

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390417

研究課題名(和文) miRNAの痛みのメカニズムへの関与の解明

研究課題名(英文) The role of miRNA in the pain mechanisms

研究代表者 萩平 哲 (HAGIHIRA SATOSHI)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90243229

研究成果の概要(和文)：ラットの慢性疼痛モデルにおいて miRNA の発現解析を行い、高発現した miRNA を選定しそれらのターゲット遺伝子の選定を行った。ターゲット遺伝子に実際に結合し得るかどうカルシフェラーゼアッセイで確認し、結合し得ることが確認出来たマイクロRNAを絞り込んだ。それらをターゲット遺伝子が実際に発現している細胞に作用させ、蛋白の発現量が低下することを確認した。今回 miRNA の機能解析の実験的手法を確立できたので今後さらにターゲット遺伝子を多く設定し確認していく予定である。

研究成果の概要(英文)：

In the current study, we investigated the function of multiple miRNAs, focusing on those that are considered potential targets for GABAA alpha 5 receptor (*Gabra5*) regulation.

The *in silico* approach identified six miRNAs that were candidates for *Gabra5* regulation (miR 598-3p, miR541, miR378, miR219-2-3p, miR223, and miR346). Luciferase assays confirmed that the six miRNAs targeted specific sequences within *Gabra5*. We next examined whether these miRNAs reduced *Gabra5* expression at the protein level. We found that only miR378 and miR541 negatively regulated *Gabra5* protein in hippocampal neurons.

*Gabra5* plays an important role in cognition and memory. By increasing the expression level of *Gabra5*, we might be able to ameliorate the symptoms of patients with Alzheimer's disease, who suffer from cognitive problems and memory dysfunction. Inhibitors of miR378 and miR541 are potential targets for this putative new therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：マイクロRNA、GABA受容体、セロトニン受容体

### 1. 研究開始当初の背景

痛みの起こる原因は様々で、そのメカニズムの探求は古くから行われ、様々な薬が開発されてきたが、人類は痛みを克服できたとは言いがたい。これまでの創薬はmechanism based medicineの概念に従い、個々の受容体や伝達経路をターゲットになされてきた。しかし、多岐に渡る痛みの原因を一度克服するような決めるとなる薬はいまだに開発されていないのが現状であり、痛みによって多くの患者が苦しみ、社会活動を妨げられることである。

我々のグループではRNAに着目した痛みのメカニズムの解明に取り組んできた。慢性痛モデルにおいてmRNAの塩基配列が変化することによって、異なる蛋白質をコードし、受容体の構造そのものを変化させることによって制御されていることを明らかとした。

(Nakae et al. Neuroscience Meeting 2007 abstract)

人類のゲノムの解明がなされて久しいが、このようにゲノムレベルでの解釈では説明できない事象が多くあることが知られるようになってきておりRNAレベルでの探求が重要であると考え今回の着想に至った。

miRNAは21から23塩基程度のそれ自身は蛋白質をコードしない小さなRNA分子で、蛋白質への翻訳の阻害や、ターゲットとなるRNAの安定性に関与する。ターゲットとなるRNAの塩基配列と完全に一致していなくても機能するため、ひとつのmiRNAが多くの遺伝子の発現に影響を及ぼしていることが知られている。(Zamore PD et al. Science 2005) 癌研究の分野において、予後判定に遺伝子解析がしばしば行われてきたが、数十個の遺伝子解析でようやく割り出さすことができた5年生存率と同等の予後判定がわずか数種類のmiRNAの発現解析で行えたとする報告も散見され(Chen Y et al. Cancer Research 2007) 注目を集めている。

近年神経科学分野においても、脳特異的に発現するmiRNAが多く存在すること(Cheng LC et al. Neuron 2005)、さらにその中に神経の発達や神経細胞の分化にかかわるものが存在することが明らかとなってきている。

(Smirnova L et al. Eur J Neurosci 2005) 痛みにかかわる分野においては幹細胞由来の神経細胞においてmiRNAがサブスタンスPの生成を制御することが報告されている。(Greco SJ et al. PNAS 2007)

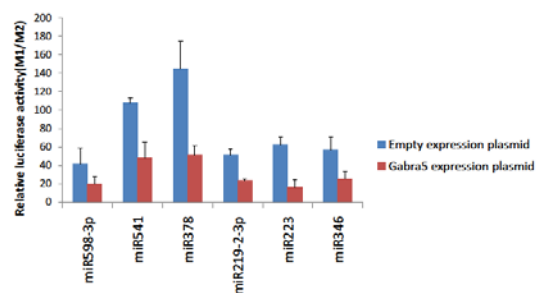
痛みの研究は今まで主に個々の受容体レベ

ルおよび伝達経路をターゲットに行われ、臨床医は痛みの原因に配慮しつつ複数の鎮痛薬を組み合わせ治療を行ってきた。しかしその戦略では、個々の医師の技量の差が大きく、効果にも差が生じてしまう。その理由の一つは痛みの原因が多様であり、痛みによって起こる事象も多岐に渡るためである。たとえそのうちの一つを克服できたとしても、全体としては痛みの軽減に繋がるとは限らない。今回の我々のグループのターゲットと考えているmiRNAは1種類の小さなRNA分子が多く、遺伝子の制御に関与する。癌研究の5年生存率予測と同様に、遺伝子レベルでは多岐に渡っている疼痛のメカニズムも、ともすればわずか数種類程度のmiRNAの発現解析で解明できる可能性を秘めている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は疼痛に関与するmiRNAを見出し、疼痛メカニズムの解明、さらに新しい視点での創薬に繋げることである。以上の目的を達成するために

- (1). ラットにおいて眼窩下神経結紮モデルを作成し、その延髄と大脳の1次知覚野を含むサンプルでmiRNAアレー、cDNAアレーを行い、痛みに関与するmiRNAをしばり込む。
- (2). miRNAデータベースを利用し、1で絞り込んだmiRNAのターゲットとなる遺伝子を探索し、cDNAアレーの結果を利用して更なる絞り込みを行う。
- (3). モデルラットを用いたmiRNA発現解析を行い、実際に変動するかを確認する。
- (4). (2)で絞り込んだmiRNAがターゲットとなる遺伝子の発現をコントロールするかど



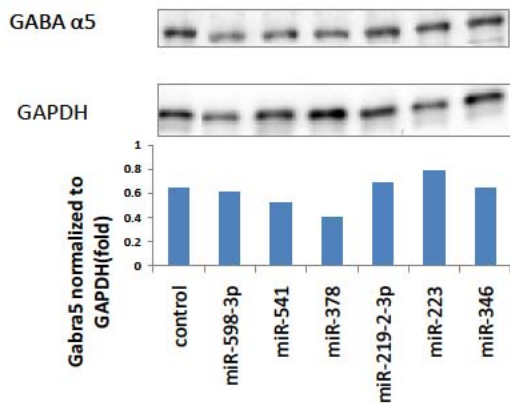
うか*invitro*での確認実験を行う。

(5). (4)で確認されたmiRNAに対し、モデル動物を用いた抑制実験を行い、そのmiRNAと動物の疼痛行動の関連を明らかにする。

(6). (5)で見出されたmiRNAをターゲットにした創薬の可能性を探る。

### 3. 研究の方法

- (1) 眼窩下神経絞扼モデルを用いたマイクロ



#### RNAアレーと cDNAアレー

痛みの動物モデルである眼窩下神経絞扼モデルを用いて、その疼痛行動を von Frey Filament を用いて評価した。その疼痛行動が出現した個体と外科的刺激のみを加えた個体、何もしない個体に対して、マイクロRNAアレー、cDNAアレーを行った。

(2) in silico でのターゲット遺伝子の予測、ターゲットとするマイクロRNAの絞り込み

(1)のアレーで痛みモデルで高発現であった数種類をピックアップした。そのmiRNAが作用し得る潜在的なターゲット遺伝子を、データベースを用いてピックアップした。その中からまずターゲット遺伝子として GABA 受容体 α5 サブユニットを選定した。

(3) ターゲット遺伝子が本当に miRNA と結合するかの確認実験

その遺伝子が本当に miRNA と結合し得るかどうかカルシフェラーゼという色素を用いた分析で調べた。

(4). (3) で結合が確認されたマイクロRNAが実際に蛋白の発現に影響するか確認実験

結合するマイクロRNAをさらに絞り込んで、6種類のマイクロRNAをGABA受容体 α5 サブユニットが発現しているB50 (海馬由来のがん細胞) に実際にリポフェクトアミン 2000 を用いて作用させ、たんぱく質の発現が実際に減るかどうかをウエスタンブロッティングを用いて調べた。コントロールにはマイクロRNAが結合しないことが確認されているものを用いた。

#### 4. 研究成果

(1) 眼窩下神経絞扼モデルの疼痛行動の解析

眼窩下神経絞扼モデルの疼痛行動は術後14日目から顕著になり28日目まで持続する。

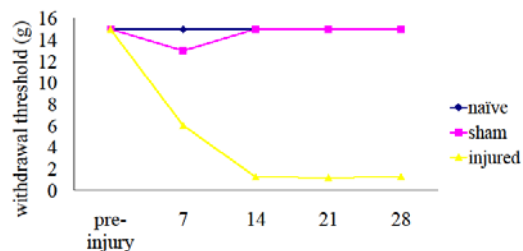
(2) Luciferase assay 解析結果

マイクロRNA 6種類について検討を行った結果、ターゲット遺伝子配列を入れないものに比べ、導入したプラスミドにおいて有意に活性の低下を認めた。このことから、6種類のうち5種類に結合して作用する可能性があることが明らかになった

(3) ウエスタンブロッティングの結果

(2) で結合の確認がなされたマイクロRNAをGABA α5サブユニットが実際に発現しているB50細胞に作用させ、たんぱく質の発現量を解析した結果、GABA受容体たんぱく質の発現は2種類のマイクロRNA (miR-541, miR-378) を作用させたもので低下した。

【考察】当初の計画であった一つのマイクロRNAが多数の遺伝子を制御し得るという結果を得るための、別のもう一つのターゲット遺伝子については分析できなかった。しかし、実際にたんぱく質の発現抑制を確認することができたので今後、今回ターゲットとしたマイクロRNAについて順次他のターゲット遺伝子について検討する予定である。GABA受容体 α5 サブユニットは痛みばかりでなく、最近認知機能障害に対する有力なターゲットである。GABA受容体はその機能を増すと抗けいれん作用、抗不安作用が見られ、その作用を増強させる薬は多く存在する。しかしそういった薬は物忘れが強く、眠気が強くなる欠点があった。一方 α5 サブユニットはその機能を抑制すると認知機能を改善させ



る。よって明らかになった GABA 受容体 α5 サブユニットに対して作用するマイクロRNAも、認知機能を障害するようなアルツハイマーのような病気の原因となっているのかもしれない。

#### 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 17 件)

- 1) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Kenji Yano, Ko Hosokawa, Masahiko Shibata, and Takashi Mashimo. The animal model of spinal cord injury as an experimental pain model. Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2011 (2011), Article ID 939023, 11 pages
- 2) Ueyama H, Hagihira S, Takashina M, Nakae A, Mashimo T. Pregnancy Does Not Enhance Volatile Anesthetic Sensitivity on the Brain: An Electroencephalographic Analysis Study. Anesthesiology 2010 113(3) 577-84.
- 3) Murray K, Nakae A, Stephens MJ, Rank M, D' Amico J, Harvey P, Li X, Harris L,

- Ballou EW, Anelli R, Heckman CJ, Mashimo T, Vavrek R, Sanelli L, Gorassini MA, Bennett DJ and Fouad K. Recovery of motoneuron and locomotor function after chronic spinal cord injury depends on constitutive activity in 5-HT<sub>2C</sub> receptors. *Nature Medicine* 2010;16(8): 694-700
- 4) Nakai K, Nakae A, Sosuke Oba, Mashimo T, Ueda K. 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *European J Pain* 2010 14(10):999-1006
- 5) Nakai K, Nakae A, Sosuke Oba, Mashimo T, Ueda K. P2X<sub>4</sub> receptor expression in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroreport* 2010 ; 21(8): 559-563
- 6) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tatsuya Tanaka, Yoko Ishida, Akiko Mikami, Mari Yoshida, Masahiko Shibata, Koichi Ueda, Takashi Mashimo. Serotonin 2C receptor RNA editing and alternative splicing in the rat oro-facial neuropathic pain model. *NeuPIG*, 2010
- 7) Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Sosuke Oba, Masahiko Shibata, Takashi Mashimo, Koichi Ueda. The role of snoRNA RBII-52 to the serotonin<sub>2C</sub> receptor in the rat oro-facial neuropathic pain model. *Neuroscience* 2009 abstract
- 8) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tatsuya Tanaka, Mari Yoshida, Akiko Mikami, Masaki Takashina, Satoshi Hagihira, Masahiko Shibata, Koichi Ueda, Takashi Mashimo. The snoRNA RBII-52 regulates alternative splicing of serotonin 2C receptor in the rat oro-facial neuropathic pain model. *Neuroscience* 2009 abstract
- 9) A. Nakae, K. Nakai, T. Tanaka, S. Hagihira, T. Mashimo. The role of snoRNA (RBII-52) in a rat model of oro-facial neuropathic pain. *European Journal of Anesthesiology* 26(Supple45): 14AP4-2, 2009
- 10) Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Sosuke Oba, Takashi Mashimo, Koichi Ueda. The role of GABAergic tonic inhibition in rat oro-facial neuropathic pain model. *Pain Practice*. Vol. 9(1)・19・2009
- 11) A. Nakae, K. Nakai, S. Oba, K. Ueda, T. Mashimo. Correlation between peripheral P2X<sub>4</sub> receptor expression and nerve injury in rat oro-facial neuropathic pain. *Pain Practice*. Vol. 9(1)・19・2009
- 12) K. C. Murray, A. Nakae, T. Ballou, R. Vavrek, K. Fouad, M. M. Rank, M. Stephens, R. Anelli, P. J. Harvey, C. Heckman, D. J. Bennett. Role of constitutively active 5HT<sub>2C</sub> receptors following spinal cord injury in rats. *Neuroscience* 2008 Abstract
- 13) A. Nakae, K. Nakai, S. Hagihira, M. Shibata, K. Ueda, T. Mashimo. Electroencephalogram changes in rat orofacial and hindpaw formalin test. *Neuroscience* 2008 Abstract
- 14) K. Nakai, S. Oba, A. Nakae, T. Mashimo, K. Ueda. P2X<sub>4</sub> receptor expression in rat oro-facial neuropathic pain model. *Neuroscience* 2008 Abstract.
- 15) Aya Nakae, Tatsuya Tanaka, Keiko Miyake, Makiko Hase, Takashi Mashimo. Comparing methods of detection and quantitation of RNA editing of rat glycine receptor alpha3. *International Journal of biological science*. 4(6):397-405, 2008
- 16) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tatsuya Tanaka, Satoshi Hagihira, Masahiko Shibata, Koichi Ueda, Takashi Mashimo. The role of RNA editing of the serotonin 2C receptor in a rat model of oro-facial neuropathic pain. *The European Journal of Neuroscience* 27(9):2373-9, 2008
- 17) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tatsuya Tanaka, Satoshi Hagihira, Masahiko Shibata, Koichi Ueda, Takashi Mashimo. Serotonin 2C receptor mRNA editing in neuropathic pain model. *Neuroscience Research* 60(2):228-231, 2008
- [学会発表] (計 18 件)
- 1) 中江 文、中井 國博、酒井 規広、井上 隆弥、上田 晃一、柴田 政彦、眞下 節。眼窩下神経絞扼モデルにおけるセロトニン<sub>2C</sub>受容体の関与。第 32 回日本疼痛学会、京都、7. 4, 2010. 口演
- 2) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tatsuya Tanaka, Yoko Ishida, Akiko Mikami, Mari Yoshida, Masahiko Shibata, Koichi Ueda, Takashi Mashimo. Serotonin 2C receptor RNA editing and alternative splicing in the rat oro-facial neuropathic pain model. *NeuPIG*, Athens, Greek, May27-30, 2010, poster
- 3) 吉田真理、田中達哉、石田葉子、中江文、中井國博、三上晶子、大場創介、柴田政彦、眞下節、上田晃一、核小体RNA、RBII-52 の神経因性疼痛でのセロトニン<sub>2C</sub>受容体に対する役割、第 32 回日本分子生物学会年会、横浜、12 月 9 日～12 日、2009. ポスター

4) 三上晶子、田中達哉、石田葉子、中江文、中井國博、吉田真理、柴田政彦、上田晃一、眞下節、核小体RNAのRBII-52によるラット顔面神経因性疼痛モデルにおけるセロトニン2Cレセプターのスプライスバリエーションの制御、第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月9日～12日、2009.ポスター

5) Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Sosuke Oba, Masahiko Shibata, Takashi Mashimo, Koichi Ueda. The role of snoRNA RBII-52 to the serotonin2C receptor in the rat oro-facial neuropathic pain model. Neuroscience 2009, Chicago, Illinois, Oct.17-21, 2009, poster

6) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tatsuya Tanaka, Mari Yoshida, Akiko Mikami, Masaki Takashina, Satoshi Hagihira, Masahiko Shibata, Koichi Ueda, Takashi Mashimo. The snoRNA RBII-52 regulates alternative splicing of serotonin 2C receptor in the rat oro-facial neuropathic pain model. Neuroscience 2009, Chicago, Illinois, Oct.17-21, 2009, poster

7) 中江文、中井國博、柴田政彦、上田晃一、眞下節、眼窩下神経絞扼モデルにおける核小体RNA (RBII-52) の関わり、第31回日本疼痛学会、名古屋、7月17日-18日、2009、口頭

8) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tatsuya Tanaka, Satoshi Hagihira, Takashi Mashimo. The role of snoRNA in a rat model of oro-facial neuropathic pain. Euroanaesthesia 2009, Milano, Italy, June6-9, 2009

9) Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Sosuke Oba, Takashi Mashimo, Koichi Ueda. The role of GABAergic tonic inhibition in rat oro-facial neuropathic pain model. 5<sup>th</sup> World Congress World Institute of Pain, New York, NY, March 13-16, 2009

10) Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tatsuya Tanaka, Koichi Ueda, Takashi Mashimo Correlation between peripheral P2X4 receptor expression and nerve injury in rat oro-facial neuropathic pain model. 5<sup>th</sup> World Congress World Institute of Pain, New York, NY, March 13-16, 2009

11) 中江文、柴田政彦、高階雅紀、萩平哲、眞下節、脊髄におけるセロトニン2C受容体のRNA編集とその病態へのかかわり、平成20年度生理学研究所研究会「筋・骨格系と内臓の痛み研究会」、岡崎、1月22日-23日、2009、口頭

12) K. C. Murray, A. Nakae, T. Ballou, R. Vavrek, K. Fouad, M. M. Rank, M. Stephens, R. Anelli, P. J. Harvey, C. Heckman, D. J. Bennett.

Role of constitutively active 5HT2C

receptors following spinal cord injury in rats. Neuroscience 2008, Washington, DC, Nov.15-19, 2008

13) A. Nakae, K. Nakai, S. Hagihira, M. Shibata, K. Ueda, T. Mashimo.

Electroencephalogram changes in rat orofacial and hindpaw formalin test. Neuroscience 2008, Washington, DC, Nov.15-19, 2008

14) K. Nakai, S. Oba, A. Nakae, T. Mashimo, K. Ueda.

P2X4 receptor expression in rat oro-facial neuropathic pain model Neuroscience 2008, Washington, DC, Nov.15-19, 2008

15) 中江文、中井國博、萩平哲、上山博史、上田晃一、眞下節、ラットホルマリンテストによる脳波変化の検討、第30回日本疼痛学会、福岡、7月18日-19日、2008

16) 中江文、中井國博、萩平哲、上田晃一、眞下節、眼窩下神経絞扼モデルにおけるP2X4受容体の関与、日本麻酔科学会第55回学術集会、横浜、6月12日-6月14日、2008、

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

萩平 哲 (HAGIHIRA SATOSHI)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90243229

### (2) 研究分担者

中江 文 (NAKAE AYA)

大阪大学・医学系研究科・

特任准教授(常勤)

研究者番号：60379170

中井 國博 (NAKAI KUNIHIRO)

大阪大学・医学系研究科・

寄附講座准教授

研究者番号：80362705

柴田 政彦 (SHIBATA MASAHIKO)

大阪大学・医学系研究科・

寄附講座教授

研究者番号：50216016

高階雅紀 (TAKASHINA MASAKI)

大阪大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30221352

眞下 節 (MASHIMO TAKASHI)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：10110785