

平成30年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20036

研究課題名(和文) 脊髄損傷後に生じる神経障害性疼痛の痛みレセプター軸索輸送制御による新規治療の探索

研究課題名(英文) Identification of pain related receptors associated with axonal transport in neuropathic pain models.

研究代表者

平井 高志 (HIRAI, Takashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40510350

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷モデルのRNAシーケンス解析では、神経障害性疼痛に関与すると思われる30遺伝子を中心に発現パターンを調査した。モデル内の各個体間での発現増減はばらつきがあり、一定の傾向を示さなかった。末梢神経損傷・脊髄損傷両モデルにおいて、3' UTRにおける延長バリエーションと同様にTRPV1とTRPA1、また恒常性維持に関与するFam134bやNaa15の3'末端における延長が顕著に観察された。末梢神経損傷モデルと同様に脊髄損傷モデルでも損傷遠位におけるDRGで疼痛マトリクスに関与すると思われる遺伝子のプロファイルが変わり、慢性疼痛に寄与するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：RNA-seq analysis revealed that expression patterns were not consistent in 30 candidate genes of spinal cord injury model rats between individuals. In both peripheral nerve injury and spinal cord injury, extended variants were apparently observed in the 3' UTR sequence of several genes, including TRPV1, TRPA1, Fam134b and Naa15. These results suggest that structure of 'pain matrix' might change in dorsal root ganglia located caudally to the epicenter of the spinal cord which results in the onset and maintenance of chronic pain.

研究分野：疼痛

キーワード：神経障害性疼痛 脊髄障害 末梢神経 後根神経節 RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

脊髄は、脳と比べ白質が外側に位置し軽微な外傷によって伝導路の障害を引き起こす。交通事故や転落などによる外傷性脊髄損傷は、脊髄の挫滅をきたし上行・下行伝導路の障害を起こすようになる。最近では、高齢化社会となって頸髄症患者が増加し、軽微な外傷で四肢麻痺と強い四肢のしびれを呈するような患者も増加していることが問題となっている。現在まで脊髄損傷もしくは脊髄症への関心は、運動麻痺に対しての神経再生研究に主に焦点が当てられてきたが、臨床研究において実際の患者では運動機能よりも痛みや感覚障害のほうがQOLに影響する(Edaら *Int. J. Rehabil. Res.* 2010) というエビデンスもあり、これらの中枢性神経障害性疼痛に対して新たな治療法が望まれているのが現状である。

脊髄損傷後の慢性疼痛は、損傷中心である脊髄よりもむしろ遠位に存在する1次求心性感覚神経において、TRPV1(Wuら *Pain* 2013)や電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav1.8, Qingら *J. Neurosci.* 2014)といった痛みレセプターの軸索における発現増加により、自発性放電が促進されることにより発症、維持されていることが近年提唱されてきた。末梢神経損傷モデルにおいてもNav1.8のmRNAが軸索に集積することをがわかっており(Supanigar et al. *JBC* 2011)、損傷を契機に感覚神経の細胞体で痛みレセプターのmRNA転写の増加および軸索輸送の促進といった一連のメカニズムが慢性疼痛の引き金になっているものと推測される。現在までmRNAの構造中、タンパクをコードしない3'非翻訳領域(3'UTR)は多くの分子でRNA自体の安定性や細胞局在などを調節している重要な配列と考えられており、大脳海馬ではBDNFや β -actinなどのmRNAの3'UTRの長いバリエーションが細胞の局在を決定していることが知られている(Juan et al. *Cell* 2008)。

我々の先行研究でNav1.8mRNAは既知の450塩基長の3'UTRとは別に、intronic regionでのスプライシングを伴う1.6k塩基長のバリエーションを発見し、末梢神経損傷によりこのバリエーションが特異的に転写され積極的に末梢軸索へ輸送されレセプターが発現することで、神経障害性疼痛を惹起している可能性があることを突き止めた(Hirai et al *Sci. Reports* 2017)。末梢神経損傷のみならず中枢神経である脊髄損傷においても末梢神経における遺伝子プロファイルがどのように変化しているか詳細に評価した報告はない。

2. 研究の目的

先行研究で新たなバリエーションの存在が明らかになったNav1.8のみならず、電位依存型カルシウムチャンネルなども同様のmRNAのnon-coding領域レベルでのバリエーションによって軸索により輸送され易い現象が存在していると考えている。今回、末梢神経損傷モデルではなく、脊髄損傷モデルにおいて坐骨神経を主に支配するL4、L5後根神経節(DRG)とその軸索において痛みレセプターの挙動とそれぞれのmRNAの構造変化を観察し、下肢でのアロディニアや知覚過敏にどのように影響しているかを詳細に検証する。

さらに注目すべき点は、新規のバリエーションに結合が予測されるRNA結合タンパク(RBPs)との関連と考えている。痛みレセプターのmRNAの局在や転写調節には上述の3'UTRにRBPsが結合し調節されていることが知られている(Johnstonら *Nature Review Molecular Cell Biology* 2005)。Nav1.8の既知の短い3'UTRには軸索輸送にかかわるRBPsとの予測結合部位は非常に少なく、一方で1.6kbpの新しいバリエーションには非常に多くの結合部位が存在していることが我々の先行研究で判明している。本研究によって分子生物学的、組織学的に脊髄損傷後に末梢神経軸索に発現するmRNAとそれをリクルートするRBPsとの動態を明らかにし、慢性疼痛の

原因の一端を解明する。

3. 研究の方法

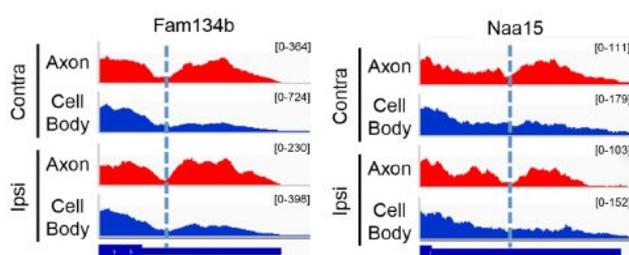
脊髄損傷ラット、末梢神経損傷ラットおよび sham ラットを受傷後 6 週で L4・L5 後根神経節 (DRG) および腰膨大部脊髄後角細胞を採取し、acutely dissociated cell を 8 μ m の無数の小孔のあいた Boyden chamber に播種し、5-FU 含有の培養液で 48 時間培養する。それぞれの細胞体から発芽する神経突起の多くは chamber の小孔を通して裏面に伸長することがわかっており (Willis & Twiss *Methods in Mol. Biol.* 2011)、表面からは DRG 細胞体を、裏面からはグリアや線維芽細胞の混入の無い条件で神経軸索の純粋な RNA を採取することができる。これらの検体の RNA を RNA-seq (Illumina Hi-seq) で全 transcript を解読し、脊髄損傷後に生じる痛みレセプター mRNA の挙動を観察し、治療ターゲットを明らかにする。

4. 研究成果

末梢神経損傷モデルと脊髄損傷モデルそれぞれの L3-L5DRG を採取し、十分量かつ質の高い RNA を抽出できた。脊髄損傷モデルのマイクロアレイ解析では、神経障害性疼痛に関与すると思われる 30 遺伝子を中心に発現パターンを調査したところ、モデル内の各個体間での発現増減は非常にばらつきがあり、一定の傾向を示さなかった。このため特定の遺伝子に着目するのではなく、末梢神経障害性疼痛でも生じた疼痛関連遺伝子の mRNA 構造変化についてさらなる調査を行った。特に注目した TRP ファミリーや電位依存性ナトリウムチャンネル、また電位依存性カルシウムチャンネルについて、損傷後 1 週、3 週、6 週にの脊髄損傷ラットでは定量 PCR を用いると Nav、TRP ファミリー、Cav の各アイソフォームは損傷を受けていないラットの DRG の発現と比べて有意差はなかった。また同様に、神経再生に関連する神経栄養因子である NGF や

NT3、BDGF などの発現増減は有意な変化は見られなかった。

また末梢神経損傷モデルと脊髄損傷モデルおよび神経損傷のないラットの DRG を分散培養後、mRNA を抽出し RNA-seq で解析を行ったところ、Integrative Genome Viewer において脊髄損傷モデルも末梢神経損傷モデルと同様に 3' UTR における延長バリエントが Nav1.8 のみならず TRPV1 と TRPA1 において確認された。また細胞核恒常性維持に關与する Fam134b や Naa15 の 3' 末端における延長が顕著に観察された (下図)。



さらに脊髄損傷モデルにおいて、ミトコンドリア恒常性に関する遺伝子や軸索輸送に關係する RNA 顆粒の遺伝子が 3' UTR の延長バリエントが多く存在していることも突き止めた。RNA 顆粒に関する遺伝子を調査すると、3' UTR の延長バリエントだけではなく既存のものよりも短いバリエントもあることが分かった。

一方で、疼痛に關連する mRNA を末梢神経遠位に輸送する RNA 結合タンパク (RBPs) の発現も RNA-seq で網羅的に調査した。FUS や ELAVL1 といった軸索輸送を担う RBPs の一部と結合しうるタンパクが有意に増加していることが分かった。これは脊髄損傷では損傷遠位の末梢神経で活発に軸索輸送が行われていることを示唆している。

以上から末梢神経損傷モデルと同様に脊髄損傷モデルでも損傷遠位における DRG で疼痛マトリクスに關与すると思われる遺伝子のプロファイルが変わり、慢性疼痛に寄与するものと考えられた。

基礎実験と並行して臨床でも慢性疼痛を

きたす頸椎術後の患者を対象としてアセト
アミノフェン・プレガバリン内服のランダム
化比較研究を行い、成果を発表した。

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2件)

Hirai T., Mulpuri Y., Cheng Y., Xia Z.,
Li W., Ruang Sri S., Spigelman I.,
Nishimura I. Aberrant plasticity of
peripheral sensory axons in a painful
neuropathy. Sci. Rep. 2017 Jun
13:7(1):3407

01:10.1038/s41598-017-03390-9.(査読有)

Hirai T., Yoshii T., Enomoto M., Yamada
T., Taniyama T., Inose H., Kato T., Okawa
A. Pregabalin versus acetaminophen for a
treatment of chronic neuropathic pain on
extremities after cervical surgery: A
prospective randomized, open-label
preliminary study. J. Pain & Relief
2016,5:6 DOI: 10.4172/2167-0846.1000273

(査読有)

[学会発表](計3件)

平井高志 榎本光裕 鍋木秀俊、横山裕之、
大川 淳 次世代シーケンサーを用いた疼痛
モデルにおける RNA の 3' UTR における新た
なバリエーション 治療として最も効率的な標
的分子の探索 第 32 回日本整形外科学会基
礎学術集会 2017/10/26

平井高志 榎本光弘 鍋木秀俊 横山裕
之 永田哲也 横田隆徳 大川淳 神経障
害性疼痛のメカニズム探索と分子標的によ
る新規治療戦略 第 25 回日本腰痛学会
2017/11/3

横山裕之 榎本光裕 鍋木秀俊 平井高
志 若林良明 大川淳 複数の神経障害性
疼痛マウスモデルの腰部後根神経節におけ
る電位依存性カルシウムチャネル 2 -1 サ

ブユニット発現と疼痛パターンの比較検討
第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会
2017/10/26

[図書](計1件)

平井高志 大川淳 頸椎症に関連する痛
み・しびれに対する薬物治療の効果 -神経
障害性疼痛治療薬 1st ラインの薬剤を中心に
- 別冊整形外科 2018 in press

6. 研究組織

(1)研究代表者

平井 高志 (HIRAI, Takashi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・助教
研究者番号：40510350

(3)連携研究者

大川 淳 (OKAWA, Atsushi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・教授
研究者番号：30251507

榎本 光裕 (ENOMOTO, Mitsuhiro)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研
究科・非常勤講師
研究者番号：90451971