

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791627

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛下におけるmiRNA変化の網羅的解析

研究課題名(英文) Multiple analysis of miRNA under neuropathic pain

研究代表者

池上 大悟 (Ikegami, Daigo)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30619747

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)：本研究では、疼痛下のmicroRNA(miRNA)の発現変動に着目し、慢性疼痛形成の分子機構の解明ならびに臨床での疼痛のバイオマーカーとして診断への応用を目的として研究を行った。神経障害性疼痛モデルにおける扁桃体、側坐核、前頭前野などの脳内ならびに脊髄内、血清中のmiRNA発現の網羅的解析により、慢性疼痛によるmiRNAのプロファイリングを行うことができた。さらには、ヒト慢性疼痛患者の血清中のmiRNAの変化を特定し、血中miRNAの痛みのバイオマーカーとしての可能性を示唆した。こうした研究結果は、Trends in Neuroscience 誌 (IF=12.902) に掲載された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the expression change of microRNA(miRNA) under neuropathic pain. The aim of these studies was to clarify the molecular mechanism of chronic pain and to explore the biomarkers of neuropathic pain. Using neuropathic pain model, we were able to profile the expression miRNA in amygdala, nucleus accumbens, prefrontal cortex, spinal cord and serum under neuropathic pain. Furthermore, we identified the change in the serum miRNA in human chronic pain patient. These result suggest that blood miRNA has the potential as a biomarker for neuropathic pain. These research results were published in Trends Neurosci, 38, 237-246, 2015 (IF:12.902), Brain, 136, 828-843, 2013 (IF; 9.457) etc.

研究分野：神経科学

キーワード：miRNA pain epigenetic

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は、持続的な疼痛刺激により疼痛が慢性化ならびに複雑化した状態である。激しい痛みは、抑うつや不安障害を引き起こし、QOL 低下の原因となるが、その発現メカニズムは未だ不明である。また、従来の行動観察を基軸とした疼痛評価は痛みの主観性、多様性に対応することが難しいため、疼痛の生理状態把握のためにも、客観的な痛みの評価をする必要性があると考えられる。

一方、RNA 干渉 (RNAi) が発見されたことにより、小さな non-coding RNA (microRNA; miRNA) に注目が集まっている。現在では、すでに 3000 種類近くの miRNA がデータベース化されている。一般的に miRNA の機能は mRNA の翻訳を転写後レベルで抑制する。また、miRNA は、標的 mRNA の結合部位の配列と必ずしも完全に一致せず、配列依存的に阻害効果の強弱が決定される。さらに、1つの miRNA は多数の mRNA を標的にしており、逆に1つの mRNA は複数の miRNA の調節を受ける。このことは生体に存在するタンパク質をコードする遺伝子の大部分が、転写後に miRNA によって制御されることを意味している。

これまでに生体期の神経新生において miRNA-124 が細胞の分化決定に重要な役割を果たすといった報告や、ドパミン神経の成熟に miRNA-133 が関与しており Parkinson 病の原因となりうるといった報告など、miRNA が脳神経系において多様な機能調節を行っていることなどが示唆されている。

このように、miRNA が生体の生理状態を非常に複雑に制御していることから、慢性疼痛の発現、難治化においても、miRNA 発現の変化が寄与する可能性は極めて高いと考えられる。

当研究室においても、これまでに坐骨神経結紮モデル動物の脳内ならびに脊髄内において神経可塑性な変化が引き起こされていることを確認している。現在までに、神経障害性疼痛下にて側坐核領域における miRNA34c、miRNA200b および miRNA429 の発現が変化することを明らかにしている。(Journal of Neuroscience, 31, 15294-15299, 2011, IF: 7.271)

2. 研究の目的

本研究では、疼痛下の脳内ならびに脊髄内 miRNA の発現変動に着目し、慢性疼痛形成における miRNA 発現変動の網羅的解析を目的とする。

一方で、細胞は細胞室内で不要になったタンパク質やアミノ酸などを「エクソソーム」と呼ばれる膜の構造体で包んだうえで、細胞外へ輸送している。このようなエクソソームは、血液、唾液、尿、母乳などの体液中を循環することが知られているが、最近になって

細胞が自らの miRNA をエクソソームに封入して分泌していることが明らかとなってきた。そこで本研究では、血中のエクソソームに封入された miRNA に着目し解析を行い、これまでに測定法のなかった、疼痛の生理状態把握のためのバイオマーカーとして診断への応用を目的とする。

3. 研究の方法

疼痛下の miRNA の変化について基礎および臨床研究を展開すべく、以下の研究を行った。

疼痛モデル動物を用いた慢性疼痛形成機構の解明

(平成 24, 25 年度)

疼痛モデルマウスの脳各部位、脊髄における miRNA の網羅的解析を行う。

(平成 25, 26 年度)

疼痛の生理状態把握のためのバイオマーカーとして診断・治療への応用

(平成 24, 25 年度)

疼痛モデルマウスの血中エクソソームからの miRNA 抽出ならびに網羅的解析

(平成 25, 26 年度)

慢性疼痛患者の血液検体からのエクソソームおよび miRNA の抽出

詳細; 実験には ICR または C57BL/6 マウスを使用した。本実験においては、坐骨神経を結紮して作製する Seltzer モデルを確立し、検討を行った。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。作製した慢性疼痛モデルの各脳部位ならびに脊髄における miRNA の発現量の変化について、miRNA array 法、TaqMan PCR 法を用いて検討を行った。また、慢性疼痛モデルの脳内活性化の変化は fMRI 法に従い、検討を行った。

疼痛の生理状態把握のためのバイオマーカーとして診断・治療への応用

これまでの miRNA の発現解析では、細胞内の miRNA が対象とされてきた。ところが最近になって、細胞外に分泌されるタイプの miRNA (分泌型 miRNA) に注目が集まるようになってきている。そのため細胞内の miRNA だけでなく、エクソソーム内の分泌型 miRNA に着目し、血中 miRNA の測定を行った。

詳細; 実験には ICR または C57BL/6 マウスを使用する。作製した慢性疼痛モデルの血液よりエクソソームを抽出し、miRNA の発現量の変化について、miRNA array 法、TaqMan PCR 法を用いて検討を行った。また、慢性疼痛患者の血液検体を収集し、エクソソーム内の miRNA を解析することにより、疼痛の生理状態把握のためのバイオマーカーとしての有用性について検討した。

4. 研究成果

本研究は、神経障害性疼痛下における疼痛発現、維持の機構の解明を目的として、坐骨神経結紮により神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、神経障害性疼痛下の脊髄、側坐核、扁桃体における microRNA (miRNA) の発現プロファイリングおよび発現変化のあった miRNA の機能の解明を試みた。

まず、痛みの発現および維持に深く関与すると考えられている脊髄領域に着目し、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄領域における miRNA の発現変化について網羅的に解析した。中でも、最も大きな発現低下を示した miR-206 に着目し、標的遺伝子の探索を行った。その結果、予測された標的遺伝子は 346 種類であったが、その中に各種成長因子である BDNF、PDGFA、VEGFA ならびにケモカインである CXCL11 といった痛みにおいて重要な役割を担う遺伝子を見出した。特に BDNF は、神経障害時における発現誘導により神経ネットワーク形成を修飾することが報告されていることから、神経障害時に脊髄内でその発現が誘導されると、ネットワーク異常をきたし、疼痛閾値の変化が引き起こされると想定される。そこで、BDNF の局在ならびにタンパク質量の変化について免疫組織学的染色法に従い検討したところ、坐骨神経結紮 1 週間後において非結紮側と比較して、結紮側脊髄後角における BDNF 免疫活性の増強が認められた。さらに、recombinant BDNF の髄腔内投与 3 日後における右後肢への熱刺激に対する逃避潜時を測定した。その結果、BDNF 投与による有意な反応潜時の短縮が認められた。以上の結果は、末梢神経障害によって脊髄内 miR-206 の発現変動を介した BDNF の増加が引き起こされることが示され、こうした変化が神経障害性疼痛の発現に一部関与する可能性が示唆された。

一方、近年 miRNA がエクソソームのようなナノサイズの小胞顆粒に包埋されることによって、多くの消化酵素から分解を免れ、血漿、血清などの体液中においても安定に存在することが報告されている。特に、がんをはじめとする疾患の病態や進行度合いなど、ヒトの生理状態によって miRNA の発現量や種類が変化するため、血液を利用した非侵襲的な診断用バイオマーカーとして期待されている。そこで、末梢神経障害時における血清よりエクソソームを抽出し、血中エクソソームにおける miRNA の発現変化について検討した。その結果、末梢神経障害によって脊髄において最大の発現増加を示した miRNA3470b の血中エクソソーム中における増加が認められた。このように、血中エクソソームにおける末梢神経障害と連動する miRNA を同定した。

こうして同定した miRNA が、実際にヒトにおいても変化が認められるか否か検討した。慢性疼痛患者の血清検体を採取し、エクソソームを抽出して解析を行ったところ、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄や血中におい

て増加したいくつかの miRNA は、ヒト臨床検体においても健常者と比較して有意に増加するといった結果が得られた。

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 9 件)

Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, Nestler EJ, Zachariou V, Narita M: Epigenetic mechanisms of chronic pain. Trends Neurosci, 38, 237-246, 2015 (査読あり)

Saisu H, Igarashi K, Narita M, Ikegami D, Kuzumaki N, Wajima K, Nakagawa T, Narita M: Neuropathic pain-like stimuli change the expression of ribosomal proteins in the amygdala: genome-wide search for a "pain-associated anxiety-related factor". Jpn. J. Pharm. Palliat. Care Sci, in press, 2015 (査読あり)

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, 828-843, 2013. (IF; 9.457) (査読あり)

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. (IF; 4.202) (査読あり)

池上大悟、山下 哲、落谷孝広、成田年: 疼痛における microRNA ならびにエクソソーム内の「分泌型 microRNA」の役割、細胞工学、32、48-51、2013 (査読あり)
成田年、池上大悟: 痛みによるエピジェネティクス細胞制御と早期除痛の本質的意義、ペインクリニック、34、601-610、2013 (査読あり)

西須大徳、山下 哲、池上大悟、中川種昭、和嶋浩一、成田年: これから期待される鎮痛補助薬の開発、薬局、64、127-132、2013 (査読あり)

池上大悟、成田年、様々なストレス要因により生じるエピジェネティック修飾、日本精神神経学雑誌、108、3660375、2013

(査読あり)

成田 年、山下 哲、酒井寛泰、仙波恵美子、**池上大悟**：痛みの細胞記憶とエピジェネティクス制御、Anesthesia21、14、40-47、2012 (査読あり)

[学会発表](計 12 件)うち招待講演(1件)

池上大悟、成田 年、第 88 回日本薬理学会年会、シンポジウム、2015

Daigo Ikegami, Kaori Ohi, Michiko Narita, Naoko Kuzumaki, Toshikazu Ushijima, Minoru Narita, Society for Neuroscience, 2014

池上大悟、成田 年、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会、招待講演、2014

大井香織、**池上大悟**、八重樫香菜子、成田道子、葛巻直子、岡野栄之、牛島俊和、成田 年、第 8 回緩和医療薬学会、2014

池上大悟、大井香織、成田道子、八重樫香菜子、大塚まき、葛巻直子、岡野栄之、牛島俊和、五十嵐勝秀、成田 年、第 37 回日本神経科学大会、2014

池上大悟、成田道子、大井香織、山下 哲、葛巻直子、五十嵐勝秀、岡野栄之、牛島俊和、成田 年、第 36 回日本疼痛学会年会、2014

池上大悟、大井香織、成田道子、葛巻直子、岡野栄之、牛島俊和、成田 年、第 8 回エピジェネティクス研究会年会、2014

池上大悟、大井香織、成田道子、山下 哲、葛巻直子、岡野栄之、牛島俊和、成田 年、第 87 回日本薬理学会年会、2014

Daigo Ikegami, Satoshi Imai, Akira Yamashita, Michiko Narita, Hideyuki Takeshima, Toshikazu Ushijima, Minoru Narita, Society for Neuroscience 2013

池上大悟、成田 年、第 7 回緩和医療薬学会年会、シンポジウム、2013

池上大悟、今井哲司、伊達明利、成田道子、竹島秀幸、牛島俊和、成田 年、第 36 回日本神経科学大会、2013

池上大悟、伊達明利、成田道子、竹島秀幸、牛島俊和、成田 年、第 7 回エピジェネティクス研究会年会、2013

[図書](計 2 件)

成田 年、**池上大悟**、分子病態薬理 I、京都廣川書店、2014

成田 年、酒井寛康、**池上大悟**、分子病態薬理 II、京都廣川書店、2013

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
星薬科大学 薬理学教室
<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/yakuri/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者：池上 大悟 (IKEGAMI, Daigo)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：30619747

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：