

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16492

研究課題名(和文) 疼痛鈍麻の表現型を示す遺伝子改変マウスの包括的遺伝子解析から新たな疼痛因子を探る

研究課題名(英文) Analysis of novel pain factors by comprehensive genetic screening of pain-insensitive mice.

研究代表者

新城 武明 (Shinjo, Takeaki)

奈良県立医科大学・麻酔科学教室・助教

研究者番号：70624914

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：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。我々は、別の研究テーマで使用しているTGマウスが、痛み刺激に対する反応が著しく低下していることを見出した。本研究では、このTGマウスを起点として疼痛の中心的な機序解明に迫ることを目的とした。TGマウスはBACトランスジーン挿入によって、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、その結果生じる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た。次世代シーケンシングを用いた順遺伝学的なスクリーニングにより、トランスジーン挿入部位近傍の3つ遺伝子制御が完全に破綻していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、痛みを感じないTGマウスを使用できることが最大の特徴である。一般的な遺伝子の機能解析手法としては、ノックアウト(KO)など遺伝子を操作してその表現型を調べる逆遺伝学が主要な方法であるが、本研究で用いた手法は、変異マウスを用いて表現型からその原因となる遺伝子を探りあてる順遺伝学である。詳細な検討の結果、疼痛鈍麻の表現型を示すTGマウスは、外来遺伝子が8番染色体に挿入され、挿入部位近傍の3つの遺伝子制御が破綻していることを明らかにした。興味深いのは、これらの候補因子は全てこれまで報告のある疼痛関連因子ではないことである。新規疼痛関連遺伝子を同定できたことは学術的に意義あるものである。

研究成果の概要(英文)：Pain significantly reduces quality of life in various diseases. The cellular and molecular mechanisms of pain remain largely unknown. We noticed that pain responses were extremely reduced in a bacterial artificial chromosome-transgenic (BAC-TG) mice. Since this TG mice harbors a BAC transgene, we first speculated that exogenous genes in the BAC may modulate pain behaviors. The exogenous gene expressions, however, were indistinguishable from those in naive mice. Based on a next hypothesis that the large transgene might affect endogenous gene expression and thereby influence pain behaviors, we performed forward genetic screening using next generation sequencing. The BAC transgene was inserted into chromosome 8 and three genes in the vicinity of the insertion site were almost knocked out. Whether these genes are involved in pain sensing mechanisms is an open question. To elucidate the roles of the candidates in pain behaviors, we investigated knockout (KO) and conditional KO mice.

研究分野：麻酔学

キーワード：疼痛 マクロファージ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

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。我々は、別の研究テーマで使用している TG マウスが、痛み刺激に対する反応が著しく低下していることを偶然に見出した。痛み反応がある程度減弱している遺伝子改変マウスはこれまでも報告されているが、この TG マウスほど劇的に痛み行動が減弱するマウスはこれまで報告例がない。疼痛の発生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が、この TG マウスは劇的に痛み行動が減弱するため、疼痛の中心的な機序解明に迫ることができる可能性が極めて高い。つまり、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に繋げるための基盤となりうる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的はこの TG 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り、疼痛の発生メカニズムを世界に先駆けて解明することである。TG マウスは BAC トランスジーン挿入によって、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あり、その結果生じる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。本研究では、候補となる因子を中心に疼痛への関与について検討する。疼痛の発生メカニズムは不明な点が多いため、疼痛への適切な対処が困難である。この TG マウスを詳細に解析することで疼痛の中心的な機序解明に迫ることができる可能性が極めて高い。

### 3. 研究の方法

#### (1) TG マウスの疼痛刺激伝達経路における異常部位の特定

機械刺激は、機械刺激性痛覚過敏反応を測定する paw pressure テストおよび von Frey テストで評価した。化学刺激は 5%ホルマリンを後肢に皮下注射したモデルで評価した。また、野生型(WT)マウスと TG マウスで時間的・空間的な差異を見出し、疼痛刺激伝達経路の中でどこに異常があるのかを絞り込むために以下の課題を行なった。疼痛発生時に機能が亢進する疼痛関連因子(TRPV1, Nav1.7, P2X3, Trk 等)の発現を調べた。DRG や脊髄において、神経細胞が活動すると発現が亢進する c-Fos や c-jun の組織学的検討を行なった。疼痛発生後 1 時間から単球、好中球、マクロファージ等の炎症性細胞の浸潤が観察されるため、細胞浸潤のタイムコースや後炎症メディエーター(ブラジキニン、プロスタグランジン等)の分泌量を測定した。

#### (2) トランスジーン挿入の近傍にある標的遺伝子の同定

TG マウスは BAC トランスジェニックマウスであるため、トランスジーン挿入の染色体への挿入によって、その領域の内在性遺伝子の発現を阻害または変動させる可能性がある。その結果生じる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。現在までにトランスジーンが染色体の特定領域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 40 個同定している。これらの遺伝子について全身の発現部位や細胞、発現時期を調べた。

#### (3) 標的遺伝子のノックアウト(KO)マウスの入手および疼痛行動評価試験

TG マウスにおいて発現に異常が認められる遺伝子の一つ、sorting nexin (Snx)に着目し、その遺伝子の KO マウスを入手した。標的遺伝子 KO マウスにおいても TG マウスと同様な疼痛関連行動が認められるか否かを評価した。

#### (4) 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

Snx 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した。また、培養細胞あるいは初代培養細胞を用いて siRNA による発現抑制およびコンストラクト導入による過剰発現で細胞内機能を解析した。

### 4. 研究成果

疼痛行動評価試験の結果、TG マウスは機械刺激、化学刺激に対して特に鈍感であることが明らかになった。また化学刺激物質であるホルマリン(5%)を足背にインジェクションした後の脊髄後角での c-fos 発現は WT と比べて顕著に低下していた。また、足背に化学刺激を施した 30 min 後では炎症メディエーターであるブラジキニンの発現量が顕著に低下していることを明

らかにすることができた。

TG マウスの順遺伝学的なスクリーニングにより、外来遺伝子が染色体の特定領域に挿入され、挿入部位近傍の3つの遺伝子制御が破綻していることを明らかにした。その中でも我々は sorting nexin (Snx)に着目し、その遺伝子のKO マウスを入手した。興味深いことに、Snx-KO マウスでも TG マウス同様に機械刺激、化学刺激に対する疼痛行動が減弱していた。意外なことに熱刺激に対する疼痛行動は WT マウスと同程度であった。

Snx-KO マウスから DRG を単離して DRG neuron の初代培養を行ない、Ca imaging を行なった結果、カプサイシン誘導性の神経応答が鈍いことが明らかになった。この原因を探るべく、これまで明らかにされている疼痛因子の発現を調べた結果、TRPV1, TrkA 等の発現が特に減弱していた。

Snx-KO マウスは DRG のみならず免疫系細胞において炎症性サイトカイン発現量、炎症メディエーター発現量にも異常がみられたことから免疫系細胞にも異常がみられることが明らかになった。現在、免疫系細胞で Snx 発現を落としたコンディショナル KO マウスを作製して、疼痛発生の詳細な機序を解析している。

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 田中達英
2. 発表標題 痛覚鈍麻マウスの順遺伝学スクリーニングによる新規疼痛候補遺伝子の同定
3. 学会等名 Neuro2019（新潟）
4. 発表年 2019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
研究協力者	田中 達英  (Tanaka Tatuhide)		