

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：慢性疼痛に対する画期的核酸医薬の開発
2. 研究開発代表者：脳神経病態学分野 教授 横田 隆徳
3. 研究開発の成果（1600字以内）

神経因性の難治性の慢性疼痛の新薬として、低分子医薬は頭打ちであり、脊髄を含めた後根神経節（DRG）を標的にしたバイオ医薬が望まれる。しかし、高分子の抗体・核酸医薬の DRG へのデリバリーは全く成功しておらず、基礎研究として髄腔内や局所投与による導入法のみである。研究代表者が開発した DNA/RNA ヘテロ核酸（HDO）にビタミン E を導入分子とした場合、肝臓において圧倒的な抑制効率（0.75mg/kg 静注で>99%抑制）が得られた。本研究では、ヘテロ核酸による慢性疼痛の原因となる DRG の内因性遺伝子の制御を目的とし、それに必要な遺伝子抑制、核酸構造、核酸修飾、最適化等の基盤技術を開発することである。

研究代表者は、本年度も昨年同様にプロジェクトの総合的推進及びデリバリーリガンド分子の最適化、新規ヘテロ核酸構造の構築に関わる技術開発を実施した。ヘテロ核酸の構造、修飾リガンドの最適化として、昨年度はビタミン E と相補鎖の間に TEG（テトラエチレングリコール）を結合させることで有意に肝機能障害の改善が得られた。本年度では、同構造にグリコールを追加したリンカー構造を考案して *in vivo* 評価を行った。同 HDO を正常マウスに静脈投与し、72 時間後に単離した腰部 DRG での内因性因子の発現効果を確認した。リンカー構造を改良した新規 HDO は TEG と同等の遺伝子抑制効果が得られたが、肝毒性が強く再考を要した。また、新規ヘテロ核酸構造として DRG の内因性因子の標的に non-coding RNA を選択した配列を設計している。昨年度、新規に設計した HDO を高容量静脈投与しても肝毒性が認められなかった。本年度も追加実験を施行し、同 HDO 投与 72 時間後には腰部だけでなく頸部、胸部 DRG でも発現抑制効果が得られ、広範囲での遺伝子抑制効果が得られた。さらに週 1 回の反復投与を 4 週間施行したところ肝毒性は認められず、投与量に応じて遺伝子抑制効果が得られた。次年度では、副作用を軽減した HDO を用いて霊長類で安全性評価および DRG での評価を行い、基盤技術を確立する予定である。

研究分担者は、本年度、疼痛標的分子の決定に関わる研究開発と複数の神経障害性モデル動物を作製して、複数の疼痛関連分子の発現を DRG での解析を行った。DRG に高発現している痛み受容体のひとつである TRP family を標的分子としている。神経障害性疼痛モデルマウスでの DRG では、疼痛慢性期において TRP 分子の発現が増加しており、HDO による遺伝子発現抑制を計画している。本年度は、*in vitro* による HDO の検証が終了し、50%以上の遺伝子抑制効果を持った HDO 配列が得られた。次年度に *in vivo* 評価を施行する予定である。一方、平行して新規神経疼痛制御遺伝子の探索も行っている。神経障害性疼痛モデルの一つである成マウスの左脛骨・腓骨神経を切断して作製したマウス SNI モデルを用いて腰部 DRG で高発現している新規分子を 30 個程度同定し、順次解析を進めている。また、SNI モデルと左坐骨神経を結紮した chronic constriction injury モデル（CCI）を作製し、Na チャネル（Nav）と Ca チャネル  $\alpha 2 \delta$  サブユニット（ $\alpha 2 \delta$ ）に注目して腰部 DRG での経時的発現パターンを解析した。Nav は経時的に大きな発現変動を示さなかったのに対し、 $\alpha 2 \delta$  は両モデルとも損傷 1 週で対照群と比較して約 3 倍の発現増加を示し、SNI のほうが損傷 6 週で CCI より高値を示していた。損傷急性期から慢性期にかけて DRG での  $\alpha 2 \delta$  の役割が高い効果が示唆された。一方、TRP family の TRPA1 は両モデルとも 3 週では発現変化なく、6 週での発現増加が観察されたことから神経障害性疼痛慢性期での関与が示唆された。次年度ではこれら成果を基にして疼痛モデル動物を使用した HDO デリバリー効果に関する検証を進めていく予定である。