

令和元年5月31日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10986

研究課題名(和文) 小児期の神経障害性疼痛抵抗性に着目した新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Novel therapeutic target based on neonatal resistance to neuropathic pain

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期および発達後のラットに対して神経結紮・切断による神経障害性疼痛誘発処置を施し、幼若期における疼痛未発症期と対応する発達後の疼痛発症期における遺伝子発現変化をRNAシーケンスにより網羅的に解析した。幼若期と発達後の神経障害により末梢の感覚情報を受容する後根神経節で発現変化パターンが異なる遺伝子群を新規に数多く同定した。これらの遺伝子群には炎症や免疫に関連する機能を有するものが数多く含まれていたことから、神経障害性疼痛の新規治療標的候補として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は既存の鎮痛薬の有効性が乏しく慢性に経過する疼痛であり、より有効な治療法の開発が緊急に求められている。本研究では、幼若期に見られる神経障害性疼痛抵抗性の分子基盤を遺伝子発現変化を包括的に比較検討することで探索し、疼痛に関与する可能性のある数多くの炎症・免疫関連遺伝子を新規に同定することに成功した。幼若期神経障害性疼痛抵抗性の分子基盤である可能性があるこれらの遺伝子は発達後の神経障害性疼痛に対する治療へ応用することで新たな治療戦略が導かれることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Traumatic nerve injury inducing neuropathic pain in adult animals were produced in neonatal and young adult rats. Comprehensive gene expression changes in nerve-injured neonatal and young adult rats were examined using RNA sequence. A number of genes that showed differential expression changes between these rats were first identified in the dorsal root ganglia, which detects peripheral sensory stimuli. Many of these genes had many inflammation- and/or immune-related functions and therefore is considered a novel therapeutic target for neuropathic pain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 RNAシーケンス 神経炎症 バイオインフォマティクス 一次感覚神経 後根神経節 ミクログリ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 研究の学術的背景

神経障害性疼痛は体性感覚系の障害に起因する難治性で慢性の疼痛である。研究の進歩により、治療法は改善してきていたが、十分な鎮痛効果が得られることは少なく、鎮痛薬の副作用も治療の大きな問題であった。従って、新たな切り口からの神経障害性疼痛治療法の開発が重要と考えられた。

ヒト小児は成人と同様に末梢の組織炎症に伴って疼痛を発症する一方で、神経障害によって引き起こされる疼痛の発症率が極めて低いことが疫学的に示されていた(Howard et al., Arch Dis Child 2014)。末梢組織から脳へ至る痛みへの神経回路は出生前に既に形成されているが、回路全体に亘って未熟であり、生後の感覚経験や内因性の自発的な感覚神経の活動により徐々に成熟していく(坂井、小児看護 2015)。すなわち、痛みを伝える神経系の発達期における特性が神経障害性疼痛に対する発症抑制に関わっている可能性が推察された。

実験動物においてもヒトと同様に、幼若期には神経障害性疼痛を発症しない。神経炎症の主要な担い手であるミクログリアやアストロサイトは末梢神経障害により脊髄後角で活性化し、炎症性サイトカインの放出などにより、痛覚過敏を惹起すること知られていた。McKelveyらは幼若期に脊髄後角における炎症性サイトカインの発現とミクログリアやアストロサイトの活性化が抑えられている可能性を報告しており(J Neurosci 2015)、神経障害による神経炎症に違いがある可能性が考えられた。すなわち、神経障害性疼痛に関する幼若期の特異性を担う候補として、グリア細胞の活性化に影響を与える一次感覚神経の機能差異、および同神経からのシグナルを受け取り神経炎症の主要な担い手として機能する脊髄ミクログリアやアストロサイトの機能差異が可能性として考えられたが、その分子・細胞基盤はほとんど明らかにされていなかった。

従って、幼若期に見られる神経障害性疼痛抵抗性の分子基盤を研究対象とすることによって、神経障害性疼痛の治療に対する新たな戦略的アプローチが可能になると考えるに至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、幼若期における神経-グリア間シグナリングを中心に神経障害性疼痛抵抗性の分子・細胞基盤を明らかにし、発達後との差異を明確にすることにより、難治性の神経障害性疼痛の新規治療標的を見出すことを目的とした。幼若期の神経障害における神経細胞、ミクログリアおよびアストロサイトを発達後と比較解析することでそれぞれの細胞群の特性を明らかにし、神経グリア間シグナリングにおける幼若期の特異性を検討することを目指した。この検討を通して、幼若期における神経障害性疼痛発症抑制に関わる分子・細胞メカニズムを見出し、神経障害性疼痛に対する新規治療戦略へと応用することを目的とした。標的分子を特定せずに RNA シーケンスにより網羅的に標的候補をスクリーニングし、バイオインフォマティクスを用いて解析を行うことで、神経炎症関連分子を中心とした新規の治療標的の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

小児期における神経障害性疼痛抵抗性の分子基盤を神経炎症に着目して解析し、神経障害性疼痛の新規治療戦略への応用を試みた。そのために、幼若期と発達後における神経障害による変化の差異を、グリア細胞を活性化する神経細胞側因子を同定するために RNA シーケンスにより網羅的に解析した。バイオインフォマティクスにより神経炎症の主要制御因子となる候補遺伝子を絞り込んだ上で、疼痛治療への応用可能性を検討した。

全ての外科手術はイソフルランの吸入による深麻酔下において行った。侵襲性が低く、動物個体サイズの変化による影響が少ないことから、腓腹神経は傷つけずに、総腓骨神経と脛骨神経を結紮/切断する spared nerve injury (SNI) モデルを神経障害性疼痛モデルとして生後 7 日において作製した。

末梢組織における侵害情報などの体性感覚刺激を受容し、脊髄へと伝達する一次感覚神経の細胞体が位置する後根神経節における遺伝子変化を RNA シーケンスにより網羅的に探索した。Total RNA からポリ A 鎖を有する mRNA を標的として cDNA ライブラリーを作製し、これらの発現量を次世代シーケンサーにより解析した。幼若期と発達後間、およびそれぞれの発達段階における末梢神経障害の有無による遺伝子発現の違いを比較検討し、以下に記す変化を示した遺伝子を、その後の詳細な解析の対象とした。また、神経障害性疼痛における神経炎症の担い手であるミクログリアやアストロサイトの性質に関して遺伝子発現を指標として幼若期と発達後において比較検討した。

- (A) 幼若期の障害でのみ変化する遺伝子
- (B) 発達後の障害でのみ変化する遺伝子
- (C) 幼若期の障害で発達後の障害と逆の変化をする遺伝子
- (D) 幼若期と発達後で発現量に差がある遺伝子

上記により見出した遺伝子群が関わりと考えられる機能や分子間ネットワークを代表的なオミクスデータ解析ツールである Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いて解析した。さらに、これら遺伝子群の発現を一括して調節する可能性のある上流因子も IPA により探索した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 幼若期および発達後のラットにおける神経障害性疼痛の比較検討

神経障害性疼痛モデルとして頻用される SNI モデルを 5-6 週令のラットにおいて作製することにより、急速に発症し、長期にわたる疼痛行動を示した。一方で、生後 1 週令のラットに SNI を施したところ、神経障害後 2-3 週間は対照側と比較して機械的刺激に対する痛覚閾値が低下せず、疼痛行動を示さなかった。その後、成長に従って痛覚閾値は低下し、神経障害性疼痛を発症した。

##### (2) 幼若期と発達後における神経障害による遺伝子発現変化の解析

幼若期における神経障害性疼痛抵抗性の分子基盤を網羅的に捉えるために、幼若期および発達後に SNI を施したラットの後根神経節を神経障害後 2 週において摘出し RNA シーケンスを行った。対照として、Sham 処置を施した後根神経節を用いた。発達後に SNI を施すことにより神経障害性疼痛を発症したラットの後根神経節と sham 処置を施したラットの後根神経節における遺伝子発現量を比較することにより有意に発現変化する遺伝子群を数多く同定した。さらに、幼若期に SNI を施したラットと sham 処置を施したラットの後根神経節において遺伝子発現量を比較したところ、神経障害性疼痛を呈していない時期にもかかわらず、多くの遺伝子の発現が変化していることを初めて明らかにした。

さらに、末梢神経障害による後根神経節での遺伝子発現変化を幼若期と発達期において比較検討することにより多くの治療標的候補となる可能性のある遺伝子群の同定に成功した。神経障害により幼若期と発達後でともに発現上昇もしくは発現低下を示す遺伝子が多く存在していたが、幼若期もしくは発達後の神経障害でのみ発現変化する遺伝子も多く同定された。さらに、幼若期と発達後で神経障害による発現変化の方向性が異なる遺伝子も数 10 から数 100 同定された。これらの幼若期と発達後で神経障害による発現変化が異なる遺伝子は幼弱期における神経障害性疼痛抵抗性の分子基盤である可能性が考えられ、もともと幼若期に備わっている性質であることから有効な治療標的として期待された。

##### (3) バイオインフォマティクスによる幼若期神経障害性疼痛抵抗性の分子基盤の探索

上記研究成果(2)で見出した幼若期における神経障害性疼痛抵抗性の分子基盤である可能性のある遺伝子群の機能や上流調節因子などをバイオインフォマティクスを用いて探索した。幼若期と発達後で異なる発現変化を示す遺伝子とその発現変化パターンや発現量 (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads; FPKM 値) により分類し、各分類に含まれた遺伝子群を解析したところ、これらの遺伝子群には炎症や免疫に関わる機能を有するものが多く含まれることが明らかになった。このような炎症や免疫に関連する機能を有する遺伝子には従来神経障害性疼痛への関与が報告されているものも多く含まれていたが、疼痛との関連が報告されていない遺伝子も数多く新たに同定された。さらに、既知疼痛関連遺伝子と新規疼痛関連遺伝子候補の mRNA 発現量や脊髄における神経炎症関連遺伝子等を定量的 PCR 法により発現解析することで RNA シーケンスの結果を確認するとともに、発達後の神経障害性疼痛に対する治療への応用を検討した。これらの結果から、有効な神経障害性疼痛治療標的が新たに開発されることが期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

Iwasaki H, Sakai A\*, Maruyama M, Ito T, Sakamoto A, Suzuki H. Increased H19 long non-coding RNA expression in Schwann cells in the peripheral neuropathic pain. J Nippon Med Sch, in press. 査読有. doi: 10.1272/jnms.JNMS.2018\_86-402

坂井 敦\*、丸山 基世、鈴木 秀典. 神経障害性疼痛におけるマイクロ RNA と長鎖非コード RNA. Pain Res, in press. 査読有.

坂井 敦、鈴木 秀典. microRNA クラスター miR-17-92 による神経障害性疼痛の制御. 生化学 90, 524-528 (2018) 査読有. doi:10.14952/SEIKAGAKU.2018.900524

Sakai A\*, Saitow F, Maruyama M, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Okada T, Suzuki H. MicroRNA cluster miR-17-92 regulates multiple functionally related voltage-gated potassium channels in chronic neuropathic pain. Nat Commun 8, 16079 (2017) 査読有. doi:110.1038/ncomms16079

Ito N, Sakai A\*, Miyake N, Maruyama M, Iwasaki H, Miyake K, Okada T, Sakamoto A, Suzuki H. miR-15b mediates oxaliplatin-induced chronic neuropathic pain through BACE1 down-regulation. Br J Pharmacol 174, 386-395 (2017) 査読有. doi:10.1111/bph.13698

[学会発表](計 18 件)

坂井 敦、丸山 基世、福永 津嵩、浜田 道昭、岡田 尚巳、鈴木 秀典. 神経障害性疼痛における長鎖非コード RNA Neat1 の作動機構の探索. 生理学研究所研究会 2018.

星川 直哉、坂井 敦、鈴木 秀典、高井 信朗. miR-21 を標的とした変形性関節症に伴う疼痛治療の可能性. 第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会 2018.

丸山 基世、坂井 敦、福永 津嵩、浜田 道昭、岡田 尚巳、鈴木 秀典. 神経障害性疼痛及び軸索再生に対する Neat1 の関与. 第 20 回日本 RNA 学会年会 2018.

Motoyo Maruyama, Atsushi Sakai, Takashi Okada, Hidenori Suzuki. Involvement of the long non-coding RNA Neat1 in the neuropathic pain and neurite outgrowth following nerve injury. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto) 2018.

Atsushi Sakai, Fumihito Saitow, Motoyo Maruyama, Noriko Miyake, Koichi Miyake, Takashi Okada, Hidenori Suzuki. Role of miR-17-92 in the functional changes of primary sensory neurons following nerve injury. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018 Kyoto) 2018.

星川 直哉、坂井 敦、高井 信朗、鈴木 秀典. 変形性膝関節症モデルラットにおいて miR-21 は Toll-like receptor を介して疼痛に関与する. 第 40 回日本疼痛学会 2018.

坂井 敦、丸山 基世、岡田 尚巳、鈴木 秀典. 神経障害性疼痛モデルラットの一次感覚神経における Neat1 長鎖非コード RNA の解析. 第 40 回日本疼痛学会 2018.

坂井 敦. 末梢神経傷害に伴う一次感覚神経機能変化における miR-17-92 の役割. 生理学研究所 研究会 2017.

丸山 基世、坂井 敦、岩崎 宏俊、鈴木 秀典. 神経傷害による長鎖非コード RNA の発現変化. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) 2017.

坂井 敦、齋藤 文仁、丸山 基世、三宅 紀子、三宅 弘一、岡田 尚巳、鈴木 秀典. miR-17-92 クラスターは感覚神経の神経損傷において電位依存性カリウムチャネル機能を調節する. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会) 2017.

鈴木 秀典、坂井 敦. 末梢性神経障害と変動する miRNA: リキッドバイオブシーによる痛みのバイオマーカーへの可能性. 第 37 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム 2017.

坂井 敦、丸山 基世、岩崎 宏俊、鈴木 秀典. 後根神経節に高発現する長鎖非コード RNA の神経障害性疼痛における変化. 第 39 回日本疼痛学会 2017.

丸山 基世、坂井 敦、鈴木 秀典. 神経障害性疼痛における長鎖ノンコーディング RNA の発現解析. 第 90 回日本薬理学会年会 2017.

坂井 敦、丸山 基世、鈴木 秀典. 感覚神経傷害による miR-21 の細胞外放出の上昇. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016.

Atsushi Sakai, Naomi Ito-Kuroki, Motoyo Maruyama, Noriko Miyake, Hirotoishi Iwasaki, Koichi Miyake, Takashi Okada, Atsuhiko Sakamoto, Hidenori Suzuki. miR-15b role in the oxaliplatin-induced neuropathic pain. 16th World Congress on Pain 2016.

坂井 敦、三宅 紀子、丸山 基世、三宅 弘一、島田 隆、岡田 尚巳、鈴木 秀典. 神経障害性疼痛における miR-17-92 クラスターによる電位依存性カリウムチャネル調節. 第 39 回日本神経科学大会 2016.

坂井 敦、丸山 基世、三宅 紀子、齋藤 文仁、三宅 弘一、島田 隆、岡田 尚巳、鈴木 秀典. 神経障害性疼痛における miR-17-92 クラスターによるカリウムチャネルの調節. 第 38 回日本疼痛学会 2016.

黒木 直美、坂井 敦、三宅 紀子、三宅 弘一、岡田 尚巳、鈴木 秀典、坂本 篤裕. 一次感覚神経節 miR-15b のオキサリプラチン誘発性神経障害性疼痛における解析. 第 63 回日本麻酔科学会 2016.

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：microRNA-21 を標的とした変形性関節症による疼痛の緩和

発明者：星川 直哉、坂井 敦、鈴木 秀典、高井 信朗

権利者：学校法人日本医科大学

番号：PCT/JP2019/009867

出願年：2019 年

国内外の別： 国外移行

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.nms.ac.jp/nms/pharmacol/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：鈴木 秀典

ローマ字氏名：Suzuki Hidenori

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：大学院医学研究科

職名：大学院教授

研究者番号(8桁): 30221328

(2)研究協力者

研究協力者氏名：丸山 基世

ローマ字氏名：Maruyama Motoyo

研究協力者氏名：井野 佑佳

ローマ字氏名：Ino Yuka

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。