

令和元年6月14日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14959

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛におけるRNA編集の役割解明

研究課題名(英文) Elucidation of role of RNA editing in neuropathic pain

研究代表者

内田 仁司 (Uchida, Hitoshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：30549621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに本研究代表者は、神経損傷に起因する神経障害性疼痛にRNA編集酵素ADAR2が関与することを明らかにしてきた。本研究では、神経損傷後にRNA編集効率が亢進する「COPA I/V部位」に焦点を当てた解析を行った。その結果、編集型・未編集型のCOPAがともに、ER-Golgi intermediate compartmentに主に局在することを明らかにした。また、RNA編集を特異的に阻害する手法を確立するための検討を進めた。一方、一次知覚神経におけるADAR2発現量とCOPA I/V部位の編集効率が、神経損傷だけではなく、末梢炎症によっても増加することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに本研究代表者は、神経障害性疼痛において、ゲノムの遺伝情報を書き換える「RNA編集」に異常が生じることを見出してきた。本研究課題は、RNA編集異常が痛みの増悪にどのように寄与するかを明らかにするとともに、RNA編集の人為的操作法の確立を目指す、学術的に意義深いものである。本研究では、炎症による痛みと神経障害性疼痛に共通して、RNA編集異常が生じることも明らかにすることができ、その原因となるメカニズムの理解を進めることができた。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that peripheral nerve injury triggers an increase in RNA editing enzyme ADAR2 expression and COPA I/V editing in the dorsal root ganglion, and that ADAR2-deficient mice show a reduction of neuropathic allodynia. The present study was aimed to elucidate the physiological and pathological roles of COPA I/V editing and their regulatory mechanisms. Here we showed that both unedited and edited COPA were primarily located at ER-Golgi intermediate compartment in the transfected HEK293T cells. Also we tried to establish a method to specifically inhibit RNA editing. On the other hand, the present study found that, besides peripheral nerve injury, peripheral inflammation caused an increase in ADAR2 expression and COPA I/V editing in the dorsal root ganglion.

研究分野：分子神経科学

キーワード：神経障害性疼痛 RNA編集 脊髄後根神経節 ADAR アロディニア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

痛みは生体に対する警告信号として機能しているが、慢性の痛みには生理学的意義はなく、適切な治療が必要である。これまでの国内外の研究から、神経損傷に起因する慢性疼痛（神経障害性疼痛）の分子基盤として、一次知覚神経における疼痛関連分子の量的・質的異常が見出されており、これらを制御する遺伝子転写調節機構と翻訳後修飾機構が重要視されてきた。これに関連して本研究代表者は、遺伝子発現を司るエピジェネティクス修飾が、神経障害性疼痛に関与することを解明してきた（Uchida et al., *Neuroscience*, 166, 1-4, 2010; *J Neurosci*, 30, 4806-4814, 2010; *Neuroscience*, 240, 147-154, 2013; *J Pharmacol Sci*, 128, 208-211, 2015）。一方、転写後修飾の役割は十分に解明されておらず、重要な研究課題が残されていた。

代表的な転写後修飾には、ADAR (adenosine deaminase acting on RNA) によって触媒され、二本鎖 RNA 中のアデノシンをイノシンに置換する「RNA 編集」がある。イノシンはシトシンと塩基対合し、翻訳時にはグアノシンとして認識されることから、RNA 編集はアミノ酸置換を引き起こす。興味深いことに、このアミノ酸置換は、主にイオンチャネルや神経伝達物質受容体などの神経機能分子に生じることが知られている。本研究開始当初において、本研究代表者は、神経損傷後の一次知覚神経において、1) RNA 編集酵素 ADAR2 の発現量と酵素活性が増加すること、2) 蛋白質翻訳領域において RNA 編集異常が生じることを見出すとともに、3) RNA 編集酵素 ADAR2 の全身性欠損マウスでは神経損傷後のアロディニアが減弱することを明らかにしていた。しかし、「RNA 編集の制御機構」と「アロディニアに関与する RNA 編集部位」などは不明であり、神経障害性疼痛における RNA 編集の役割解明には、更なる解析が必要であった。

### 2. 研究の目的

本研究課題の申請時における当初の研究目的は、神経損傷後の一次知覚神経に生じる、ADAR2 を介する RNA 編集亢進に焦点を当て、その制御機構と RNA 編集基質の機能解析を通じて、神経障害性疼痛における RNA 編集の病態学的役割を明らかにすることである。具体的な項目は、1) 一次知覚神経に発現する ADAR2 の病態学的役割の解明、2) 蛋白質翻訳領域における RNA 編集亢進部位の病態学的役割の解明、3) ADAR2 を介する RNA 編集の制御機構の解明、4) pri-miRNA の RNA 編集亢進により発現変調する遺伝子の同定、5) 編集型 miRNA と RNA 編集制御機構の病態学的役割の解明、である。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では、既に同定している「神経損傷後の一次知覚神経に生じる、蛋白質翻訳領域内の RNA 編集亢進部位」、特に COPA I/V 部位に注目した。Flag あるいは Halo タグ標識化された編集型・未編集型の COPA を発現するプラスミドを構築し、培養細胞レベルでの細胞内局在などを比較解析した。

(2) 特定部位の RNA 編集を阻害する手法を確立するために、COPA I/V 部位の相補的配列 (editing complementary sequence, ECS) の特定を試みるとともに、GluA2 Q/R 部位の ECS を標的とした CRISPR/Cas9 システムの有用性評価を試みた。

(3) C57BL/6N 雄性マウスの足蹠皮下に完全フロイントアジュバント (complete Freund's adjuvant, CFA) を投与し、脊髄後根神経節における ADAR1 および ADAR2 の発現量を定量的 PCR 法にて解析するとともに、ADAR2 の酵素活性を PCR 法にて評価した。さらに、RNA 編集基質の編集効率をダイレクトシーケンシング法にて評価した。

### 4. 研究成果

まず、本研究の基礎となる研究成果が、本研究期間内に *FASEB J* (Uchida et al., 31:1847-1855, 2017) に論文掲載された。

(1) これまでの本研究代表者の研究から、神経損傷後の一次知覚神経では、1) COPA I/V 部位、5-HT<sub>2C</sub>R D 部位、GluA2 R/G 部位の 3 箇所の編集効率が ADAR2 依存的に増加すること、2) 5-HT<sub>2C</sub>R と GluA2 の mRNA レベルが劇的に減少するのに対して、COPA の mRNA レベルに変化が生じないこと、が明らかになっていることから、本研究では COPA I/V 部位に焦点を当てることとした。COPA は、ゴルジ体から小胞体へのタンパク質の逆行性輸送に関わるコートタンパク質複合体 I の サブユニットをコードしており、WD40 モチーフを介して cargo 分子と相互作用することが知られている。WD40 repeat-like-containing domain に位置する CopA I/V (I164V) 部位はゼブラフィッシュからヒトまで、種を超えて保存されており (Maas et al., *Biochem Biophys Res Commun*, 412, 407-412, 2011; Solomon et al., *Proteins*, 82, 3117-3131, 2014) 肝細胞癌においてその RNA 編集効率が低下することが報告されている (Chan et al., *Gut*, 63, 832-843, 2014)。しかしながら、本研究当初、この RNA 編集によるアミノ酸置換の結果生じる機能変換、そしてその生理学的・病態学的意義は未解明のままであった。そこで本研究では、編集型と未編集型の COPA の機能的相違を明らかにするために、flag タグ標識化した編集型・未編集型 COPA を発現するプラスミドを構築し、HEK293T 細胞に強制発現させ、その細胞内局在について、各種細胞内オルガネラマーカーとの共染色を用いた比較解析を行った。その結果、編集型及び未編集型の COPA はいずれも、ERGIC-53 陽性の ER-Golgi intermediate compartment (小胞体とゴルジ体の中間に位置するオルガネラ) に主に局在することが分かった。一方、神経細胞における COPA は、神経軸索に局在し (Peter et al., *Hum Mol Genet*, 20, 1701-1711, 2011)

RNA を輸送する可能性が指摘されている (Todd et al., Hum Mol Genet, 22, 729-736, 2013)。そこで、現在、培養神経細胞における編集型・未編集型 COPA の細胞内局在の相違について検討を進めている。同時に、Halo タグ標識化された編集型・未編集型の COPA を発現するプラスミドも構築し、特に神経細胞における相互作用分子の相違について、検討を進めており、現在も継続している。一方、最近になって、乳癌細胞では編集型 COPA が増加すること、そして、編集型 COPA は癌細胞の生存や浸潤を亢進させることが報告された (Peng et al., Cancer Cell, 33, 817-828, 2018) が、詳細な機構は不明のままである。本研究代表者が継続している研究は、神経障害性疼痛だけではなく、癌の病態機序の解明に貢献することが期待できる。

(2) ECS に対するアンチセンスオリゴを処理することにより、特定の RNA 編集を阻害できることが報告されている (Mizrahi et al., ACS Chem Biol, 2013)。しかしながら、COPA I/V 部位の RNA 編集に関与する ECS は同定されていない。そこで、COPA I/V 部位を含む領域の RNA 二次構造を mFold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/rna-folding-form>) を用いて予測し、その二重構造に必要なゲノム領域を発現するプラスミドを構築した。同時に、RNA 編集酵素 ADAR1、ADAR2、そしてそれらの不活性変異体を発現するプラスミドも構築した。HEK293T 細胞にこれらを同時発現させることにより、COPA I/V 部位の RNA 編集に必要な ECS の同定を試みているが、未だ成功していない。現在もその解析を継続している。一方、CRISPR/Cas9 システムを用いて、ECS に変異を導入することで、特定の RNA 編集を阻害することも考えられる。そこで、ECS が既に同定されている GluA2 Q/R 部位を対象として、その ECS を標的とするガイド RNA を複数設計し、CRISPR/Cas9 システムによる配列切断について、HEK293T 細胞を用いて評価した。しかしながら、配列切断を確認することができず、現在、ECS が既に同定されている他の RNA 編集部位について、同様の解析を進めている。特定の RNA 編集を *in vivo* にて操作する手法は、これまでに報告されていないことから、本研究代表者が継続している研究は、RNA 編集の生理学的・病態学的役割を理解する上で非常に重要であると考えられる。

(3) 一次知覚神経における ADAR2 による RNA 編集の制御機構を解明するために、局所炎症の影響を検討した。マウスの足蹠皮下に起炎物質 CFA を投与し、一次知覚神経における ADAR2 の mRNA レベルの経時的変化を解析した。その結果、CFA 投与 6 時間後において、ADAR2 発現量の有意な増加が認められたが、この変化は CFA 投与 1 日後には消失していた。一方、ADAR1 の mRNA レベルに有意な変化は観察されなかった。次に、ADAR2 の酵素活性の指標として、ADAR2 の自己編集に起因するスプライシング変化を評価した。その結果、CFA 投与後における ADAR2 の酵素活性の変化は認められなかった。これらの結果から、炎症性シグナルが一次知覚神経における ADAR2 の発現増加を惹起することが示唆され、神経損傷後の局所炎症が ADAR2 発現増加に寄与する可能性が考えられる。しかしながら、神経損傷後と異なって、炎症後では ADAR2 の酵素活性上昇が生じないことから、一次知覚神経における ADAR2 の発現量と酵素活性には別々の制御機構が存在することが示唆された。

次に、CFA 投与 6 時間後の一次知覚神経における COPA I/V 部位、5-HT<sub>2c</sub>R D 部位、GluA2 R/G 部位の編集効率をダイレクトシーケンシング法にて解析した。その結果、COPA I/V 部位の編集効率が増加するのに対して、5-HT<sub>2c</sub>R D 部位の編集効率が低下することが見出された。一方、GluA2 R/G 部位の編集効率に変化は認められなかった。以上の結果から、COPA I/V 部位の編集効率の増加は、神経損傷後と炎症後に共通して生じるイベントであることが判明した。今後、神経損傷後の ADAR2 発現増加と COPA I/V 部位の編集効率増加に対して、抗炎症薬の効果を検討することにより、その因果関係を明らかにすることを計画している。また、上記(1)及び(2)の解析が進むことにより、神経障害性疼痛ならびに炎症性疼痛の理解が進むことが期待できる。また、これまでの本研究代表者の研究から、神経損傷後の一次知覚神経では、GluA3 R/G 部位、GluA2 Q/R 部位、CYFIP2 K/E 部位、GluA2 Q/Q 部位、Gabra-3 I/M 部位、Kv1.1 I/V 部位の編集効率が低下することが明らかになっている。よって、現在、炎症後におけるこれらの部位の編集効率の変化についても、解析を継続している。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1) [Uchida H](#), Abe M, Tainaka K, Sakimura K

Imaging of microglia/macrophage under peripheral inflammatory pain model.

Pain Research, 34, 31-38, 2019 (査読有り) DOI: <https://doi.org/10.11154/pain.34.31>

2) [Uchida H](#), Matsumura S, Katano T, Watanabe M, Schlossmann J, Ito S

Two isoforms of cyclic GMP-dependent kinase-I exhibit distinct expression patterns in the adult mouse dorsal root ganglion.

Mol Pain, 2018, 14:1-11 (査読有り) DOI: [10.1177/1744806918796409](https://doi.org/10.1177/1744806918796409)

3) [Uchida H](#), Matsumura S, Okada S, Suzuki T, Minami T, Ito S

RNA editing enzyme ADAR2 is a mediator of neuropathic pain after peripheral nerve injury.

FASEB J, 2017, 31:1847-1855 (査読有り) DOI: [10.1096/fj.201600950R](https://doi.org/10.1096/fj.201600950R)

〔学会発表〕(計7件)

1) 内田仁司, 阿部学, 田井中一貴, 三國貴康, 崎村建司  
Iba1 陽性マクロファージの組織透明化 / 三次元イメージング  
第 92 回日本薬理学会年会, 2019 年

2) 内田仁司  
慢性の痛みにおける神経エピソードの役割  
第 28 回行動薬理若手研究会, 2019 年

3) 内田仁司, 阿部学, 田井中一貴, 三國貴康, 崎村建司  
ミクログリア可視化マウスの三次元蛍光イメージング  
第 134 回日本薬理学会近畿部会, 2018 年

4) 内田仁司, 阿部学, 田井中一貴, 崎村建司  
末梢炎症後におけるミクログリア / マクロファージの可視化  
第 40 回日本疼痛学会, 2018 年

5) 内田仁司, 松村伸治, 崎村建司, 伊藤誠二  
発生および慢性疼痛下の一次知覚神経における RNA 編集の変動  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017 年

6) 内田仁司, 松村伸治, 崎村建司, 伊藤誠二  
神経障害性および炎症性疼痛モデルにおける RNA 編集異常  
第 68 回日本薬理学会北部会, 2017 年

7) 内田仁司, 崎村建司, 伊藤誠二  
RNA 編集酵素 ADAR2 は神経障害性疼痛に関与する  
第 40 回日本神経科学大会, 2017 年

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
該当なし

取得状況(計0件)  
該当なし

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

本研究は、本研究代表者が一人で行った研究である。

(1) 研究分担者  
該当なし

(2) 研究協力者  
該当なし

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。