

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04320

研究課題名(和文) LincRNAome解析を通じた新しい疼痛治療学の基盤確立

研究課題名(英文) Genome-wide linc RNA analysis in patients with neuropathic pain

研究代表者

山内 正憲 (Yamauchi, Masanori)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00404723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：遷延性術後痛(PONV)は手術後に生じる不快な合併症の1つである。だがその分子遺伝学的機序は明らかになっていない。本研究はラット下肢の皮膚・筋肉に切開と牽引を用いて、ラットCPSPモデルを確立した後に、疼痛伝達経路である脊髄と後根神経節のゲノム網羅的な遺伝子発現変化を、とくに長鎖非翻訳RNA(LincRNA)に着目して、CPSPの分子遺伝学的機序を解明するものである。行動学的研究ではCPSPモデルで長期の疼痛関連行動変化を出現させることができた。トランスクリプトーム解析ではAABR07007055.1遺伝子と転写されるLincRNAとの関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CPSPは術後の合併症の中でも10-20%の高い頻度で起こる不快な合併症の1つである。CPSPの臨床的危険因子は疫学研究ですでに明らかになっており、周術期管理に影響を与えているが、PONVを完全に予防することは困難で、患者の医療に対する満足度を下げても多い。本研究ではAABR07007055.1をはじめとした複数の長鎖非翻訳RNAの関与を同定できた。この知見は近い将来、国際誌に原著論文として発表予定である。今後はこれらの長鎖非翻訳RNAの末梢神経や中枢神経での機能を解析して、新たな核酸医薬の周術期での使用を視野に入れて、さらに研究を推進したい。

研究成果の概要(英文)：Chronic postsurgical pain (CPSP) is an unpleasant complication after surgery. However, the molecular genetic mechanisms underlying CPSP have not been fully elucidated. The aims of this study were to determine the whole genome-wide change in long non-coding RNA gene expression in the rat spinal cord and dorsal root ganglions and to try to determine the involvement of long non-coding RNAs in CPSP. The results of a behavioral study showed that pain-related behaviors persisted for over 60 days in the CPSP model rat but not in sham-operated rats. Whole transcriptome sequencing showed that AABR07007055.1 gene expression was significantly increased in both spinal cord and dorsal root ganglions of the CPSP model. We focused on AABR07007055.1 gene as a candidate associated with CPSP. The findings suggested that the change in AABR07007055.1 gene expression level may be involved in the molecular mechanisms underlying the development of CPSP.

研究分野：麻酔科学・疼痛医学

キーワード：神経障害性疼痛 長鎖非翻訳RNA ゲノム網羅的関連解析

1. 研究開始当初の背景

疼痛治療学は社会ではペインクリニックとして認知されており、慢性疼痛(神経障害性疼痛)を診断治療する医療分野の1つである。近年、そのなかでも遷延性術後痛(Chronic Postsurgical Pain: CPSP)が大きな話題となっている。このCPSPは通常、数日で消失するはずの手術後の創部痛が3ヶ月以上にわたって持続するものである。明らかな疼痛ではなく知覚の異常、たとえば季節の変わり目に傷が疼くなども含めると、全手術患者の10-20%に起こるとされ、予想以上に有病率が高いことが判ってきた。とくに1-2%の患者のCPSPは治療抵抗性で難治であることが問題であり、ペインクリニックを受診することも多い。それにもかかわらずCPSPが形成されるメカニズムは、これまでほとんど判っていない。

2. 研究の目的

われわれは疼痛治療学・疼痛遺伝学で全貌がほとんど判っていない長鎖非翻訳RNA(long intergenic non-coding RNA: lincRNA または lncRNA)に焦点をあて、次世代DNAシーケンサーを用いたLincRNAome解析(ゲノム網羅的長鎖非翻訳RNA発現解析)を中心戦略として、手術患者のCPSP形成に関与するlncRNAを同定して、そのメカニズムの一端の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) ラット CPSP モデルの開発と疼痛行動解析

まずわれわれはFlattersの皮膚筋肉/切開牽引手術(SMIR手術)を独自に改変した方法で、長期に渡り機械刺激・熱刺激に対して逃避閾値の低下を示す新規のラットCPSPモデルを開発した。

手術ではイソフルラン麻酔下に背臥位としたラットの下肢に、伏在静脈の約4mm内側で15-20mmの皮膚切開を行い、次に伏在静脈の4mm内側でgracilis muscleを7-10mm切開した。さらに先端が鈍な鋏でその下の筋層を剥離し、adductor muscleに開創器をかけ20mm展開した。開創器の展開を60分行った後に、筋層を吸収糸で縫合、皮膚をナイロン糸で閉創した。

機械刺激にはvon Frey試験、熱刺激にはHargreaves試験を行い、前者では足底を刺激する圧、後者は下肢の逃避が起こるまでの潜時を計測した。術後9週間まで逃避閾値を測定し、ラットCPSPモデル群(n=10)と、偽手術として皮膚と筋層の切開・縫合のみを行った従来の遷延ではない手術後痛モデルに近いsham群(n=8)を比較した。

(2) ラット遷延性術後痛モデルの組織学的解析

術後14日に坐骨神経のKlüver-Barrera染色、坐骨神経でneurofilament抗体を用いた免疫染色、後根神経節でATF3抗体を用いた免疫染色を行った。

(3) ラット遷延性術後痛モデルの脊髄と後根神経節におけるLincRNAome解析

さらに術後14日目にCPSPモデル群(n=3)とsham群(n=3)で、患側の脊髄と後根神経節から全量RNAを抽出し、次世代DNAシーケンサーを用いてRNAシーケンスを行った。シーケンスの結果(リード)はHISAT2でラット参照ゲノム(rn6)にマッピングし、StringTieですべての遺伝子についてカウントデータ表(遺伝子名×遺伝子発現量の行列)を作成した。両群間の遺伝子発現量の差は、DESeq2を用いて統計学的に比較した。さらにEnsemblゲノムデータベースのBioMartサービスを用いて、rn6におけるlncRNAのGene Symbol名を獲得し、lncRNAのデータのみを抽出した。DESeq2による比較でp<0.1であった遺伝子を、発現変動lncRNA遺伝子(DELRG)と定義した。

4. 研究成果

(1) 新規のラット CPSP モデルは9週間、手術後痛が継続して回復する

行動解析では、CPSPモデル群では機械刺激による逃避閾値の低下は手術直後から術後63日目まで持続した。対してsham群では術後4日目でもっとも閾値の低下が観察され、すぐに回復した。一方、熱刺激による逃避閾値の低下はCPSPモデル群では手術直後から術後35日目まで持続した。われわれが開発したこの新しいモデルは実際の患者の手術に用いられる器具と操作(皮膚と筋肉の切開・牽引)だけで疼痛の遷延を引き起こした。

(2) ラット CPSP モデルでは坐骨神経の広範な脱髄を認めるが軸索損傷は生じていない

組織学的解析ではCPSPモデル群の髄鞘の染色面積がsham群より減少していた。しかし、CPSPモデル群の坐骨神経では、sham手術を行ったラットに対して、neurofilamentの染色は同じレベルであった。またCPSPモデル群の後根神経節では、ATF3の染色は確認できな

かった．これらの観察からはラット CPSP モデルでは坐骨神経の広範な脱髄を認めるが軸索損傷は生じていないことを示唆している．

(3) ラット CPSP モデルで高度に発現量が変動する lncRNA を同定したが、機能は不明である

RNA シークエンスではまず脊髄で 28,245 種の遺伝子発現を定量した．後根神経節では 28,101 種の遺伝子発現を定量した．rn6 における lncRNA 遺伝子は 3,091 種で紐付いた lncRNA は 3,304 種であった．DESeq2 で CPSP モデル群と sham 群の間で発現量を比較したところ、DELRG は脊髄で 3 種、後根神経節で 11 種であった(表 1)．

表 1 CPSP モデル群における lncRNA の高度な発現変化 (vs. sham 群)

Gene Symbol 名	平均発現量 (FPKM)	発現量変化 (倍)	p 値
脊髄			
AC134224.3	912	0.76	0.004
AC134224.1	2258	0.77	0.01
AABR07007055.1	158	1.25	0.07
後根神経節			
AABR07000382.1	72	6.44	< 0.00000001
AABR07017145.2	2787	0.67	0.0000023
AABR07007055.1	424	1.90	0.0000077
AABR07044837.2	18	1.79	0.000067
AABR07038849.1	354	0.72	0.01
AABR07005593.1	27	1.45	0.05
AC108616.2	76	0.69	0.05
AABR07034750.1	905	0.85	0.06
AABR07056953.1	83	1.44	0.06
AABR07000385.2	116	0.73	0.06
AABR07021547.1	231	1.31	0.09

FPKM: fragments per kilobase of exon per million mapped reads

これら 14 種の lncRNA についてはその機能を同定した先行研究は存在しない．脊髄での DELRG では、AC134224.3 と AC134224.1 は近傍に位置しており、どちらも CPSP モデルでは減少しているため、同じ機能を有しているのかもしれない．もう 1 つの AABR07007055.1 は、脊髄で発現量が増加しているが、後根神経節でも高度に発現量が増加しており、脊髄の前シナプスレベルでのメカニズムへの関与が示唆されるのかもしれない．まずはこの lncRNA について今後、wet の実験で機能解析を推進する予定である．

一方、後根神経節では、AABR07000382.1 の高度な発現増加や AABR07017145.2 の発現低下が観察されるが、その生化学的意義は明らかではない．1 つ興味深いのは AC108616.2 がラットゲノム上の Chrnb3 遺伝子と Chrnb4 遺伝子の間の領域にコードされていることである．両遺伝子はそれぞれ、ニコチン性アセチルコリン受容体の 3 サブユニットと 4 サブユニットを転写・翻訳するので、この lncRNA はニコチン性アセチルコリン受容体の機能の修飾に関与しているのかもしれない．

以上、われわれの研究では、手術患者の CPSP 形成のメカニズムに関与する可能性のある lncRNA を同定することができた．今後はさらに lncRNA の機能解析を行い、さらに詳細な分子遺伝学的機序に肉迫する予定である．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木潤, 杉野繁一, 紺野大輔, 城戸幹太, 片桐紀香, 山内正憲
2. 発表標題 新規ラット遷延性術後痛モデルの開発と後根神経節・脊髄におけるトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉野 繁一 (Sugino Shigekazu) (00423765)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	城戸 幹太 (Kido Kanta) (40343032)	神奈川歯科大学・歯学部・診療科講師 (32703)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	今村 百可 (Imamura Yuka)	ペンシルバニア州立大学・ゲノム科学部門・准教授	
研究協力者	鈴木 潤 (Suzuki Jun)	東北大学・医学系研究科・大学院生 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	片桐 法香 (Katagiri Norika)	神奈川歯科大学・歯学部・大学院生 (32703)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関