

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860423

研究課題名(和文) アデノ随伴ウィルスベクターを用いた神経障害性痛に対する遺伝子治療

研究課題名(英文) Adeno-associated virus-mediated gene therapy for neuropathic pain.

## 研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、痛みに関わる神経伝達に重要な役割を果たすとされる脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子に注目し、アデノ随伴ウィルス(AAV)ベクターを用いて痛み発生メカニズムに寄与するBDNFの発現抑制を実現することで、難治性疼痛の新たな治療法を確立することである。

まず、痛みに関わる特異的なBDNFの発現を阻害するRNAを組み込んだAAVベクターを作成した。次に、痛み動物モデルにおいて脊髄くも膜下腔内に作成したAAVベクターを投与し、神経節におけるBDNF合成阻害を確認し、その鎮痛効果を検討する。最終的には本治療法の安全性を確認し、臨床における治療法開発への道を探る。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is to inhibit the expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), which plays a pivotal role in the development of neuropathic pain, using an adeno-associated virus vector (AAV).

First, we designed an AAV vector containing small interfering (si)RNA that inhibits the expression of specific BDNF related to pain. Then we plan to administer the AAV vector in the spinal subarachnoid space in animal pain models, confirm the BDNF synthesis inhibition in ganglia and examine its analgesic effect. Eventually, we intend to assess the safety of this therapy, and make this strategy developed in clinical.

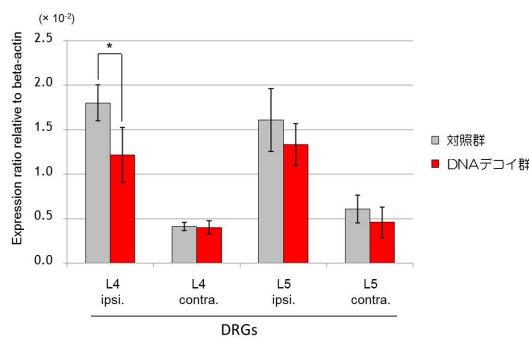
研究分野：医歯薬学(疼痛学)

キーワード：神経障害性疼痛 アデノ随伴ウィルスベクター 遺伝子治療 慢性痛

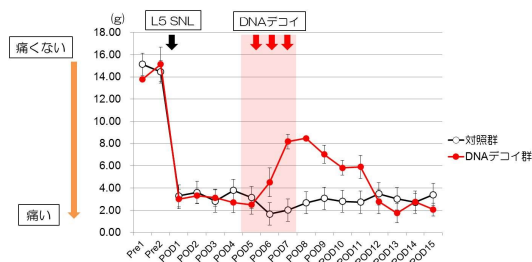
1. 研究開始当初の背景

疼痛の基礎的研究は近年飛躍的に発展したが、臨床的には神経障害性痛などいわゆる難治性痛に多数の患者が苦しんでいるのが現状である。当研究室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。

最近では、神経障害性痛の成立に脊髄レベルで BDNF が大きく関与していることが示唆されている。BDNF には 11 のエクソンが存在するといわれているが、神経障害性痛に関与する BDNF エクソンを我々は特定し、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)。さらには、その特定した BDNF エクソンの転写調節領域を同定し、DNA デコイを作成し、実際にラット神経障害性痛モデルにくも膜下投与することで、後根神経節における BDNF mRNA の発現抑制効果と疼痛行動改善効果を証明した(本研究代表者 Obata N et al., Biochem Biophys Res Commun 408:139-44,2011)。(図 1、2)



(図 1)



(図 2)

我々の追加実験によって、DNA デコイによる BDNF mRNA 転写抑制効果は 5 日程度で消失することが判明している。そこで、より長期間の発現抑制効果を目指して、AAV ベクターを利用することを着想した。AAV ベクターはそれ自体に病原性はなく安全性が高いことから、近年の遺伝子治療を探る研究では注目を浴びつつある。神経細胞のような非分裂細胞にも効率よく遺伝子導入でき、実際に神経・筋疾患を対象とした AAV ベクターを用いた臨床試験がすでに行われている。この手法を応用し、DNA デコイよりも発現抑

制効果が高いと考えられる siRNA を挿入した AAV ベクターをくも膜下投与することで、さらに高く長期的な鎮痛効果を得ることができるのではないかと発想に至った。

2. 研究の目的

- (1) siRNA を挿入した AAV ベクターの作成
- (2) In-vitro で BDNF 発現抑制効果を確認
- (3) 神経障害性痛動物モデルの作成
- (4) In-vivo で BDNF 発現抑制効果を確認
- (5) 疼痛行動評価
- (6) 安全性の評価

3. 研究の方法

(1) siRNA を挿入した AAV ベクターの作成  
BDNF エクソン 1 mRNA に対する siRNA のデザイン

BDNF エクソン 1 に対する効果的な si-RNA 配列は、コンピュータアルゴリズムにより予測できるため、有効と予測される 10 種類程度の配列の siRNA を合成する。そのうち最も強い発現抑制効果がどの配列で得られるかは実際に検討する必要がある。予備実験では C6 細胞 (ラットグリオーマ由来セルライン) がエクソン 1 を含む mRNA を発現していたため培養 C6 細胞に siRNA をトランスフェクションし BDNF mRNA 発現を定量 PCR により解析する。ポジティブコントロール用のラット GAPDH-siRNA を使用し、あらかじめトランスフェクション効率を最適化する。

ベクターの作成

の実験により求めた最適な siRNA 配列をウイルス作成用プラスミドにクローニングする。

制限酵素サイト付き DNA 配列を合成し、siRNA 発現用プロモータ U6 の下流に挿入する。さらに IRES-GFP cassette を組み込むことにより、ウイルスの導入効率、局在性および発現効率を組織学的に簡便に評価できるように工夫した。対照として GFP だけを発現する AAV を使用する。

(2) In-vitro での BDNF 発現抑制効果の確認

作成した AAV の DRG 細胞への感染力価の測定のため、培養 DRG 細胞を使用し GFP 発現率、BDNF mRNA 抑制率を測定する。IRES-GFP カセットがあるため、培養状態のまま導入効率を確認できる。GFP 発現のピークに細胞をハーベストし、定量 PCR により mRNA の抑制率を求める。

(3) 神経障害性痛動物モデルの作成

ラットに対して、麻酔下に背部の皮膚を開後、L6 の横突起周囲を丁寧に剥離後切断し、第 5 腰神経を 5-0 絹糸にて神経を結紮する (L5 SNL モデル)。その後、くも膜下に薬剤注入用の、PE10 カテーテルを挿入する。止血を確認して閉創し、それぞれ個別のゲージにて経過観察する。この処置によって、術後 2 日目から、数週間持続する痛覚過敏状態

が観察される。

(4) In-vivo での BDNF 発現抑制効果の確認

AAV ベクターくも膜下投与後 5 - 6 週に組織 (DRG、脊髄) を摘出し、ウイルス感染のモニタリングとなる GFP の発現、及び BDNF の発現抑制を確認する。定量 PCR にて mRNA の変化を、ウエスタンブロット法にてタンパク質の変化を確認する。

(5) 疼痛行動評価

疼痛行動評価は、機械刺激によるアロディニアを測定する。具体的には von Frey filament を用いて両側ラット足底を刺激し、その逃避反応から 50% 逃避閾値を測定する。

(6) 安全性の評価

副作用の有無を組織学的に、また Rotor rod test により行動学的に検証し、将来の臨床応用の道を探る。

#### 4. 研究成果

異動に伴い、細胞培養および動物実験設備の整備 (疼痛モデル作成、疼痛レベル評価など)、分子生物学的研究の基本的手技が行える環境を整備しつつ、以下の研究を遂行した。

(1) BDNF 定量条件の検討:

C6 (ラットグリオーマ細胞) から mRNA を抽出し、BDNF transcript variant I のエクソン 1 および Coding Sequence (CDS) のプライマーを用いて Real Time PCR を行い定量条件の検討を行った。CDS (BDNF の全ての Transcript variants に共通の配列) に比べ、エクソン 1 の発現量は非常に少なく (およそ 1/100 以下)、定量性に欠けるという結果となった。

(2) ハウスキーピング遺伝子 (Cyclophilin B (CPB)) の定量条件の検討 (Real Time PCR):

定量は再現性あり、コントロールとして使用する予定としている。

(3) siRNA の検討:

siRNA ポジティブおよびネガティブコントロールを購入し、これらを用いたトランスフェクション条件の検討を行った。具体的には siRNA 量、細胞数、トランスフェクション試薬量、無血清培地での洗浄、siRNA 暴露時間などの条件を検討し、コントロール CPB に対する siRNA 効果を確認した (50% ノックダウン)。一方、エクソン 1 に対する siRNA ターゲット配列は SIGMA 社に設計を依頼し、3 つのターゲット領域を得た。しかし、C6 細胞から得られるエクソン 1 は低濃度であり、siRNA によるノックダウン効果を検討するには定量精度が低かった。そこで BDNF transcript variant I をクローニングし、細胞へのトランスフェクションによる BDNF 過発現細胞を作成することになった。

(4) BDNF クローニング:

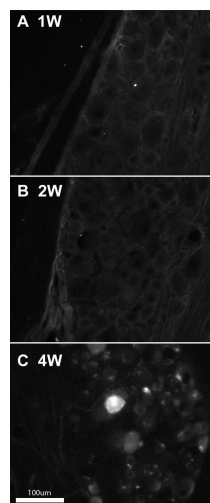
ラット脳から mRNA 抽出した後、BDNF transcript variant I (4252bp) のうち、エクソン 1 と CDS を含む 1410bp の遺伝子クロー

ニングを試みた。プラスミドベクター pcDNA3.1(+) へ挿入するため、BDNF transcript variant I の 5' 末端に BamHI サイト、CDS 領域の 3' 末端に EcoRI サイトを接着したプライマーを設計した。ラット脳サンプルを用いても、1 回の PCR では目的配列 (1410bp) を増幅できなかったが、目的配列内に複数のプライマー設計し、プライマーの組み合わせにより、得られた配列をつなぎ合わせて PCR を行ったところ、目的とする BDNF transcript variant I を得た。

(5) 神経障害性痛動物モデルの作成:

Wistar ラットに対して、麻酔下に背部の皮膚を切開後、L6 の横突起周囲を丁寧に剥離後切断し、第 5 腰神経を 5-0 絹糸にて結紮した。その後、くも膜下に薬剤注入用のカテーテルを挿入した。止血を確認して閉創した。術後 2 日目から数週間持続する痛覚過敏状態が観察された。

今後は BDNF 過発現細胞を作成し、siRNA の効果を確認した後、shRNA およびアデノ随伴ウイルスベクターを用いた shRNA 発現系を作成し、ラット神経障害性痛モデルに対する投与を行う予定である。また、成果がまとまった段階で国内外の関連学会で逐次報告予定である。我々は、予備実験において、くも膜下投与した AAV ベクターが後根神経節の神経細胞に特異的に導入されることはすでに確認している。(図 3) BDNF の特定エクソンをターゲットとすることで安全性の面においても、選択的阻害による遺伝子療法は難治性痛に苦しむ人々に大きな福音となり得る。加えて、AAV ベクターを用いた遺伝子治療は他の領域では臨床応用の治験が開始されており、今後の臨床応用としての期待が大きいと考えている。



(図 3)

#### 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 1 件)

Tomotsuka N、Kaku R、Obata N、  
Matsuoka Y、Kanzaki H、Taniguchi A、  
Muto N、Omiya H、Itano Y、Sato T、  
Ichikawa H、Mizobuchi S、Morimatsu H、  
Up-regulation of brain-derived  
neurotrophic factor in the dorsal root  
ganglion of the rat bone cancer pain model、  
J Pain Res、査読有、2014、11 巻、pp.415-23、  
doi: 10.2147/JPR.S63527

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし