

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16480

研究課題名(和文) 侵害受容C線維の刺激特異性を決める遺伝子の探索とlabeled line説の検証

研究課題名(英文) Identification of novel pain related factor based on transcriptome analysis

研究代表者

石西 綾美 (Isonishi, Ayami)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10836018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：疼痛の発生メカニズム、および神経系における伝達機構は多様でありその全貌は明らかではない。本研究では極端な疼痛鈍麻の表現型を示すTGマウスの順遺伝学的解析により、原因遺伝子となるSNX25を探り当て、さらに機能解明を目指した。SNX25 KOマウスの2ヶ月齢では、熱刺激に対する痛み行動に変化はないが、機械刺激および化学刺激に対して鈍麻の表現型を示した。しかし、6-8カ月齢では熱刺激に対する痛み行動も減弱することが明らかとなった。熱刺激、機械刺激および化学刺激に対する疼痛発生機序にも時期特異的な違いがあり、その制御因子としてSNX25およびその下流因子が関与していることを示唆する知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛覚神経機能に関わる遺伝子を効率的に探索することは容易ではなく、その大規模な探索もこれまであまり行われてきていない。本研究は疼痛鈍麻TGマウスを用いて次世代シーケンスおよびcDNAマイクロアレイにより網羅的解析を行い、疼痛原因遺伝子の候補を見出した。現在の一般的な遺伝子の機能解析手法としては、ノックアウトなど遺伝子を操作してその表現型を調べる逆遺伝学が主要な方法であるが、本研究で用いた手法は、既に見えているTGマウスの表現型からその原因となる遺伝子を探りあてる順遺伝学であり、これまで機能が十分に知られていなかったSNX25の疼痛発生への関与を明らかにした点で学術的意義を有する。

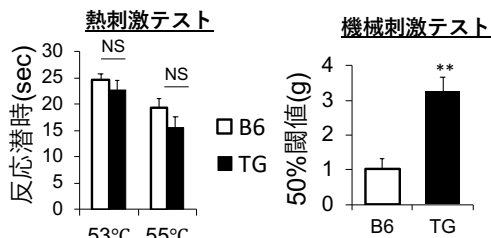
研究成果の概要(英文)：The mechanisms of pain generation and its transmission in the nervous system are diverse, and the full picture is not yet clear. In this study, we sought to identify the SNX25 gene responsible for pain by sequential genetic analysis of TG mice, which exhibit an extreme pain blunting phenotype, and to further elucidate its function. SNX25 KO mice exhibited a insensitive phenotype in response to mechanical and chemical stimuli at 2 months of age. Although thermal nociception in the Snx25 +/- mice was not affected at 2 months of age, older mice of 6-8 months displayed a higher latency to respond to a heat stimulus. Our findings suggest that there are time-specific differences in the mechanisms of pain generation to mechanical, chemical, and thermal stimuli, and that SNX25 and its downstream factors are involved as their regulators.

研究分野：神経化学

キーワード：疼痛 順遺伝学スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

痛みは身体の異常を感知して警告信号を発信する重要な役割を果たす。疼痛刺激は A $\delta$  線維（有髄線維）と C 線維（無髄線維）によって伝えられる。A $\delta$  線維は、高閾値機械受容として機械刺激に反応し鋭い痛みに関与するのに対し、C 線維は熱・機械・化学刺激の多様（ポリモーダル）な刺激に反応するとされている。機械刺激や化学刺激に対する痛み反応が著しく低下している BAC トランスジェニックマウス（以下、TG マウス）を見出した。興味深いことに、機械刺激および化学刺激に対する反応は著しく低下しているものの、熱刺激に対する反応は正常であったことから、多様な刺激に反応すると考えられていた C 線維は、実は行動を伴った明確なグループに区別できることを示唆するデータを得た（図 1）。本研究開始当初は上記事象に関与する分子実体を明らかにしたいと考えた。



## 2. 研究の目的

極端な疼痛鈍麻の表現型を呈す TG マウスの順遺伝学的解析により、機械刺激および化学刺激誘発性疼痛を引き起こす原因遺伝子を探り当て、さらに同定遺伝子が C 線維の熱刺激による疼痛行動と機械・化学刺激による疼痛行動の相違を説明することが出来るかを検証することが本研究開始当初の目的であった。

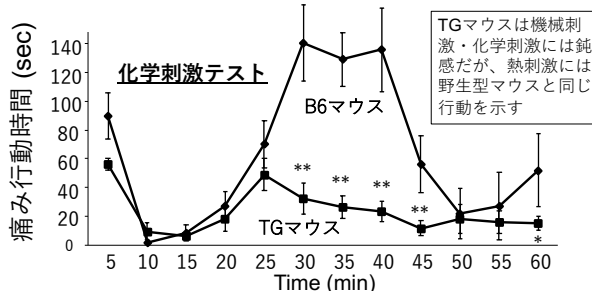


図 1 TGマウスと野生型(B6)マウスの痛み行動

## 3. 研究の方法

### A トランスジェニックの染色体挿入により影響を受ける標的遺伝子の同定

TG マウスは BAC トランスジェニックマウスであるため、トランスジェニックの染色体への挿入によって、その領域の内在性遺伝子の発現を阻害または変動させ、その結果生じる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た。本研究開始までにトランスジェニックが 8 番染色体に挿入されていることを明らかにしており、本研究課題では遺伝子網羅解析により疼痛鈍麻を引き起こす原因遺伝子の絞り込みを cDNA マイクロアレイ、PCR ミニアレイ、qPCR で行なった。

### B 標的遺伝子のノックアウト (KO) マウスの入手および疼痛行動評価試験

TG マウスにおいて発現に異常が認められる遺伝子（後述するように本研究課題では SNX25 に着目した）を同定後、SNX25 KO マウスを入手して TG マウスと同様の疼痛関連行動が認められるか否かを観察した。行動試験は熱刺激としてホットプレートテストを、機械刺激は von Frey フィラメントを足底部へ押し当て疼痛行動を評価する von Frey テスト、化学刺激は 5%ホルマリン溶液を足底部へインジェクションして疼痛行動を評価するホルマリンテストを行なった。また、神経障害性疼痛として坐骨神経の部分結紮による Spared Nerve Injury (SNI)モデルで疼痛行動を評価した。

### C 標的遺伝子のコンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作製および疼痛行動評価試験

侵害刺激を受容する感覚受容細胞は、神経性の感覚受容器の一次求心性神経である。一次求心性神経は、脊髄後根神経節 (DRG) に細胞体を持ち、脊髄と末梢へ軸索を出す偽単極細胞である。本研究課題では、DRG 特異的 (Advillin-CreERT2 マウスを用いた) にコンディショナル KO (SNX25 cKO)マウスを作製して疼痛行動試験を行い、TG マウスおよび SNX25 KO マウスと同様な疼痛関連行動が認められるか否かを観察した。

## 4. 研究成果

### A トランスジェニックの染色体挿入により影響を受ける標的遺伝子の同定

TG マウスでは BAC トランスジェニックが 8 番染色体に挿入されていること、そして挿入部位近傍の遺伝子制御が破綻していることを見出した。トランスジェニックの挿入によって挿入部位近傍の 3 つの遺伝子 (*Snx25*, *Slc25a4*, *Cfap97*) がほぼ完全に消失していた（図 2）。さらに骨髄細

胞の cDNA マイクロアレイにより、野生型マウス (WT) と比較して TG マウスで発現量が大きく変動する遺伝子を数十個同定した。またホルマリンによる炎症性疼痛モデル作成後、DRG における疼痛関連遺伝子を PCR ミニアレイにより探索し、既知の疼痛関連因子の発現も減弱していることを見出した。

### B 標的遺伝子の KO マウスの入手および疼痛行動評価試験

TG マウスにおいて発現に異常が認められる遺伝子として、本研究では細胞膜の動態や細胞内トラフィックに関与する Sorting nexin (SNX25) に着目した。SNX25 KO マウスも TG マウスと同様に機械刺激および化学刺激に対する反応は著しく低下した。神経障害性疼痛モデルにおいても SNX25 KO マウスはアロディニアが軽減した。興味深いことに SNX25 KO マウスは 2 ヶ月齢では熱刺激に対する痛み行動は WT マウスと全く変わらないものの、6-8 カ月齢では熱刺激に対する痛み行動が減弱することが明らかになった (図 3)。また、疼痛発生時に機能が亢進する疼痛関連因子 (TRPV1, Nav1.7, Trk 等) の発現を調べた結果、SNX25 KO マウスでは DRG におけるこれらの発現が著しく低下していることを見出した。これらのことから、SNX25 は疼痛関連因子の発現を調節し、疼痛発生に重要な因子であることが明らかになった。

### C 標的遺伝子の cKO マウスの作製および疼痛行動評価試験

SNX25 KO マウスは TG マウス同様、痛み行動が減弱することが明らかになったが、SNX25 の全身 KO マウスでは詳細な疼痛機序が見いだせない。SNX25 が疼痛に及ぼす責任部位を同定するため Advillin-CreERT2 マウスを使用して DRG 特異的な SNX25 cKO マウスを作製し、TG マウスおよび SNX25 KO マウスと同様な疼痛関連行動が認められるかを観察した。タモキシフェン処理 (0.05% タモキシフェン食餌、2 週間) で DRG における SNX25 発現が顕著に低下することを確認したうえで、機械刺激に対する疼痛行動を評価したが、疼痛反応は低下傾向にあるものの、コントロールマウスと比べて有意な差は見いだせなかった。化学刺激に対する疼痛行動に至ってはコントロールマウスの行動パターンと全く差がなかった。

以上のことより、疼痛発生において SNX25 が重要であることが明らかとなった。研究開始当初、多様な刺激に反応すると考えられる C 線維は、実は行動を伴った明確なグループに区別できるのではないかと考えた。現に SNX25 KO マウスは 2 ヶ月齢では熱刺激に対する痛み行動は WT マウスと全く変わらないものの機械刺激および化学刺激に対しては鈍麻の表現型を呈した。一方で、8 カ月齢では SNX25 KO マウスでも熱刺激に対する痛み行動が減弱することが明らかになった。本研究課題では labeled line 説の検証までには至らなかったが、熱刺激、機械刺激、化学刺激に対する疼痛発生機序にも時期特異的な違いがあり、その制御因子として SNX25 およびその下流因子が関与していることを示唆する知見が得られた。さらなる詳細な機序解明は今後の課題である。

また、DRG における SNX25 cKO ではコントロールマウスと比較して疼痛行動に明白な相違は観察されなかったことから、SNX25 の疼痛発生の責任部位は DRG 以外と考えられる。しかしながら、近年のフローサイトメトリーやシングルセルトランスクリプトーム解析の結果、一次求心性神経はいくつかのサブセットに分類できることが明らかになりつつある (Usoskin et al. *Nat. Neurosci.* 18: 145-153, 2015)。末梢神経の SNX25 は実際に感覚受容に影響しないのかを再検証するべく、各神経サブセットの Cre ドライバーマウスを用いて SNX25 cKO マウスを作製し、疼痛刺激に対する行動を評価する必要がある。また、侵害受容ニューロンの活性化には、末梢の種々の細胞も関与しており、今後は末梢の細胞にも着目して解析する予定である。

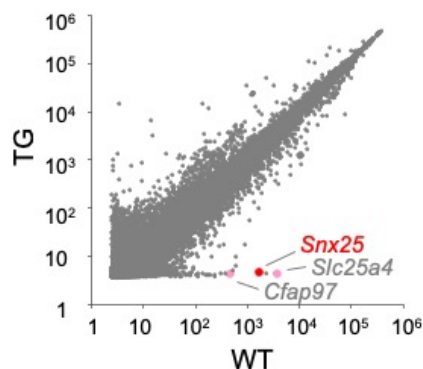


図 2 TGマウスとWTマウスの遺伝子網羅解析

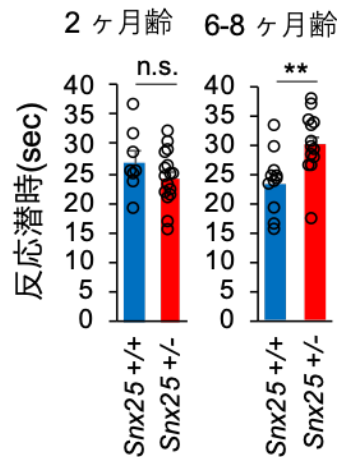


図 3 SNX25 KOマウスの熱刺激に対する反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takemura S, Isonishi A, Tanaka T, Okuda H, Tatsumi K, Yamano M, Wanaka A.	4. 巻 225
2. 論文標題 Neural expression of sorting nexin 25 and its regulation of tyrosine receptor kinase B trafficking.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Structure and Function	6. 最初と最後の頁 2615-2642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00429-020-02144-0	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 達英、奥田 洋明、石西 綾美、辰巳 晃子、和中 明生
2. 発表標題 「痛覚鈍麻マウスの順遺伝学スクリーニングによる新規疼痛候補遺伝子の同定」
3. 学会等名 第97回 日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 達英、奥田 洋明、石西 綾美、辰巳 晃子、和中 明生
2. 発表標題 「真皮マクロファージはNGF発現レベルを調節して痛覚感受性を決定する」
3. 学会等名 第64回 日本神経化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中達英、奥田洋明、寺田雄紀、新城武明、西村和也、石西綾美、三谷早希、竹村晶子、辰巳晃子、和中明生
2. 発表標題 「順遺伝学スクリーニングによる新規疼痛候補遺伝子の解析」
3. 学会等名 第63回 日本神経化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中達英、奥田洋明、寺田雄紀、新城武明、西村和也、石西綾美、三谷早希、竹村晶子、辰巳晃子、和中明生
2. 発表標題 「痛覚鈍麻マウスの順遺伝学スクリーニングによる新規疼痛候補遺伝子の解析」
3. 学会等名 第43回 日本神経科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中達英、奥田洋明、寺田雄紀、新城武明、西村和也、石西綾美、竹村晶子、辰巳晃子、和中明生
2. 発表標題 「痛覚鈍麻マウスの順遺伝学スクリーニングによる新規疼痛候補遺伝子の同定」
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 達英、奥田 洋明、寺田 雄紀、新城 武明、西村 和也、石西 綾美、竹村 晶子、辰巳 晃子、和中 明生
2. 発表標題 「痛覚鈍麻マウスの順遺伝学スクリーニングによる新規疼痛候補遺伝子の同定」
3. 学会等名 Neuro2019 (新潟)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------