

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03552

研究課題名（和文）細胞外RNAの特性を活用した神経障害性疼痛に対する次世代治療戦略の探索

研究課題名（英文）Exploring an extracellular RNA-based innovative therapy for 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） 13,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞外RNAは能動的に放出され、近傍の細胞に取り込まれて機能することで細胞間情報伝達を仲介することが知られている。本研究では、細胞外RNAを包括的に解析することでヒトに有効な次世代の疼痛治療戦略となりうる末梢神経障害の早期検出と疼痛治療の可能性を模索した。実験動物およびヒトiPS細胞に由来する一次感覚神経を用いて、神経損傷やオキサリプラチンによる神経障害性疼痛に対するバイオマーカー候補や神経障害性疼痛に関与する分子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、一次感覚神経から放出される細胞外RNAは神経障害性疼痛における治療標的となる可能性を有することが明らかになった。また、一次感覚神経からの細胞外RNA放出は疾患特異的に変化し、血中で検出可能なことから疾患バイオマーカーとなりうる可能性も明らかになった。一次感覚神経から放出される細胞外RNAの病態機能的意義を探索していくことで、神経障害性疼痛における新規治療戦略に繋がっていくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：Extracellular RNA is known to be actively released and taken up by neighboring cells to mediate intercellular communication. In this study, we explored an effective next-generation pain treatment strategy in humans that enables early detection and treatment of peripheral neuropathic pain by comprehensively analyzing extracellular RNA. Using primary sensory neurons derived from experimental animals and human iPS cells, we identified candidate biomarkers for peripheral neuropathic pain caused by nerve injury and oxaliplatin. We also identified potential therapeutic targets for peripheral neuropathic pain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 マイクロRNA 細胞外小胞 一次感覚神経 バイオマーカー lncRNA オキサリプラチン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経障害を伴う慢性疼痛は難治性で苦痛が強いため、積極的に治療することが重要である。しかしながら、糖尿病や一部抗がん薬は疾患や薬物治療の経過に伴って末梢性神経障害性疼痛が生じる可能性が明らかにも関わらず、疼痛を誘発する神経障害を予測できないために、現状では発症後の対症療法が主体となっている。さらに、末梢神経障害は中枢グリア細胞の活性化を伴う神経炎症や痛覚に関わる神経細胞の興奮性亢進・シナプス伝達増強のような可塑的变化による中枢感作を脊髄から脳へと誘発していくため、疼痛発症後のコントロールや根治は困難となっていく。すなわち、神経障害性疼痛が発症し難治化する前に、軽微な段階の末梢神経障害を検出し、末梢神経障害もしくは中枢感作の進行を予防する先制医療は難治性の神経障害性疼痛に対する次世代の疼痛治療戦略となる可能性を秘めている。

細胞内にのみ存在し、機能すると考えられてきた RNA が細胞外にも安定して存在することが明らかにされてきた。このような細胞外 RNA は受動的に細胞から放出されたゴミとして細胞外に存在するのではなく、少なくとも一部の RNA は能動的に放出され、近傍の細胞に取り込まれて機能することで細胞間情報伝達を仲介している。末梢神経障害の進行や疼痛の難治化においては、障害された神経細胞から末梢の免疫細胞や脊髄後角の神経細胞・グリア細胞への情報伝達が重要となる。すなわち細胞外 RNA は末梢神経障害の進行や疼痛の難治化を仲介する細胞間情報伝達を担っている可能性が考えられる。特に、microRNA は血漿タンパク質と結合して、もしくはエクソソームのような膜性の小胞に包含されて大量に細胞外へと放出され、近傍の細胞において遺伝子の翻訳抑制をすることが報告されてきている。実際に神経障害性疼痛においても、我々は miR-21 の細胞外放出が一次感覚神経の障害や脱分極刺激により上昇し、脊髄髄腔内(細胞外)へ miR-21 阻害薬を投与することにより神経障害性疼痛が緩和することを見出している (Sakai & Suzuki, BBRC 2013)。一方で、一部の長鎖非コード RNA (lncRNA) なども少量ではあるが細胞外に放出されるが、その機能的意義はほとんど明らかになっていない。また、lncRNA はタンパク質や他の RNA に特異的に結合することで、局所におけるタンパク質複合体形成や細胞内輸送、翻訳調節に関与しうる。以上より、近年報告されてきた microRNA のみでなく、様々なタイプの非コード RNA をも含めた細胞外 RNA による細胞間情報伝達を解析することは、末梢神経障害の進行や疼痛の難治化の更なる分子機構解明に寄与し、疼痛予防戦略の開発に繋がることを期待される。

神経障害性疼痛を予防する上で、末梢神経障害の予測もしくは早期検出が不可欠であるが、細胞外 RNA は治療標的としてだけでなく、末梢神経障害の予測因子としても有用な可能性がある。実際に、上述の一次感覚神経から放出される miR-21 は末梢神経障害により血中で上昇することが報告されており、一次感覚神経からの細胞外 RNA 放出は血中含有量にも反映されうると考えられる。しかしながら、miR-21 はがんなどの様々な疾患でも上昇するため、特異的なバイオマーカーとなり得ない。この点において、その他の RNA、特に lncRNA は神経系に多様に存在し、細胞種に特異的な発現をすることが多いことから、全身循環中における発現解析であっても末梢神経障害特異的な血中バイオマーカーとして有望である。

2. 研究の目的

末梢神経障害により一次感覚神経から細胞外へと放出される RNA を捉え、疼痛の発症・難治化に関わる神経炎症や神経可塑的变化への関与を検討する。加えて、実際にヒト患者血液中における含有量を病態の経過を追って測定することにより、ヒト疾患における当該細胞外 RNA の妥当性を評価すると共に末梢神経障害の予測因子の同定を試みる。すなわち、細胞外 RNA を包括的に解析することでヒトに有効な次世代の疼痛治療戦略となりうる末梢神経障害の早期検出と疼痛難治化の予防法を模索する。

3. 研究の方法

(1) 一次感覚神経から放出される細胞外小胞の解析

ラットから採取した後根神経節由来の一次感覚神経初代培養およびヒト iPS 細胞より分化誘導した一次感覚神経の培養上清に放出される細胞外小胞を回収し、含有される細胞外 RNA を抽出した。細胞外に存在する microRNA や lncRNA の発現量は次世代シーケンスおよび定量的 PCR を用いて定量解析した。また、細胞外小胞に含有されるタンパク質をショットガン解析および western blotting により解析した。

神経障害性疼痛を高頻度に誘発する抗がん薬である白金製剤(オキサリプラチン)に関して、ラット DRG およびヒト iPS 細胞由来一次感覚神経における遺伝子発現と細胞外 RNA 放出への影響を検討した。

(2) 疼痛モデル動物における血中 microRNA 発現の解析

ラットを用いて、神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経の絞扼性神経損傷 chronic constriction injury (CCI) モデルおよび、炎症性モデルとして完全フロイントアジュバント(CFA)モデルを

作製した。疼痛閾値の評価は von Frey filament による機械的刺激への逃避閾値を指標に評価した。CCI モデルおよび CFA モデル作製後に、一次感覚神経の初代培養を作製した。一次感覚神経の培養上清や血清中に含有される microRNA 量は、ポリマー沈殿法により EV を抽出した上で、定量的 PCR を行うことで測定した。

(3) 神経障害性疼痛における lncRNA 遺伝子の解析

脊髄神経結紮による神経障害性疼痛モデル動物を用いて、後根神経節において発現変化する lncRNA を網羅的解析により同定した。顕著な発現上昇を示した新規 lncRNA に関して、経時的発現変化や発現分布を定量的 PCR および in situ hybridization により検討した。本 lncRNA の遺伝子欠損マウスを作製し、神経障害性疼痛および後根神経節における遺伝子発現への影響を検討した。

(4) オキサリプラチン誘発性神経障害性疼痛におけるエンドセリンの解析

オキサリプラチンを単回腹腔内投与することにより、神経障害性疼痛モデルラットを作製した。機械的アロディニアは von Frey テストで、冷感アロディニアはアセトンテストで評価した。オキサリプラチン誘発性神経障害性疼痛に対するエンドセリン受容体拮抗薬の予防効果を調べるために、非選択的 ET 受容体拮抗薬であるボセンタンおよび ETA 受容体選択的拮抗薬であるアラセンタン、ETB 受容体選択的拮抗薬である BQ-788 を投与した。

4 . 研究成果

(1) 一次感覚神経の細胞外小胞に含有される RNA とタンパク質の同定

一次感覚神経培養から放出された細胞外小胞に含有される RNA の、オキサリプラチンによる変化を明らかにした。加えて、含有される RNA 群が関わる機能を pathway 解析により同定した。また、細胞外小胞に含有される膜タンパク質を同定し、一部の膜タンパク質を標的とした薬物による影響を明らかにした。

(2) 神経障害性疼痛モデルラットにおける miR-221 放出の上昇

一次感覚神経からの放出が変化する microRNA を 6 種 (let-7d、miR-21、miR-142-3p、miR-146b、miR-203-3p、miR-221) 同定した (図 1)。このうち、miR-221 のみが神経障害性疼痛モデルラットの血清中においても含有量の増加が見られた (図 2)。血清中 miR-221 は神経損傷後 7 日目から 28 日目にかけて、長期的に増加していた。神経障害性疼痛を既に発症していた神経損傷後早期において増加は認めなかった。一方、炎症性疼痛モデルにおいては、miR-221 の一次感覚神経からの放出および血清中含量いずれにおいても変化は見られなかった。

図 1

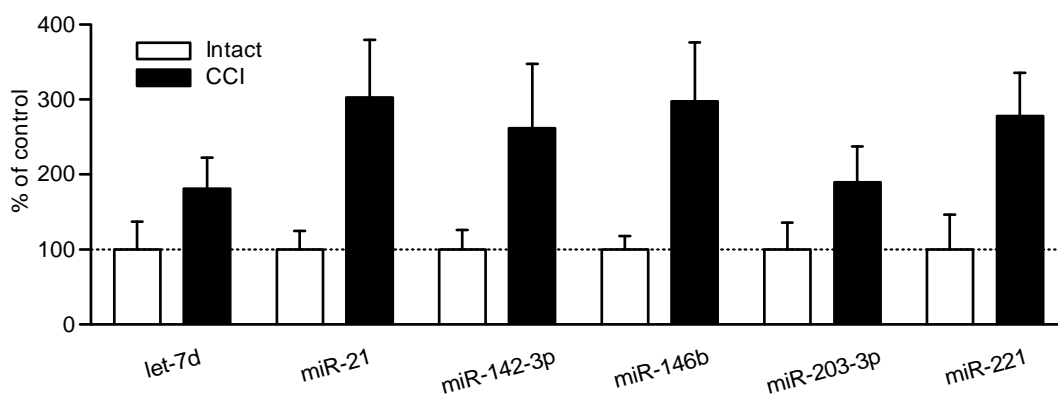
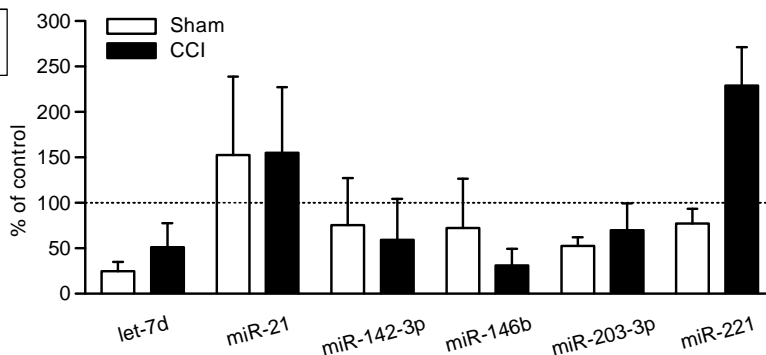


図 2



(3) 神経障害性疼痛に寄与する新規 lncRNA 遺伝子の同定

神経障害性疼痛において、一次感覚神経で著名かつ持続的な発現上昇を示す新規 lncRNA を同定した。本 lncRNA 遺伝子を欠損するマウスは物理刺激や熱刺激に対する痛覚閾値は正常であったが、脊髄神経結紮による神経障害性疼痛は減弱していた。さらに、本 lncRNA 遺伝子欠損および脊髄神経結紮により、後根神経節で発現変化する遺伝子群を同定した。

(4) エンドセリン受容体拮抗薬によるオキサリプラチン誘発性神経障害性疼痛の抑制
 機械的アロディニアはオキサリプラチン投与後2時間から出現し、少なくとも14日間持続した。一方、冷感アロディニアはオキサリプラチン投与後4日目で消失した。ボセンタンにより、機械的アロディニアと冷感アロディニアが抑制された(図3)。アトラセンタンもオキサリプラチンによる機械的アロディニアと冷感アロディニアの両方を抑制した(図4)。一方でBQ-788は機械的アロディニアと冷感アロディニアともに抑制しなかった。アトラセンタンを脊髄髄腔内投与したところ機械的アロディニアは抑制されたが、冷感アロディニアは抑制されなかった。一方で、アトラセンタンを足底に皮下投与したところ、機械的アロディニアは一時的にのみ抑制されたのに対し、冷感アロディニアが顕著に抑制された。

図 3

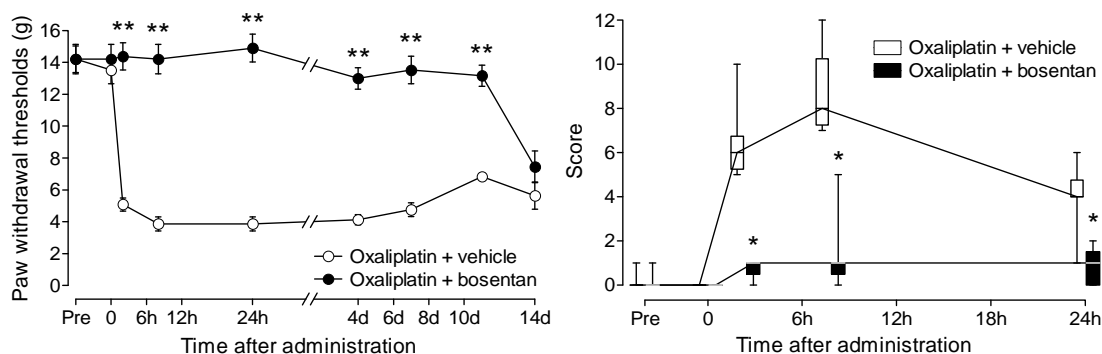
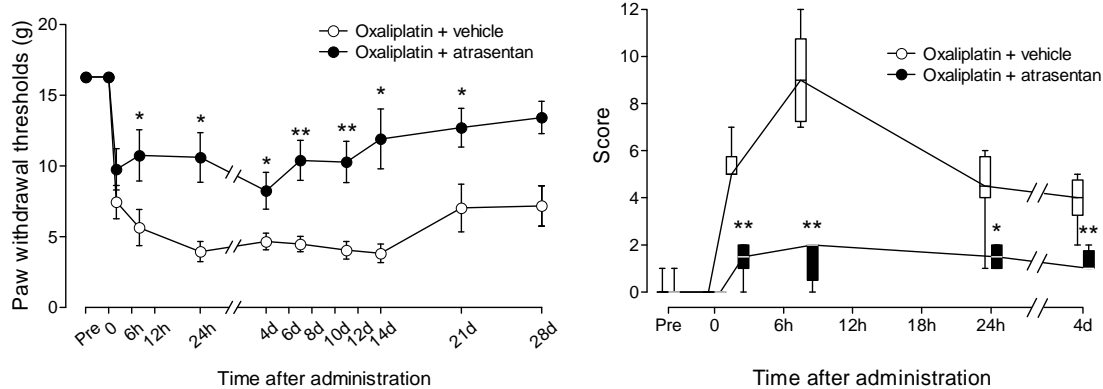


図 4



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Ikuma Yuko, Sakai Atsushi, Sakamoto Atsuhiko, Suzuki Hidenori	4. 巻 18
2. 論文標題 Increased extracellular release of microRNAs from dorsal root ganglion cells in a rat model of neuropathic pain caused by peripheral nerve injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0280425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0280425	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 Maruyama Motoyo, Suzuki Hidenori, Sakai Atsushi	4. 巻 37
2. 論文標題 Potential roles of extracellular non-coding RNAs in pain treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PAIN RESEARCH	6. 最初と最後の頁 89～96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11154/pain.37.89	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 Matsuura Kae, Sakai Atsushi, Watanabe Yuji, Mikahara Yasunori, Sakamoto Atsuhiko, Suzuki Hidenori	4. 巻 17
2. 論文標題 Endothelin receptor type A is involved in the development of oxaliplatin-induced mechanical allodynia and cold allodynia acting through spinal and peripheral mechanisms in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/17448069211058004	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 Ito Takaya, Sakai Atsushi, Maruyama Motoyo, Miyagawa Yoshitaka, Okada Takashi, Fukayama Haruhisa, Suzuki Hidenori	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 1-11
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 -

1. 著者名 Hoshikawa Naoya、Sakai Atsushi、Takai Shinro、Suzuki Hidenori	4. 巻 19
2. 論文標題 Targeting extracellular miR-21-TLR7 signaling provides long-lasting analgesia in osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 199 ~ 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2019.11.011	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 坂井敦	4. 巻 37
2. 論文標題 慢性疼痛と一次求心ニューロンの遺伝子発現	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1502-1505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai Atsushi、Maruyama Motoyo、Suzuki Hidenori	4. 巻 34
2. 論文標題 MicroRNA and long non-coding RNA in neuropathic pain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PAIN RESEARCH	6. 最初と最後の頁 219 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11154/pain.34.219	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 坂井敦、鈴木秀典	4. 巻 68増刊
2. 論文標題 マイクロRNAに着目したリキッドバイオプシーと痛みのバイオマーカーへの可能性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 麻酔	6. 最初と最後の頁 S137-S175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Atsushi Sakai
2. 発表標題 Long non-coding RNAs in primary sensory neurons as potential biomarkers and pain modulators in neuropathic pain
3. 学会等名 International Congress on Neuropathic Pain (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Motoyo Maruyama, Atsushi Sakai, Tsukasa Fukunaga, Yoshitaka Miyagawa, Takashi Okada, Michiaki Hamada, Hidenori Suzuki
2. 発表標題 Neat1 lncRNA regulates proinflammatory gene expressions in DRG neurons after nerve injury
3. 学会等名 Long non-coding RNAs in primary sensory neurons as potential biomarkers and pain modulators in neuropathic pain (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂井 敦, 山田 岳史, 丸山 基世, 吉田 寛, 鈴木 秀典
2. 発表標題 オキシリプラチン誘発性末梢神経傷害におけるバイオマーカー探索
3. 学会等名 生理学研究所研究会 痛み研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂井敦、井野佑佳、丸山基世、坂本篤裕、鈴木秀典
2. 発表標題 神経障害性疼痛における一次感覚神経のTSLPサイトカインの解析
3. 学会等名 Neuro2022 第45回神経科学大会、第65回日本神経化学学会大会、第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井熊優香、坂井敦、鈴木秀典、坂本篤裕
2. 発表標題 末梢感覚神経障害に対するバイオマーカーの探索を目指した細胞外マイクロRNAの解析
3. 学会等名 第68回日本麻酔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井敦、丸山基世、鈴木秀典
2. 発表標題 iPS細胞由来一次感覚神経から放出される細胞外小胞におけるRNA解析
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会 CJK第1回国際会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井敦
2. 発表標題 細胞外非コードRNAの疼痛疾患治療への応用可能性
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井敦、丸山基世、山田岳史、鈴木秀典
2. 発表標題 iPS細胞由来一次感覚神経から放出される長鎖非コードRNAのオキサリプラチン誘発性神経障害に対するバイオマーカーとしての検討
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂井敦、丸山基世、山田岳史、吉田寛、鈴木秀典
2. 発表標題 オキサリプラチン誘発性末梢神経障害を予測する血中長鎖非コードRNAバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤孝哉、坂井敦、丸山基世、岩崎宏俊、宮川世志幸、脇田亮、深山治久、鈴木秀典
2. 発表標題 一次感覚神経における超保存領域含有長鎖非コードRNAの神経障害性疼痛への関与
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂井敦、伊藤孝哉、丸山基世、宮川世志幸、深山治久、鈴木秀典
2. 発表標題 神経障害性疼痛における一次感覚神経に発現するDRGXによるMMP-9発現調節
3. 学会等名 第42回日本疼痛学会
4. 発表年 2020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 坂井敦、丸山 基世、片山映、岡田尚巳、鈴木秀典
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルラットにおけるNeat1長鎖非コードRNAの発現抑制は疼痛を緩和させる
3. 学会等名 第13回日本緩和医療薬学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井敦、丸山基世、福永津嵩、片山映、浜田道昭、岡田尚巳、鈴木秀典
2. 発表標題 Neat1長鎖非コードRNAの発現抑制による神経障害性疼痛モデルラットの疼痛緩和作用
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井敦、丸山基世、宮川世志幸、岡田尚巳、鈴木秀典
2. 発表標題 一次感覚神経に発現する新規長鎖非コードRNAの神経障害性疼痛における関与
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会 (NEURO2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤孝哉、坂井敦、丸山基世、宮川世志幸、岡田尚巳、深山治久、鈴木秀典
2. 発表標題 一次感覚神経におけるホメオボックス遺伝子DRGXの神経障害性疼痛への関与
3. 学会等名 第141回日本薬理学会関東部会
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 坂井敦
2. 発表標題 神経障害性疼痛の治療における非コードRNAの可能性
3. 学会等名 第22回 日本脳神経減圧術学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊藤孝哉、坂井敦、丸山基世、宮川世志幸、岡田尚巳、深山治久、鈴木秀典
2. 発表標題 DRG神経におけるホメオボックス遺伝子DRGXの神経障害性疼痛への関与
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>日本医科大学薬理学ホームページ http://square.umin.ac.jp/nms-pharmacol/index.html</p>

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	齋藤 文仁 (Saitow Fumihito) (20360175)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	山田 岳史 (Yamada Takeshi) (50307948)	日本医科大学・医学部・准教授 (32666)	
研究分担者	丸山 基世 (Maruyama Motoyo) (60709757)	日本医科大学・医学部・助教 (32666)	

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