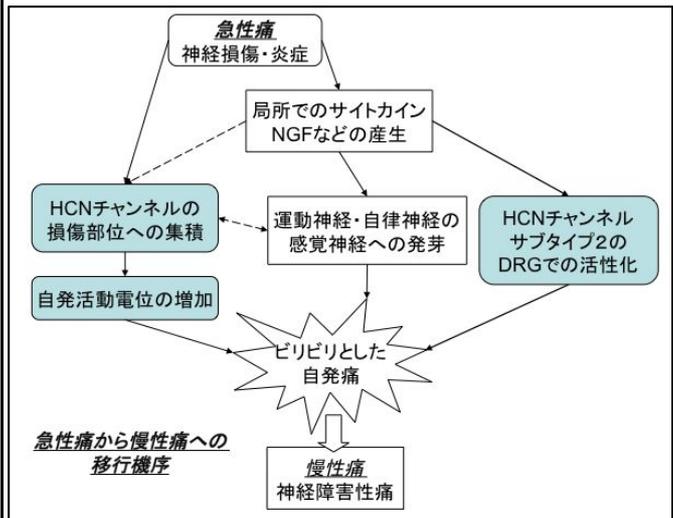
慢性痛は現在の社会的な問題である。急性痛に対する治療は進んでいるが、慢性痛に対する薬物療法はオピオイドなど副作用が強いものが中心であり、痛みのコントロールに難渋することもしばしばである。またこれらの薬剤は、痛みに対する対症療法であり、原因の除去につながる可能性は低く、奏功した場合でも長期間の内服が必要となるため、日常生活の質の向上にはつながりにくい。

4つのサブタイプを持つHCNチャンネルは神経全体の活動に関与しており、特に心臓で心拍数をコントロールしていることからペースメーカーチャンネルとして知られている。中枢神経系に広く分布しているHCNチャンネルのサブタイプ2が、炎症による痛み、神経障害性痛に関与している可能性があることが最近になって示されている。Chaplanらは2003年にHCNチャンネルの非特異的ブロッカーであるZD7288を用いて、ラット神経結紮モデルにおける感覚神経での自発活動電位の減少、痛み行動の抑制を観察した(J of Neurosci. 2003;23:1169-78)。その後2011年にEmeryらによって、さらに詳しい報告が追加された。彼らは痛覚を伝達する神経に特異的に発現しているナトリウムチャンネルであるNav1.8の遺伝子と反応して、後根神経節だけでHCNチャンネルサブタイプ2をノックダウンしたマウスを用いて、炎症性疼痛に対する痛み行動の減少、慢性痛につながると考えられている痛覚過敏状態になりにくいことなどを証明した(Science. 2011;333:1462-6)。またJiangらによると、神経障害部位にHCNチャンネルの集積が認められ、自発活動電位の増幅が起こり、この変化が急性痛から慢性痛への移行に影響を及ぼすことが示唆されている(Pain. 2008;137:495-506)。

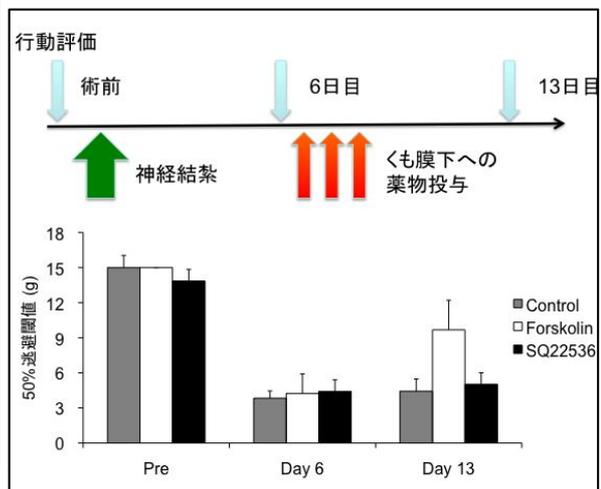
これらの報告を総合的に判断すると、障害部位での炎症性物質の影響によるHCNチャンネルの活性化、及び障害部位でのチャンネルの強発現が、長期間持続する痛みの一因となっていることは明らかであり、同部位でのHCNチャンネル電流の抑制、つまりはHCNチャンネルに特異的な薬物の投与、または障害部位での強発現の抑制が、急性痛から慢性痛への移行を抑制できる可能性を示している。しかも興味深いのは、4つあるサブタイプのうち、脊髄後根神経節に多く発現しているサブタイプ2のみが中枢神経系において炎症性痛つまり急性の痛みから、神経障害性痛いわゆる慢性痛への移行において中心的な役割を担っていることである。

もし選択的なブロックが可能となれば疼痛治療に応用が可能であるが、現時点でサブタイプ2に特異的なHCNチャンネルブロッカーは開発されていない。全てのサブ

タイプを抑制するIvabradineは、心臓を中心に発現し、心拍数をコントロールしているHCNチャンネルサブタイプ4をもブロックしてしまうため、痛みを抑える治療の結果、重篤な徐脈を引き起こす可能性があり、臨床応用は難しいことが予想される。



研究代表者らはこれまでにHCNチャンネルの糖鎖付加が細胞膜表面への発現に及ぼす影響、つまりHCNチャンネルの自発痛への関与について研究を行ってきた。その結果、糖鎖付加を行うことが出来ない遺伝子多型HCNチャンネルはサブタイプ1、2共に細胞膜へは発現がみられるものの電流は通さないこと、またチャンネルのC末端にあるCyclic adenosine monophosphate (以下cAMP)結合部位を通じて薬物による糖鎖付加の調整が行われていることを初めて明らかにすることが出来た。またその結果に基づき、C末端を持たない、つまりはcAMPによる細胞内シグナルによる調節を受けない遺伝子多型チャンネルのサブクローニングに着手し、培養細胞上にそれらのチャンネルを強発現することに成功している(データ未発表)。これらのin vitroでの実験に加えて、平成24年度までの研究により、動物実験レベルでもこれらcAMPの調節によって痛み行動の抑制がみられることを明らかにすること



が出来た。

以上のような背景、及びここまでの実験の結果に基づき、本研究は cAMP による調節を受けない遺伝子多型 HCN チャンネルサブタイプ 2 を脊髄後根神経節へ遺伝子導入することによって、自発活動電位を抑制し、急性痛から慢性痛への移行を阻止することを目的とする。

2. 研究の目的

ペースメーカーチャンネルとしても知られている HCN チャンネル 4 つのサブタイプのうち、特にサブタイプ 2 は、脊髄後根神経節において神経障害性痛におけるピリピリとした痛みを引き起こす自発活動電位をコントロールしており、急性痛から慢性痛への移行に大きく関与している。本研究では、未だに選択的な拮抗薬をもたない HCN チャンネルサブタイプ 2 の働きを抑えるため、遺伝子多型に注目して細胞内刺激伝達作用を持たないチャンネルを強発現することが疼痛行動に及ぼす効果を明らかにし、将来的にこの方法を、単なる対症療法でない根本的な痛みの遺伝子治療に応用することを目的とする。

3. 研究の方法

SD ラットを用いて L5 腰神経結紮モデルを作成する。ペントバルビタール麻酔下に背部から切開して、横突起を切除し、ラット第 5 腰神経を露出する。その他の神経を損傷しないようにしながら、第 5 腰神経を 5-0 絹糸で 2 重結紮する。生理食塩水で洗浄後、閉創し、術後に抗生物質を皮下に投与する。この処置によって術後 7 日目前後より痛覚過敏などの疼痛関連行動が観察され始め、術後 28 日目以降も継続して観察されることが報告されている (Anesth Analg. 104:936-43, 2007)。

マウスに比較して、ラットは手術手技、脊髄・後根神経節のサンプリングが容易であり、癌性骨疼痛モデルにおいても、自発痛だけでなく機械刺激によるアロディニアが観察できる事が特徴である。注入する腫瘍細胞にはラット MRMT-1 細胞を用いる。これは HBSS 培地にて 10% 胎児牛血清を加えた状態で培養しておく。週 2 回の培地交換、抗生物質の投与を行う。注入直前にトリプシンにて処理後、細胞浮遊液を作成する。

ペントバルビタール麻酔下に、ラットの脛骨上の皮膚を切開する。周囲の血管、筋肉など組織を傷つけないように脛骨近位骨端部を露出させる。23 ゲージ針にて骨に穴を開け、0.5mm のドリルで刺入口を形成する。5 μ l のハミルトンシリンジを用いて 5 μ l の HBSS 培地に浮遊させた 3 \times 10³ 個の MRMT-1 細胞を注入する。対照群には、HBSS 培地のみを注入する。リークを防ぐため刺入口を骨蠟で塞ぎ、生理食塩水で洗

浄後、クリップにて閉創する。術後創部はポビドンヨードにて消毒し、抗生物質を皮下に投与する。この処置によって術後 7 日目前後より、疼痛関連行動が観察され始め、術後 28 日目以降も継続して観察されることが報告されている (Pain 100:219-29, 2002)。

術後 5 日目に創部のクリップを除去する。術後 7 日目より毎日一定の時間に、20 分間行動観察用ケージの中で動物を慣らした後、10 分間、自発痛による足を舐めたり噛んだり振ったりする疼痛行動の回数をカウントする。次に機械的刺激に対する疼痛行動評価を行う。電動フォンフライを用いて両側ラット足底を刺激し、その逃避反応から 50% 反応閾値を測定する (Exp Neurol. 163:490-4, 2000)。最後に左右の下肢の荷重変化について Incapacitance Tester を用いて検討する。ラットを測定用のアクリルチャンバーに入れ、両後肢がそれぞれの荷重測定用のパッドの上に乗るように位置を調整する。1 回 3 秒間測定し、それぞれのラットで 5 回ずつの平均から患側後肢の荷重/健側後肢の荷重を求める。それぞれ術後 14 日目まで行う。

コントロールとして、2 週間後にフォンフライテストによって、疼痛行動を確認後、それぞれのラットから後根神経節を摘出し、HCN チャンネルサブタイプ 2 の発現変化について、ウエスタンブロット法によってタンパク質の増減を明らかにし、免疫染色法で局在について検討する。

本研究で使用する遺伝子多型チャンネルタンパク質を発現するシャトルベクターは、研究代表者によって、前所属であるウイスコンシン大学においてすでに作成済みである。そのベクターから DRG に特異的に感染するアデノ関連ウイルス 2/8 を作成する。

このベクターをラット脊髄神経結紮モデル、ラット癌性骨疼痛モデルに形質導入し、その効果を検討する。評価法としては疼痛行動評価、およびウエスタンブロット法を用いる。細胞への遺伝子導入効果によって機能抑制の程度が異なることが予想されるため、2 つのモデルそれぞれ 100 匹に対して、様々な形質導入用薬剤を用いて効果を詳細に検討する。

動物モデル作成と同時にウイルスベクターをくも膜下腔に投与し、その後の疼痛行動を 4 週間まで観察する。

上述の動物モデルから後根神経節を摘出し、ウエスタンブロット法にて形質導入されたタンパク質の検討を行う。遺伝子多型 HCN チャンネルは、ウエスタンブロットにおいて分子量が小さくなることから、その導入効果を判定することが可能である。

初年度に引き続き、モデルの作成と遺伝子導入、疼痛行動での効果確認、蛋白レベルでの発現確認を行う。初年度の結果を参考にして、より導入効果の高い疼痛モデル

を選択することを目的とする。神経障害性痛モデル、癌性骨疼痛モデルはどちらも臨床にも通じる慢性痛のモデルとして確立されているが、本研究では、研究結果がより早く得られる方のみについて平成27年度での臨床応用へ向けた長期投与、安全性の確認の検討を行う。

最適な条件を検討しつつ、さらに副作用の有無など、臨床応用を念頭に置いた動物実験を引き続き行う。具体的には、他の臓器への影響の有無、血行動態の変動の有無、長期間の観察などが必要と考えられる。

4. 研究成果

SNL モデルに対して、術後6, 7, 8日目にフォルスコリンをくも膜下に投与した。その結果、投与群では対照群と比較して痛み行動が有意に抑制された。免疫組織学的検討の結果、両群とも後根神経節では、HCN チャンネルの細胞膜への集積が確認されたが、フォルスコリン投与群では、対照群と比較して、細胞膜への発現が抑制されていた。ウイルスベクターの作成に難渋したため、遺伝子多型チャンネルのラットモデルへの導入にまで至らなかったが、これまでの成果については投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

賀来 隆治 (KAKU, Ryuji)

岡山大学、医歯薬学総合研究科、助教

研究者番号：50444659

(2)研究分担者

小幡 典彦 (OBATA, Norihiko)

神戸大学、医学部附属病院、助教

研究者番号：30509443