

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20791070

研究課題名（和文） 核小体低分子 RNA を用いた神経因性疼痛治療薬の開発

研究課題名（英文） The druggable approach using small nucleolar RNA of the neuropathic pain

研究代表者 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

研究成果の概要（和文）：SnoRNA の RBII-52 がセロトニン 2C 受容体の RNA 編集とスプライシングの双方に寄与する可能性が報告された。痛み刺激でセロトニン 2C 受容体は RNA 編集とスプライシングによる制御を受け、その 2 つを制御する因子として RBII-52 が関与するという仮定のもとに研究を行った。眼窩下神経絞扼モデルで RBII-52 の定量とスプライスバリエントの定量を行い、RBII-52 やスプライスバリエントの変化は神経因性疼痛よりは外科的ストレスによって変動する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The serotonin 2C receptor (5HTR2C) receives RNA editing. It is also known that as a result of alternative splicing of the 5HTR2C, a frame shift occurs and a non-functional receptor is created. Having studied the 5HTR2C RNA editing efficiency in a rat oro-facial neuropathic pain model (Nakae et al. EJN 2008), our interest turned to the factor contributing to RNA editing and efficacy of alternative splicing. In human study, HBII-52 (one kind of small nuclear RNA; equal in function to RBII-52) contributes to regulating the 5HTR2C RNA editing and alternative splicing. In this research, an infra-orbital loose ligation model was used. The tendency of RBII-52 expression in injured and sham operated animals decreased. On the other hand, only the Va containing pattern (non-functional) increased in injured and sham rats. The relationship between RBII-52 expression, the 5HT2C-R alternative splicing and RNA editing was unclear. Modulation of 5HTR2C activity might be capable of far finer tuning than we previously imagined through noxious stimuli response, such as neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

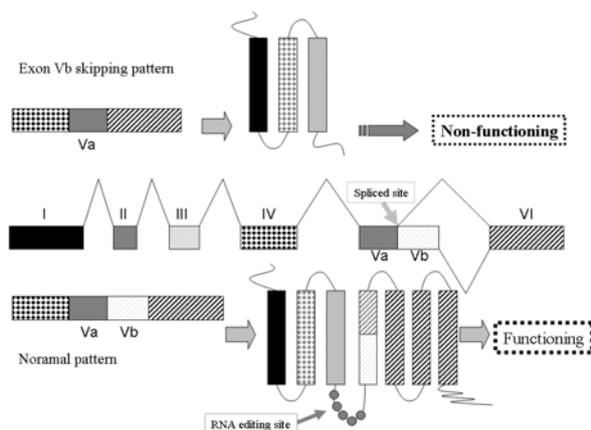
研究分野：医歯薬学

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：snoRNA・RNA編集・疼痛モデル

1. 研究開始当初の背景

セロトニン2C受容体はGタンパク共役型受容体でRNA編集を受けることが知られている。我々のグループは神経因性疼痛の動物モデルにおいてRNA編集の効果について既に報告した。セロトニン2C受容体がRNA編集だけではなく選択的スプライシングによる制御を受けることが明らかになっており、さらに、ヒトでの報告で核小体低分子RNAの一種であるHBII-52(ラットにおけるRBII-52と同じ働きを持つ分子)がセロトニン2C受容体RNA編集や選択的スプライシングの制御に寄与するという報告を受け、RBII-52の発現を調節することにより新たな鎮痛薬の開発につながる可能性を考えこの研究に着手した。



2. 研究の目的

この研究の目的はラットの神経因性疼痛モデルにおいてRBII-52がセロトニン2C受容体のRNA編集や選択的スプライシングにどのように関与するか明らかにすること、さらに、痛みにも利な方に制御することにより新たな鎮痛薬の開発につなげることであった。

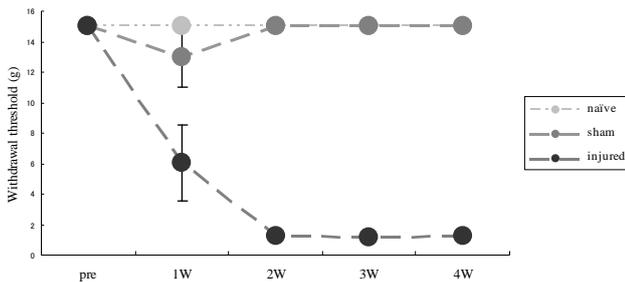
3. 研究の方法

- 1) RBII-52, セロトニン2C受容体スプライスバリエント定量系の確立。
 - ①RBII-52、各種バリエントのクローンをサブクローニング法で釣り上げ、ダイレクトシーケンスで確認し、プラスミドに組み込んで大腸菌を用いて増やし、濃度の調整を行って標準サンプルを作成した。
 - ②それぞれを特異的に検出するタックマンプローブとプライマーの作成を行った。
 - ③標準サンプルを使用して、その定量系が正確か確認を行った。
- 2) 動物モデルにおける発現解析
 - ①ラットで眼窩下神経絞扼モデルを作成、疼痛行動の評価を行った。
 - ②手術後28日目に頸部脊髄のサンプルをとりだしRNA抽出を行った。
 - ③cDNA変換を行った後、リアルタイムPCRを用いて1)で確立した定量系を用いてナイーブ、シャム手術、モデル手術のそれぞれのサンプルを解析した。

④統計は Wilcoxon の順位和検定を用いた。

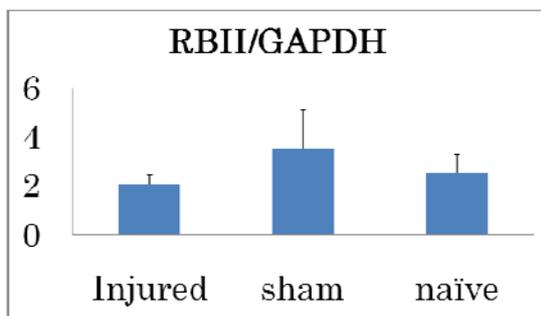
4. 研究成果

- 1) 定量系の確立には成功した。
- 2) 動物モデルで疼痛行動を確認した。
 シヤムでは疼痛行動が出ないのに対し、モデルでは優位に疼痛閾値が低下した。
 モデルサンプルとシヤム手術のサンプルにおいて RBII-52 の発現は優位さを認めなかった。セロトニン 2C スプライスバリエントにおいて無機能な受容体の割合がモデルサンプルとシヤムサンプルで発現が増加した。



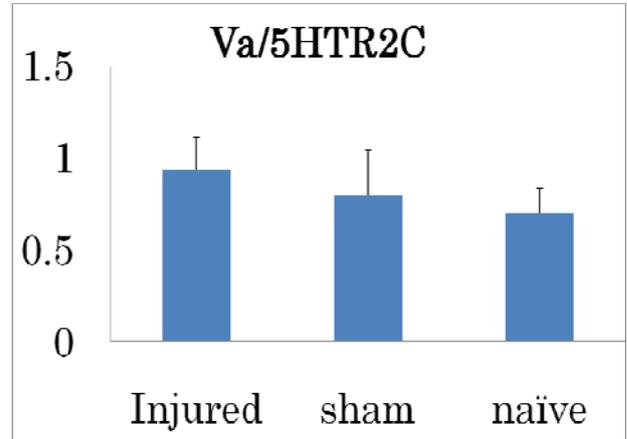
Behavioural responses to IoN loose ligation.

On post-injury day 14, infraorbital nerve loose ligation statistically significantly correlated with reflex withdrawal from mechanical stimulation using von Frey Filament. Pain threshold values from the ION territory of ION loose-ligation-injured rats were statistically significantly lower than for sham and naïve animals.



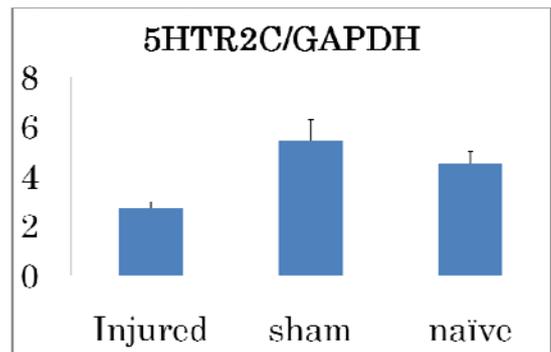
Different snoRNA RBII-52 expression in spinal cord

Expression of RBII-52 in samples from injured and naïve tend to be lower than from sham-operated rats, but the difference was not statistically significant.



Different 5HTR2C expression in spinal cord

Expression of 5HTR2C in samples from injured is lower than from



Different alternative splicing ratio in spinal cord

Ratio of alternative splicing of 5HTR2C in samples from injured is higher than from sham-operated and naïve rats.

以上の現象は RBII-52 やセロトニン 2C 受容体スプライスバリエントが神経因性疼痛というよりは外科的ストレスにより変動を起こす可能性が示唆された。

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 7 件)

- 1) 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_{2C} receptors. *Nature Medicine* 2010; 26(10):694-700 【査読あり】
- 2) Nakai K, Nakae A, Sosuke Oba, Mashimo T, Ueda K. 5-HT_{2C} receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *European J Pain* 2010 May 18. [Epub ahead of print] 【査読あり】
- 3) Nakai K, Nakae A, Sosuke Oba, Mashimo T, Ueda K. P2X₄ receptor expression in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroreport* 2010; 21(8):559-63【査読あり】
- 4) 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. *NeuPIG2010*, abstract 【査読あり】
- 5) Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Sosuke Oba, Masahiko Shibata, Takashi Mashimo, Koichi Ueda. The role of snoRNA RBII-52 to the serotonin_{2C} receptor in the rat oro-facial neuropathic pain model. *Neuroscience* 2009 abstract 15 【査読あり】
- 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 abstract 15 【査読あり】
- 7) 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 【査読あり】

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 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_{2C} 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

- 2) 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ズ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.
- 3) Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Sosuke Oba, Masahiko Shibata, Takashi Mashimo, Koichi Ueda. The role of snoRNA RBII-52 to the serotonin_{2C} receptor in the rat oro-facial neuropathic pain model. *Neuroscience* 2009, Chicago, Illinois, Oct.17-21, 2009
- 4) 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
- 5) 中江文、中井國博、柴田政彦、上田幸一、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
- 6) 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：