

令和元年5月10日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08451

研究課題名(和文) 新たな疼痛モデルを用いた痛みの発生メカニズム・伝達経路の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of pain using a new pain model.

研究代表者

奥田 洋明 (Okuda, Hiroaki)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40453162

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)：本研究ではMlc1-tTAマウスの解析を通じて、その疼痛関連行動と原因遺伝子を解析することにより、新たな疼痛発生・伝達メカニズムの解明を目指した。Mlc1-tTAマウスでは、染色体8qB1.1の領域の3つの遺伝子の発現が欠損しており、また骨髄において顕著な構造異常が認められた。そこで骨髄由来のマクロファージを培養し、免疫応答や貪食能を検討した結果、野生型と比べて特に貪食能の異常が認められた。以上の結果より、Mlc1-tTAマウスでは骨髄由来の免疫細胞の機能異常が認められ、その結果、各種侵害刺激に対する反応の差異が発生していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性痛の予防や治療は社会的にも重要であるが、慢性痛の発生要因が多岐にわたり、その機序に関しても不明な点が多いことが、疼痛への適切な対処を困難にしている。本研究成果は、骨髄由来の免疫細胞の異常が、疼痛に対する閾値を変化させることを示唆しており、慢性痛の発症メカニズムの解明に新たな視点を加えたと考える。今後のさらなる解析が、新たな鎮痛薬・治療の探索と共に、疼痛に悩む患者の生活の質の向上の一助になりうると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the mechanism of pain through the analysis of Mlc1-tTA mice that has insertion of the transgene into the chromosome and may be caused aberrant expression of the endogenous gene in this region. In Mlc1-tTA mice, the region of chromosome 8qB1.1 was deleted and the expression of three genes in this region was defective. Furthermore, aberrant structure of the bone marrow is observed. Then, we examined the function of bone marrow-derived immune cells. Particularly, the phagocytic ability in primary macrophages derived from bone marrow was upregulated as compared with the wild type. These results suggest that functional abnormality of bone marrow-derived immune cells may cause alteration in the pain threshold level of mechanical and various noxious stimuli.

研究分野：神経化学

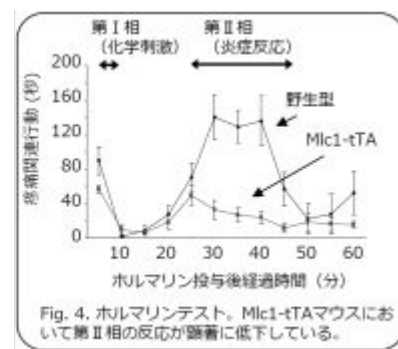
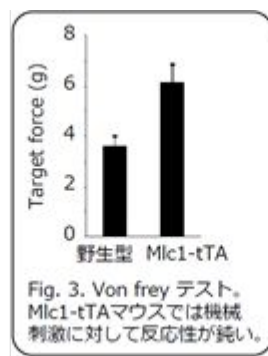
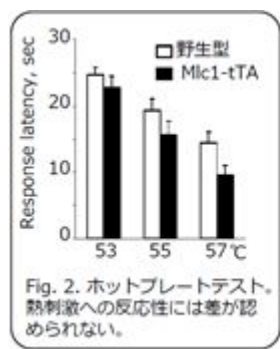
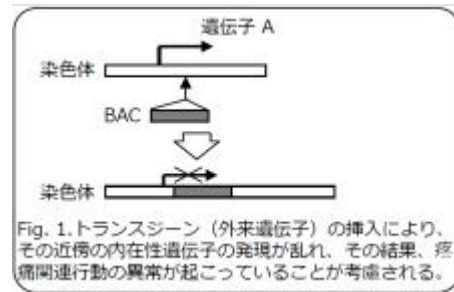
キーワード：疼痛 神経化学

1. 研究開始当初の背景

本来、疼痛刺激は生命を脅かすような危険を知らせる重要な仕組みであるが、過剰または持続的な疼痛は患者の肉体的な不快感だけではなく、精神的な抑圧をも引き起こして生活の質を低下させる。疼痛の改善のためには適切な診断・治療が必要であるが、個人の感じている痛みは共有できる感覚ではないので、それぞれの痛みを評価することも、個人間の痛みを比較することも難しく、疼痛の実態を客観的に把握することは極めて困難であること、また、そもそも疼痛の発生のメカニズムは多様であることが、疼痛への適切な対処を困難にしている。このような現状から、疼痛刺激の発生・伝達メカニズムの解明は、治療や新たな薬剤の開発にも極めて重要であると考えられる。

2. 研究の目的

我々の研究室において複数の系統の遺伝子改変マウスを飼育しており、これらのうち、Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 (Mlc1) 遺伝子のプロモーターの下流でテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tetracycline-controlled transactivator; tTA) を発現する BAC トランスジェニックマウス (以下、Mlc1-tTA マウス) において興味深い現象が認められた。この Mlc1-tTA マウスは BAC トランスジェニックマウスであるため、トランスジーン (外来遺伝子) の染色体への挿入により、その領域の内在性の遺伝子の発現に異常が起こっている可能性がある (Fig. 1)。この Mlc1-tTA マウスはジェノタイピングの際の刺激に対する反応性が、野生型と比較して弱いことが認められた。そこで、Mlc1-tTA マウスは疼痛への感受性が低下しているのではないかと考え、各種の侵害刺激 (熱・機械・化学刺激) に対する行動解析を行った。予備検討の段階ではあるが、ホットプレートテストによる熱刺激に対する反応性は野生型と比較して差が認められなかったが (Fig. 2)、Von Frey テストによる機械刺激に対しては閾値の上昇、即ち、感受性の低下が認められた (Fig. 3)。また、ホルマリン投与による化学刺激に対する反応は、特に炎症反応に対する行動である第 2 相の反応が顕著に減少しており、また、疼痛関連行動だけでなく視覚的にも発赤や腫脹反応が減弱していた (Fig. 4)。



Mlc1-tTA マウスは、何らかの遺伝子の発現に異常を起こしている可能性があり、その結果、各種侵害刺激に対する反応性の違いが生じていると考えられる。従って、本研究の目的は、Mlc1-tTA マウスの解析を通じて、その疼痛関連行動と原因遺伝子を解析することにより、新たな疼痛発生・伝達メカニズムの解明を行うことにある。

3. 研究の方法

本申請研究の目的としては、各種侵害刺激に対する反応に差異が認められる Mlc1-tTA マウスの解析を通じて、その疼痛関連行動と原因遺伝子を解析することにより、新たな疼痛発生・伝達メカニズムの解明を行うことにある。期間内に以下の検討を目指した。

- ・ Mlc1-tTA マウスの様々な疼痛刺激に対する反応の検討。
- ・ トランスジーン (外来遺伝子) の染色体挿入位置の同定。
- ・ トランスジーン挿入による発現変動遺伝子の解析。
- ・ 疼痛発生・伝達への標的遺伝子の関与のメカニズムの解明。

1) Mlc1-tTA マウスの様々な疼痛刺激に対する反応の検討。

予備検討において Mlc1-tTA マウスは急性痛(ホットプレートテスト)に対しては野生型と比較して差が認められなかったが、機械刺激(Von Frey テスト)に対する感受性の低下が認められている。さらには化学刺激(ホルマリン)に対しては特に第 相の炎症反応の著しい低下が認められた。同種の別なテストに対して同様の反応を示すが否か、熱刺激、機械刺激、化学刺激に対する疼痛関連行動を検討して痛みに対する感受性を詳細に評価した。

- ・熱刺激に対する反応性テストとしてはホットプレート試験、テイルフリック試験、テイルデップ試験を行った。

- ・機械刺激に対する反応性のテストとしては von Frey 試験および paw pressure test 試験を行った。

- ・化学刺激に対する反応性のテストとしてはホルマリン試験を行った。

- ・神経因性疼痛に対しては坐骨神経部分結紮モデルを作製して検討した。

2) Mlc1-tTA マウスのトランスジーンの色体への挿入位置の同定。

Mlc1-tTA マウスは BAC トランスジェニックマウスであるため、トランスジーン(外来遺伝子)の色体への挿入部位によっては、その領域の内在性の遺伝子の発現を阻害または変動させる可能性が考えられる。その結果、何らかの遺伝子の機能異常により、疼痛刺激に対する行動変化が起きたと考えられる。そこでトランスジーンの色体への挿入部位を Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR) 法および次世代シーケンサーを用いたゲノム解析にて検討を行った。

3) トランスジーン挿入による発現変動遺伝子の解析。

挿入部位近隣の遺伝子の発現を Real time RT-PCR 法を用いて検討することにより、Mlc1-tTA マウスにおいて発現に異常が認められる遺伝子(標的遺伝子)を解析した。mRNA は脳、脊髄および骨髄より採取した。

4) 疼痛発生・伝達への標的遺伝子の関与のメカニズムの解明。

マウス骨髄より mRNA を採取し、マイクロアレイを用いて発現が変動している遺伝子およびシグナルを探索した。また骨髄由来マクロファージを培養し、LPS に対する免疫応答および食食能の差を検討した。

4. 研究成果

1) Mlc1-tTA マウスの様々な疼痛刺激に対する反応の検討。

最初に Mlc1-tTA マウスの様々な疼痛刺激に対する反応を検討した。Mlc1-tTA マウスは熱刺激(ホットプレート試験、テイルフリック試験、テイルデップ試験)に対しては野生型と比較して差が認められなかったが、機械刺激(Von Frey テスト、paw pressure test 試験)に対する感受性の低下が認められた。化学刺激(ホルマリン)に対しては特に第 相の炎症反応の著しい低下が認められた。また、神経障害性疼痛モデルである坐骨神経部分結紮モデルを作製して痛覚過敏に対する反応を検討した結果、Mlc1-tTA マウスでは痛覚過敏が減弱していた。痛覚過敏の形成には炎症が重要であることから、Mlc1-tTA マウスでは炎症反応が弱いことが示唆される。以上の結果より、Mlc1-tTA マウスでは機械刺激に対する感受性の低下と炎症反応の抑制が起こっていることが示唆される。

2) Mlc1-tTA マウスのトランスジーンの色体への挿入位置の同定。

次に、これらの現象はどのような遺伝子の欠損に起因するのかを調べるため、トランスジーンの色体への挿入位置の同定を行った。当初、トランスジーンの色体への挿入部位を Thermal Asymmetric Interlaced PCR 法を用いて検討を行ったが同定が困難だったため、次世代シーケンサーを用いての解析も行った。その結果、色体 8qB1.1 および 11qD の領域にトランスジーンの色体への挿入が予想された。

3) トランスジーン挿入による発現変動遺伝子の解析。

トランスジーン挿入位置の遺伝子の発現を Real time RT-PCR 法を用いて詳細に解析した結果、色体 8qB1.1 の領域の 3 つの遺伝子の発現が欠損していることが判明した。また、Mlc1-tTA マウスでは炎症反応の減弱がみられたため、免疫応答、特にマクロファージ系や T 細胞に何らかの異常があると推察される。そこで、マウス骨髄における遺伝子発現をマイクロアレイを用いて解析した結果、上記 3 つの遺伝子の発現が欠損していること、さらに Mlc1-tTA マウスではある特定のシグナルに関与する遺伝子の発現が低下していることが認められた。以上の結果より、トランスジーンにより 8qB1.1 の領域の 3 つの遺伝子の発現が欠損することにより、機械刺激に対する感受性の低下と炎症反応の抑制が起こっている可能性が示唆される。

4) 疼痛発生・伝達への標的遺伝子の関与のメカニズムの解明。

まず、Mlc1-tTA マウスの組織構造をコントロールマウスと比較したところ、骨髄、心臓および骨格筋において構造の変化が認められた。Mlc1-tTA マウスでは炎症反応の低下および顕著な骨髄構造の異常が認められたことから、次に Mlc1-tTA マウスより骨髄マクロファージを採取・培養し、野生型と比較してどのような表現型の変化がみられるのかを検討した。LPS 刺激によるサイトカインの発現を検討した結果、IL1beta など一部のサイトカインの発現が野生型と比べて増加が認められた。また、蛍光ビーズを用いて貪食能を検討した結果、野生型と比べて顕著に貪食能の増加もしくは分解能の減少が認められた。また、同定された3つの遺伝子のそれぞれのノックアウトマウスの疼痛関連行動を検討した結果、そのうちの1つの遺伝子の欠損で痛覚閾値の上昇が認められた。

以上の結果より、Mlc1-tTA マウスでは骨髄由来の免疫細胞の機能異常が認められ、その結果、各種侵害刺激に対する反応の差異が発生していると考えられる。

5 . 主な発表論文等

特になし

〔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)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://anatomy-2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。