

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09232

研究課題名(和文) Target protector RNAによるHCNチャネルを標的とした鎮痛戦略

研究課題名(英文) Development of novel therapeutics for intractable neuropathic pain based on target protector RNA modulating HCN channel function

研究代表者

鈴木 秀典 (SUZUKI, Hidenori)

日本医科大学・大学院医学研究科・研究生

研究者番号：30221328

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)：難治性の神経障害性疼痛の治療標的としてHCNチャネルは有望であるが、その阻害薬はHCNチャネルを発現する心臓に対する有害作用等が懸念されている。本研究では、microRNAの標的遺伝子のうち、特定のmRNAへの結合のみを阻害するアンチセンス核酸(target protector)を用いて、HCNチャネル調節サブユニットの発現を修飾した。一次感覚神経において末梢神経障害により発現上昇するmicroRNAと標的mRNAが相互作用する核酸配列とその周辺配列を標的として、抑制効果の高いtarget protector候補をスクリーニングによって同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害を伴う慢性疼痛治療に対し、数多くのイオンチャネルに対する選択的阻害薬が合成されてきたが、実臨床における有効性や安全性に課題があり、承認に至っていない。本研究の成果は、従来のようなイオンチャネル選択的阻害薬ではなく、チャネル機能を制御するサブユニットを標的にしたmicroRNAの結合を阻害するtarget protectorを治療薬とする全く新しい観点からの研究であり、HCNチャネルサブユニットの発現量を変化させるmicroRNA結合配列を標的としたtarget protectorを見出したことは、社会的に望まれている神経障害性疼痛治療薬開発の有用な突破口となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：HCN channels are promising therapeutic targets for refractory neuropathic pain, although there are concerns about adverse effects on the heart, which expresses several types of HCN channels. In this study, we attempted to suppress HCN channel function in primary sensory neurons by modulating the expression of HCN channel regulatory subunits using antisense nucleic acids (target protectors) that can only inhibit the binding between the HCN regulatory subunit mRNAs and microRNAs that target them. Target protector candidates with high inhibitory effects were identified by screening of nucleic acid sequences around the interaction site between mRNA and microRNAs that were upregulated in primary sensory neurons after nerve injury. The results suggest the potential for development of novel therapeutics for intractable neuropathic pain based on target protector RNA modulating HCN channel function.

研究分野：神経薬理学

キーワード：HCNチャネル microRNA target protector 一次感覚神経 神経障害性疼痛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害を伴う慢性疼痛は難治性で苦痛が強いため、積極的に治療することが求められるが、現状の疼痛治療は未だ効果が不十分であり、様々な有害作用が問題となる。そのため、これまでに数多くの分子が新規鎮痛薬の標的として研究されてきた。特に、ナトリウムイオンやカルシウムイオンなどを透過するイオンチャネルは侵害刺激による一次感覚神経での活動電位の発生や伝搬、神経伝達物質放出に不可欠であるため、積極的に開発が行われている。様々なイオンチャネルに対する新規の阻害薬が合成されてきたが、実臨床における有効性や安全性に課題があり、承認に至っていない。中でも、イオンチャネル阻害薬は循環器系や他の神経系への有害作用が強く懸念される。心臓に発現するイオンチャネルの主要なサブタイプが一次感覚神経と異なっている場合においても、今まで開発された阻害薬自体のサブタイプ選択性は完全ではない。そのため、従来のようなイオンチャネル選択的阻害薬の開発のみでなく、新たな視点からイオンチャネル機能の阻害を試みることは有用な突破口となる可能性がある。

Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) チャネルは細胞膜の過分極により開口し、cAMP のような環状ヌクレオチドの結合により活性化される非選択的陽イオンチャネルである。HCN チャネルは oscillatory activity を生じることから、HCN チャネルを介した一次感覚神経の異所性発火(自発発火)はヒトの神経障害性疼痛の主症状となる自発痛の要因として考えられている。従来動物実験ではあまり検証されてこなかった自発痛にも有効な治療標的として HCN チャネルは期待されており、その阻害薬の開発が活発に行われている。

疼痛には一次感覚神経に発現する HCN1 や HCN2 チャネルが主に関わっている。一方で、心臓のペースメーカー(自動能)においては HCN4 が主要なサブタイプとして知られているが、それ以外のサブタイプも発現することから、サブタイプ特異性が高い HCN チャネル阻害薬であっても心臓への有害作用の懸念があり、鎮痛薬としての開発に大きな障害となっている。このような鎮痛効果が強く期待される HCN チャネルに関して、有害作用を回避しつつも鎮痛効果が期待できる、一次感覚神経特異的にチャネル機能の抑制を誘導する戦略を申請者は microRNA (miRNA) の機能解析を通して見出した。一次感覚神経における miR-17-92 クラスターの発現上昇は複数の電位依存性カリウムチャネルとその調節サブユニットを抑制することで、神経障害性疼痛に寄与することを明らかにしたが (Sakai et al., Nat Commun 2017)、包括的スクリーニングによって、カリウムチャネル以外にも神経障害性疼痛に関わる HCN チャネル調節サブユニットの発現を修飾する可能性がある miRNA を見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、miRNA による HCN チャネル調節サブユニットの発現抑制作用を特異的に阻害することで、一次感覚神経特異的な本サブユニットの発現増強を試みる。この際、miRNA に対するアンチセンス核酸による機能阻害が良く行われるが、miRNA は様々な臓器に発現し、同一細胞においても様々な遺伝子を抑制するため、標的としない細胞や遺伝子にも影響してしまう。そのため、本計画では調節サブユニット mRNA の 3'-UTR 配列に対するアンチセンス核酸を使用し、miRNA の調節サブユニットへの結合のみを阻害することで、特異性を高める。このようなアンチセンス核酸である target protector はコード領域より下流に結合するため、タンパク質の翻訳は阻害せずに miRNA による発現抑制を阻害し、タンパク質発現量を増加させることが期待される。同時

に、target protector は当該 miRNA と調節サブユニットの両方を発現する細胞でしか調節サブユニットの発現を増加できないので、調節サブユニットを発現しない心臓細胞には作用が及ばないことが期待される。核酸医薬は今後急速に普及していくと考えられるが、疼痛緩和医療においても、こうした新たな治療薬開発の研究基盤を確立することを本研究の最終目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) HCN チャネル調節サブユニットの発現抑制に働く miRNA 結合部位の探索

miRNA は mRNA の 3'-UTR に塩基配列特異的に結合することで、標的遺伝子の発現を負に調節する。in silico 予測により HCN チャネル調節サブユニットの 3'-UTR 上に miRNA が結合する可能性がある領域を見出しているため、実際に in vitro で miRNA 結合部位を検討する。miRNA の発現パターンは細胞種によって全く異なることから、実際にげっ歯類個体から抽出した一次感覚神経において、当該 miRNA の発現量や神経障害性疼痛における発現変化を定量的 PCR により検討する。HCN チャネル調節サブユニットの発現抑制に関わる miRNA 結合領域の位置と抑制の程度をルシフェラーゼアッセイにより検討し、発現調節のための標的配列として同定する。

#### (2) HCN チャネル調節サブユニットへの miRNA 結合を阻害する target protector の同定

上記の実験により見出した HCN チャネル調節サブユニットの発現調節に重要な miRNA 結合部位に関して、miRNA の結合を阻害するのに最適な target protector (サブユニット 3'-UTR 配列に対するアンチセンス核酸) を同定する。異なる複数の miRNA 種が同一もしくは重複した塩基配列を認識することが散見されることから、target protector は複数の miRNA による作用を同時に阻害し、特定の miRNA 自体を阻害するよりも強力な効果が期待される。阻害効果の高い標的塩基配列を求めめるために、標的結合部位の異なる様々な塩基長のアンチセンス核酸を設計する。miRNA 結合配列を含む HCN サブユニット 3'-UTR 配列をルシフェラーゼ遺伝子の下流に組み込むことで、in vitro において効率良く阻害効果をスクリーニングする。

#### (3) Target protector による鎮痛効果の検討

miRNA 結合に対する阻害効果の高い target protector を実験動物の脊髄髄腔内へ投与し、神経障害性疼痛に対する核酸医薬としての有用性を調べる。

### 4. 研究成果

(1) 後根神経節に発現する複数の HCN チャネルサブタイプの発現分布や発現量を in situ hybridization や定量的 PCR により測定すると共に、神経障害性疼痛における変化を明らかにした。また、HCN チャネルサブタイプを標的とする複数の miRNA に関して、神経障害性疼痛における発現変化を明らかにした。

(2) 神経障害性疼痛において後根神経節で発現上昇し、HCN チャネルサブユニットを標的とすることが in silico 解析により予測された microRNA に関して、HCN サブユニットへの結合部位をルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。さらに、本 3'-UTR 配列上の microRNA 結合予測部位に変異を入れることで、発現量が変化する結合部位を見出した。これらの microRNA を一次感覚神経に過剰発現させることにより、痛覚過敏が誘導されることを明らかにした。

(3) microRNA と HCN サブユニットとの結合配列を target protector の標的配列とした様々な長さのアンチセンス核酸をトランスフェクションすることによる microRNA を介した発現調節への影響を検討し、target protector 候補を同定した。

(4) 核酸修飾した target protector を神経障害性疼痛モデル動物へ投与し、疼痛行動や HCN チャンネルの調節サブユニットの発現量を解析した。さらに、HCN チャンネル調節サブユニットの発現制御により痛覚過敏が発症し、複数の HCN チャンネル阻害薬により痛覚過敏が減弱することを明らかにした。これらの解析を通して、target protector による HCN チャンネルへの影響や治療薬としての可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuura K, Sakai A, Watanabe Y, Mikahara Y, Sakamoto A, Suzuki H.	4. 巻 17
2. 論文標題 Endothelin receptor type A is involved in the development of oxaliplatin-induced mechanical allodynia and cold allodynia acting through spinal and peripheral mechanisms in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Pain	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/17448069211058004	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 丸山基世、鈴木秀典、坂井 敦	4. 巻 37
2. 論文標題 細胞外非コードRNA の疼痛疾患治療への応用可能性 Potential roles of extracellular non-coding RNAs in pain treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pain Res	6. 最初と最後の頁 89-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11154/pain.37.89	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 Ikuma Y, Sakai A, Sakamoto A, Suzuki H.	4. 巻 18
2. 論文標題 Increased extracellular release of microRNAs from dorsal root ganglion cells in a rat model of neuropathic pain caused by peripheral nerve injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0280425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0280425	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤孝哉, 坂井敦, 丸山基世, 岩崎宏俊, 宮川世志幸, 脇田亮, 深山治久, 鈴木秀典
2. 発表標題 一次感覚神経における超保存領域含有長鎖非コードRNAの神経障害性疼痛への関与
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井敦、伊藤孝哉、丸山基世、宮川世志幸、深山治久、鈴木秀典
2. 発表標題 神経障害性疼痛における一次感覚神経に発現するDRGXによるMMP-9発現調節
3. 学会等名 第42回日本疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井敦
2. 発表標題 細胞外非コードRNAの疼痛疾患治療への応用可能性
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井野佑佳、坂井敦、丸山基世、鈴木秀典、坂本篤裕
2. 発表標題 小児期の神経障害性疼痛抵抗性に着目した新規治療標的の探索
3. 学会等名 第68回日本麻酔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井熊優香、坂井敦、鈴木秀典、坂本篤裕
2. 発表標題 末梢感覚神経障害に対するバイオマーカーの探索を目指した細胞外マイクロRNAの解析
3. 学会等名 第68回日本麻酔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸山基世、坂井敦、福永津嵩、宮川世志幸、浜田道昭、鈴木秀典
2. 発表標題 一次感覚神経のNeat1 lncRNAは神経障害性疼痛におけるミクログリアの活性化に関する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂井 敦、井野佑佳、丸山基世、坂本篤裕、鈴木秀典
2. 発表標題 神経障害性疼痛における一次感覚神経のTSLPサイトカインの解析 Analysis of TSLP cytokine from primary sensory neurons in neuropathic pain
3. 学会等名 Neuro2022 第45回神経科学大会、第65回日本神経化学学会大会、第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂井 敦、井野佑佳、丸山基世、坂本篤裕、鈴木秀典
2. 発表標題 幼若期の神経障害性疼痛抵抗性の解析に基づく新規発症因子TSLPサイトカインの同定
3. 学会等名 第44回日本疼痛学会、第2回日本術後痛学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂井 敦、山田岳史、丸山基世、吉田 寛、鈴木 秀典
2. 発表標題 オキサリプラチン誘発性末梢神経傷害におけるバイオマーカー探索
3. 学会等名 2022年度生理学研究所研究会 痛み研究会2022 「痛みの統合的理解とその制御に向けて」
4. 発表年 2023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
研究分担者	齋藤 文仁  (SAITOW Fumihito)  (20360175)	日本医科大学・医学部・准教授   (32666)	
研究分担者	坂井 敦  (SAKAI Atsushi)  (30386156)	日本医科大学・医学部・講師   (32666)	
研究分担者	丸山 基世  (MARUYAMA Motoyo)  (60709757)	日本医科大学・医学部・助教   (32666)	

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