

氏 名	小川 暢弘
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士 甲第717号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成26年 9月10日
学位論文題目	Gene Therapy for Neuropathic Pain by Silencing of TNF- α Expression with Lentiviral Vectors Targeting the Dorsal Root Ganglion in Mice (マウスにおける脊髄後根神経節を標的としたレンチウイルスベクターを用いた TNF- α 発現抑制による神経因性疼痛に対する遺伝子治療法)
審査委員	主査 教授 後藤 敏 副査 教授 等 誠司 副査 教授 松浦 博

論文内容要旨

※整理番号	723	(ふりがな) 氏名	おがわ のぶひろ 小川 暢弘
学位論文題目	<p align="center">Gene Therapy for Neuropathic Pain by Silencing of TNF-α Expression with Lentiviral Vectors Targeting the Dorsal Root Ganglion in Mice</p> <p align="center">(マウスにおける脊髄後根神経節を標的としたレンチウイルスベクターを用いた TNF-α発現抑制による神経因性疼痛に対する遺伝子治療法)</p>		
<p>【目的】 神経因性疼痛は外傷および様々な疾病に起因し、患者の QOL および ADL を著しく低下させる慢性疼痛である。現存の治療のみでは十分とはいえ、新たな治療法の開発が望まれている。近年、その病理学的機序として脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) における TNF-αなどの pro-inflammatory mediator の関与が報告されている。そこで、我々は神経因性疼痛の治療戦略として DRG における TNF-α発現抑制に着目した。本研究では、抗 TNF-α薬の全身投与は免疫抑制などの副作用が問題となるため、組織限定的かつ長期間の効果発現が期待できるレンチウイルスベクターの局所投与による RNA 干渉技術を用いた神経因性疼痛に対する新規遺伝子治療法を検討した。</p> <p>【方法】 神経因性疼痛モデルマウスの作製および評価：9-10 週齢雄性 C57BL/6 マウスを用い、背部に皮膚切開を加え、L5 脊椎横突起直下に走行する両側 L5 脊髄神経を同定し、左側を切断、右側を温存する手術にて L5 脊髄神経切断 (spinal nerve transaction, SNT) モデルを作製した。SNT にて術側後肢に神経因性疼痛の症状である機械的痛覚過敏が誘発されたかを、マウス足底への金属フィラメントによる持続的加圧刺激に対する逃避行動閾値の計測 (プランターテスト) を用い定量的に評価することで神経因性疼痛モデルとしての再現性を確認し、同モデルの両側 L5DRG における TNF-α mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて評価し、その関連性を検証した。 レンチウイルスベクターの作製および評価：TNF-α発現を抑制する治療ベクター作製のため、配列特異的に mRNA へ結合することで標的遺伝子発現を抑制できる short hairpin RNA (shRNA) を用いた。まず、マウス TNF-αを標的とする shRNA 配列を The RNAi Consortium (TRC) より 4 候補選定し、それら shRNA 配列とレポーター遺伝子 GFP を発現するレンチウイルスベクターを作製した (LV-TNF-shRNA1-4)。次に、TNF-α発現抑制効果を評価するため、マウス TNF-α過剰発現レンチウイルスベクターを感染させた 293T 細胞を作製することにより、TNF-α過剰発現系を作り、その 6 時間後に LV-TNF-shRNA1-4 を感染させ、72 時間後に 293T 細胞におけるマウス TNF-α mRNA 発現を、定量的 RT-PCR 法を用いて shRNA 配列を含まないコントロールベクター (LV-GFP) 感染群と比較することで発現抑制効率を判定した。 治療ベクターによる神経因性疼痛に対する治療効果の検討：作製した神経因性疼痛モデルマウスに対して、<i>in vitro</i>にて最も TNF-α発現抑制効率の高かった LV-TNF-shRNA3 による神経因性疼痛抑制効果の検討を行った。L5 脊髄神経切断直後に LV-TNF-shRNA3 (治療群) または LV-GFP (非治療群) を切断部中枢側に各 1.86×10^5 IFU 局所投与し、術後 14 日間、治療効果をプランターテストにて行動学的に検討し、術後 3、7、14 日目における標的 DRG 組織を用いて組織学的検討を行った。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研染色究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2 千字程度でタイプ等で印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

まず、治療ベクターの導入効率および TNF- α 発現抑制効果を定量的 RT-PCR 法、免疫染色法にて評価した。次に、治療による DRG 神経細胞保護効果とアポトーシス抑制効果を、術後 14 日目の術側 L5DRG における残存神経細胞数を Nissl 染色にて、アポトーシスを Cleaved Caspase3 の免疫染色にて評価した。さらに、SNT にて術側 DRG で上昇するとされる疼痛関連分子である ATF3、NPY、IL-6 および疼痛誘発分子である CGRP の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法を用い経時的に評価した。

【結果】

SNT マウスの機械的痛覚過敏と L5DRG での TNF- α 発現の上昇: SNT マウスでは偽手術側後肢の機械的痛覚閾値が 5-7g 程度であったのに対し、術側では術後 1 日目から閾値が 2g 程度の強い機械的痛覚過敏が生じ、その後 14 日目まで同程度の痛覚過敏が持続した。SNT 後、3、7 日目に、術側 L5DRG では TNF- α mRNA 発現が術前の約 2.5 倍に上昇しており、SNT マウスの神経因性疼痛モデルとしての整合性が確認された。

LV-TNF-shRNA の TNF- α 発現抑制効果 (*in vitro*): 293T 細胞を用いた TNF- α 発現抑制実験にて、LV-GFP 群に比して LV-TNF-shRNA1-4 群ではマウス TNF- α mRNA 発現が著しく抑制され、いずれも治療ベクターとしての能力を有していることが確認された。それぞれの抑制効率は shRNA1 群が 48%、2 群が 75%、3 群が 89%、4 群が 85% であり、LV-TNF-shRNA3 が最も高かった。

LV-TNF-shRNA3 の神経因性疼痛に対する治療効果: 治療群の SNT による機械的痛覚過敏は、14 日間を通して非治療群に比して著明に改善し、閾値が約 3g まで上昇した。また、治療群の両側 L5DRG 組織では、14 日間経時的に増加する GFP mRNA 発現および免疫染色による GFP 陽性神経細胞を認め、有効な治療遺伝子導入が示唆されたことに加え、非治療群の術側 L5DRG では、SNT 後 14 日間、TNF- α mRNA 発現および免疫染色による TNF- α 陽性神経細胞数が著しく増加したが治療群ではそれらの増加が 14 日間を通して術前のレベルまで抑制されており、標的 DRG にて十分な TNF- α 抑制効果を認めた。

次に、術後 14 日目の術側 L5DRG では、正常 DRG に比して神経細胞数が減少し、Cleaved Caspase3 陽性神経細胞数が増加したのに対し、治療群では非治療群に比して残存細胞数が有意に多く、Cleaved Caspase3 陽性細胞数が有意に減少した。このことから、LV-TNF-shRNA3 による治療は障害 DRG への神経保護効果、アポトーシス抑制効果を持つことが示唆された。さらに、SNT により術側 L5DRG では ATF3、NPY、IL-6 の mRNA 発現が上昇したが、治療群では非治療群に比してこれら疼痛関連分子の発現上昇の程度が著しく抑制され、治療による疼痛軽減の DRG における分子機構の一部であると考えられた。一方で CGRP mRNA 発現は有意な変動を認めず、今回の検討において神経因性疼痛との関連はなかった。

【考察】

本研究で、我々はモデル動物においてレンチウイルスベクターを介した DRG 神経細胞における TNF- α mRNA 発現抑制が、神経損傷により生じる神経因性疼痛の治療となりうることを示した。その機序として、DRG における TNF- α mRNA 発現の抑制が、SNT にて生じる DRG での疼痛関連分子の発現を抑制し、障害 DRG 神経細胞に対し保護的に働くことで疼痛軽減に寄与したと考えられた。一方で、本研究では疼痛の改善効果は部分的であった。完全寛解のためには、TNF- α 発現の抑制に加えて神経因性疼痛の病理学的機序を取り巻く他の分子機構の制御が必要であると考えられた。

【結論】

神経因性疼痛モデルマウスにおいて、DRG を標的としたレンチウイルスベクターによる TNF- α 発現抑制は神経因性疼痛の治療法として有効であった。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	723	氏名	小川 暢弘
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>神経因性疼痛に対するこれまでの治療法は十分でなく、より効果的な治療法の開発が望まれる。本研究では、TNF-α に対する sh(small hairpin)RNA を発現するレンチウイルス (LV-TNF-shRNA3) の局所投与が神経因性疼痛の新規治療法になりうるかどうかについてマウスを用いて検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) L5 脊髄神経切断 (spinal nerve transaction, SNT) により、後肢の機械的痛覚閾値が下がり、脊髄神経後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) での TNF-α mRNA 発現が上昇する。 2) SNT 後の DRG での TNF-α mRNA の上昇ならびに疼痛関連分子 ATF3、NPY、IL-6 mRNA の上昇は、LV-TNF-shRNA3 の局所投与により著明に抑制される。 3) SNT 後の DRG での caspase3 の活性化と神経細胞数の減少は、LV-TNF-shRNA3 の局所投与により著明に抑制される。 4) SNT による機械的痛覚閾値の低下は、LV-TNF-shRNA3 の局所投与により改善する。 <p>本論文は、TNF-α mRNA を標的とした shRNA 発現レンチウイルスベクターによる神経因性疼痛治療の可能性について新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試験を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 588 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 26 年 9 月 2 日)</p>			