

Title	NF- $\kappa$ B "decoy" suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model
Author(s)	阪上, 学
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43725">https://hdl.handle.net/11094/43725</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	さか うえ がく 阪 上 学
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 5 1 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 9 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当 医 学 系 研 究 科 外 科 系 専 攻
学 位 論 文 名	NF- $\kappa$ B “decoy” suppresses cytokine expression and thermal hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. (NF- $\kappa$ B デコイはサイトカイン発現と温熱性刺激に対する痛覚過敏を抑制する)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 真 下 節  (副査) 教 授 清 野 宏 教 授 吉 矢 生 人

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

帯状疱疹後神経痛、反射性交換神経性ジストロフィー、幻肢痛などの神経因性疼痛は慢性痛の代表的なもので、非常に難治性である。これらの神経因性疼痛の病態解明は最近急速に進みつつあるが、根本的な治療法に結びついた研究は依然として進んでいない。分子生物学的手法を用いた慢性疼痛に対する基礎研究は緒に着いたばかりであり、中でも神経系と免疫系のネットワークに焦点を当てた研究はほとんど見られない。急性痛の成立には組織傷害後の炎症性機転が関与しているが、炎症性メディエーターのなかでも免疫担当細胞が産生するサイトカインと疼痛との関係が近年注目を集めている。また炎症性サイトカインが慢性疼痛の成立、増悪にも関与しているとの報告も見られる。本研究では炎症性サイトカイン、接着分子などが共通に利用するシグナル伝達分子 NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) に焦点をあて、NF- $\kappa$ B を阻害する事で神経因性疼痛の病態解明並びに臨床的治療を試みる。近年、リウマチや IBD (炎症性腸疾患) 等の疾患の病態形成にシグナル伝達分子 NF- $\kappa$ B が関与している事が明らかになってきている。慢性疼痛動物モデルに於いても神経障害後、局所で NF- $\kappa$ B の活性化が報告されている。そこで NF- $\kappa$ B 活性化を効果的に制御することができれば急性痛のみならず神経因性疼痛の治療薬の一つとなる可能性がある。本研究では NF- $\kappa$ B の結合部位に特異的な 2 本鎖 DNA を合成し、HVJ-liposome 法を用いてデコイ型核酸として神経絞扼部位に遺伝子導入することで神経損傷後の局所の NF- $\kappa$ B 活性化を競合的に阻害することを試みる。活性化 NF- $\kappa$ B 抑制が炎症機転を抑制し、痛覚過敏行動に与える影響を検討する。さらに NF- $\kappa$ B 抑制の影響を免疫学的手法を用いて検討を加える。

#### 【方法並びに成績】

##### 1) 遺伝子-蛋白相互作用の解析

デコイ型核酸による NF- $\kappa$ B 活性化の抑制を検索するためにゲルシフトアッセイを行う。ラット神経因性疼痛モデルの傷害神経から採取したサンプルより蛋白抽出液を調製し、ラベルしたプローブ DNA 断片と結合させて非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行う。形成された DNA-蛋白複合体の移動度よりデコイ群、スクランブルデコイ群において活性化 NF- $\kappa$ B の解析を行う。スクランブルデコイ群では陽性コントロールと同様に NF- $\kappa$ B 活性化が見られたが、デコイ群では NF- $\kappa$ B 活性化が抑制された。

##### 2) サイトカイン特異的 mRNA の定量

傷害神経局所ではシュワン細胞やマイクログリアなどの神経細胞、血管系より遊走してきたマクロファージが炎症性サイトカインを産生し神経因性疼痛の増悪因子となっていることが近年報告されている。ラット神経因性疼痛モデルの脊髄後根神経節において、局所で産生されるサイトカイン並びに接着分子の発現をNF- $\kappa$ B デコイとスクランブルデコイ群の2群で定量PCRを用いて定量する。炎症性サイトカインのTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、INF- $\gamma$ 、炎症性メディエーターiNOS、接着分子ICAM-1、VCAM-1を測定した。スクランブルデコイ群ではサイトカイン、iNOS、接着分子の発現は増加したがデコイ群ではこれらの分子の発現は抑制された。

### 3) 神経因性疼痛動物モデルの作製及び疼痛反応実験の遂行

6週齢のSDラットを用い、片側の第5脊髄神経を絹糸で結紮することにより神経因性疼痛動物モデルを作製する。疼痛の評価は温熱刺激に対する逃避反応について疼痛の定量化を行う。スクランブルデコイ群では3日目より疼痛過敏行動が見られたが、デコイ群では14日目まで疼痛過敏行動が抑制された。

#### 【総括】

慢性疼痛の病態解明は依然として進んでおらず潜在的な患者数が多いにも関わらず有効な治療法がないために多くの患者が日常生活の質を著しく損ねている。神経因性疼痛に代表される慢性疼痛の臨床的な治療には決め手となるものではなく、種々の薬物療法や神経ブロック、また心理的カウンセリング等が行われている。本研究では慢性疼痛の発生機序にシグナル伝達分子NF- $\kappa$ Bが関与していることをデコイ法を用いて示した。NF- $\kappa$ B活性化を抑制することでサイトカイン産生、接着分子発現を抑制し、疼痛行動を減少させることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

神経因性疼痛は難治性で慢性疼痛に移行する率が高く、その臨床的な治療にも決め手となるものはない。また、神経因性疼痛の発症メカニズムや詳細な病態については不明な事が多い。神経因性疼痛の発症メカニズムは多岐にわたるが末梢神経レベルでは炎症性機転が重要であると言われている。本研究ではシグナル伝達分子NF- $\kappa$ Bに焦点をあて、神経損傷ラットを用いて神経因性疼痛の発症メカニズムの解明と治療法の開発を試みた。その結果、NF- $\kappa$ Bの活性化を抑制すると、炎症性サイトカインや接着分子特異的 mRNA の発現が抑制されること、さらに温熱刺激に対する痛覚過敏行動が抑制されることを明らかにした。これは神経因性疼痛の発症メカニズムにシグナル伝達分子NF- $\kappa$ Bが関与していること、またNF- $\kappa$ B活性化を抑制することで疼痛を軽減させる事が可能であることを示している。本研究は神経因性疼痛の発症を阻止する効果的な遺伝子治療法の開発の可能性を示唆しており、学位の授与に値するものと考えられる。