

令和元年6月11日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10813

研究課題名(和文)末梢神経損傷にตอบสนองする疼痛慢性化分子の探索と治療開発

研究課題名(英文) The search of target molecules and therapeutic development for neuropathic pain using animal models

研究代表者

榎本 光裕 (ENOMOTO, Mitsuhiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：90451971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：異なるマウス神経障害性疼痛モデルを3種作製し、Caチャンネル α_2 サブユニットの発現を比較した。足底感覚障害の経時的变化と同分子の発現パターンは疼痛モデルで異なっていた。よって各モデルに共通して発現する新規分子の探索が必要となる。一方、spared nerve injuryモデルによるDNAマイクロアレイ解析によって、DRGに発現高値を示したバソプレッシン関連分子を同定した。各疼痛モデルでRNA発現増加を認め、今後の治療標的になると思われた。同分子はDRGグリアに関連し、FACS技術を用いてDRGニューロンとグリアの単離を確立した。今後、慢性疼痛時での役割を明らかにし、治療開発を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛治療薬プレガバリンの標的分子Caチャンネル α_2 サブユニットの発現パターンは、マウス神経障害性疼痛モデルの感覚障害と相関しないことが明らかとなった。臨床的にプレガバリンに反応しない症例も多く、新規疼痛分子探索の必要性が示唆された。本研究で同定したバソプレッシン関連分子はグリアや血管内皮にも作用し、新規標的分子として有望である。ただし、疼痛に関連する具体的な作用機序は明らかではなく、今後、DRGをニューロン、グリア、血管等に分けて解析する必要がある。本学で開発されたヘテロ2本鎖核酸を利用した遺伝子発現制御がDRGで可能になれば、難治性疼痛の新たな治療法として期待できる。

研究成果の概要(英文)：We established three different types of mouse neuropathic pain models and compared their behavioral changes to expressions of Ca channel α_2 -1 subunit (α_2 -1) among them. The higher expressions of α_2 -1 in lumbar DRGs of all models were observed than the non-injury model. However, the patterns of hypersensitivities were not correlated to the α_2 -1 expressions at chronic phase after injury. We should investigate pain molecules commonly expressing in all pain models. Meanwhile, DRGs from mice with spared nerve injury were analyzed with DNA microarray. Arginine vasopressin receptor was found to be highly expressed in the DRGs 3 weeks after injury. The receptor would be expressing in the DRG glia and a therapeutic target for neuropathic pain. DRGs could divide into neurons and glias by using flow cytometry. We will elucidate functions of the receptor and develop therapeutics with DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide in the near future.

研究分野：整形外科

キーワード：慢性疼痛 末梢神経損傷

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

交通事故や転落などによる高エネルギー外傷は、脳・脊髄損傷だけでなく腕神経叢損傷、坐骨神経損傷、骨折に伴った四肢末梢神経損傷を引き起こし運動、知覚機能に大きな障害をもたらしている。特に「体性感覚系に対する損傷や疾患の直接的結果として生じている疼痛」を神経障害性疼痛と定義し、神経障害性疼痛患者の約 2-4 割は、既存の痛み止めが無効であると報告されている (Dworkin et al. Pain 2007)。このような慢性的な神経障害性疼痛は、患者にとって麻痺と並び機能障害を引き起こすことが知られており、新規治療法の開発が急務である。末梢性疾患の場合、臨床的には帯状疱疹後神経痛、複合性局所疼痛症候群、外傷後疼痛、絞扼性神経障害 (手根管症候群など) が対象となる。

本研究グループは、科研費を利用して脊髄損傷後の運動機能の再建に取り組んできた。その中で胸髄損傷ラットの運動機能検査時に損傷髄節に沿った背側皮膚を触ると、発声と逃避行動を観察することができた。臨床的にも脊髄損傷患者の 65~85% に疼痛があって、その 30% が激しい疼痛経験であったことが報告されている (Siddall. Spinal Cord. 2009)。よって疾患対象となる動物モデルでの疼痛分子の同定と治療も急務と考えてきた。

痛み受容体は一次求心性ニューロンに発現し、温度、pH、圧、カプサイシンといった化学刺激に応答する。応答する受容体は、複数あって TRP family、ASIC1-4、Piezo1/2、さらに Na⁺、Ca²⁺ チャンネルも関与する。本学神経内科教室との過去の合同研究で、TRPV1 を標的とし、shRNA を導入した AAV9 を神経障害性疼痛マウスのくも膜下腔に投与を実施した。TRPV1 遺伝子抑制によって温熱刺激過敏を有意に抑制できることが明らかとなったが、機械刺激による過敏性の低下は得られなかった (Hirai T, Enomoto M, et al. Mol Ther 2014)。AAV-shRNA による腰部 DRG での遺伝子発現制御は可能となったが、神経障害性疼痛に対する治療標的として TRPV1 のみでは不十分な結果であった。神経障害性疼痛に特徴的な機械刺激による知覚過敏を治療するためには TRPV1 以外の疼痛関連分子の探索が必要で、治療にはその分子に対する発現制御が必要と考えた。

2. 研究の目的

外傷による末梢神経損傷や絞扼性神経障害に伴う痛みは、侵害刺激の閾値低下をきたしアロディニアとなる。慢性的な神経障害性疼痛は、患者にとって麻痺と並び機能障害を引き起こすことが知られており、新規治療法の開発が急務である。軽微な皮膚刺激で疼痛を生じる状態を治療するためには、慢性疼痛に応答する分子の同定と治療のための発現制御が必要である。本研究計画では、神経損傷後に脊髄後角、後根神経節 (DRG) から神経終末までの一次ニューロンに発現するイオンチャンネルの経時的なパターンを解析して、慢性期に特異的に関与する分子を同定することである。さらに同定した疼痛慢性期応答分子に対して遺伝子発現制御技術を用いて難治性疼痛治療の開発を行うことである。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルの作製と行動学的評価: 損傷後に後肢の慢性的な疼痛を生じる。慢性疼痛にはさまざまなパターンがあり、複数の動物モデルを作製することから 3 モデルを作製した。

・ Spared nerve injury (SNI) モデル: 坐骨神経を露出して腓骨神経、脛骨神経を切断して腓腹神経を残すモデルで 1~2 週経過すると機械刺激に過敏になる。

・ 坐骨神経結紮 (Partial sciatic nerve ligation: PSLN) モデル: 坐骨神経を 8-0 絹糸で周径の約 1/2 を部分結紮した。chronic constriction injury モデルとして広く使用されている。

・ 坐骨神経 Cuff モデル: 2mm 長のポリエチレンチューブに縦割を入れて坐骨神経を圧迫する。行動学的評価: 神経損傷前後で経時的に von Frey テスト (機械刺激)、アセトンテスト (冷感)、熱刺激テスト (熱感) を施行し、足底の知覚を評価した。

(2) 一次求心性ニューロンでの疼痛関連分子の経時的な発現

損傷急性期 (3 日)、慢性期 (3 週・6 週) にわけて疼痛マウスから腰部 DRG を単離した。

・ RNA 発現解析: 神経障害性疼痛の治療薬のプレガバリンの標的分子であるカルシウムチャンネル 2 -1 サブユニット (2 -1) を標的に RT-PCR 法を用いた RNA 発現解析を行った。

(3) SNI モデル特異的疼痛分子の探索: SNI モデルは腓腹神経のみを残存させるモデルである。SNI、腓腹神経切断、坐骨神経切断、対照 (皮切のみ) の 4 群を作製して 3 週後に腰部 DRG を単離し、SNI 特異的に腰部 DRG に発現する分子を DNA マイクロアレイによって解析した。

関連分子に関して損傷 3 週目に腰部 DRG を単離して固定標本を作製し、免疫染色を実施した。

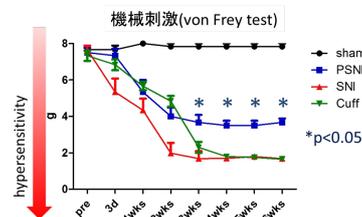
(4) Thy1-YFP トランスジェニックマウスを用いた疼痛慢性化機序の解明

・ Thy1-YFP Tg マウス: 運動・知覚神経の可視化が可能マウスである (Feng et al. Neuron. 2000)。DRG neuron も YFP 陽性となるため定量評価に有用である。同マウスの SNI モデルを作製し、3 週目に腰部 DRG を単離し、Liu らの方法 (J Neurosci Methods 2017) に従ってパライン処理を行った。細胞塊形成が顕著だったため Collagenase P で酵素処理し、FACS を実施した。

4. 研究成果

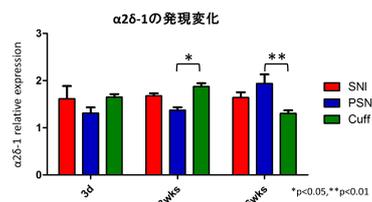
(1) 神経損傷後の足底の知覚変化

行動学的には、損傷3日でSNI群が最も痛覚過敏となった。Cuff群、PSNL群は損傷後、徐々に痛覚過敏を示し、Cuff群では3週目以降SNI群と同様の痛覚過敏を示した。一方、PSNL群は3週目以降痛覚過敏の悪化はなかった(機械刺激：右グラフ)。



(2) 神経損傷後の $\alpha 26-1$ の発現変化

$\alpha 26-1$ の mRNA 発現は損傷3日目ではSNIがSham群の1.6倍と最も高値を示し、徐々に発現低下を示した。PSNL群は6週目でも発現増加を示し、Cuff群では3週目でSham群の1.9倍、6週目で1.3倍と減少した(右棒グラフ)。

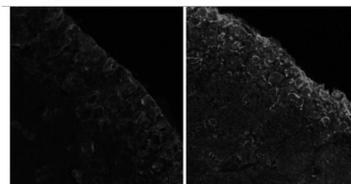


SNIモデルでは機械刺激に対する反応閾値の低下とともに、 $\alpha 26-1$ /mRNAの発現が有意に増加し、持続していた。PSNLモデルでも同様のパターンを示していたが、Cuffモデルでは損傷6週で $\alpha 26-1$ /mRNAの発現が減少した。同分子が各モデルの疼痛パターンと相関しているわけではなく、他の分子が疼痛慢性化に寄与している可能性を示唆するものであった。

(3) SNIモデル特異的疼痛分子

疼痛に関連する分子について網羅的にRNA発現を解析し、グループ間で比較した。その中で坐骨神経切断モデルよりもSNIモデルで2倍以上の発現高値を示した神経に関連する4分子を同定した。その中でバソプレッシン関連分子AVPR1aに注目した。新規にSNIモデルと左坐骨神経を絹糸で部分結紮するPSNLモデルを作製して経時的に腰部DRGでの同分子でのmRNA発現を解析した。SNIでは損傷3週目で対照群と比較して1.8倍、6週目で1.3倍の発現高値を認めた。PSNLでは、3週目で2.5倍、6週目で1.6倍の発現高値を認めた。同分子は、損傷慢性期で2つの疼痛モデルに共通して腰部DRGで高値を示していた。また、SNIモデルの腰部部分での発現解析では、腰部DRGと同様に損傷3週、6週で高値を示していた。蛍光免疫染色では、SNIモデルの3週目腰部DRGでAVPR1a陽性領域の発現増加を認め、ニューロン周囲のグリアでの発現が目立つ(右写真)。本結果から同分子が腰部DRGから脊髄までの経路で疼痛慢性期に反応していることが明らかとなった。

L4 DRG : AVPR1a positive area
Sham SNI



(4) FACSを利用したDRGニューロンとグリアの単離

細胞生存率は約90%であった。YFP陽性神経細胞は検出可能で細胞サイズに関して2峰性を示し、グリアの選択的単離解析が可能であった。グリア細胞数は、健側よりもSNI側で約11%増加していた。今後、AVPR1a抗体を用いて発現パターンを解析し、慢性疼痛時の役割を明らかにしていく予定である。

<引用文献>

Dworkin RH, et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain*. 2007

Siddall PJ. Management of neuropathic pain following spinal cord injury: now and in the future. *Spinal Cord*. 2009

Hirai T, Enomoto M, et al. Intrathecal AAV serotype 9-mediated delivery of shRNA against TRPV1 attenuates thermal hyperalgesia in a mouse model of peripheral nerve injury. *Mol Ther*. 2014

Feng G, et al. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 2000

Liu L, et al. Flow cytometry analysis of inflammatory cells isolated from the sciatic nerve and DRG after chronic constriction injury in mice. *J Neurosci Methods*. 2017

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

Deng X, Li L, Enomoto M, Kawano Y. Continuously Frequency-Tuneable Plasmonic Structures for Terahertz Bio-sensing and Spectroscopy. *Sci Rep*. 2019 Mar 5;9(1):3498. doi: 10.1038/s41598-019-39015-6. PubMed PMID: 30837486; PubMed Central PMCID: PMC6401124.

Oyaizu T, Enomoto M, Yamamoto N, Tsuji K, Horie M, Muneta T, Sekiya I, Okawa A, Yagishita K. Hyperbaric oxygen reduces inflammation, oxygenates injured muscle, and regenerates skeletal muscle via macrophage and satellite cell activation. *Sci Rep*. 2018 Jan 22;8(1):1288. doi: 10.1038/s41598-018-19670-x. PubMed PMID: 29358697; PubMed Central PMCID: PMC5778072.

Ushio S, Kawabata S, Sumiya S, Kato T, Yoshii T, Yamada T, Enomoto M, Okawa A. A multi-train electrical stimulation protocol facilitates transcranial electrical motor evoked potentials and increases induction rate and reproducibility even in

patients with preoperative neurological deficits. J Clin Monit Comput. 2018 Jun;32(3):549-558. doi: 10.1007/s10877-017-0045-8. Epub 2017 Jul 14. PubMed PMID: 28710663.

Yoshii T, Hirai T, Yamada T, Inose H, Kato T, Sakai K, Enomoto M, Kawabata S, Arai Y, Okawa A. Intraoperative evaluation using mobile computed tomography in anterior cervical decompression with floating method for massive ossification of the posterior longitudinal ligament. J Orthop Surg Res. 2017 Jan 19;12(1):12. doi: 10.1186/s13018-017-0515-1. PubMed PMID: 28103899; PubMed Central PMCID: PMC5244593.

Enomoto M, Yagishita K, Okuma K, Oyaizu T, Kojima Y, Okubo A, Maeda T, Miyamoto S, Okawa A. Hyperbaric oxygen therapy for a refractory skin ulcer after radical mastectomy and radiation therapy: a case report. J Med Case Rep. 2017 Jan 4;11(1):5. doi: 10.1186/s13256-016-1168-0. PubMed PMID: 28049509; PubMed Central PMCID: PMC5209955.

Yoshii T, Hirai T, Sakai K, Sotome S, Enomoto M, Yamada T, Inose H, Kato T, Kawabata S, Okawa A. Anterior Cervical Corpectomy and Fusion Using a Synthetic Hydroxyapatite Graft for Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament. Orthopedics. 2017 Mar 1;40(2):e334-e339. doi: 10.3928/01477447-20161208-02. Epub 2016 Dec 15. PubMed PMID: 27977040.

Hayashi K, Takahashi T, Ikegawa M, Horie M, Oyaizu T, Enomoto M, Shibata S, Yagishita K, Ueno T. The facilitatory effects of hyperbaric oxygen treatment on membrane bone wound healing in a rat calvarial defect model. Undersea Hyperb Med. 2016 Mar-Apr;43(2):135-42. PubMed PMID: 27265990.

Hirai T, Yoshii T, Enomoto M, Yamada T, Taniyama T, Inose H, Kato T, Okawa A (2016) Pregabalin Versus Acetaminophen for a Treatment of Chronic Neuropathic Pain on Extremities after Cervical Surgery: A Prospective Randomized, Open-Label Preliminary Study. J Pain Relief 5:273. doi:10.4172/2167-0846.1000273

[学会発表](計 8 件)

李 樂陽, 榎本 光裕, 横山 裕之, 鍋木 秀俊, 平井 高志, 若林 良明, 大川 淳 マウス腓骨神経損傷慢性期での神経再建後の再生様式と機能回復 再建方法による違い 第 33 回日本整形外科基礎学術集会 2018 年 10 月 11~12 日 奈良

横山 裕之, 平井 高志, 榎本 光裕, 永田 哲也, 横田 隆徳, 大川 淳 DNA マイクロアレイを用いた神経障害性疼痛関連分子の調査 第 33 回日本整形外科基礎学術集会 奈良 2018 年 10 月 11~12 日 奈良

李 樂陽, 榎本 光裕, 鍋木 秀俊, 横山 裕之, 平井 高志, 若林 良明, 大川 淳 マウス腓骨神経再生のための神経筋接合部の役割 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年 10 月 26~27 日 沖縄

平井 高志, 榎本 光裕, 鍋木 秀俊, 横山 裕之, 大川 淳 次世代シーケンサーを用いた疼痛モデルにおける RNA の 3'UTR における新たなバリエーション 治療として最も効率的な標的分子の探索 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年 10 月 26~27 日 沖縄

横山 裕之, 榎本 光裕, 平井 高志, 鍋木 秀俊, 大川 淳, 若林 良明 複数の神経障害性疼痛マウスモデルの腰部後根神経節における電位依存性カルシウムチャンネル 2 -1 サブユニット発現と疼痛パターンの比較検討 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年 10 月 26~27 日 沖縄

鷲見晶 鍋木秀俊 平井高志 大川淳 榎本光裕 神経障害性疼痛モデルにおける腰部後根神経節での電位依存性ナトリウムおよびカルシウムチャンネル 2 サブユニットの役割 第 31 回日本整形外科基礎学術集会 2016 年 10 月 13~14 日 福岡

榎本 光裕, 柳下 和慶, 請川 大, 森田 定雄, 大川 淳 高齢者慢性腰痛と前屈時腰背筋活動の関係 第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会 2016 年 6 月 9~11 日 京都

鍋木秀俊 鷲見晶 平井高志 若林良明 横田隆徳 大川淳 榎本光裕 Role of voltage-gated sodium channels and calcium channel subunit alpha-2/delta-1 in the lumbar dorsal root ganglions of persistent peripheral neuropathic pain model mice. Neuroscience2016 (国際学会) 2016 年 11 月 12~16 日 サンディエゴ(米国)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

東京医科歯科大学整形外科 <https://tmdu-orth.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：早乙女 進一
ローマ字氏名：(SOTOME, Shinichi)
所属研究機関名：東京医科歯大学
部局名：大学院医歯学総合研究科
職名：寄付講座准教授
研究者番号(8桁)：20401391

研究分担者氏名：大川 淳
ローマ字氏名：(OKAWA, Atsushi)
所属研究機関名：東京医科歯大学
部局名：大学院医歯学総合研究科
職名：教授
研究者番号(8桁)：30251507

研究分担者氏名：辻 邦和
ローマ字氏名：(TSUJI, Kunikazu)
所属研究機関名：東京医科歯大学
部局名：大学院医歯学総合研究科
職名：寄付講座准教授
研究者番号(8桁)：20323694

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横山 裕之
ローマ字氏名：(YOKOYAMA, Hiroyuki)

研究協力者氏名：平井 高志
ローマ字氏名：(HIRAI, Takashi)

研究協力者氏名：李 樂陽
ローマ字氏名：(LI, Leyang)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。