

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462435

研究課題名(和文) マイクロRNAプロファイリングを基盤とした神経障害・痛みのバイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Development of pain biomarkers based on microRNA profiling

研究代表者

田中 達哉 (TANAKA, TATSUYA)

大阪大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：20645204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はマイクロRNAのプロファイリングをもとに痛みのバイオマーカーを見出すことを目的とし、全脳を用いたバイオマーカーの開発を目指した。疼痛モデルとして術後遷延痛モデルを用い、急性期(術後2日目)、慢性期(術後28日目)の両方で疼痛行動が持続することを確認し、全脳サンプルの採取を行った。術後2日目、と28日目のクラスター解析(Ward's Method)で5種類のマイクロRNAを用いた分析で、第一分枝で区別することに成功した。術後遷延性疼痛モデルの脳内では、痛みの急性期から慢性期にかけて、何らかの変化がおこっており、わずか5種類のマイクロRNAで説明可能な変化である可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop pain biomarkers on microRNAs in the brain. The post-operative persistent pain (PPP) model, recently developed recently by our group was utilized in this study. After confirming the pain-related behavior of this PPP model both in the acute phase (2days postoperatively) and in the chronic phase (28the postoperative day), and the whole brain samples were taken. The cluster analysis (Ward's method) using Day2 and Day 28 samples revealed that by using only five kinds of microRNA, the two different conditions (acute and chronic pain) can be successfully distinguished by the first branch of this analysis. The PPP models' brain changed from acute phase to chronic phase. This may explain that only five different kinds of micro RNA are responsible for this change.

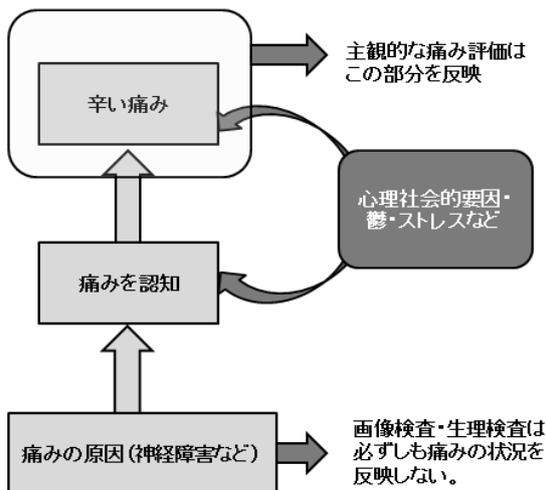
研究分野：分子生物学

キーワード：疼痛モデル マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

痛みは主観的なものと国際疼痛学会においても定義づけられている。

右図に示すように痛みはその原因となる疾病の状況を必ずしも反映しない。よって、画像診断や生理検査が決め手とならない。さらに、その認知過程において心理社会的要因が深く関与し、それらすべての状況を反映するのが自覚的な「痛み」となる。治療効果を判定するにも、現状では客観的指標がなく、新しい薬の治験の場面においてすら、その自覚症状のみで行われているのが現状である。**患者の訴えだけで治療効果を判断する診療は、他の病気であればありえない事であり、より客観的な指標の開発が必要である。**



我々のグループは慢性痛、特に神経障害性疼痛に関する研究を行ってきた (Nakae, Tanaka et al., Euro J Neurosci 2008)。臨床の報告において、神経障害は強いと、痛みはあまり問題にならず、運動障害が生じない程度の障害で、痛みが問題になる。これは、神経を絞扼するモデル動物を作成する際に、強すぎる障害を与えるとかえって痛みが生じず、弱い障害においてかえって強い疼痛行動を呈することとも一致する (表1)。今回は

神経障害の程度	痛みの伝わり	痛みの程度
軽度	ほとんど影響がない。	痛みがあっても容易に治癒
中等度	異常なシグナル伝達	強い痛み
高度	神経伝達も障害	痛みが生じない。運動障害が問題。

表1. 神経障害の程度と痛みの関係

対照群として通常の外科的ストレスを与える群だけでなく、強い神経障害で痛みの生じない群を解析し、神経障害ではなく痛みを反映させる。

マイクロ RNA は近年注目されているたんぱく質をコードしない小さな分子であるが、たんぱく質の翻訳抑制を行う。我々は、**痛みにおいてもその関与があることを明らかにし、日本疼痛学会で発表し、現在投稿準備中**である。組織におけるその働きは言うまでもないが、血中に出現するマイクロ RNA のバイオ

マーカーとしての可能性に注目が集まっている。現に、癌研究では、組織中のマイクロ RNA が血中のマイクロ RNA プロファイリングに反映され、新たな腫瘍マーカーとして期待されている (Song et al., PLoS One 2012)。今回の研究で動物モデルの血液中のマイクロ RNA 網羅的プロファイリングにより、新たな痛みの客観的なバイオマーカー、痛みを定量的に示す新たな検査法が開発できると考えこの研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究はマイクロ RNA のプロファイリングをもとに**痛みのバイオマーカー**を見出すことを目的とする。そのために、
①痛みの動物モデルで、その疼痛行動を解析する。
②術後 2 日目、4 週間に脳を採取し、**大規模シークエンサーを用いた網羅的マイクロ RNA プロファイリング**を行い、痛みのバイオマーカーを絞り込む。

ことを目指した。研究当初は血液からのバイオマーカーの開発を目指して取り組んだが、血液からのマイクロ RNA 採取に苦勞し、大規模シークエンサーで解析できるレベルのクオリティーを確保できなかったため、全脳を用いたバイオマーカーの開発を目指した。

3. 研究の方法

C57B16J マウス 30 匹をそれぞれ手術前群 10 匹、急性痛群 (術後 2 日目) 10 匹、慢性痛群 (術後 28 日目) 10 匹とし、20 匹のマウスに対し、セボフルラン・ソムノペンチルで麻酔後、術後遷延痛モデルを作製した。

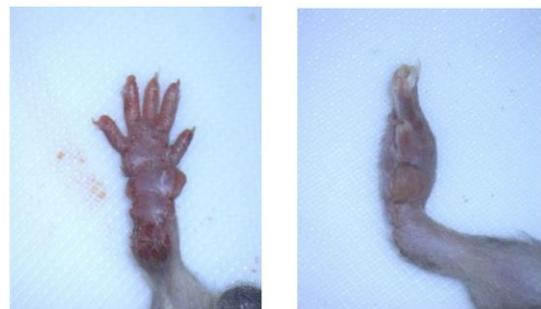


図2. 術後遷延痛モデルの術直後の外観

術後遷延痛モデルは足底皮膚弁という手技をマウスの足底に施すもので、術直後より患部が腫脹し、疼痛行動が術直後から出現し、従来法である von Frey Filament を用いた評価が可能なモデルである。本研究開始当初に使用を予定していたモデルは、神経障害を起し、術直後は疼痛行動が現れないことから、臨床現場で見られる慢性痛を再現しているとは言えない点があり、最終的に本モデルを使用することとした。

それぞれの群のタイミングで全脳を摘出した後、RNALater で一晩浸した後、マイクロ RNA 抽出キットを用いてマイクロ RNA を抽出した。バイオアナライザーでマイクロ RNA の部分にピークが確保されていることを確認

後、ライブラリー作成を行い、Thermo Fisher Scientific の Ion Proton System を用いて、網羅的なマイクロ RNA 発現解析を行った。

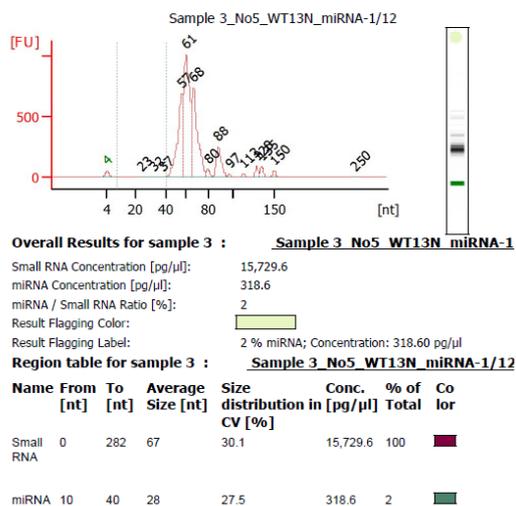


図 3. 抽出したマイクロ RNA の QC の例

4. 研究成果

C57B16J の術後遷延痛モデルの行動評価は図 4 の通りであった。

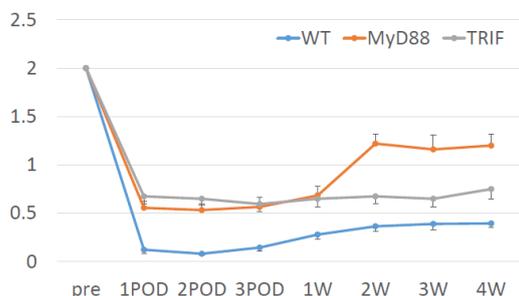


図 4. 術後遷延痛モデルの行動評価

最終的に解析対象としたのは手術前 6 匹分、術後 2 日目 5 匹分、術後 28 日目 5 匹分であった。

解析可能なマイクロ RNA のうち、発現量が 10 コピー未満の者を解析対象から除外すると、約 800 種類となった。特に急性期と慢性期の区別を目指し、術後 2 日目（急性期）と術後 28 日目（慢性期）についてのデータを取り出し、解析を行う方針とした。JMP11.0 を用いた解析で、まず、説明変数スクリーニングを行ったところ、寄与率がゼロより大きいマイクロ RNA が 39 種類同定された。クラスター解析 (Ward's Method) で 5 種類のマイクロ RNA を用いた分析で、第一分枝で急性期と慢性期を区別することに成功した (図 5)。

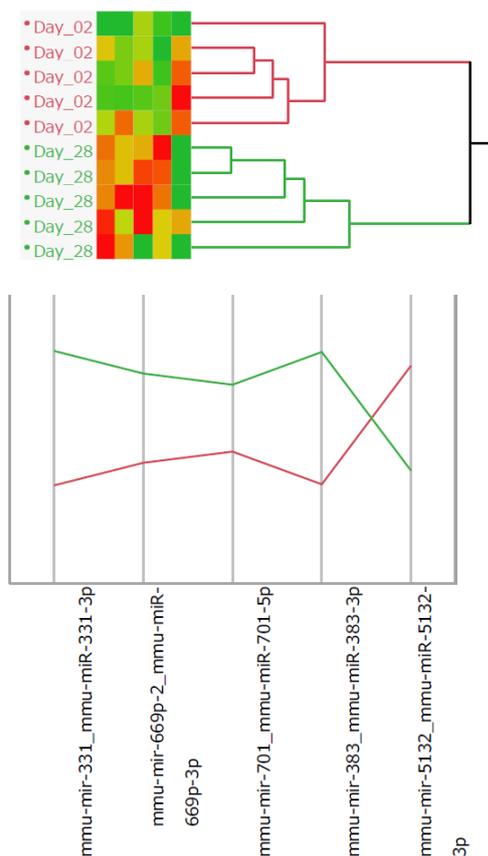


図 5. 2 日目と 28 日目のクラスター分析

次に急性期と手術前の比較を試みるために、比較を行ったところ、13 種のマイクロ RNA を用いることによって、Day0 と Day2 が第一分枝で分類された (図 6)。

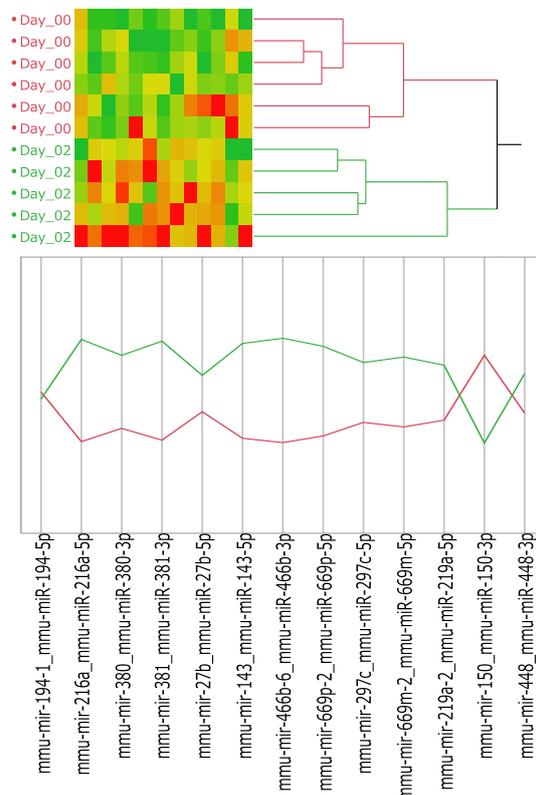


図 6. 手術前と 2 日目の比較

以上の結果より、術後遷延性疼痛モデルの脳内では、痛み急性期から慢性期にかけて、何らかの変化がおこっており、その変化の源はわずか5種類のマイクロRNAで説明可能な変化である可能性があると考えられた。今後、マイクロRNAのターゲット遺伝子を同定し、術後痛の急性期から慢性期にかけて、脳で何が起きているのかを明らかにする試みを継続していく必要がある。

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0件)

[学会発表] (計7件)

1. Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Yuki Mori, Hiroki Kato, Jun Hatazawa, Yoshichika Yoshioka

Objective Way of Evaluating Chronic Pain in Animal Model

ISMRRM 2017, Osaka, Japan, Feb.2017.

2. Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Yutaro Kumagai, Ko Hosokawa, Yoshichika Yoshioka.

Confirmation of pain-related behavior changes of newly developed persistent post-operative pain model by using MyD88^{-/-} and TRIF^{-/-} mice.

Society for Neuroscience 2016, Chicago, IL, USA, Nov. 2016.

3. Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Tateki Kubo, Yoshiki Minegishi, Yuji Fujino, Ko Hosokawa.

The role of spinal adrenoceptor subtypes in trigeminal nerve injury-induced mechanical hypersensitivity of rats.

Society for Neuroscience 2016, Chicago, IL, USA, Nov. 2016.

4. Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Tateki Kubo, Yoshiki Minegishi, Yuji Fujino, Ko Hosokawa,

The role of spinal adrenoceptor subtypes in trigeminal nerve injury-induced mechanical hypersensitivity of rats.

Society for Neuroscience 2016, Chicago, IL, USA, Oct. 2016.

5. Aya Nakae, Kunihiro Nakai, Tateki Kubo, Ko Hosokawa, Yuji Fujino

Systemic hypersensitivity to pain in a rat model of oro-facial neuropathic pain ~Similarity to human pain chronicity~

Euroanaesthesia2015, Berlin, Germany, May. 2015.

6. Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Tateki Kubo, Yoshiki Minegishi, Yuji Fujino, Ko Hosokawa.

Role of spinal 5-HT1A, 5HT1B, and 5-HT1D receptors in a rat model of trigeminal neuropathic pain.

World Congress of Pain 2014, Yokohama, Japan, Sept. 2014.

7. Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Tateki Kubo, Yoshiki Minegishi, Yuji Fujino, Ko Hosokawa.

Role of spinal 5-HT4, 5HT6, and 5-HT7 receptors in a rat model of trigeminal neuropathic pain. Euroanaesthesia 2014, Stockholm, Sweden, June, 2014.

[図書] (計0件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 達哉 (TANAKA, Tatsuya)
大阪大学・医学部・技術専門職員
研究者番号：20645204

(2) 研究分担者

中江 文 (NAKAE, Aya)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤)
研究者番号：60379170

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

中井 國博 (NAKAI, Kunihiro)
福井大学・医学部附属病院・准教授