

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K16758

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛における選択的スプライシング異常を標的とした新規治療法の検討

研究課題名(英文) Examination of new therapies targeting alternative splicing abnormalities in neuropathic pain.

研究代表者

丸山 基世 (Maruyama, Motoyo)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：60709757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、神経障害性疼痛モデル動物の一次感覚神経において、選択的スプライシングパターンが顕著に変化しており、神経障害性疼痛において選択的スプライシング異常が病態に寄与している可能性を見出した。特に、神経障害に伴う選択的スプライシングの主要制御因子である lncRNA の発現変化が炎症や神経機能に関わる様々な遺伝子の発現変化を引き起こすことが明らかとなった。さらに、一次感覚神経において疼痛寄与 lncRNA が数多くのスプライシング調節タンパク質と結合し、細胞内局在を調節することにより神経障害性疼痛に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

選択的スプライシング調節機構の破綻と疾患との関連性が重要視されているが、選択的スプライシングの異常から神経障害性疼痛に対する治療標的を探索する研究はほとんど報告がなかった。我々は従来、解析が困難とされていた選択的スプライシングの解析を次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析やウイルスベクターを利用することにより可能としてきた。また、今回の研究成果はスプライシング制御因子である lncRNA を標的とするという全く新たな視点での疼痛の分子機構の解明への一助を担い、より包括的な疼痛の分子基盤の理解に基づいた治療法の開発に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：We found that alternative splicing patterns were significantly altered in the primary sensory neurons of neuropathic pain model animals, and that alternative splicing abnormalities may contribute to the pathology of neuropathic pain. It was revealed that expression changes of lncRNA, which is a major regulator of alternative splicing, following nerve injury cause expression changes of various genes involved in inflammation and neural function. Furthermore, it was suggested that lncRNA may contribute to neuropathic pain by regulating intracellular localization of many splicing regulatory proteins in the primary sensory neurons via binding to them.

研究分野：神経薬理学・実験動物学

キーワード：神経障害性疼痛 選択的スプライシング lncRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は体性感覚系の障害に起因する難治性の慢性疼痛であり、既存の鎮痛薬の効果は十分でなく、鎮痛薬の副作用も治療の妨げとなっている。疼痛の分子基盤が非常に多様であることが神経障害性疼痛の理解を遅らせており、既知のメカニズムに基づいた治療候補は未だヒトにおける有効性を見出せていない。すなわち、新たな視点から疼痛の病態分子機構を解明し、より包括的な分子基盤の理解に基づいた治療法の開発が必要であると考えられる。

非コード RNA はタンパク質をコードしない機能性 RNA として細胞内に豊富に存在し、実に様々な生命現象において役割を担うことが明らかとなってきた。非コード RNA の中でも microRNA は神経障害性疼痛に対する治療標的としての重要性が認識されつつある (Sakai and Suzuki, Adv ExpMed Biol 2015)。一方で長鎖非コード RNA (long non-coding RNA: lncRNA) は 200 塩基以上の長さを持ち、microRNA よりもはるかに多様な種類が存在する。また、半数以上が神経系に発現していることから特に神経機能における重要性が示唆されているにも関わらず神経障害性疼痛における役割はほとんど明らかになっていない。我々は神経障害性疼痛モデル動物の一次感覚神経において、次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンスにより特に選択的スプライシングの主要制御因子である数種の lncRNA が有意に発現変化することを見出した。これら lncRNA は一次感覚神経細胞においてスプライシングの場である核内に発現しており、一次感覚神経においても選択的スプライシングの調節に関わっていると推察された。更に、lncRNA の発現を抑制したラットにおいて、神経障害性疼痛が有意に減弱したことから、lncRNA による選択的スプライシングの調節が神経障害性疼痛に関与している可能性が示唆された。

選択的スプライシングはゲノムから転写された pre-mRNA からイントロンが除去され、エクソン同士が結合する過程で成熟 mRNA に含まれるエクソンが選択される核内イベントである。これはスプライシング調節タンパク質が pre-mRNA に結合することで調節されている。lncRNA は多くの特定のスプライシング調節タンパク質と結合し、それらタンパク質が pre-mRNA に作用することを妨げるため、スプライシング調節タンパク質の主要制御因子として重要な役割を担っている。このような選択的スプライシングの調節は、mRNA に含まれるエクソンを選択することによりアミノ酸配列を変え、同一遺伝子にも関わらず時に全く異なる機能を有するタンパク質を産生する。すなわち、選択的スプライシングの異常は劇的な細胞機能の変化を誘発し、様々な疾患の原因となる。脊椎動物では、神経組織において最も選択的スプライシングパターンが高く保存されていることから、神経系における機能的な重要性が窺われた。

我々は RNA シーケンスを行うことで、神経障害性疼痛モデル動物の一次感覚神経における、選択的スプライシングパターンの変化を網羅的に検出することに成功した。315 個の遺伝子で選択的スプライシングパターンが顕著に変化していることから、実際に神経障害性疼痛においても選択的スプライシング異常が病態に寄与している可能性が強く示唆された。すなわち選択的スプライシングは重要な治療標的の候補になりうると考えられるが、神経障害性疼痛に対する関与はほとんど分かっていない。数少ない報告の中では、神経障害性疼痛下において TRPA1 の選択的スプライシングパターンが変化することによって痛みが増強するとの報告はあるが (Zhou et al., NatCommun 2013)、選択的スプライシング変化の基盤となるメカニズムは全く明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、選択的スプライシングの主要制御因子である lncRNA の解析を通して、神経障害性疼痛における選択的スプライシング異常を明らかにするとともに、これら lncRNA が調節するスプライシング調節タンパク質及び選択的スプライシングが変化する遺伝子を同定し、治療標的としての可能性を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

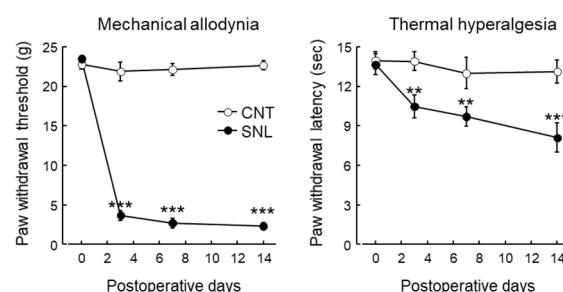
(1) 神経障害性疼痛 (SNL) モデルの作製

全ての動物実験は日本医科大学動物実験委員会の審査および学長承認の下(承認番号:27-037)、国際疼痛学会に推奨されたガイドライン (Zimmermann, Pain 1983) に従って実施した。

雄性の Sprague-Dawley ラット (5-7 週齢) を実験に使用した。イソフルラン麻酔下 (2-3%) で左側の第 5 腰髄 (L5) 神経を 1 mm 間隔で 2 か所結紮する脊髄神経結紮 (spinal nerve ligation; SNL) を施し、結紮していない右側を対照とした。

(2) 行動テスト

後肢足底への機械的刺激に対する逃避行動閾値は von Frey 線維 (室町機械) を用いて、熱刺激に対する逃避行動潜時は Plantar test (Ugo Basile) を用いて測定



し、神経障害によって誘発される痛みの程度を評価した。

SNL モデルにおいて、神経障害の3日後より、機械的刺激または熱刺激に対する痛覚閾値が有意に減少した(右上図)。

(3) RNA シーケンス

L5の後根神経節(dorsal root ganglion; DRG)からRNAiso Plus(Takara)を用いてtotal RNAを抽出した。ポリアデニル化RNAライブラリーはTruSeq Stranded mRNA LT sample Prep Kit(Illumina)を用いて調製した。シーケンスはIllumina HiSeq 2500 high-throughput sequencing systemにより実施した(150 bp ペアエンドリード)。得られたリードはRattus norvegicus UCSC rn5 reference genomeにマッピングし、RNA-Seq Alignment v1.0(Illumina)を用いて転写産物に構築した。FPKM値はCufflinks Assembly & DE v2.0(Illumina)により計算した。

一次感覚神経におけるlncRNAの機能を予測するために、RNAシーケンスのデータから得られたDifferentially expressed genesをIngenuity Pathway Analysis(IPA, Qiagen K.K.)にて解析した。

(4) 定量的PCR

Total RNAはiScript Select cDNA Synthesis Kit(Bio-Rad)を用いてランダムプライマーにより逆転写した。lncRNAに対する特異的なプライマーセットを用いてPower SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)により定量的PCRを行った。

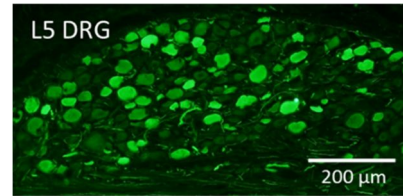
(5) in situ hybridization

SNL後14日目にラットを4%パラホルムアルデヒド加リン酸緩衝生理食塩水で灌流固定し、採取したDRGから10 μmの凍結切片を作製した。1日目に切片をジゴキシゲニン(DIG)標識した標的lncRNAに対するRNAプローブと65°Cで一晩ハイブリダイズした。2日目にスライドを抗DIG抗体と4°Cで一晩反応させた。3日目にAlexa Fluor 488標識抗ヒツジIgG抗体とインキュベートし、封入して顕微鏡で撮影した。

(6) アデノ随伴ウイルスベクターの作製

一次感覚神経において特異的にlncRNAの発現を抑制するために、lncRNAに対するshort hairpin RNAを組み込んだ血清型6のアデノ随伴ウイルス(adeno-associated virus; AAV)ベクターを作製した。スクランブル配列を組み込んだAAVベクターを対照として使用した。AAVベクターをSNL施術の7日前にL5 DRGに直接注入した。

EGFP発現を指標にL5 DRGへのAAVベクターの導入を確認した(右図)。



(7) RNA プルダウンおよびRNA免疫沈降

一次感覚神経においてlncRNAと特異的に結合するRNA結合タンパク質を同定するために、ビオチン標識したlncRNAの全長配列RNAをDRGライセートと反応させ、lncRNAに結合したタンパク質をストレプトアビジンビーズを用いてプルダウンした(Thermo Fisher Scientific)。lncRNAの配列と関係の無いプラスミドベクター(pBluescript II)由来のRNAを対照に用いた。抽出したタンパク質はSDS-PAGEにより分離し、銀染色を用いて可視化した。lncRNAに結合したタンパク質を網羅的に解析するために、ショットガン方式にて質量分析に供し、タンパク質を同定した(メディカル・プロテオスコープ)。

同定したタンパク質とlncRNAとの結合を確認するために、タンパク質に特異的な抗体を用いてDRGライセート由来のRNAをプルダウンし、定量的PCRを実施してlncRNAの結合量を測定した。

(8) 免疫染色

一次感覚神経においてlncRNAと特異的に結合するRNA結合タンパク質の細胞内局在を調べるために、ラットのDRG凍結切片を用いて免疫染色を行った。1日目に切片を各RNA結合タンパク質に対する一次抗体と4°Cで一晩反応させた。2日目に切片を二次抗体とインキュベートし、封入して顕微鏡で撮影した。

4. 研究成果

(1) スプライシング制御因子lncRNAの疼痛への関与の検討

神経障害性疼痛モデル動物において、神経障害に伴い発現が有意に増加したlncRNAを一次感覚神経特異的に発現抑制したところ、神経障害後の疼痛が有意に減弱した。疼痛が緩和した動物の一次感覚神経の遺伝子発現変化をRNAシーケンスにより網羅的に解析を行い、炎症や神経機能に関与する遺伝子が多く含まれることが明らかとなり、本lncRNAはこれら遺伝子の選択的スプライシングを調節することにより疼痛に寄与する可能性が示唆された。

(2) 疼痛寄与 lncRNA に特異的に結合するスプライシング調節タンパク質の同定

スプライシング調節タンパク質の多くが組織特異的な発現を示すため、RNA プルダウン法により、一次感覚神経において疼痛寄与 lncRNA に対して特異的に結合する RNA 結合タンパク質をプルダウンした。ショットガン解析により数多くのスプライシング制御タンパク質が含まれることが明らかとなった。免疫沈降法により、本 lncRNA とスプライシング調節タンパク質の結合を定量的に解析した。さらに、免疫染色を用いて、これらスプライシング調節タンパク質の一次感覚神経における細胞内局在を詳細に解析し、大半が核内に発現していたが、いくつかは細胞質にも局在していることが明らかとなり、特に神経障害に伴い細胞内局在が劇的に変化したスプライシング調節タンパク質を同定した。本 lncRNA がこれらスプライシング調節タンパク質の細胞内局在を調節することで疼痛に寄与する遺伝子発現調節に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Atsushi Sakai, Fumihito Saitow, Motoyo Maruyama, Noriko Miyake, Koichi Miyake, Takashi Shimada, Takashi Okada, Hidenori Suzuki.	4. 巻 8
2. 論文標題 MicroRNA cluster miR-17-92 regulates multiple functionally related voltage-gated potassium channels in chronic neuropathic pain.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 16079
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ncomms16079	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hirotoshi Iwasaki, Atsushi Sakai, Motoyo Maruyama, Takaya Ito, Atsuhiko Sakamoto, Hidenori Suzuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Increased H19 Long Non-coding RNA Expression in Schwann Cells in Peripheral Neuropathic Pain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Nippon Medical School	6. 最初と最後の頁 215-221
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1272/jnms.JNMS.2018_86-402	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takaya Ito, Atsushi Sakai, Motoyo Maruyama, Yoshitaka Miyagawa, Takashi Okada, Haruhisa Fukayama, Hidenori Suzuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Dorsal Root Ganglia Homeobox downregulation in primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular pain	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806920904462	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 丸山基世、坂井敦、片山映、岡田尚巳、鈴木秀典
2. 発表標題 神経障害性疼痛におけるNeat1長鎖非コードRNAの遺伝子発現調節機構の検討
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山基世、坂井敦、片山映、岡田尚巳、鈴木秀典
2. 発表標題 神経障害性疼痛に寄与するNeat1長鎖非コードRNA結合タンパク質の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山 基世
2. 発表標題 Involvement of the long non-coding RNA Neat1 in the neuropathic pain and neurite outgrowth following nerve injury
3. 学会等名 18th World Congress on Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丸山 基世
2. 発表標題 神経障害性疼痛及び軸索再生に対するNeat1の関与
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂井 敦、丸山基世、岩崎宏俊、鈴木秀典
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第39回日本疼痛学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 丸山基世、坂井 敦、岩崎宏俊、鈴木秀典
2. 発表標題 神経傷害による長鎖非コードRNAの発現変化
3. 学会等名 第40回2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂井 敦、丸山 基世、鈴木秀典
2. 発表標題 miR-17-92 cluster microRNAs cooperatively regulate multiple voltage-gated potassium channels in the sensory neurons after nerve injury
3. 学会等名 第40回2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017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

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