

令和元年5月8日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20112

研究課題名(和文)新しい疼痛モデルマウスを用いた新規疼痛関連遺伝子の探索

研究課題名(英文)The search for new pain related genes using a new pain model mouse

研究代表者

寺田 雄紀(TERADA, YUKI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90745431

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文):我々は各種侵害刺激(熱刺激、機械刺激、化学刺激)に対する反応が異なる遺伝子改変マウスを偶然に同定し、このマウスの疼痛関連行動と原因遺伝子を解析することによって、新たな疼痛発生・伝達メカニズムの解明及び、神経-免疫相互連関の同定を目指した。この遺伝子改変マウスの様々な疼痛刺激に対する反応の検討を行ったうえで、トランスジーン染色体への挿入位置を同定した。その後、トランスジーン挿入による発現変動遺伝子の解析を行い複数の標的遺伝子の同定に成功した。複数の因子の中でも、疼痛との関連が過去に報告のない特に興味深い標的遺伝子のノックアウトマウスを作成し、機序解明を目指して解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疼痛の発生メカニズム及び神経系における伝達機構は多様でありその全貌は明らかではない。さらに一部の疼痛は治療抵抗性であり患者の生命の質を著しく低下させている。本研究により得られる結果は、疼痛発生・伝達メカニズムに新たな視点を与えると共に、治療または薬剤開発の一助になる可能性を秘めていると考えられる。

研究成果の概要(英文):We accidentally identified the transgenic mouse that differ in the response to various noxious stimuli (heat stimulation, mechanical stimulation, chemical stimulation). So we analyzed the pain-related behavior and causative genes of this mouse. We aimed for creating the mechanism of a new pain generation and transmission and the elucidation of and the identification of the neuro-immunity relation.

After examining the response to various pain stimuli of this genetically modified mouse, the insertion position of the transgene into the chromosome was identified. After that, analysis of expression variation genes by transgene insertion was carried out, and multiple target genes were identified successfully.

Among multiple factors, we have created a knockout mouse with a particularly interesting target gene that has not ever been reported in relation to pain, and are analyzing for the purpose of elucidating the mechanism.

研究分野：疼痛学

キーワード：疼痛 機械刺激 神経栄養因子

1. 研究開始当初の背景

本来、疼痛刺激は生命を脅かすような危険を知らせる重要な仕組みであるが、過剰または持続的な疼痛は患者の肉体的な不快感だけではなく、精神的な抑圧をも引き起こして生活の質を低下させる。疼痛の改善のためには適切な診断・治療が必要であるが、個人の感じている痛みは共有できる感覚ではないので、それぞれの痛みを評価することも、個人間の痛みを比較することも難しく、疼痛の実態を客観的に把握することは極めて困難であること、また、そもそも疼痛の発生のメカニズムは多様であることが、疼痛への適切な対処を困難にしている。このような現状から、疼痛刺激の発生・伝達メカニズムの解明は、治療や新たな薬剤の開発にも極めて重要であると考えられる。

我々の研究室において複数の系統の遺伝子改変マウスを飼育しており、これらのうち、Megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1 (Mlc1) 遺伝子のプロモーターの下流でテトラサイクリン制御性トランス活性化因子 (tetracycline-controlled transactivator; tTA) を発現する BAC トランスジェニックマウス (以下、Mlc1-tTA マウス) において興味深い現象が認められた。この Mlc1-tTA マウスは BAC トランスジェニックマウスであるため、トランスジーン (外来遺伝子) の染色体への挿入により、その領域の内在性の遺伝子の発現に異常が起こっている可能性がある。この Mlc1-tTA マウスはジェノタイプングの際の刺激に対する反応性が、野生型と比較して弱いことが認められた。そこで、Mlc1-tTA マウスは疼痛への感受性が低下しているのではないかと考え、各種の侵害刺激 (熱・機械・化学刺激) に対する行動解析を行った。予備検討の段階ではあるが、ホットプレートテストによる熱刺激に対する反応性は野生型と比較して差が認められなかったが、Von Frey テストによる機械刺激に対しては閾値の上昇、即ち、感受性の低下が認められた。また、ホルマリン投与による化学刺激に対する反応は、特に炎症反応に対する行動である第 相の反応が顕著に減少しており、また、疼痛関連行動だけでなく視覚的にも発赤や腫脹反応が減弱していた。

熱誘発性疼痛行動と機械刺激誘発疼痛行動が乖離する動物モデルはこれまで報告されておらず、新たな疼痛発生伝達メカニズムの同定を可能にするモデルと期待される。

Mlc1-tTA マウスは、何らかの遺伝子の発現に異常を起こしている可能性があり、その結果、各種侵害刺激に対する反応性の違いが生じていると考えられる。従って、Mlc1-tTA マウスを詳細に解析することにより、疼痛刺激の発生または伝達メカニズムに新たな視点が得られると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的としては、各種侵害刺激に対しての反応に差異が認められる Mlc1-tTA マウスの解析を通じて、その疼痛関連行動と原因遺伝子を解析することにより、新たな疼痛発生・伝達メカニズムの解明を行うことにある。

- ・トランスジーン (外来遺伝子) の染色体挿入位置の同定。
- ・トランスジーン挿入により影響を受ける、その近傍の遺伝子 (標的遺伝子) の発現解析。
- ・疼痛発生・伝達への標的遺伝子の関与のメカニズムの解明。

以上の3点を本研究の主要な目的とした。

3. 研究の方法

1) Mlc1-tTA マウスの様々な疼痛刺激に対する反応の検討。

予備検討において Mlc1-tTA マウスは急性痛 (ホットプレートテスト) に対しては野生型と比較して差が認められなかったが、機械刺激 (Von Frey テスト) に対する感受性の低下が認められている。さらには化学刺激 (ホルマリン) に対しては特に第 相の炎症反応の著しい低下が認められた。同種の別なテストに対して同様の反応を示すが否か、熱刺激、機械刺激、化学刺激に対する疼痛関連行動を検討して痛みに対する感受性を詳細に評価する。

また、脊髄後根神経節から大脳皮質感覚野までの疼痛の伝達経路において疼痛刺激伝達時の神経細胞の活動性の差を、cFos など神経の興奮により発現するタンパク質の免疫染色を行うことにより評価する。

これら疼痛関連行動を評価することにより、どの疼痛伝達経路に異常があるのかを同定する。

2) Mlc1-tTA マウスのトランスジーン(外来遺伝子)の染色体への挿入位置の同定。

Mlc1-tTA マウスは BAC トランスジェニックマウスであるため、トランスジーン(外来遺伝子)の染色体への挿入部位によっては、その領域の内在性の遺伝子の発現を阻害または変動させる可能性が考えられる。その結果、何らかの遺伝子の機能異常により、疼痛刺激に対する行動変化が起きたと考えられる。そこでトランスジーン(外来遺伝子)の挿入部位を Thermal Asymmetric Interlaced PCR (TAIL-PCR) 法を用いることにより同定する。また、FISH (蛍光 in situ ハイブリダイゼーション) 法による染色体の多重染色により同定部位の確認を行う。

以上の方法によって挿入部位の同定が出来ない可能性も考慮し、次世代シーケンサーを用いての解析の外注も同時に行う。

3) トランスジーン挿入による発現変動遺伝子の解析。

挿入部位が同定された後、近隣の遺伝子の発現を Real time RT-PCR 法を用いて解析することにより、Mlc1-tTA マウスにおいて発現に異常が認められる遺伝子 (標的遺伝子) を同定する。

サンプルとする臓器や発達時期に関しては、過去の論文やデータベースを調べてから調整する。Real time RT-PCR 法により変化があった遺伝子については、In-situ hybridization 法や免疫染色を用いることにより、全身の発現部位や細胞、発現時期などを野生型と比較して詳細に調べる。特に皮膚から大脳皮質感覚野までの疼痛の伝達経路と、骨髄や胸腺などの免疫に関する臓器に注目して解析する。

また、Mlc1-tTA マウスではホルマリン試験において投与 30 分後の第 相（炎症反応）の低下が認められたことから、免疫応答、特にマクロファージ系や T 細胞に何らかの異常があると推察される。そこで、マウス骨髄および胸腺より mRNA を採取し、マイクロアレイを用いて発現が変動している遺伝子を探索し、炎症部位での組織染色像と組み合わせ、標準的遺伝子を同定する。

4) 標的遺伝子（標準的遺伝子）のノックアウトマウスの作成。

Mlc1-tTA マウスにおいて発現に異常が認められる遺伝子（標的遺伝子または標準的遺伝子）が同定された後、その遺伝子のノックアウトマウスを作成する。すでに作成され、譲渡または購入可能な場合は購入する。

5) 標的遺伝子（標準的遺伝子）ノックアウトマウスの疼痛に対する行動評価試験。

標的遺伝子ノックアウトマウスにおいても Mlc1-tTA マウスと同様な疼痛関連行動が認められるか否か、熱刺激、機械刺激、化学刺激に対する疼痛関連行動を検討して痛みに対する感受性を評価する。

6) 標的遺伝子（標準的遺伝子）の疼痛シグナルへの関与の解析。

上記 3~5) の検討により、疼痛と関連する標的遺伝子が同定された後、その標的遺伝子がどのようなメカニズムで疼痛関連行動を変化させるか検討する。

4. 研究成果

我々は、Mlc1-tTA マウスの様々な疼痛刺激に対する反応の検討を行ったうえで、トランスジーンの色体への挿入位置を同定した。トランスジーンが 8 番染色体に挿入されていること、挿入部位近傍の遺伝子制御が破綻していることを明らかにし、cDNA マイクロアレイにより、野生型マウスと比較して TG マウスで発現量が大きく変動する遺伝子を複数同定した。興味深いのは、これら複数の候補因子は全てが、これまでに報告のある疼痛関連因子ではないことである。

同定された複数の因子の中でも、疼痛との関連が過去に報告のない特に興味深い標的遺伝子のノックアウトマウスを作成し、機序解明を目指して解析している。

また、本研究の過程において、様々な疼痛研究の手法を用いたが、神経障害性疼痛モデル動物の中でも、痛覚過敏等の同一の行動を示すにもかかわらず、後根神経節（DRG）における正反対の神経栄養因子の発現様式（直接神経損傷では増加、糖尿病性では低下）に興味を持ち、坐骨神経の直接損傷モデルの中で損傷神経が投射する DRG と非損傷の DRG を厳格に分離できる Spared Nerve Injury (SNI) モデルマウスを用いた実験で、「SNI 後のマウス DRG における神経栄養因子の発現」を調べた。SNI 後、損傷 DRG では神経成長因子（NGF）の発現が増加し、一方で非損傷 DRG では NGF の発現が低下することを明らかにした（図 1、2）

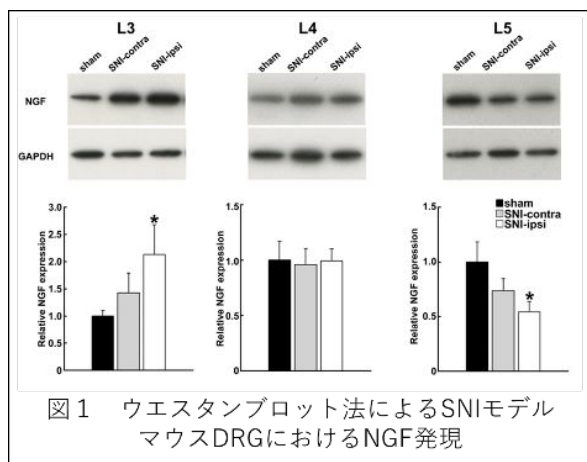


図 1 ウェスタンブロット法による SNI モデルマウス DRG における NGF 発現

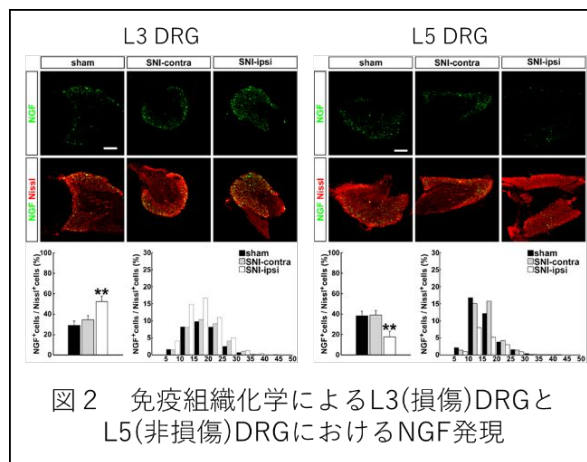


図 2 免疫組織化学による L3 (損傷) DRG と L5 (非損傷) DRG における NGF 発現

非損傷神経における NGF の発現低下が神経障害性疼痛の本体である可能性を論じ、国際誌に報告し、国際学会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Terada Y, Morita-Takemura S, Isonishi A, Tanaka T, Okuda H, Tatsumi K, Shinjo T, Kawaguchi M, Wanaka A. NGF and BDNF expression in mouse DRG after spared nerve injury. *Neurosci Lett.* 686. 67-73. 2018.

〔学会発表〕(計1件)

Terada Y, Morita-Takemura S, Isonishi A, Tanaka T, Okuda H, Tatsumi K, Shinjo T, Kawaguchi M, Wanaka A. NGF and BDNF expression in mouse DRG after spared nerve injury. The 6th Congress of Asian Society for Neuroanesthesia and Critical Care. Excellent Presentation Session (Basic Science). Mar 15th 2019

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。