

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09455

研究課題名（和文）メッセンジャーRNA医薬を用いた神経障害性疼痛の新規治療開発

研究課題名（英文）Novel therapy for neuropathic pain model based on mRNA agents

研究代表者

平井 高志（Hirai, Takashi）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40510350

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）：マウス神経障害性疼痛モデルを作成、脊髄後角部を切り出し、RNAを抽出次世代シーケンサーによって網羅的に遺伝子発現変化を調査した。脊髄後角部に対するRNAseqで、患側とShamモデルにおいて発現に変化がみられたものは約70種類存在した。そのうちSNIモデルで発現上昇していたものは6遺伝子でありこれらをそれぞれ遺伝子A～Fと名付けた。遺伝子Aの発現量は、約8000倍もの差があり、有意に上昇していた。また、SNIモデルの健側と患側の比較でも、遺伝子Aの発現量は患側で2.8倍に増加していた。遺伝子B、FもSNIモデルの患側で有意に上昇していた。一方約60種類の遺伝子が発現減少していることも分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経障害が生じることで脊髄後角において患側では多くの遺伝子発現が低下することが分かったが、少数の遺伝子では劇的に発現が増加することが分かった。様々な神経障害モデルにおける共通の遺伝子変化を抽出し、メカニズムの原因を突き止めることができれば新たな治療標的として期待できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We created a mouse neuropathic pain model, excised the dorsal horn of the spinal cord, extracted RNA, and comprehensively investigated gene expression changes using a next-generation sequencer. Approximately 70 types of RNAseq for the dorsal horn of the spinal cord showed changes in expression between the affected side and the Sham model. Of these, 6 genes were upregulated in the SNI model, and these were named genes A to F, respectively. The expression level of gene A was significantly elevated with a difference of about 8000-fold. In addition, the expression level of gene A increased 2.8-fold on the affected side in a comparison of the unaffected side and the affected side in the SNI model. Genes B and F were also significantly elevated in the affected side of the SNI model. On the other hand, it was also found that the expression of about 60 kinds of genes was decreased.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：神経障害性疼痛 脊髄後角 RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

痛みは多くの人々が罹患し、日常生活の質が下がることが知られている。分類として炎症性疼痛、社会心理的疼痛、神経障害性疼痛に大きく分けられ、特に神経障害性疼痛は加齢とともにそのリスクが増加し、難治性疼痛へ移行することがあり既存の治療薬では効果が期待できないことが多い。そのためこれらの痛みに対する新たな治療を開発するために疼痛発症メカニズムを正しく把握することは重要である。

2. 研究の目的

今回の整形外科学で、難治性神経障害性疼痛モデルマウスも使用し、痛みを制御していると考えられる脊髄後角でどのような変化が生じているのかを次世代シーケンサーやPCRにより検証したので報告する。

3. 研究の方法

C57BL6/J 雌マウスを使用した。今回SNI (Spared nerve injury)モデルとして、脛骨神経、腓骨神経を切断し、腓腹神経は温存したモデルを作成した。一方でSham モデルとして、坐骨神経を露出させるまで展開し閉創を行ったモデルを作成した。【図1】その後、両モデルを行動観察の後、モデル作成3週後に安楽死処分し、マイクロダイセクション法を用いた。脊髄後角部を切り出し、RNAを抽出し次世代シーケンサーによって網羅的に遺伝子発現変化を調査した。本実験では、遺伝子の発現量を比較するためにFPKM (Fragments per kilobase of exon per million reads mapped)を用いた。本実験では、2つの仮説を立てて実験を行った。1つは一次求心性感覚神経の中継地点である脊髄後角部において、神経成長因子であるBDNF (Brain-derived neurotrophic factor) が疾患特異的に変化していること。もう1つは、脊髄後角部において特定の遺伝子の発現量が変化していることである。また、FPKMとは、転写産物の長さに依存されずに正規化された数値である。その値を用いて、神経損傷を起こした患側と健側比較、またSham手術群との比較、さらには神経損傷群腰髄と頸髄を比較した。【図2】この結果から特に発現変化が見られいくつかの遺伝子について定量PCRを行った。

4. 研究成果

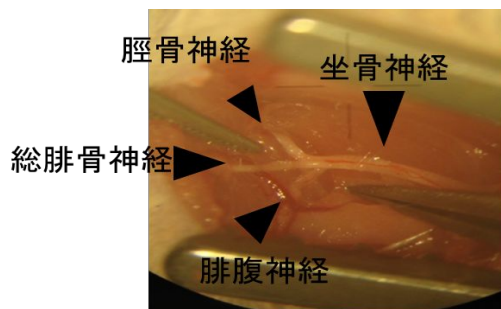
脊髄後角における可塑性変化をもたらすと考えられるBDNFの詳細なvariantを調査したが、疼痛時の特定のvariantパターンは見られなかった。【図3】次に特定遺伝子の発現量を比較した。脊髄後角部に対するRNAシーケンスで、SNIモデル患側とShamモデルにおいて発現に変化がみられたものは約70種類存在した。【図4】その中で特にSNIモデルで発現上昇していたものは6項目存在した。これらの遺伝子をそれぞれ遺伝子A~Fと名付けた。特に遺伝子Aの発現量は、約8000倍もの差があり、有意に上昇していた。また、SNIモデルの健側と患側の比較でも、遺伝子Aの発現量は患側で2.8倍に増加していた。さらに遺伝子B、FもSNIモデルの患側で有意に上昇していた。一方、SNIモデルで発現減少した約60種類の遺伝子の多くが、SNIモデルの患側でも同様に減少していることが分かった。上記の結果を踏まえて、遺伝子A、B、Fについて定量PCRによる追加実験を行った。RARシーケンスで用いた検体を使用し比較した。その結果、遺伝子Aでは1.22倍、遺伝子Bでは1.41倍、遺伝子Fでは1.14倍増加していた。有意な上昇がみられたのは遺伝子Bのみであった。【図5】脳海馬にみられる記憶の温存メカニズムが神経スパイン可塑性変化に関与することが知られており、シナプス後膜を形成するBDNFがこのメカニズムに関連していることが知られている。今回の結果から疼痛

モデルではBDNF の疾患特異的なパターンが見られなかったことから、SNI モデルの疼痛は脊髄シナプス後膜における構造変化によるものではないことが推察された。次に、遺伝子A、B、F に対するRNA-seq では発現量が有意に上昇していたが、定量PCR では遺伝子B 以外で発現量の上昇がみられなかった。実際には定量PCR はRNA-seq より信頼度が高いとされ、RNA-seq は不安定な実験方法である

ため、ウェスタンブロットなどでタンパク量を正しく測定する必要があると考えられる。以上の結果を踏まえ、遺伝子 A、B、F の生体内での役割を調査した。遺伝子 B は骨細胞外マトリックスの構成タンパク質をコードし、脊髄における役割は不明であり今後の調査が必要である。また、遺伝子 F は体性感覚における冷刺激受容体として存在すると考えられ、冷感刺激は疼痛と同義であるため説明可能であった。一方で遺伝子 A は、神経障害性疼痛を引き起こすメカニズムに綿密に関連している可能性が示唆された。遺伝子 A はポリアミン系に関連しており、ポリアミンが減少するとフィードバックにより遺伝子 A がコードする

Sadenosylmethioninedecarboxylase が上昇することが分かっている。そして、

Sadenosylmethioninedecarboxylase が上昇することで、Sadenosylmethionine(SAM)が減少し、S-adenosylhomocysteine(SAH)への系が不活化する。それによって生体内のメチル化が抑制され、異常メチル化が発生することが分かっている。ここで、神経障害性疼痛と異常メチル化には関連があることが分かっている。MCP-3 プロモーター領域を抑制するヒストン領域を異常メチル化させると、MCP-3 の発現が上昇する。MCP-3 は脊髄内ミクログリアを活性化するので、脊髄後角部が過敏になり、疼痛が発生するというメカニズムである。したがってもし遺伝子 A が、MCP-3 領域を制御するヒストンの異常メチル化を特異的に生じたとしたら、脊髄内ミクログリアを活性化することで神経障害性疼痛が発生する可能性がある。今後は、遺伝子 A の antagonist 投与やノックアウトマウスを用いての行動解析、脊髄後角部に対するウェスタンブロットを行い、神経障害性疼痛との関連をより詳細に検討することが期待される。



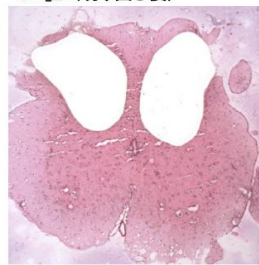
【図 1】 Spared nerve injury model の作成

神経障害
nerve
るために、
断し、純感
温存した。
て坐骨神経
た Sham モ

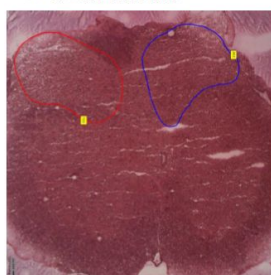
SNI_L1(切り出し前)



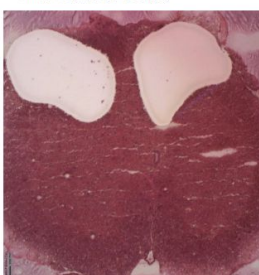
SNI_L1(切り出し後)



SNI_L2(切り出し前)



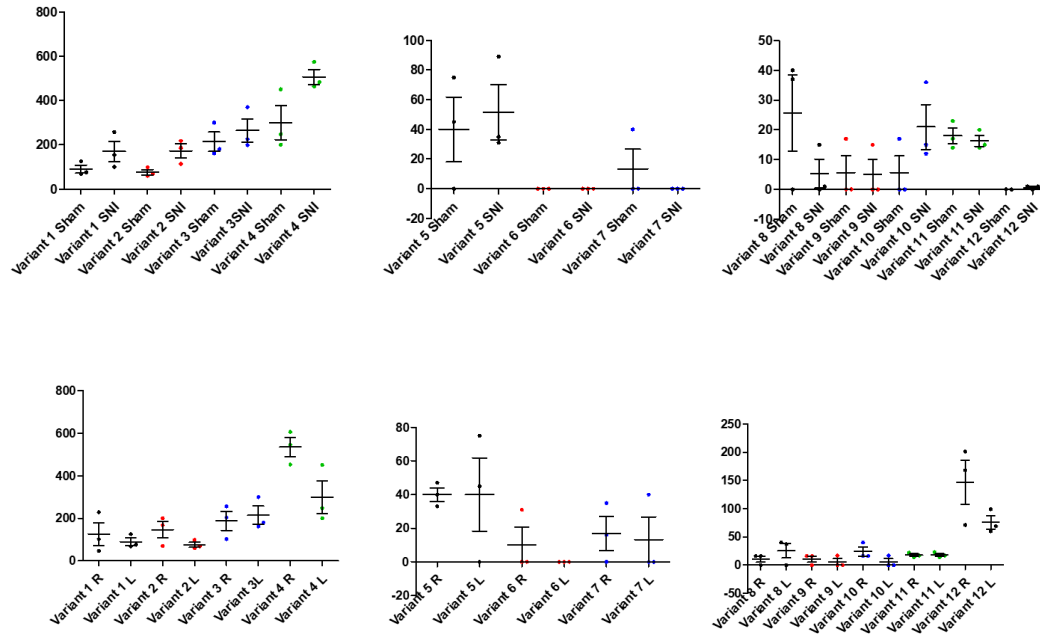
SNI_L2(切り出し後)



性疼痛モデル (Spared
injury model) を作成す
脛骨神経と腓骨神経を切
覚神経である腓腹神経は
また、コントロールとし
を露出しそのまま閉創し
デルも作成した。

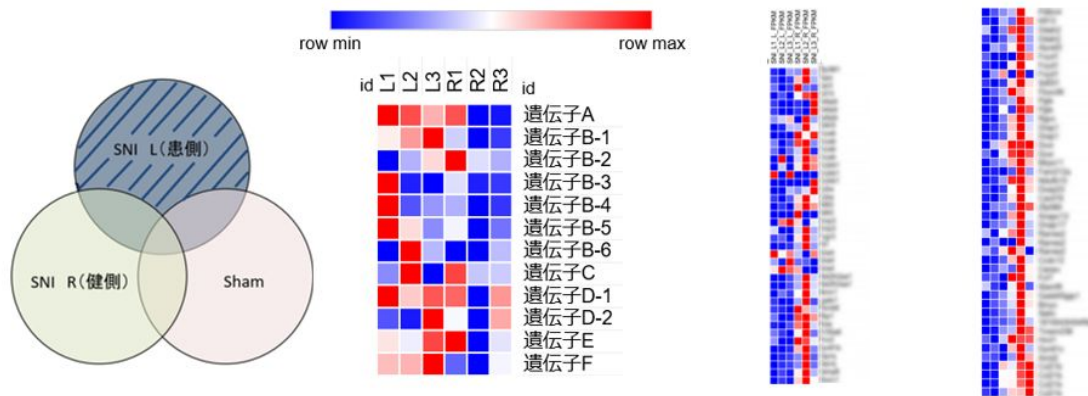
【図2】RNA-seqにおける脊髄後角部の切り出し

SNIモデルとShamモデルの両側脊髄後角部の遺伝子発現を調査するため、レーザーキヤプチャーによるマイクロダイセクション法を用いて行った。



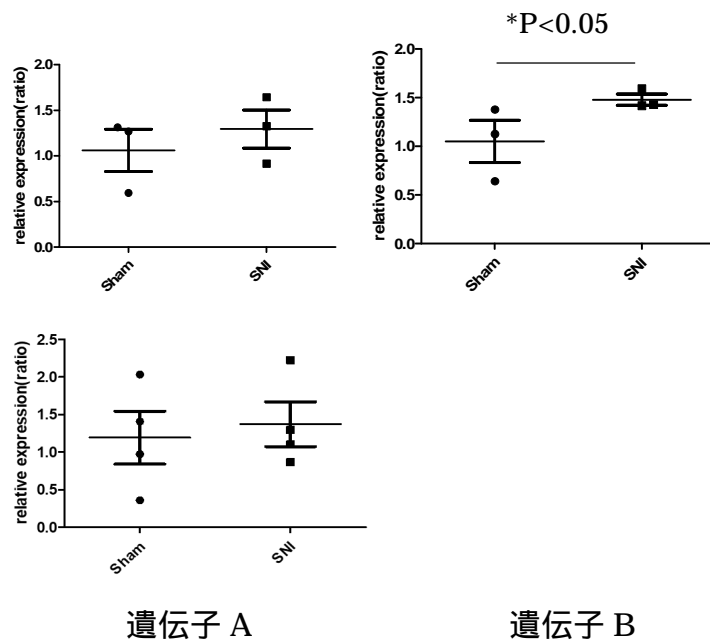
【図3】RNA-seq解析の結果 No.1

神経成長因子であるBDNFが疾患特異的に変化していたかを表すグラフである。上段がShamとSNIの患側を比較したグラフで、下段がSNIの健側と患側を比較したグラフである。同一のvariantについて変化の仕方を見ると、上段と下段で同様の変化を示しているvariantは存在しなかった。



【図4】RNA-seq解析の結果 No.2

遺伝子発現に変化のあったものをまとめたヒートマップである。左がSNIとShamを比較して、SNIで上昇していた遺伝子群、右が減少していた遺伝子群である。各々の群でSNIの患側と健側で比較したところ、遺伝子A、B、FはSNIの患側でも同様に上昇していた。減少群はそのほとんどがSNI患側で減少していた。



【図 5】 定量 PCR 結果

遺伝子 A、B、F について定量 PCR を行った結果のグラフである。遺伝子 A は 1.22 倍、遺伝子 B は 1.41 倍、遺伝子 F は 1.14 倍の変化があった。有意差があったものは遺伝子 B のみであった。

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 5.Yokoyama H., Hirai T., Nagata T., Enomoto M., Kaburagi H. Li L., Motoyoshi T., Yoshii T., Okawa A., & Yokota T.	4. 巻 20;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 J. Pain Res.	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. eCollection 2020.	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5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平井高志
2. 発表標題 頰椎疾患による神経障害性疼痛の治療の実際
3. 学会等名 Pain Live Symposium in Shiga（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井高志
2. 発表標題 頰椎・腰椎疾患の神経障害性疼痛の診断と治療
3. 学会等名 Pain Live Symposium in 奈良（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Su Chen 横山裕之 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 平井高志
2. 発表標題 整形外科領域における難渋する痛みの病態と治療法
3. 学会等名 第23回 浅草医学会（招待講演）
4. 発表年 2020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

〔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	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	吉井 俊貴 (Yoshii Toshitaka) (50583754)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	
研究分担者	位高 啓史 (Itaka Keiji) (60292926)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授 (12602)	

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