

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08936

研究課題名（和文）非コードRNAスプライスバリエントを標的とした新規鎮痛戦略の探索

研究課題名（英文）Exploration of novel analgesic strategies targeting non-coding RNA splice variants

研究代表者

丸山 基世（Maruyama, Motoyo）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60709757

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）：我々は神経機能に重要な特定の遺伝子の選択的スプライシングにより産生される宿主遺伝子のタンパク質をコードしていないスプライスバリエント（lncRNA-SV）が一次感覚神経において末梢神経傷害により劇的に発現変化することを見出した。さらに、lncRNA-SVの一次感覚神経特異的な発現抑制は痛覚過敏を誘発した一方で、lncRNA-SVの過剰発現により神経障害性疼痛モデル動物に対する鎮痛作用が得られ、lncRNA-SVは宿主遺伝子とは真逆の疼痛抑制作用を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

200塩基以上の長さを持つlncRNAはタンパク質をコードするmRNAよりも多くの種類が存在するにもかかわらず、未だその大半の機能が未知である。本研究成果は今までにほとんどその機能的意義が検討されていなかった、コード遺伝子から選択的スプライシングにより産生されるlncRNA-SVが宿主遺伝子とは真逆の疼痛抑制作用を有し、宿主遺伝子とは異なる独自の機能を介して鎮痛作用を発揮している可能性を見出した。これにより、より包括的な疼痛の分子基盤の理解の一助となり、選択的スプライシングを標的とした核酸医薬による新たな鎮痛戦略開発に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：We found that nonprotein-coding splice variant (lncRNA-SV), which are produced by alternative splicing of specific genes important for neural function, are dramatically upregulated in primary sensory neurons following peripheral nerve injury. Furthermore, specific suppression of lncRNA-SV expression in primary sensory neurons induced hyperalgesia, whereas overexpression of lncRNA-SV attenuated pain in neuropathic pain model animals, demonstrating that lncRNA-SV has a pain-suppressing effect that is the exact opposite of that of the host gene.

研究分野：神経薬理学・実験動物学

キーワード：神経障害性疼痛 lncRNA 選択的スプライシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一次感覚神経はがんや一部抗がん薬、虚血性障害、外傷など非常に様々な要因によって障害されることで、慢性の難治性疼痛である神経障害性疼痛の発症へとつながる。このような疼痛は非常に苦痛を伴うのみでなく、原疾患の治療に対する妨げにもなるが、未だ十分な治療法はない。そのため、全く新しい概念の導入による新規治療標的の同定が期待される。

非コード RNA はタンパク質をコードしないが、機能性 RNA としてあらゆる生命機能に深く関わり、様々な疾患で重要な役割を担うことが明らかにされてきている。中でも、200 塩基以上の長さを持つ長鎖非コード RNA (lncRNA) はタンパク質をコードする mRNA よりも多くの種類が存在するにもかかわらず、未だその大半の機能が未知である。lncRNA の産生様式は様々であるが、タンパク質をコードする遺伝子のアンチセンス方向やエンハンサー領域あるいはコード遺伝子間のゲノム領域等から産生される lncRNA に対し、コード遺伝子から選択的スプライシングにより産生される lncRNA の機能的意義はほとんど検討されていない。我々は神経機能に重要な遺伝子の選択的スプライシングにより産生されるスプライシングバリエント (lncRNA-SV) が一次感覚神経の核膜周辺に豊富に発現し、末梢神経傷害により劇的に発現低下することを見出した。一般的に lncRNA はコード遺伝子と比較して発現量が低いものが多いが、この lncRNA-SV は一部にイントロン配列を保持し、タンパク質への翻訳に重要なポリ A 鎖を有していないにもかかわらず、ホスト遺伝子に匹敵する量を示していた。さらに、lncRNA-SV はヒト、マウス、ラット間において 200 塩基以上にわたって塩基配列が完全に一致したゲノム領域として定義される“超保存領域”を含んでおり、非常に高い種保存性を保持していることから機能的な重要性やヒトへの応用可能性が強く示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、lncRNA-SV の神経障害性疼痛における寄与を明らかにし、その疼痛調節機構を探索することで、新たな神経障害性疼痛の治療戦略の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛 (SNL) モデルの作製

全ての動物実験は日本医科大学動物実験委員会の審査および学長承認の下 (承認番号: 2020-042)、国際疼痛学会に推奨されたガイドライン (Zimmermann, Pain 1983) に従って実施した。

雄性の Sprague-Dawley ラット (7-8 週齢) を実験に使用した。イソフルラン麻酔下 (2-3%) で左側の第 5 腰髄 (L5) 神経を 1 mm 間隔で 2 か所結紮する脊髄神経結紮 (spinal nerve ligation; SNL) を施し、結紮していない右側を対照とした。

(2) 行動テスト

後肢足底への機械的刺激に対する逃避行動閾値は von Frey 線維 (室町機械) を用いて、熱刺激に対する逃避行動潜時は Plantar test (Ugo Basile) を用いて測定し、神経障害によって誘発される痛みの程度を評価した。

(3) RNA シーケンス

L5 の後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) から RNAiso Plus (Takara) を用いて total RNA を抽出した。ポリアデニル化 RNA ライブラリーは TruSeq Stranded mRNA LT sample Prep Kit (Illumina) を用いて調製した。シーケンスは Illumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing system により実施した (150 bp ペアエンドリード)。得られたリードは Rattus norvegicus UCSC rn5 reference genome にマッピングし、RNA-Seq Alignment v1.0 (Illumina) を用いて転写産物に構築した。FPKM 値は Cufflinks Assembly & DE v2.0 (Illumina) により計算した。

一次感覚神経における lncRNA-SV の機能を予測するために、RNA シーケンスのデータから得られた Differentially expressed genes を Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Qiagen K.K.) にて解析した。

(4) 定量的 PCR

Total RNA は iScript Select cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) を用いてランダムプライマーにより逆転写した。lncRNA-SV に対する特異的なプライマーセットを用いて Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) により定量的 PCR を行った。

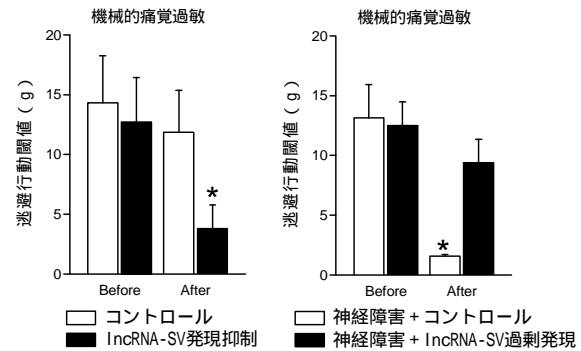
(5) アデノ随伴ウイルスベクターの作製

一次感覚神経において特異的に lncRNA-SV の発現抑制または過剰発現を誘導するために、lncRNA-SV に対する short hairpin RNA または lncRNA-SV の全長を組み込んだ血清型 6 のアデノ随伴ウイルス (adeno-associated virus; AAV) ベクターを作製した。AAV ベクターを SNL 施術の 7 日前もしくは健常ラットの L5 DRG に直接注入した。

4. 研究成果

(1) lncRNA-SV の疼痛への関与の検討

lncRNA-SV の一次感覚神経特異的な発現抑制は健常ラットにおいて痛覚過敏を誘発した。ホスト遺伝子は疼痛を引き起こすことが報告されており、lncRNA-SV はホスト遺伝子とは真逆の疼痛抑制作用を有することが明らかとなった。一方で、lncRNA-SV の過剰発現は神経障害性疼痛モデル動物の疼痛を減弱させた(右図)。この際、lncRNA-SV による鎮痛作用は、ホスト遺伝子の発現増加を伴っていたことから、ホスト遺伝子とは異なる独自の機能を介して鎮痛作用を発揮している可能性が示された。



(2) lncRNA-SV の作動メカニズムの解析

(1)において、一次感覚神経特異的な lncRNA-SV の発現操作を行った動物の一次感覚神経における遺伝子発現変化を RNA シーケンスを用いて網羅的に解析し、パイオインフォマティクスにより lncRNA-SV が関わるシグナル経路や細胞機能を明らかにした。また、lncRNA-SV による遺伝子発現変化を仲介する可能性のある転写調節因子等を同定した。これにより、lncRNA-SV の生成メカニズム同定のための情報が得られ、疼痛抑制 lncRNA-SV の発現を増加させる splicing switching oligonucleotide の設計のための足掛かりとなった。

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 Maruyama M, Sakai A, Fukunaga T, Miyagawa Y, Okada T, Hamada M, Suzuki H	4. 巻 14
2. 論文標題 Neat1 lncRNA organizes the inflammatory gene expressions in the dorsal root ganglion in neuropathic pain caused by nerve injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1185322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1185322	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0件

〔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	坂井 敦 (Sakai Atsushi) (30386156)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	
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)	

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