

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659295

研究課題名(和文) 神経因性疼痛における神経選択的スプライシングを標的とした発症機序解明

研究課題名(英文) Study of the neuron-specific alternative splicing in neuropathic pain

研究代表者

下條 正仁 (SHIMOJO, Masahito)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：90591925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：神経因性疼痛は多くの人を抱えている深刻な問題であるが、その発症機序は不明な点が多く有効な治療法が少ない。神経因性疼痛発症モデルでは、神経特異的抑制転写因子REST (RE1-Silencing Transcription factor) の神経特異的アイソフォームREST4が増加していること、さらに選択的スプライシングに関与するnSR100の発現が高くなっているデータを得た。このREST4の発現により、疼痛発症と関係する遺伝子発現と疼痛発症の関連が示唆された。RESTに制御を受ける遺伝子発現(PACAP等)を詳細に調べることは、神経因性疼痛の新たな発症機序解明につながることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiological mechanism for neuropathic pain, one of the most common types of intractable pain, remains largely unknown. Neuropeptide pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP), which is distributed in the dorsal root ganglia (DRG) and dorsal horn, is required for the development of spinal sensitization and induction of neuropathic pain. Using an L5-sciatic nerve transection mouse model, we found that following nerve injury PACAP mRNA increased in the DRG. REST4, a neuron-specific splicing isoform of REST produced by the neural-specific SR-related protein of 100 kDa (nSR100) and nSR100 itself also increased. This study shows that PACAP expression in the DRG after nerve injury is controlled by REST4, which is produced by nSR100-dependent alternative splicing of the REST gene. We suggest that elucidation of the detailed mechanism of PACAP up-regulation will lead to a viable target for the treatment of neuropathic pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：神経障害性疼痛 転写因子 スプライシング

### 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は世界中の多くの人を抱えている問題であるが、その発症機序は不明な点が多い。これまでに、神経損傷により種々の神経遺伝子の発現が上昇しているとの報告があるがその機序については不明な点が多い。

RESTは9個のジンクフィンガードメインを含む転写抑制因子であり、1300以上の神経系遺伝子を転写抑制することが報告されている。最近、RESTはnSR100による神経選択的スプライシングにより神経特異的アイソフォームREST4が合成される事が報告された。申請者は、神経因性疼痛モデルマウスではREST4とnSR100が高発現しており、さらにPACAPがREST4により発現調節されている可能性を示すデータを得ている。

### 2. 研究の目的

神経因性疼痛は世界中の多くの人を抱えている深刻な問題であるが、その発症機序は不明な点が多く、有効な治療法が少ない。昨年日本でも認可された神経因性疼痛の治療薬であるプレガバリンにおいても、Ca<sup>2+</sup>チャンネルサブユニットを標的としているが、その機序については依然不明な点が多い。最近、申請者は、PACAPが神経特異的抑制転写因子REST (RE1-Silencing Transcription factor) に発現調節されていること、神経因性疼痛モデルでは神経特異的アイソフォームREST4が増加している研究結果を得ていること、さらにREST4はnSR100による神経選択的スプライシングで合成されるが、神経因性疼痛モデルではnSR100の発現が高くなっているデータを得ている。本研究では、PACAPとREST4/REST、nSR100の関与を明らかとし、神経因性疼痛の発症機序を解明することを目的とした。神経因性疼痛モデルマウス(L5-SNT)を作製し、REST/REST4とその発現を調節するnSR100、さらにPACAP発現を遺伝子レベルとタンパク質レベルで詳細に解析し、疼痛の発症機序解明を目的とした。神経損傷時に発現するREST、REST4およびそれらの神経選択的スプライシングに機能するnSR100が、RE1を有する遺伝子発現(PACAP等)に関与することを詳細に調べることは神経因性疼痛の新たな発症機序解明につながる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 神経因性疼痛モデルマウス (L5-SNT) の作製

6週齢C57BL/6マウス(20-25g)より、既報に基づいて神経因性疼痛モデルマウス(L5-SNT)を作製し、神経損傷1週間後、行動解析により疼痛モデルマウスを確認した。

#### (2) qRT-PCRによる遺伝子発現解析

マウスDRGよりRNAを抽出し、逆転写反応を行いcDNAを作製した。各遺伝子に特異的なプライマーを用い、qRT-PCRを行った。内在

性のアクチンを対照に、各遺伝子の発現解析を行った。

#### (3) レポーター遺伝子解析

PACAP遺伝子上にはRE1が局在し、正常状態ではRESTが結合しており、神経損傷後に誘導されるREST4でRESTが遊離し、PACAP発現が促進されると仮定した。このことを明らかにする目的で、マウスPACAPのプロモーター(299bp)にRE1(21bp)をpGL3.1(Promega)に導入したレポーター遺伝子を作製した。さらに、報告のあるNRSLE1及びNRSLE2を用いてプラスミドを作製した。各コンストラクトには、その機能を失う変異(TT又はTGをGGに変更)を導入し解析を行った。

#### (4) クロマチン免疫沈降(ChIP)解析

L5-SNTマウス及びnaïveマウスのDRGを用いて、クロマチン複合体をホルムアルデヒドで架橋し、抗REST抗体、および正常IgGをコントロールとして免疫沈降を行った。免疫沈降したDNAを用いて、特異的プライマーによりPCRを行った。PCR生成物は、2%アガロースゲルで電気泳動後、解析を行った。

#### (5) 免疫染色

Naïve及びL5-SNTマウスを、4%PFAを用いて還流固定後DRGを採取し、さらに固定を行った。その後凍結したDRGを免疫染色用にスライスした。抗体は、anti-REST抗体(1:200希釈、Millipore)、anti-REST4抗体(1:500希釈)を用いた。コントロールとして、anti-NF200抗体(1:1000希釈、Sigma)を用いて、4、一晩行った。2次抗体として、AlexaFluor488又はAlexaFluor546を用いて染色後、蛍光顕微鏡(Leica)を用いて解析を行った。

#### (6) *In vitro* トランスフェクション解析

FLAGエピトープを有したREST、REST4またはnSR100ベクター(Flag-REST、Flag-REST4、またはFlag-nSR100)を作製し、PC12細胞にトランスフェクションを行った。6well plateに2 x 10<sup>5</sup> cells/wellで24時間培養後、ScreenFectA(和光)を用いて、各プラスミドのトランスフェクションを行い、45-48時間後、細胞を回収した。GFPを用いた導入効率は、50-60%であった。遺伝子導入、48時間後、細胞を回収し、各遺伝子の発現をqRT-PCRにて解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 神経因性疼痛モデルマウス (L5-SNT) DRG における REST 及び PACAP 遺伝子発現解析  
 神経因性疼痛モデルマウス (L5-Sciatic Nerve Transection; L5-SNT) を作製した。術後 1 週間後、疼痛発症の評価は既報のマウスの行動解析にて行った。1 週間後、後根神経節 (DRG) を摘出し、DRG より RNA を抽出後、逆転写反応を行った後、特異的プライマーを用いたリアルタイム RT-PCR により各遺伝子の発現を解析し、未処置マウス (naïve) との比較を行った。コントロールとして、アクチンを指標に行った。その結果、PACAP mRNA の上昇 (約 4 倍) に加えて、REST4 の発現上昇 (約 1.69 倍) を発見した。神経因性疼痛モデル DRG では、PACAP 発現が増加するというこれまでの報告と一致していたが、REST4 の発現上昇は新しい発見であった。

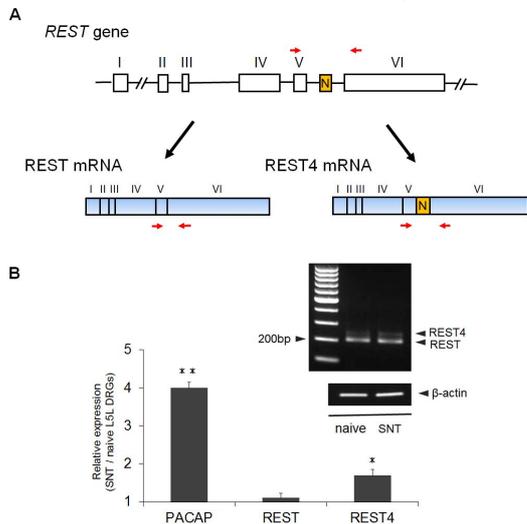


図 1 . L5-SNT DRG における REST4 の発現

(2) 神経因性疼痛モデルマウスにおける nSR100 の発現と REST/REST4 の発現の解析  
 最近、REST4 の産生にはスプライシングアクティベーター nSR100 が関与していることが報告された。L5-SNT マウス DRG 内の nSR100、REST4 を解析した結果、REST 発現はほぼ変化が見られなかったが、2 日目に PACAP の上昇と SR100 の上昇が共にみられ、3 日には少し

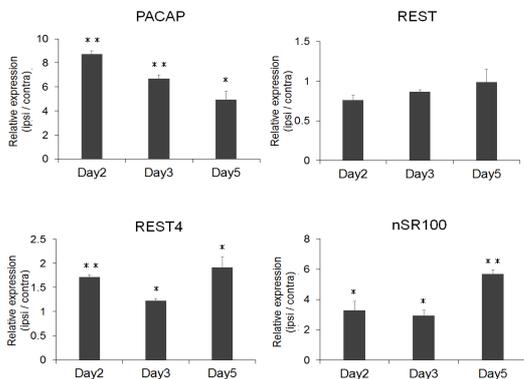


図 2 . L5-SNT マウス DRG における遺伝子発現の経時的変化

低下していた。神経損傷に伴い、nSR100 の増加は REST4 の増加と相関性が見られた (図 2)。マウス DRG 内の REST4 と nSR100 cDNA はクローニングを行い、GenBank に登録を行った (JN019832.1 及び JN860221.1)。

(3) nSR100 発現による PACAP 及び REST4 遺伝子発現解析

L5-SNT DRG において、nSR100 によるスプライシングで合成される REST4 により PACAP 遺伝子発現が促進されることを調べる目的で、REST4 および nSR100 発現ベクターを構築した。これまでに、PC12 は NGF または dbcAMP 刺激により、PACAP を分泌することが報告されていることから、REST4 または nSR100 を過剰発現させることで、PACAP 遺伝子発現が受ける影響を解析した (図 3)。プラスミドをトランスフェクション 48 時間後、細胞を回収し、RNA を調製した。REST4 を過剰発現した場合、PACAP はコントロールと比較して約 3 倍に増加した。一方、nSR100 を過剰発現した場合、PACAP 及び REST4 発現が促進された。REST の発現は変化が見られなかった。野生型の PC12 では REST4 はまったく発現をしていないので、トランスフェクションを行った REST4 及び nSR100 の発現を 1 として解析を行った。REST のみを過剰発現した場合、PACAP、nSR100 および REST4 発現には、影響しなかった。これらの結果から、*in vitro* での PACAP 発現は、nSR100 により発現誘導される REST4 により促進されていることが示唆された。

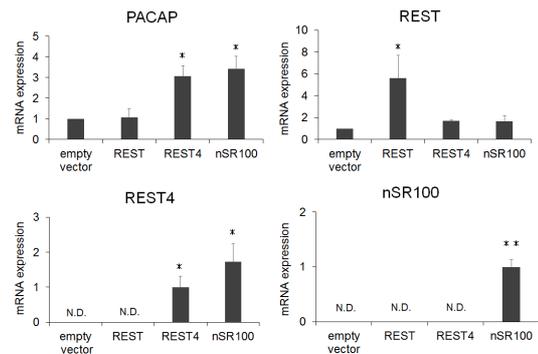


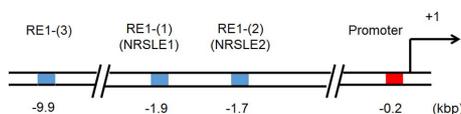
図 3 nSR100 遺伝子の強制発現における REST 遺伝子の発現解析

(4) PACAP 遺伝子上 RE1 のレポーター遺伝子を用いた機能解析

naïve マウスでは、PACAP 遺伝子上の RE1 が機能して正常状態で REST が結合しており、神経損傷後に誘導される REST4 で PACAP 発現が促進されると仮定した。このことを明らかにする目的で、マウス PACAP のプロモーター (299 bp) に RE1 (21 bp) を pGL3.1 (Promega) に導入したレポーター遺伝子解析を行った (図 4)。これまでに、PACAP には RE1 様エレメント (NRSLE1 と NRSLE2) が局在していることが報告され、*in vitro* においては機能を有していた。しかし、その配列は RE1 配列とミスマッチがあった。他の報告で *in silico*

解析では、PACAP 遺伝子のさらに上流に新しい RE1 が報告されていたが、*in vitro/in vivo* での機能解析は行われていなかった。そこで、NRSLE1(RE1-1)、NRSLE2(RE1-2)、及び RE1(RE1-3)をマウス PACAP プロモーター配列に導入したルシフェラーゼレポーター遺伝子ベクターを構築した。各ベクターを HeLa 細胞に導入し、24 時間後ルシフェラーゼ発現を解析した。導入した RE1 には、その機能を消失する変異を導入することで行った。ルシフェラーゼレポータープラスミドは、Renilla ルシフェラーゼプラスミドと共に FugeneHD (Promega) を用いて導入した。この解析の結果、これまで報告のあった NRSLE1 及び NRSLE2 は、*in vivo* では機能せず、その上流に新しく発見した RE1-(3)が機能していることが示唆された。

(A) Schematic of mouse PACAP gene



(B) Reporter gene assay

Consensus RE1 TTCAGCACCACGGACAGCGCC  
 mouse RE1-(1): gTaAGagCCACGGAGtGtg  
 mouse RE1-(2): aagAGCACCACtGcCAaaGct  
 mouse RE1-(3): TTCAGctCctqGGcCAGaGtC

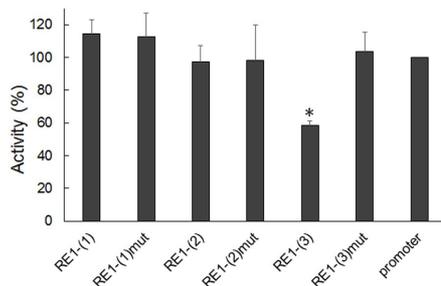


図4 . レポーター遺伝子解析

(5) クロマチン免疫沈降反応 (ChIP) による PACAP 遺伝子上の RE1 の機能解析

naïve 及び L5-SNT マウス DRG より核を分離後、ChIP 解析を行った。ChIP 解析の結果、naïve マウス DRG では RE1-(3)のみに REST が結合しているが、L5-SNT モデルマウスでは、その結合が消失していた。この結果から、RE1-(3)が、*in vivo* で機能していることが示唆された。

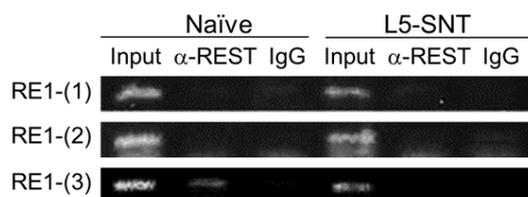


図5 . ChIP 解析

(6) 神経損傷における REST および REST4 の細胞内局在解析

これまでに、REST4 は REST の転写抑制機能に脱抑制を示すことが報告されている。DRG において、REST4 が REST と相互作用することを解析するために、naïve マウスおよび L5-SNT モデルマウス DRG 内の、REST と REST4 の細胞内局在を免疫染色法により行った。naïve マウス DRG では、REST と REST4 は、小細胞とは異なり大細胞の核内に検出された。一方、L5-SNT マウス DRG では、REST4 発現が促進し、REST と共に細胞質に移行していることが示唆された。

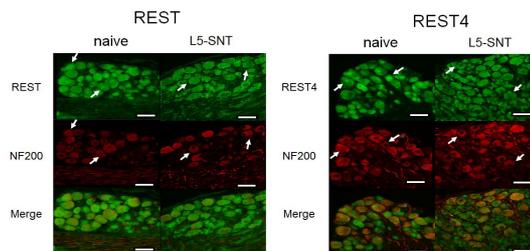


図6 . DRG の免疫染色

以上の結果より、神経因性疼痛発症時には、REST のスプライシングが nSR100 により起こり、その結果 REST4 発現が誘導され、PACAP 遺伝子の発現が促進されることが明らかとなった。この nSR100 の発現機構に関する詳細な研究は、疼痛発症機構解明につながる。

## 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計2件)

Shudo Y., Shimojo M., Ito S. Pituitary adenylyate-cyclase activating polypeptide (PACAP) is possibly regulated by RE1-silencing transcription factor (REST/NRSF) isoform in neuropathic pain. Society for Neuroscience, Nov. 9-13, 2013 San Diego, USA.

Shudo Y., Shimojo M., Fukunaga M., Ito S. Pituitary adenylyate-cyclase activating polypeptide (PACAP) is possibly regulated by RE1-silencing transcription factor (REST/NRSF) isoform in neuropathic pain. 2013年12月3-6日、第36回日本分子生物学会年会(神戸)

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

下條 正仁 (SHIMOJO, Masahito)  
 関西医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：90591925