

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09543

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛における後根神経節での非神経細胞の役割と治療開発

研究課題名(英文) Therapeutic development and role of non-neuronal cells in dorsal root ganglion for neuropathic pain

研究代表者

榎本 光裕 (Enomoto, Mitsuhiro)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・非常勤講師

研究者番号：90451971

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)：腰部DRGの形態を遺伝子改変マウスで確認することができた。野生型マウスを使用した神経障害性疼痛モデルでは、損傷1週目から機械刺激過敏を呈し、3週以降は過敏となっていた。損傷1週後から腰部DRGニューロンは減少し、3週と6週で減少した状態となっていた。サテライトグリア、ミクログリアは、損傷1週後に有意に増加していた。本研究によって神経障害性疼痛の慢性化に神経細胞の減少と非神経細胞の増加の関与が示唆された。また、新規核酸医薬HDO静脈投与によって腰部DRGでの内因性非翻訳領域RNAの発現を90%抑制することができた。今後、慢性疼痛遺伝子プロファイル解析を進め、新規疼痛治療を開発していく予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎変性疾患や絞扼性末梢神経障害を有していると「神経痛」を訴えることが多く、治療に難渋する。本研究目的は、神経伝達経路の後根神経節(DRG)で慢性疼痛に関与する細胞、分子を探索し、新規治療の開発を行うことである。本研究期間では、DRG内の神経細胞と非神経細胞であるグリアが密接に関与し、疼痛の慢性化に寄与することが明らかになった。さらに新規核酸医薬HDOの静脈注射によってDRGの遺伝子制御が可能となった。今後、DRGを標的としたHDOによる遺伝子制御によって「神経痛」の克服を目指す。

研究成果の概要(英文)：Spared nerve injury (SNI) model exhibits strong mechanical hypersensitivity in the sural nerve dominant area. Wild-type mice were used and neuron, satellite cell (SGC), and microglia in lumbar DRGs were histologically analyzed 1, 3 and 6 weeks after SNI. The number of neuron decreased 1 week and maintained up to 6 weeks after SNI. In contrast, the number of SGC showed an increase 1 week and stepwise decline 6 weeks after SNI. The number of microglia also showed an increase and then decreased 3 weeks after SNI. The activation of SGC maintained for 6 weeks. These results indicate that SGC would induce prolonged painful states after nerve injury. Further analyses are needed for gene profiles such as ion channels between neuron and non-neuronal cell. Finally, systemic administration of heteroduplex oligonucleotide (HDO) significantly inhibited gene expression in DRGs. A therapy with HDO may be a clinically effective approach to modify gene expressions of DRGs for chronic neuropathic pain.

研究分野：整形外科学

キーワード：神経障害性疼痛 末梢神経障害 後根神経節

1. 研究開始当初の背景

整形外科診療では、四肢の痛みに対する訴えを多く経験する。脊椎変性疾患、絞扼性末梢神経障害などによる長期の神経圧迫は「神経障害性疼痛」を引き起こし、日常生活の質を損なう。日本、フランス、ドイツでの有病率は全調査対象者の6~7%程度(小川 Practice of Pain Management 2012)であるが、年齢とともに割合が増加しており超高齢化社会の日本では早期の対応が必要となる。疼痛の慢性化を避けるためにも直接障害や圧迫を受ける一次求心性ニューロンへの対応、治療が必要となる。疼痛に反応する後根神経節(DRG)は、末梢と脊髄に軸索を伸ばす神経細胞と衛星細胞(サテライトグリア:SGC)で構成されている。また、DRG周囲には毛細血管が豊富で間質細胞が存在している。従来、神経細胞のみに注目してきた研究が多く、非神経細胞に関連した報告は少ない。

現在、末梢性神経障害性疼痛に対してプレガバリンが治療の主流であるが、プレガバリンは脊椎手術後の四肢の痛みに関しては約50%有効と報告(富田ら 中部整災誌 2014)されている。半数近くは痛みままであり、脳、脊髄後角に作用する薬剤は発売、使用されているものの3~5割程度の患者が治療に難渋し、日常生活に支障をきたしている。上記背景にあるように副作用が少なく疼痛に反応するDRGを標的にできるような新規治療法の開発が必要と考える。

所属研究室では、頻りにマウスDRGを採取し、脊髄を脊椎ごと脊椎ごと横切し切片作製できる技術を持っている。そのような状況のなかで過去に報告された痛み受容体について神経障害性疼痛マウスでのRNAあるいはタンパク発現をみると再現性がないことが多々見られた(科研費16K10813、基盤研究C:末梢神経損傷に反応する疼痛慢性化分子の探索と治療開発)。DRG神経細胞の細胞体は大きい、細胞周囲を覆っているSGC、多数の毛細血管の存在に気が付いた。発現パターンが一定しない理由として非神経細胞の役割が大きいのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経障害性疼痛時のDRGにおける非神経細胞の役割を明らかにし、新規治療法を開発することである。現在、遺伝子改変マウスの発達で様々な細胞を特異的にラベルできるようになった。Thy1-YFP Tg マウスは、運動・知覚神経の可視化が可能で、DRGを含め神経組織がYFP陽性となり神経細胞体、神経線維の観察が容易である。Sox10-Venus マウスは神経堤細胞を可視化し、DRGのSGCをVenusで可視化できる。また、血管内皮細胞についてもTie2-GFP マウスが作製されており可視化可能となっている。可視化された細胞をFACS技術で回収することでそれぞれの遺伝子機能のプロファイルを解析、比較することが可能である。DRGでのSGC単離についての方法が最近報告(Jager et al. Journal Neurosci Methods 2018)されており、技術的に新しく学術的に独自性のあるものである。さらに本学神経内科で開発された新規核酸医薬(Nishina et al. Nature Comm 2015)であるヘテロ核酸(HDO)を作製して、疼痛慢性性に静脈注射あるいはクモ膜下注射によって非神経細胞での遺伝子制御を行い、一次求心性ニューロンに対する新規治療法の開発を行うことである。

3. 研究の方法

(1) Thy1-YFP Tg マウス、Sox10-Venus マウス DRG の組織学的解析: 遺伝子改変マウスを入手し、同マウスを灌流固定し、腰部後根神経節(DRG)切片を作製した。Tie2-GFP マウスに関してコロナ禍もあって入手不可能であった。

(2) Spared nerve injury (SNI)モデル: 麻酔下に坐骨神経を露出して腓骨神経、脛骨神経を切断して腓腹神経を残す。経時的に足底の知覚を評価するために von Frey テスト(機械刺激)を実施した。

(3) 疼痛モデルマウスの腰部 DRG ニューロンおよびグリア細胞の形態変化: SNI モデル作製後1週、3週、6週で灌流固定し、3群を作製した。損傷対側を含めて第3(L3)、第4腰部(L4)DRGを単離し、凍結切片を作製した。ニューロンに対して抗NeuN抗体、サテライトグリア(SGC)に対して抗Glutamine synthetase (Gl Syn)抗体を用いて二重免疫染色し、5切片ですべての陽性細胞数を計測した。損傷対側の陽性数を100%として患側の割合を計算した。さらにSNI後1週、3週で腰部DRGのミクログリア数を解析し、その役割について検討した。ミクログリアに対してIba1抗体を使用して蛍光免疫染色を行い、陽性領域をImageJで定量し、患側、健側比較を行った。また、ミクログリアに発現する疼痛関連分子であるP2X7受容体の局在も確認した。

(4) 疼痛モデルマウスの腰部 DRG から SGC の単離と mRNA 解析: Sox10-Venus mouse を使用して SNI モデルを作製した。SNI 後、1 週、3 週で両側 L3、L4、L5DRG を単離して患側と健側にわけた。FACS Aria を用いて蛍光標識された細胞をソーティングした。ソーティングした細胞は、ただちに RNA を抽出し、既知の遺伝子プロファイルを用いて RT-PCR による解析を行うが、本研究期間では実施できなかった。

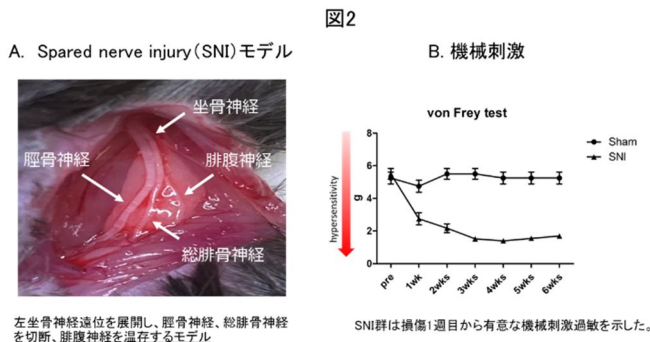
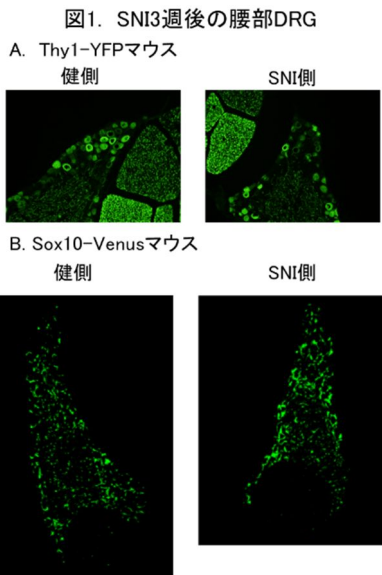
(5) HDO を用いた DRG に対する遺伝子制御: 内因性非翻訳領域 RNA、malat-1 の発現変化を腰部 DRG で確認した。通常のアンチセンスオリゴ(ASO)、HDO を 50 mg/kg of body weight に調整して尾静脈に注射した。対照群として PBS を注射した。注射後、72 時間で L3、4、5DRG から RNA を

抽出し、RT-PCR を実施した。

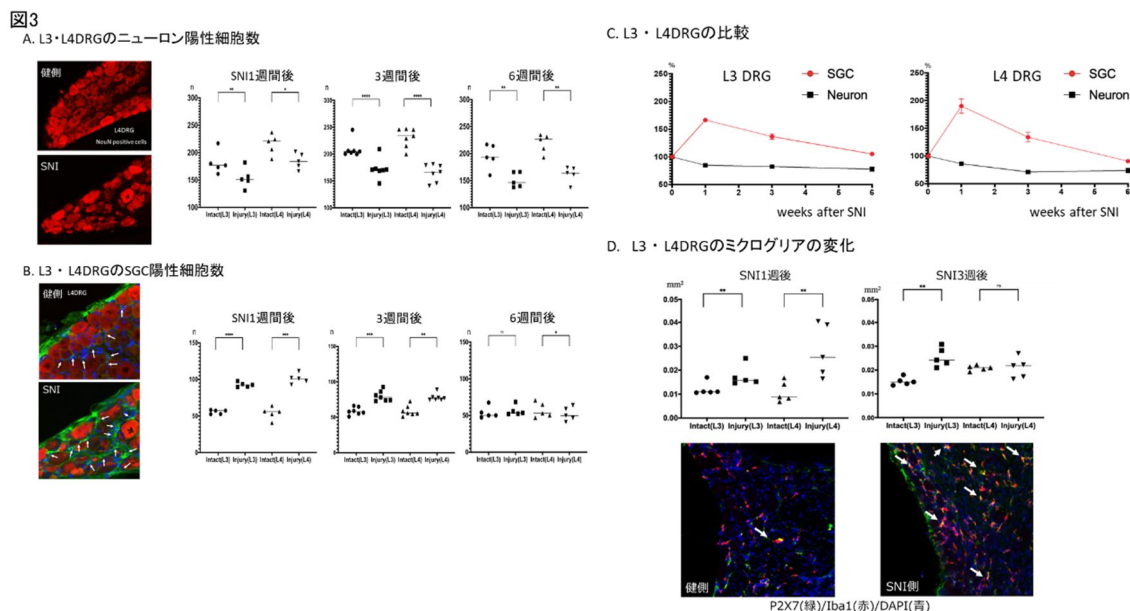
4. 研究成果

(1) Thy1-YFP Tg マウス、Sox10-Venus マウス DRG : Thy1-YFP Tg マウスの腰部 DRG 切片を観察すると YFP 陽性 DRG ニューロンを蛍光顕微鏡で容易に観察することができた (図 1A)。Sox10-Venus マウスでは、DRG ニューロン周囲、間質に Venus 陽性の細胞を多数観察することができた (図 1B)。

(2) Spared nerve injury (SNI)モデル：坐骨神経を同定 (図 2A) してから腓骨神経、脛骨神経を切断して感覚神経である腓腹神経を残す神経障害性疼痛モデルである。行動学的には、損傷 1 週目から有意な機械刺激過敏を呈し、3 週以降は過敏状態が継続する (図 2B)。研究者間での技術的な差がなく、安定した疼痛モデルを作製することができた。



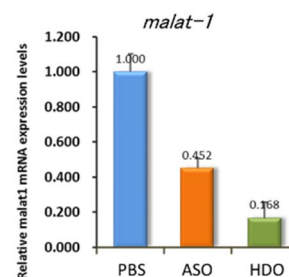
(3) SNI 後の腰部 DRG でのニューロン、グリア変化：NeuN 陽性細胞数は、損傷 1 週間で減少し、6 週後も減少したままであった。L3DRG での減少割合は少なく、L4DRG で多かった (図 3A)。Gl Syn 陽性細胞数は、損傷 1 週で陽性細胞が増加し、3 週で低下、6 週では健側と同等レベルとなっていた (図 3B)。L3DRG よりも L4DRG での割合変化が強かった (図 3C)。本研究による損傷 1 週目での SGC 増加が慢性疼痛初期過程に関与している可能性が示唆された。一方、ニューロンは経時的に減少しており、ニューロン自身の変化が疼痛慢性化に関与している可能性がある。さらに L3、L4DRG の違いは、坐骨神経知覚線維の投射路数の違いを示していると思われる。ミクログリアは、SNI1 週後、患側の L3、L4DRG で有意に増加していた (図 3D)。SNI3 週後には患側 L3DRG で増加を維持していたが、L4DRG では患、健側差がなかった。P2X7 受容体陽性は、患側のミクログリアに多く発現がみられた。神経障害後、急性期にミクログリアの活性が上昇し、慢性期で L4DRG のミクログリア発現が減少していることがわかった。一方、L3DRG 患側は発現増加を維持しており、より長期の観察が必要であった。さらに疼痛関連分子である P2X7 受容体の発現増加もみられていることから神経障害性疼痛初期においてミクログリアが重要な役割を有していることが明らかとなった。



(4) Sox10-Venus mouse を使用した SNI 後の腰部 DRG から SGC の単離と mRNA 解析：細胞分離に Collagenase P Solution(1.25mg/ml)を用いることで DRG 細胞を single cell として単離できた。FACS Aria を用いて蛍光標識された細胞をソーティングしたが、1 検体のみでは回収細胞数が低く、1 解析にマウス 3 検体を使用した。単離した全細胞数に対して Venous 陽性細胞数の割合は約 12~55%であった。ソーティング後、蛍光顕微鏡で細胞を観察するとすべて Venous 陽性であった。Venous 陽性の細胞回収率に差があることから繰り返し実験を行い安定した結果を得るようにしている。3 検体の DRG から 1.7~5.3ng/ μ l の RNA を回収することができたが、FACS の条件設定がさらに必要であった。今後、回収された RNA から慢性疼痛遺伝子プロファイルを作成する予定である。

(5) DRG に対する遺伝子制御：対照群である PBS 群と比較して malat-1RNA の発現は約 90%減少していた(図4)。血液検査では、肝腎障害を認めなかった。DRG に対する遺伝子制御に関して本研究期間に慢性疼痛動物モデルへの使用はできなかったが、本研究結果を基盤にしてグリア発現に関与する分子を特定し、HDO を利用した新規疼痛治療を開発していく予定である。

図4 DRGに対する遺伝子制御



<引用文献>

日本の痛みの今 神経障害性疼痛の疫学と現状

小川 節郎 Practice of Pain Management(2185-4521)3巻2号 Page98-103(2012.06)

脊椎術後遺残症状に対するプレガバリンの有効性(原著論文)

富田 浩之、吉原 永武 中部日本整形外科災害外科学会雑誌(0008-9443)57巻3号 Page545-546(2014.05)

Jager SB, Pallesen LT, Vaegter CB. Isolation of satellite glial cells for high-quality RNA purification. J Neurosci Methods. 2018 Mar 1;297:1-8. doi: 10.1016/j.jneumeth.2018.01.001. Epub 2018 Jan 2. PMID: 29305237.

Nishina K, Piao W, Yoshida-Tanaka K, Sujino Y, Nishina T, Yamamoto T, Nitta K, Yoshioka K, Kuwahara H, Yasuhara H, Baba T, Ono F, Miyata K, Miyake K, Seth PP, Low A, Yoshida M, Bennett CF, Kataoka K, Mizusawa H, Obika S, Yokota T. DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing. Nat Commun. 2015 Aug 10;6:7969. doi: 10.1038/ncomms8969. PMID: 26258894; PMCID: PMC4918363.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yamamoto N, Oyaizu T, Yagishita K, Enomoto M, Horie M, Okawa A. | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 Multiple and early hyperbaric oxygen treatments enhance muscle healing after muscle contusion injury: a pilot study | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Undersea Hyperb Med. | 6. 最初と最後の頁 227-238 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江 正樹, 大川 淳, 柳下 和慶 | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 骨格筋圧挫損傷後急性期において高気圧酸素治療によりもたらされる血管新生・筋再生促進メカニズム | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 日本高気圧環境・潜水医学会雑誌 | 6. 最初と最後の頁 14-23 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yokoyama Hiroyuki, Hirai Takashi, Nagata Tetsuya, Enomoto Mitsuhiro, Kaburagi Hidetoshi, Leiyo Li, Motoyoshi Takayuki, Yoshii Toshitaka, Okawa Atsushi, Yokota Takanori | 4. 巻 Volume 13 |
| 2. 論文標題 DNA Microarray Analysis of Differential Gene Expression in the Dorsal Root Ganglia of Four Different Neuropathic Pain Mouse Models | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pain Research | 6. 最初と最後の頁 3031~3043 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/JPR.S272952 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamamoto Naoki, Oyaizu Takuya, Enomoto Mitsuhiro, Horie Masaki, Yuasa Masato, Okawa Atsushi, Yagishita Kazuyoshi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 VEGF and bFGF induction by nitric oxide is associated with hyperbaric oxygen-induced angiogenesis and muscle regeneration | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-59615-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kaburagi Hidetoshi, Nagata Tetsuya, Enomoto Mitsuhiro, Hirai Takashi, Ohyagi Masaki, Ihara Kensuke, Yoshida-Tanaka Kie, Ebihara Satoe, Asada Ken, Yokoyama Hiroyuki, Okawa Atsushi, Yokota Takanori | 4. 巻 28 |
| 2. 論文標題 Systemic DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide administration for regulating the gene expression of dorsal root ganglion and sciatic nerve | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids | 6. 最初と最後の頁 910 ~ 919 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2022.05.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Li Leyang, Enomoto Mitsuhiro, Yokoyama Hiroyuki, Kaburagi Hidetoshi, Hirai Takashi, Tsuji Kunikazu, Wakabayashi Yoshiaki, Okawa Atsushi | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Remnant neuromuscular junctions in denervated muscles contribute to functional recovery in delayed peripheral nerve repair | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Neural Regeneration Research | 6. 最初と最後の頁 731 ~ 731 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.266925 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Sakaki Kyohei, Hoshino Yuko, Kawabata Shigenori, Adachi Yoshiaki, Watanabe Taishi, Sekihara Kensuke, Ishii Senichi, Tomori Masaki, Tomizawa Shoji, Enomoto Mitsuhiro, Okawa Atsushi | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 Evaluation of neural activity by magnetospinography with 3D sensors | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Neurophysiology | 6. 最初と最後の頁 1252 ~ 1266 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clinph.2020.02.025 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Su Chen, 横山 裕之, 元吉 貴之, 平井 高志, 榎本 光裕, 大川 淳 |
| 2. 発表標題 マウス神経障害性疼痛モデルにおける腰部後根神経節のニューロン・グリア変化 |
| 3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 横山 裕之, 平井 高志, 榎本 光裕, 鍋木 秀俊, 吉井 俊貴, 永田 哲也, 横田 隆徳, 大川 淳 |
| 2. 発表標題 DNAマイクロアレイを用いたマウス腰部後根神経節における神経障害性疼痛関連遺伝子の調査 |
| 3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山本 尚輝, 小柳津 卓哉, 榎本 光裕, 堀江 正樹, 大原 敏之, 塩田 幹夫, 柳下 和慶, 大川 淳 |
| 2. 発表標題 骨格筋圧挫損傷急性期において高気圧高酸素環境は低酸素誘導因子の増加を介して筋新生に至る過程を促進する |
| 3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 横山 裕之, 平井 高志, 榎本 光裕, 永田 哲也, 横田 隆徳, 大川 淳 |
| 2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスの腰部後根神経節におけるarginine vasopressin receptor 1aの関与 |
| 3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 李 楽陽, 榎本 光裕, 鍋木 秀俊, 横山 裕之, 平井 高志, 若林 良明, 大川 淳 |
| 2. 発表標題 末梢神経損傷再建後の標的神経筋内でのSchwann細胞と神経筋接合部構成分子の発現変化 |
| 3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Leyang Li, Mitsuhiro Enomoto, Hiroyuki Yokoyama, Hidetoshi Kaburagi, Takashi Hirai, Yoshiaki Wakabayashi, Shinichi Sotome, Atsushi Okawa |
| 2. 発表標題 Remodeling of neuromuscular junctions in target muscle following nerve regeneration in mice after delayed peripheral nerve repair |
| 3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 羽片 創, 蘇 晨, 平井 高志, 榎本 光裕, 大川 淳 |
| 2. 発表標題 末梢神経障害性疼痛モデルにおける後根神経節のグリア・マクロファージの変化 |
| 3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 蘇 晨, 羽片 創, 平井 高志, 榎本 光裕, 大川 淳 |
| 2. 発表標題 神経障害性疼痛時における後根神経節ニューロンとサテライトグリアの役割 |
| 3. 学会等名 第37回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京医科歯科大学整形外科
<https://tmdu-orth.jp/>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 辻 邦和 (TSUJI KUNIKAZU) (20323694) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・ジョイントリサーチ講座教授 (12602) | |
| 研究分担者 | 大川 淳 (OKAWA ATSUSHI) (30251507) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602) | |
| 研究分担者 | 平井 高志 (HIRAI TAKASHI) (40510350) | 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602) | |

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 蘇 晨 (SU CHEN) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |