

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462454

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛特異的microRNAクラスターの多角的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of neuropathic pain-specific microRNA cluster

研究代表者

坂井 敦 (Sakai, Atsushi)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30386156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛は未だ十分な治療が確立されておらず、より優れた治療法の開発が求められている。miR-17-92クラスターに属する複数のmicroRNAが一次感覚神経において慢性の神経障害性疼痛に対して重要な役割を担うことを明らかにした。また、これらmicroRNAの標的候補遺伝子を数多く見出し、その機能的意義を明らかにした。更に、これら標的遺伝子の機能を修飾する化合物が神経障害性疼痛を著明に減弱したことから、miR-17-92を標的とすることによる治療戦略の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain remains a major clinical problem and thus development of effective and safe therapy for the pain is awaited. miR-17-92 cluster microRNAs are critical for chronic neuropathic pain. These microRNAs are predicted to target many genes, some of which are indeed responsible for neuropathic pain. Drugs modifying these gene function exerted potent analgesia. Therefore, miR-17-92 may provide an opportunity for development of neuropathic pain therapy.

研究分野：薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 マイクロRNA クラスター 一次感覚神経

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経障害性疼痛は神経系そのものの障害に起因する慢性疼痛である。急性痛や炎症性疼痛のような痛みには生体防御や回復の促進などの利益的な役割があるのに対し、神経障害性疼痛は有害なものでしかない。しかしながら、この疼痛は難治性であるため、多くの患者が無意味に非常な苦痛を伴った生活を強いられている。また患者は既に疼痛が固定化して治療が困難な状況にあることが多くあるため、慢性化した疼痛を取り除くことが重要となる。即ち、神経障害性疼痛の治療においては、神経障害性疼痛に特異的に慢性化した痛みを緩和することが重要である。しかしながら、疼痛緩和治療は近年大きく進歩しているが、難治性の神経障害性疼痛に関しては未だ十分な治療法がない。

(2) 神経障害性疼痛の治療が困難な理由の1つに、感覚神経において可塑的に発現変化するタンパクの多様性がある。タンパク分子はゲノムから転写により生じた messenger RNA (mRNA) が翻訳されることにより作られて機能を発揮する。従来、タンパク発現の調節においては転写活性の調節が重要であると考えられていたが、タンパクをコードしない非翻訳性 RNA の一種である microRNA(miRNA) による mRNA の翻訳制御がタンパク発現の調節において極めて重要であることが近年明らかにされてきた。21-25 塩基程度の低分子 RNA である miRNA はゲノムから転写によって作られたヘアピン構造を有する一次 RNA 転写産物が切断される事により生じる。miRNA は mRNA の 3' 側非翻訳領域の相補的な塩基配列に結合し、主にタンパクへの翻訳を抑制することで数多くの特定のタンパク発現を抑制する。通常、単一の miRNA は数百の遺伝子を標的とすることが予測されており、神経系の発生・分化から機能調節・可塑性にまで重要であることが明らかとされつつある。従って、神経障害性疼痛においても miRNA が多様なタンパクの発現変化を引き起こし、疼痛の治療抵抗性の一因になっていると考えられた。

(3) miR-17-92 クラスタは 6 種類もの miRNA が同一の一次 RNA 転写産物上に集中しているユニークな miRNA 群である。すなわち、miR-17-92 はクラスタとして大量の遺伝子の発現調節に関わることから特に重要な miRNA 群である。事実、正常な個体発生やガンなどの病態に関与することが明らかにされてきており、欠損マウスは致死的である。一方で、我々はマイクロアレイの解析により miR-17-92 クラスタの各成熟 miRNA が神経障害性疼痛の慢性期において有意に発現上昇しており、発現変化する miRNA の中でも特に主要な割合を占めていることを見出していた。また、末梢組織の炎症に起因する疼痛においては発現変化がみられなかった。す

なわち、miR-17-92 クラスタは神経障害性疼痛特異的に慢性期において重要な役割を担っていることが推測された。

2. 研究の目的

miR-17-92 を標的とすることは幅広い疼痛メカニズムを一網打尽にすることで強力な鎮痛効果を発揮する可能性がある一方で、疼痛とは関係のないタンパク変化を誘導し副作用の原因となる可能性もある。また、個々の miRNA レベルにおいても同様の可能性があり、miRNA の標的遺伝子のうちの少数のみが疼痛に関わる可能性も考えられる。従って、本研究では miR-17-92 クラスタを中心として、miR-17-92 一次 RNA 転写産物の発現調節、各 miRNA と痛みとの関係から標的遺伝子までを多角的に解析し、神経障害性疼痛の慢性期治療に最適化した新規治療標的を以下の過程を経て同定することを目指した。

1) miR-17-92 クラスタの各 miRNA と神経障害性疼痛との関連の個別検討

miR-17-92 クラスタの各 miRNA はそれぞれ別々の遺伝子を標的としており、疼痛に対する寄与もそれぞれ異なると考えられる。また、全ての miRNA が疼痛に関わるとは限らないため、神経障害性疼痛に対する各 miRNA の関与を個別に検討し、実際に疼痛に関わる miRNA を同定する。

2) miR-17-92 の発現調節機構の同定

miR-17-92 の一次 RNA 転写産物の発現量は通常の mRNA の発現と同様に転写因子の活性などにより調節される。従って、miR-17-92 の発現上昇を導く転写因子やその調節機構を同定し、治療標的としての可能性を検討する。

3) 疼痛に関連する miR-17-92 の標的遺伝子探索

miRNA による疼痛の調節には標的遺伝子のうちの少数のみが関与している可能性もあり、それら疼痛に関わる標的遺伝子のみを治療標的とすることは副作用を軽減できる可能性がある。また、従来の網羅的な遺伝子発現解析は mRNA を標的としており、miRNA による mRNA の量的変化を伴わないタンパク発現の変化を捉えられなかった。従って、miRNA の標的遺伝子を解析することは、従来の網羅的解析では明らかにならなかった治療標的となりうるタンパクの同定につながる利点もある。

3. 研究の方法

(1) 動物実験

雄性の Sprague-Dawley ラットを用いて実験を行った。全ての手術はペントバルビタールの腹腔内投与もしくはイソフルランの吸入による深麻酔下において行った。神経障害性疼痛モデルとして世界中の研究者に幅広く用いられている脊髄神経結紮 (SNL) モデ

ルを用いた。痛覚の指標として、後肢足底に機械的刺激及び熱刺激を行い、それらの刺激に対する回避行動を疼痛反応として観察した。

一次感覚神経における遺伝子発現を操作するために、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV; 血清型 6) を作製し、ラット後根神経節へ直接投与した。遺伝子導入はマーカートンパクである EGFP の発現およびトランスジェンの定量により確認した。

(2) 定量的 PCR

ラット後根神経節より total RNA を RNAiso plus を用いて抽出した。Total RNA はランダムプライマーもしくは microRNA 特異的なステムループプライマーを用いて逆転写を行った。Primary microRNA, mature microRNA 及び mRNA の発現量は TaqMan 法による定量的 PCR により解析した。

(3) 神経突起伸長の測定

ラット後根神経節を切除後、コラゲナーゼ / ディスパーゼおよびトリプシンで処理したのち、ピペッティングにより細胞を分離した。さらにパーコールを用いた密度勾配遠心により、一次感覚神経を単離し、ポリ D リジン / ラミニンをコートしたガラス上で培養した。レンチウイルスベクターを用いて、これら神経細胞に遺伝子導入を行った。チュブリン III に対する蛍光免疫染色を行うことにより神経突起を可視化し、Sholl 解析を行った。

(4) バイオインフォマティクス

Ingenuity パスウェイ解析ソフトを用いて、疼痛に関わる microRNA の標的候補遺伝子群を抽出した。これら候補遺伝子を更に、神経障害により mRNA 発現が低下する遺伝子に絞り込んだ。これらの遺伝子群が関わる機能をパスウェイ解析により探索した。

(5) ルシフェラーゼアッセイ

miR-17-92 の標的候補遺伝子の 3' 側非翻訳領域を下流に組み込んだルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラスミドを作製し、microRNA によるルシフェラーゼ活性への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛モデルラットの後根神経節における miR-17-92 の発現変化

miR-17-92 クラスターの各 microRNA の後根神経節における発現が神経障害性疼痛発症初期から長期間にわたって上昇することを明らかにした。また、miR-17-92 の一次転写産物である pri-miR-17-92 の発現も同様に上昇していたことから、転写活性の亢進が microRNA の発現上昇に関わっている可能性が示唆された。

(2) miR-17-92 の過剰発現による痛覚への影響

miR-17-92 を発現する AAV ベクターを作製し、実際に各 microRNA の発現を誘導できることを確認した。健常動物の後根神経節に投与し、一次感覚神経特異的に miR-17-92 を過剰発現させることにより、機械刺激に対する痛覚閾値が著明に減弱することを明らかにした。一方で、熱刺激による痛みには影響しなかった。更に、miR-17-92 クラスターの全 6 種の microRNA を個別に強制発現させることにより、疼痛に関わるクラスターメンバーとして miR-18a と miR-19a, miR-19b, miR-92a を同定した。

(3) miR-17-92 の抑制による神経障害性疼痛への影響

miR-18a 及び miR-19a, miR-19b, miR-92a の機能をそれぞれ阻害するアンチセンス RNA を発現する AAV ベクターを作製し、ラット後根神経節へ投与した。これらの microRNA の機能を阻害することにより、痛覚閾値は顕著な影響を受けなかった。一方で、これら microRNA の機能阻害は神経障害性疼痛を長期にわたって有意に抑制した。

(4) 神経突起伸長に対する miR-17-92 の関与
末梢神経障害に伴って一次感覚神経の神経突起伸長能は亢進し、神経障害の治癒において重要であると考えられているため、この過程に対する miR-17-92 の役割も検討した。miR-17-92 を過剰発現することにより、一次感覚神経の突起伸長が抑制された。

(5) miR-17-92 の標的遺伝子群の機能探索

神経障害により発現が低下し、疼痛に寄与する microRNA の標的となる可能性のある遺伝子を大量に見出した。Ingenuity パスウェイ解析により、これらの遺伝子群には神経疾患に関わるものが多く含まれていることや、細胞間シグナリング、神経系発生、神経疾患に関与する分子ネットワークを形成していることが明らかになった。

(6) miR-17-92 標的遺伝子の同定

miR-17-92 の標的候補遺伝子のうち、ファミリーを形成する複数の遺伝子が実際にこれら microRNA の標的遺伝子であることをルシフェラーゼアッセイにより明らかにした。さらに、標的遺伝子の microRNA が結合すると予測される塩基配列を変異することにより、microRNA のルシフェラーゼ活性低下作用が消失することを見出し、実際にこの配列を microRNA が認識することを明らかにした。これら microRNA の認識配列は哺乳類において広く保存されていることから、機能的な重要性が示唆された。

また、in vivo においても一次感覚神経に miR-17-92 クラスターを過剰発現させることにより、これら標的遺伝子群の発現が低下す

ることを見出した。更に、電気生理学的にもこれらの知見が正しいことを確認し、痛覚神経機能の調節に miR-17-92 が重要であることが明らかになった。これらの遺伝子群を標的とする化合物を組み合わせて投与することにより、顕著な鎮痛効果が得られたことから、miR-17-92 およびその標的遺伝子群が神経障害性疼痛の治療標的として有望な候補となることが考えられる。

(7) 今後の展望

miR-17-92 を抑制することは神経障害性疼痛を緩和するのみでなく、神経障害に伴う修復過程の一部と考えられる神経突起伸長も促進することが明らかとなった。このことは、miR-17-92 を標的とすることが慢性に経過する神経障害性疼痛の鎮痛のみでなく、神経障害の根治治療に繋がる可能性も示唆している。今回、我々が同定した miR-17-92 の標的遺伝子以外にも非常に多くの遺伝子が疼痛もしくは神経修復に関与している可能性が残されており、miR-17-92 の更なる機能解析が新たな神経障害性疼痛治療の開発に繋がることが期待される。

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 4 件)

坂井 敦. 新生児における痛みの神経学的発達と病態生理. 小児看護 38, 1494-1500 (2015). (査読無)
Shigemori T, Sakai A, Takumi T, Itoh Y, Suzuki H. Altered microglia in the amygdala are involved in anxiety-related behaviors of a copy number variation mouse model of autism. J Nippon Med Sch 82, 92-99 (2015). DOI:10.1272/jnms.82.92 (査読有)
Kimura M, Sakai A, Sakamoto A, Suzuki H. Glial cell line-derived neurotrophic factor-mediated enhancement of noradrenergic descending inhibition in the locus coeruleus exerts a prolonged analgesic effect on neuropathic pain. Br J Pharmacol 172, 2469-2478 (2015). DOI: 10.1111/bph.13073 (査読有)
Sakai A, Suzuki H. Emerging roles of microRNAs in chronic pain. Neurochem Int 77, 58-67 (2014). DOI:10.1016/j.neuint.2014.05.010 (査読有)

[学会発表](計 20 件)

坂井 敦, 三宅紀子, 丸山基世, 三宅弘二, 島田 隆, 岡田尚巳, 鈴木秀典. miR-17-92 クラスターによる神経障害性疼痛及び軸索伸長の調節. 第 89 回日本

薬理学会年会. 2016 年 3 月 10 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

坂井 敦, 三宅紀子, 丸山基世, 三宅弘二, 島田 隆, 岡田尚巳, 鈴木秀典. 神経傷害に伴う疼痛及び軸索伸長における miR-17-92 クラスターの機能解析. BMB2015 第 38 日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会 合同大会. 2015 年 12 月 1 日. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

坂井 敦, 三宅紀子, 三宅弘二, 島田 隆, 鈴木秀典. 神経障害性疼痛及び軸索伸長に対する miR-17-92 クラスターの関与. 第 88 回日本薬理学会年会. 2015 年 3 月 20 日. 名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市)

坂井 敦. 神経障害性疼痛に対する治療標的としてのマイクロ RNA の可能性. 薬力学研究会学術講演会. 2015 年 1 月 28 日. 東京医科歯科大学 (東京都・文京区)

坂井 敦, 三宅紀子, 三宅弘二, 島田 隆, 鈴木秀典. 一次感覚神経における miR-17-92 クラスターの痛覚及び軸索伸長への影響. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 26 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

坂井 敦, 三宅紀子, 三宅弘二, 島田 隆, 鈴木秀典. 神経障害性疼痛に対する miR-17-92 クラスターの関与. 第 37 回日本神経科学大会. 2014 年 9 月 12 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Atsushi Sakai, Noriko Miyake, Koichi Miyake, Takashi Shimada, Hidenori Suzuki. miR-17-92 cluster upregulation contributes to intractable neuropathic pain. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Regulatory & Non-Coding RNAs. August 28, 2014. Cold Spring Harbor Laboratory (New York, USA)

坂井 敦, 三宅紀子, 三宅弘二, 島田 隆, 鈴木秀典. 一次感覚神経において神経障害性疼痛特異的に発現変化するマイクロ RNA の解析. 第 36 回日本疼痛学会. 2014 年 6 月 20 日. KKR ホテル大阪 (大阪府・大阪市)

坂井 敦, 鈴木秀典. 神経障害性疼痛における一次感覚神経節での miR-17-92 クラスター発現上昇. 第 87 回日本薬理学会年会. 2014 年 3 月 19 日. 東北大学・仙台国際センター (宮城県・仙台市)

[図書](計 1 件)

Sakai A, Suzuki H. microRNA and pain. In microRNA: Medical evidence (ed. by G. Santulli), Advances in Experimental Medicine and Biology 888, 17-39 (2015).

〔その他〕
ホームページ等
研究室ホームページ
<http://www.nms.ac.jp/nms/pharmacol/>

6．研究組織

(1)研究代表者

坂井 敦 (SAKAI, Atsushi)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：30386156

(2)研究分担者

該当者なし

(3)連携研究者

三宅 弘一 (MIYAKE, Koichi)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90267211