

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390300

研究課題名(和文)慢性疼痛発現におけるエピジェネティクス制御機構の網羅的解析

研究課題名(英文)Multiple analyses of epigenetics modification under neuropathic pain

研究代表者

成田 年(Narita, Minoru)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40318613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円、(間接経費) 3,510,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛は適切な初期治療戦略を見出せない場合において、長期的な遺伝子変動を伴った難治性の疾患となる。近年、様々な孤発性難治疾患の発現メカニズムとしてゲノムに書かれた遺伝情報が変更されることなく、個体発生や細胞分化の過程において遺伝子発現が制御される、いわゆる「エピジェネティクス」現象が注目されるようになってきている。本研究では、慢性疼痛におけるエピジェネティクス修飾の網羅的解析を行うことで、エピジェネティクス修飾による細胞の長期的基質変化が慢性疼痛の発現に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Clinically, it is well-known that chronic pain induces depression, anxiety, and reduced quality of life. Neuropathic pain, which is characterized by spontaneous burning pain, hyperalgesia and allodynia is the most difficult pain to manage in the pain clinic. However, the complicated pathophysiology of the neuropathic pain is not yet understood. A better understanding of its pathophysiology has given us more insight into its various mechanisms and possible treatment options. In this study, chronic pain-induced epigenetic changes in cellular function was focused to explain the pain-induced synaptic plasticity and cell memory. For global understanding of the pain, it is necessary to analyze the correlation between these temporal parameters and phenomics.

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：エピジェネティクス 慢性疼痛 脊髄 ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

これまでの基礎研究によって慢性疼痛とともに運動する数多くの脊髄内分子が発見されているものの、これらの研究報告の多くは、特定分子を標的とした、いわばエンドポイント解析(注釈エンドポイント解析とは最終的なエンドポイントを作業仮説に基づき自分で設定し、検討する方法であり、客観的、網羅的な解析とは異なる)が中心であり、そのパスウェイ解析も手短なアプローチに終息することが多く、時系列を追った網羅的な解析はあまり見受けられない。特に痛みによる長期的変動の“スイッチ ON”機構はほとんど明確になっておらず、また、“スイッチ OFF”機構については、議論さえ、されていない。それゆえに、『現象』の一面や『対処療法』は提示できても、“スイッチ OFF”機構に根ざした根本的治療指針を提示することは困難であった。

一方、近年、様々な孤発性難治疾患の発現メカニズムとしてゲノムに書かれた遺伝情報が変更されることなく、個体発生や細胞分化の過程において遺伝子発現が制御される、いわゆる「エピジェネティクス」現象が注目されるようになってきている(Torres-Padilla et al. *Nature*, 445, 214-218, 2007)。エピジェネティクスの機構としてDNAメチル化やヒストン修飾等が挙げられ、これらの変化は遺伝子機能に長期的な影響を与え、細胞を正常な(健全な)状態に維持することを困難とする。これまでに慢性疼痛におけるエピジェネティクス制御に関する研究報告はほとんどないが、痛みの慢性化のメカニズムには、脊髄後角における知覚入力 of 長期的増感(中枢感作)が関与していることが明らかとなっている(Kim et al. *J. Neurosci.*, 29, 10000-10009, 2009, Pernía-Andrade et al. *Science*, 325, 760-764, 2009)ことから、エピジェネティクス修飾による細胞の長期的基質変化が慢性疼痛の発現に寄与する可能性は極めて高いと考えられる。そこで本研究では、新規のアプローチとして慢性疼痛におけるエピジェネティクス修飾の網羅的解析を行う。

2. 研究の目的

ゲノムからタンパク質の発現は一連の遺伝子発現システムにより制御されている。そのもっとも重要な工程は、ゲノムDNAからmRNAを合成する転写反応である。DNAマイクロアレイはゲノムスケールで全ての遺伝子の発現情報を同時に知るといふ、いわゆるトランスクリプトーム解析を可能とした。DNAマイクロアレイの基本的な原理は、ハイブリダイゼーション法による核酸の検出に基づいており、それをマイクロ化したものである。そこで本研究では、まず神経障害性疼痛をはじめとした慢性疼痛モデル動物を作製し、脊髄を摘出してDNAマイクロアレイ法に従い、約39,000の遺伝子群から、慢

性疼痛時の脊髄における網羅的なmRNA発現解析ならびにパスウェイ解析を行う。

一方、こうした遺伝子プロファイルの最大の問題点は、測定精度の明確な判定基準がないことである。そこで本研究では、DNAアレイ解析をもとに、変動が大きかった分子を抽出し、定量的PCR法に準じて標的分子の発現変化の時系列を追って調べていく。さらにはこうした発現遺伝子の長期的変動の“スイッチ ON”および“スイッチ OFF”機構を探索する目的で、標的遺伝子のDNAメチル化やヒストン修飾等のエピジェネティクス修飾機構を解析していく。一般に哺乳類ではDNAのメチル化はシトシン-グアニン(CpG)配列のシトシンのみに起こる修飾であり、遺伝子発現抑制やヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たしている。ゲノム中のCpG配列の出現頻度は低い、局所的にCpGが集中したCpGアイランドと呼ばれる領域が存在し、プロモーター領域に多く認められる。この領域がメチル化されると遺伝子発現は強く抑制される。プロモーター領域以外においては、セントロメア近傍やトランスポゾンなど非翻訳領域のCpG配列の大部分は恒常的にメチル化されており、構成的ヘテロクロマチンに封入されている。DNAメチル化による転写制御機構として、プロモーター領域におけるDNAメチル化による転写因子の結合阻害を介した転写抑制や、methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) や methyl DNA-binding domain (MBD) といったDNAメチル化依存性のDNA結合タンパク質を含む複合体による転写調節機構が明らかにされている(Wolffe et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 5894-5896, 1999, Nan et al. *Cell*, 88, 471-481, 1997)。こうしたDNAメチル化のプロファイリングをすることにより、慢性疼痛時の中枢性可塑的变化における特定分子のDNAメチル化に伴った長期的なゲノム修飾の有無について言及する。また、ヒストンの翻訳後修飾(アセチル化、リン酸化、メチル化など)の組み合わせが、転写・複製・修復、細胞分裂などのゲノム動態と関連していることが明らかになっている。これをヒストンコード、あるいは、DNAのメチル化と合わせてエピジェネティックコードと呼ぶ。エピジェネティクスの機構は、DNAおよびタンパク質の修飾酵素による印付け、特異的な認識タンパク質の印付けへの結合、タンパク質複合体のリクルートによるクロマチン形成、という基本的なメカニズムで働いている。転写が活発な遺伝子は、ヒストン(H3K4、H3K9、H3K14、H3K18、H3K23、H3K27)の高アセチル化、H3K4のメチル化、H3S10のリン酸化などが見られる(Tsankova et al. *Nat. Rev. Neurosci.*, 8, 355-367, 2007)。一方、DNAの高メチル化、ヒストンの低アセチル化、H3K9およびH3K27のメチル化は遺伝子転写の抑制状態を示す。このようにヒストンの翻訳後修飾を

網羅的に解析していくことによって、慢性的な痛み刺激が、ゲノムワイドに長期的な変動を引き起こす可能性の有無を提示していくことを目的とする。

3. 研究の方法

平成 22 年度

慢性疼痛モデル動物を作製し、脊髄後根神経節あるいは脊髄を採取して DNA マイクロアレイ法に従い、発現遺伝子変化を網羅的に解析した。

実験には ICR マウスあるいは C57BL/6 マウスを使用し、坐骨神経を結紮して作製する慢性疼痛モデルを使用した。熱刺激に対する痛覚過敏反応の測定は、足底熱刺激法を用いて評価し、機械刺激に対するアロディニアの測定は、von Frey フィラメント法に準じ評価を行った。慢性疼痛モデルにおいて疼痛閾値がピークあるいは閾値変化が安定した時期を何点か抽出して、慢性疼痛モデルにおける疼痛関連部位の脊髄後根神経節ならびに脊髄を摘出して、DNA マイクロアレイ用に DNA サンプルを作製した。その後、DNA マイクロアレイ法に準じ、約 39,000 の遺伝子群から、慢性疼痛時に変化する遺伝子を網羅的に解析した。

平成 23 年度

DNA マイクロアレイ法から得られた知見をもとに、各変動遺伝子の定量的解析を real-time PCR 法に従って行った。Real-time PCR 法によって確認された変動発現遺伝子のエピジェネティクス修飾を解析するために、標的 DNA のメチル化を検討した。DNA メチル化解析には、重亜硫酸塩による塩基置換反応 (bisulfite-mediated conversion) を用いた。また、標的 DNA のヒストン修飾についても検討した。ヒストン修飾を解析するためにそれぞれのヒストン修飾抗体を用いて、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、その後、PCR や DNA アレイを行うことで、特定の遺伝子のヒストン修飾の変化を解析した。

平成 24 年度

ヒストンのメチル化などを修飾するエンハンサーやコ・リプレッサーの発現変化ならびにヒストン修飾因子の発現を調節する non-coding RNA である microRNA (microRNA) の発現変化を網羅的に解析した。

全ゲノム中の non-coding RNA 領域の割合は、生物の複雑性を伴って増大し、ヒトで最大 98%にも及ぶ。近年 RNA 干渉が発見されたことにより、小さな non-coding RNA である microRNA(miRNA)に注目が集まり、すでに1000種類近くのmiRNAがデータベース化されている。ゲノム上に数百~1,000近く存在するmiRNA遺伝子は、それぞれ特有のプロモーターを有し、RNAポリメラーゼIIによって転写される。その中には、複数のmiRNA遺伝子がクラスターを形成する。

初期転写産物は数百~数千ヌクレオチドの primary miRNA として転写され、Drosha を含むマイクロプロセッサーと呼ばれる複合体によって切断され約 60~100 ヌクレオチドの precursor-miRNA となる。その後 Dicer によって miRNA duplex となり、機能性 RNA 分子として働く成熟 miRNA 鎖が RNA-induced silencing complex (RISC) に取り込まれ、miRNA 分子に基づく遺伝子発現抑制が惹起される (Carthew & Sontheimer, Cell, 136, 642-655, 2009)。近年、miRNA はヒストン修飾や DNA メチル化に関連することが明らかにされている。miRNA による転写抑制により DNA メチル化が誘発され、ヒストン H3K9 のメチル化と関連してヘテロクロマチン形成が引き起こる。こうした事実は、miRNA がヒストン修飾や DNA メチル化をさらに上位で調節する因子として機能していることを示すものである。本研究では、慢性疼痛モデルの脊髄および脊髄後根神経節における miRNA をはじめとしたヒストン修飾因子の発現を real-time PCR 法に従って解析した。

平成 25 年度

最終的に得られた慢性疼痛時で変動する遺伝子群のデータをもとに、それらの遺伝子に連動する蛋白質の機能を促進あるいは阻害する薬剤を脊髄内へ直接投与し、痛みシグナルの上行性経路の活性化を functional MRI (fMRI) 法に従い、可視化した。

これまで申請者らは、フロインドアジュバンドを右側後肢足蹠皮下に投与して作製した慢性炎症性疼痛動物モデルにおいて麻酔下で fMRI 法に従い画像解析を行い、視床、帯状回ならびに一次体性感覚野領域といった痛みの伝達経路の活性化が引き起こされることを明らかにしている (Taketa Y et al., Anesthesiology, 112, 418-431, 2010)。そこで本研究では、慢性疼痛時で変動する遺伝子群のデータをもとに、それらの遺伝子に連動する蛋白質の機能を促進あるいは阻害する薬剤を脊髄内へ直接投与し、痛みシグナルの上行性経路の活性化を fMRI 法に従い、可視化した。

4. 研究成果

平成 23 年度

慢性疼痛モデル (Seltzer モデル) 動物を作製し、脊髄後根神経節あるいは脊髄を採取して行った DNA マイクロアレイ法に従い、網羅的に遺伝子発現変化について解析を行った。その結果、MCP-3 をはじめとするやケモカインを中心とする遺伝子群の変動が同定された。DNA マイクロアレイ法から得られた知見をもとに、各変動遺伝子の定量的解析は、real-time PCR 法を用いて行った。Real-time PCR 法によって発現変動の確認された遺伝子についてエピジェネティクス修飾を解析した。DNA メチル化解析には、重亜硫酸塩による塩基置換反応

(bisulfite-mediated conversion) を応用した bisulfite MSP (methylation-specific PCR) 法を使用し検討を行った。その結果、慢性疼痛モデルマウスの脊髄においては DNA メチル化の変化は認められなかった。さらに、標的 DNA のヒストン修飾を解析するためにそれぞれのヒストン修飾抗体を用いて、クロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、DNA マイクロアレイ法および real-time PCR の結果をもとに、ChIP on PCR を行った。その結果、MCP-3 遺伝子の転写開始点直上において、抑制性のヒストン修飾である H3K27 トリメチル化の低下が認められた。

平成 24 年度

末梢神経障害による中枢のエピジェネティクス変化という視点から痛み病態の統合的解析を行った。平成 23 年度の研究により、神経障害性疼痛下の脊髄領域において MCP-3 のプロモーターにおける転写活性を抑制的に制御する H3K27 トリメチル化の抑制、つまり転写活性の増強が引き起こされていることを明らかにしていたが、さらなる解析を進め、IL-6 欠損マウスを用いてエピジェネティクス変動を解析したところ、MCP-3 mRNA の発現誘導ならびに H3K27 トリメチル化の抑制は消失した。このことから、こうした反応が IL-6 依存的であると考えられる。さらに、脊髄内で発現上昇した MCP-3 の局在を検討した結果、坐骨神経結紮により増加した MCP-3 タンパク質は、GFAP 陽性アストロサイト細胞上においてのみ発現していた。一方、MCP-3 の機能を検討する目的で、MCP-3 リコンビナントタンパクを髄腔内投与すると、熱痛覚過敏反応やアロディニア反応が認められた。また、fMRI を用いた検討では、視床外側核、一次体性感覚野領域において脳機能の活性化が認められた。これらの結果から、末梢神経障害時の脊髄内アストロサイトにおいて IL-6 依存的にヒストン修飾の変化を伴った MCP-3 の長期的な産生が誘導され、疼痛の維持または悪化に寄与していると考えられる。

平成 25 年度

平成 24 年度において、脊髄内で発現上昇した MCP-3 タンパク質は、GFAP 陽性アストロサイト細胞上においてのみ発現していることが明らかとなったため、マウスの脊髄組織を MACS を用いて cell sorting し、得られたアストロサイト分画を用いてさらなる検討を行った。その結果、MCP-3 の発現増加はアストロサイト分画で引き起こされていることが確認された。

一方、神経障害性疼痛下における miRNA の発現変化について検討を試みた。神経障害性疼痛下の脊髄における miRNA 発現変動について網羅的に解析を行った結果、著明な発現変動が認められた数種の miRNA を確認した。さらに脊髄後根神経節における miRNA および神経障害性疼痛モデルマウスの血液

からエクソソームを抽出し、分泌型 miRNA の変化を検討した。その結果、脊髄後根神経節において発現増加が認められた数種の miRNA が、血中エクソソームにおいても著明に増加していた。以上の結果から miRNA はエクソソームに内包されて血中に分泌され身体中に循環している可能性が示唆された。こうした結果より血中エクソソーム内で発現変動を示す miRNA は神経障害性疼痛のバイオマーカーとなりうる可能性が考えられる。

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 48 件)

・ Yamashita A, Hamada A, Suhara Y, Kawabe R, Yanase M, Kuzumaki N, Narita M, Matsui R, Okano H, Narita M: Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain. *Synapse*, **68**, 235-47 (2014)

・ Odo M, Koh K, Takada T, Yamashita A, Narita M, Kuzumaki N, Ikegami D, Sakai H, Iseki M, Inada E, Narita M: Changes in circadian rhythm for mRNA expression of melatonin 1A and 1B receptors in the hypothalamus under a neuropathic pain-like state. *Synapse*, **68**, 253-8 (2014)

・ Ito H, Yanase M, Yamashita A, Kitabatake C, Hamada A, Suhara Y, Narita M, Ikegami D, Sakai H, Yamazaki M, Narita M: Analysis of sleep disorders under pain using an optogenetic tool: possible involvement of the activation of dorsal raphe nucleus-serotonergic neurons. *Mol Brain*, **6**, 59 (2013)

・ Imai S, Ikegami D, Yamashita A, Shimizu T, Narita M, Niikura K, Furuya M, Kobayashi Y, Miyashita K, Okutsu D, Kato A, Nakamura A, Araki A, Omi K, Nakamura M, James Okano H, Okano H, Ando T, Takeshima H, Ushijima T, Kuzumaki N, Suzuki T, Narita M: Epigenetic transcriptional activation of monocyte chemotactic protein 3 contributes to long-lasting neuropathic pain. *Brain*, **136**, 828-43 (2013)

・ Takada T, Yamashita A, Date A, Yanase M, Suhara Y, Hamada A, Sakai H, Ikegami D, Iseki M, Inada E, Narita M: Changes in the circadian rhythm of mRNA expression for μ -opioid receptors in the periaqueductal gray under a neuropathic pain-like state. *Synapse*, **67**, 216-23 (2013)

・ Torigoe K, Nakahara K, Rahmadi M, Yoshizawa K, Horiuchi H, Hirayama S, Imai S, Kuzumaki N, Itoh T, Yamashita A, Shakunaga K, Yamasaki M, Nagase H, Matoba M, Suzuki T, Narita M: Usefulness of olanzapine as an adjunct to opioid treatment and for the treatment of neuropathic pain. *Anesthesiology*, **116**, 159-69. (2012)

・ Enomoto T, Yamashita A, Torigoe K, Horiuchi H, Hirayama S, Nakahara K, Yanase M, Sakai H,

Ikegami D, Nagase H, Suzuki T, Iseki M, Inada E, Narita M. Effects of mirtazapine on sleep disturbance under neuropathic pain-like state. Synapse. 66, 483-8. (2012)

・ Imai S, Saeki M, Yanase M, Horiuchi H, Abe M, Narita M, Kuzumaki N, Suzuki T, and Narita M: Change in microRNAs associated with neuronal adaptive responses in the nucleus accumbens under neuropathic pain. Journal of Neuroscience, 31,15294-15299 (2011)

・ Narita M, Niikura K, Nanjo-Niikura K, Narita M, Furuya M, Yamashita A, Saeki M, Matsushima Y, Imai S, Shimizu T, Asato M, Kuzumaki N, Okutsu D, Miyoshi K, Suzuki M, Tsukiyama Y, Konno M, Yomiya K, Matoba M and Suzuki T: Sleep disturbances in a neuropathic pain-like condition in the mouse are associated with altered GABAergic transmission in the cingulate cortex. Pain, 152,1358-72 (2011)

・ Taketa Y, Niikura K, Kobayashi Y, Furuya M, Shimizu T, Narita M, Imai S, Kuzumaki N, Maitani Y, Yamazaki M, Inada E, Iseki M, Suzuki T and Narita M: Direct evidence for the ongoing brain activation by enhanced dynorphinergic system in the spinal cord under inflammatory noxious stimuli. Anesthesiology, 112, 418-431 (2010)

他 38 報 (総説を含む)

〔学会発表〕(計 93 件)

招待講演

International Narcotics Research Conference(INRC) Annual Meeting 2013, 2013 年 7 月 14-19 日, Cairns, Australia, Chronic Nociceptive stimuli negatively control the mesolimbic dopaminergic transmission, Narita, M., Yamashita, A.

第 5 回 宮城県痛みを考える会、2012 年 6 月 30 日、仙台、“痛みの記憶”と“痛みストレス”の統合的理解、成田 年

第 3 回 福島県痛みを考える会、2012 年 5 月 12 日、福島、痛みの多次元解析：“痛み記憶”の解釈、成田 年

他、シンポジウム 14 回、一般演題 79

〔図書〕(計 1 件)

分子病態薬理学 II 痛みの病態と治療、そして緩和医療、成田 年、酒井寛泰、池上大悟 京都廣川書店, 2013