

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07827

研究課題名(和文) 痛覚鈍麻マウスを用いた順遺伝学的スクリーニングによる新たな疼痛制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of pain regulators by forward genetic screening using pain-insensitive mice.

研究代表者

田中 達英 (Tanaka, Tatsuhide)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：80567032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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。機械刺激や化学刺激に対して疼痛鈍麻の表現型を示すBACトランスジェニックマウス(TGマウス)の順遺伝学的解析から疼痛関連候補因子として3遺伝子を同定し、本研究ではそのうちの一つSorting nexin 25(SNX25)について機能解析を行なった。TGマウス、SNX25 KOマウスおよびSNX25 floxedマウスと様々なCreドライバーマウスを用いたconditional-KOマウスの解析から免疫系細胞におけるSNX25が痛覚制御に重要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

侵害受容器から一次求心性神経、脊髄を介して視床・大脳皮質に伝達される痛覚の中枢経路に関する研究はこれまで多くの報告があるが、免疫系細胞と疼痛の関係は不明な点が多い。本研究では、疼痛鈍麻の表現型を示すTGマウスを出発点としていることが最大の特徴であり、TGマウスやSNX25 KOマウスで免疫系細胞に異常が認められたことから、従前の痛覚中枢機序解析では成し得なかった免疫-疼痛システム連関の詳細なデータを効率的に取得することが出来た。本研究成果をもとに疼痛抑制物質のスクリーニング方法を特許申請中であり、さらに本成果の医療応用を見据え疼痛に対する新規阻害剤の探索、開発、化合物評価法の確立を目指す。

研究成果の概要(英文)：The mechanisms of pain generation and its transmission in the nervous system are diverse and the full picture is not yet clear. In this study, we identified three genes (Snx25, Slc25a4, Cfap97) as candidate pain-related factors in BAC transgenic mice (TG mice), which show a pain-insensitive phenotype in response to mechanical and chemical stimuli. In this study, we focused on Snx25 and obtained Snx25 knockout (KO) mice and examined their pain behavior. Our results revealed that SNX25 is important for pain regulation in immune cells.

研究分野：神経化学

キーワード：疼痛 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

我々は別の研究テーマで使用している BAC トランスジェニックマウス (以下、TG マウス) においてホルマリンによる化学刺激 (5%ホルマリン溶液を足底に投与) に対する痛み反応が著しく低下していることを見出した。特にホルマリンにより誘導される炎症反応で発症する第2相 (ホルマリン皮下注射後 20・60 分) において疼痛行動をはじめ、発赤や腫脹が認められない。TG マウスではホルマリン投与後の炎症反応の低下が認められることから、末梢における免疫システムに何らかの異常が起き、その結果、疼痛行動が起こらないことが示唆された。

TG マウスは BAC トランスジェニックマウスであるため、我々は当初、BAC 内に含まれた遺伝子こそが疼痛機序に重要であると考えたが、当該遺伝子の発現は野生型マウスと比較しても変動せず、また疼痛の発生に寄与しないことを見出した。そこで次に、TG マウスは BAC トランスジーン (198kb) の挿入によって、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た。本研究課題開始までにトランスジーンが 8 番染色体に挿入されていること、挿入部位近傍の 3 つ遺伝子制御が破綻していることを見出していった。本研究では、これら候補となる因子のうち、細胞膜の動態や細胞内トラフィッキングに関与する Sorting nexin (SNX) ファミリーに属するものの、その機能がほとんど不明であった SNX25 に着目し免疫系細胞による疼痛への関与について検討した。

2. 研究の目的

極端な疼痛鈍麻の表現型を示す TG マウスの順遺伝学的スクリーニングから、疼痛発生の原因と考えられる遺伝子のうち、SNX25 に関して炎症・免疫系細胞に着目して新規疼痛分子機序を解明することを目的とした。本研究課題では、SNX25 KO マウス、SNX25 conditional KO マウスを用いた個体レベルでの解析、およびマウス骨髄から分化させたマクロファージ初代培養細胞を用いた細胞レベルでの解析から炎症性疼痛の発生における SNX25 を介した新規疼痛メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

A. 部位および時期特異的な KO マウスの作製とその機能解析

SNX25 KO マウスは TG マウス同様、痛み行動が減弱する。我々は末梢の免疫系細胞における SNX25 により疼痛が惹起されると仮説を立てたが、SNX25 KO マウスでは詳細な疼痛機序が見出せない。SNX25 が疼痛に及ぼす責任部位は本当に免疫系細胞か、または痛みの伝導に関わる DRG か、あるいは両方かを明らかにするためには部位時期特異的な KO マウスの解析が必須であった。そこで、マクロファージ特異的 (Cx3cr1-CreERT2 マウスを用いた)、および DRG 特異的 (Advillin-CreERT2 マウスを用いた) に SNX25 を KO した conditional-KO マウスを作製し、どちらの conditional-KO マウスで痛み行動が減弱するかを検討した。

B. SNX25 KO、conditional KO マウスにおける末梢レベルでの解析

本研究課題開始までに TG マウスにおいて化学刺激 (5% ホルマリンを後肢皮膚にインジェクション) 後の末梢マクロファージでサイトカインやケモカイン発現量が減少していることを見出していった。本研究課題では、SNX25 KO マウスおよび Cx3cr1 Cre ドライバーマウスを用いた SNX25 conditional KO でも同様にサイトカインやケモカイン発現量が変化するかを検討した。また、炎症性因子の発現のみならず、マクロファージの食食能、遊走能、炎症メディエーター分泌能が野生型 (WT) と差異が認められるかを検討した。

C. マクロファージにおける *in vitro* での SNX25 機能解析

WT マウス骨髄から M-CSF を用いてマクロファージ (Bone marrow-derived macrophage, BMDM) に分化させ、SNX25 遺伝子に対する siRNA による機能抑制およびコンストラクトを用いた過剰発現系で発痛物質産生、サイトカイン産生等の異常がみられるかを検討した。同様に、SNX25 KO マウスおよび SNX25 conditional KO マウスからも BMDM を調整し発痛物質、サイトカイン等の発現を調べた。

D. SNX25 KO、conditional KO マウスにおける後根神経節 (DRG) での疼痛因子発現解析

一般的に疼痛刺激は Aδ 線維と C 線維によって伝えられ、化学刺激による痛みは C 線維のポリモーダル受容器を介してシグナルが伝達されて一次求心性神経の細胞体がある DRG に到達する。末梢で炎症が起こった場合、活動電位を介して炎症情報が伝わるだけでなく、末梢の免疫系細胞で産生された神経成長因子とその受容体との複合体が神経終末で取り込まれて細胞体に向かって輸送され、炎症に備えるための疼痛関連遺伝子の発現が誘導されることが報告されて

いる。SNX25 KO マウス、SNX25 conditional KO マウスでは、ポリモーダル受容器（TRP チャネル、Na⁺チャネル、炎症メディエーター受容体、神経栄養因子受容体等）の発現や機能が減弱している可能性があるため、DRG における痛み関連因子の発現量を調べた。

4. 研究成果

A. 部位および時期特異的な KO マウスの作製とその機能解析

マクロファージ特異的に SNX25 を KO した conditional-KO マウス (*Cx3cr1^{CreERT2}/WT; Snx25^{loxP/loxP}*)、および DRG 特異的に SNX25 を KO した conditional-KO マウス (*Avil^{CreERT2}/WT; Snx25^{loxP/loxP}*) を作製した(両マウスともにタモキシフェン (TAM) 誘導型)。作製した conditional-KO マウスにおいてホルマリンによる化学刺激に対する痛み行動を観察した(コントロールは *Snx25^{loxP/loxP}* マウス+TAM または *Cx3cr1^{CreERT2}/WT; Snx25^{loxP/loxP}-TAM* とした)ところ、マクロファージ特異的に SNX25 を KO した conditional-KO マウスでは疼痛鈍麻の表現型を示した。一方で DRG 特異的に SNX25 を KO した conditional-KO マウスでは疼痛行動に異常は認められなかった(図1)。このことから、免疫系細胞(特にマクロファージ)における SNX25 が炎症性疼痛発症に重要であることが明らかになった。

マクロファージ特異的に SNX25 を KO した conditional-KO マウス

DRG 特異的に SNX25 を KO した conditional-KO マウス

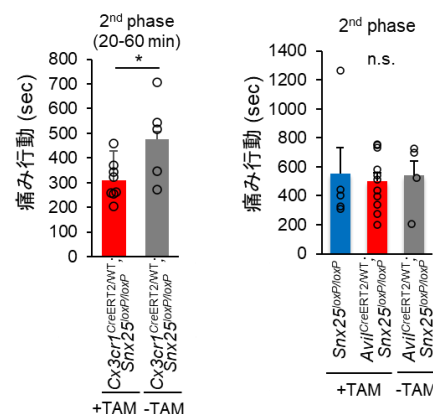


図1 化学刺激(ホルマリン)に対する痛み行動

B. SNX25 KO、conditional KO マウスにおける末梢レベルでの解析

SNX25 KO マウスおよびマクロファージ特異的に SNX25 を KO した conditional-KO マウスでホルマリンの後肢皮膚への投与3日後のサイトカインやケモカイン発現が変化するかを検討したところ、ともに WT と比較して発現量が全体的に減弱することが明らかになった(図2)。

C. マクロファージにおける *in vitro* での SNX25 機能解析

WT マウス骨髄から M-CSF を用いて BMDM に分化させ、SNX25 遺伝子に対する siRNA による機能抑制で、*in vivo* 実験同様に様々な炎症関連因子の発現が減弱した。また疼痛発症に重要な因子の一つである神経成長因子(Nerve growth factor, NGF)の発現量も低下した。これは SNX25 KO マウスおよび *Cx3cr1^{CreERT2}/WT; Snx25^{loxP/loxP}* マウスから調整した BMDM でも同様の結果が得られた。

D. SNX25 KO、conditional KO マウスにおける DRG での解析

SNX25 KO マウス、*Cx3cr1^{CreERT2}/WT; Snx25^{loxP/loxP}* マウスの DRG におけるポリモーダル受容体の発現を調べたところ、コントロールと比べて TRPV1, TrkA, Nav 等の発現量が遺伝子レベルで減弱していることが明らかになった。一方で DRG 特異的に SNX25 を KO した *Avil^{CreERT2}/WT; Snx25^{loxP/loxP}* マウスの DRG ではこれらの遺伝子の発現に差異は認められなかった。

以上のことより、炎症性疼痛の発症において末梢(皮膚)の免疫系細胞における SNX25 が特に重要であることが明らかとなった。SNX25 の KO では NGF の発現が顕著に損なわれること、DRG における疼痛関連因子の発現が遺伝子レベルで減弱することから、SNX25 は NGF の発現を制御して感覚神経における疼痛関連因子の発現を調節していることが考えられる。今後さらに SNX25 を介した疼痛発症の詳細な分子機序を解明したい。

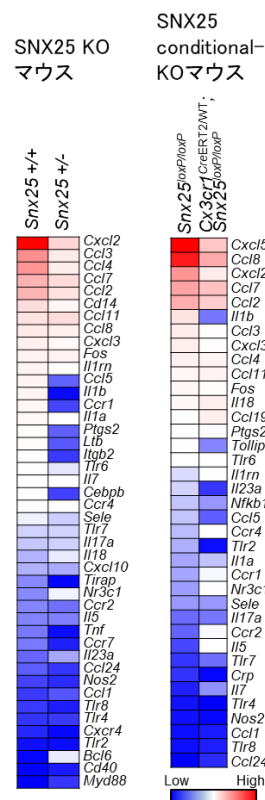


図2 末梢レベル(後肢皮膚)における炎症関連因子の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishimura K, Tanaka T, Takemura S, Tatsumi K, Wanaka A	4. 巻 16
2. 論文標題 SNX25 regulates proinflammatory cytokine expression via the NF-κB signal in macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0247840
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0247840.	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 Takemura S, Isonishi A, Tanaka T, Okuda H, Tatsumi K, Yamano M, Wanaka A.	4. 巻 225
2. 論文標題 Neural expression of sorting nexin 25 and its regulation of tyrosine receptor kinase B trafficking.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Struct. Funct.	6. 最初と最後の頁 2615-2642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00429-020-02144-0.	査読の有無 有
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7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、和中明生
2. 発表標題 皮膚マクロファージはNGFレベルを調節することで痛覚を制御する
3. 学会等名 第127回日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 達英、奥田 洋明、石西 綾美、辰巳 晃子、和中 明生
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 第97回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 達英、奥田 洋明、石西 綾美、辰巳 晃子、和中 明生
2. 発表標題 真皮マクロファージはNGF発現レベルを調節して痛覚感受性を決定する
3. 学会等名 第64回日本神経化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中達英、奥田洋明、寺田雄紀、新城武明、西村和也、石西綾美、三谷早希、竹村晶子、辰巳晃子、和中明生
2. 発表標題 順遺伝学スクリーニングによる新規疼痛候補遺伝子の解析
3. 学会等名 第63回日本神経化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中達英、奥田洋明、寺田雄紀、新城武明、西村和也、石西綾美、三谷早希、竹村晶子、辰巳晃子、和中明生
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解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中達英、奥田洋明、寺田雄紀、新城武明、西村和也、石西綾美、竹村晶子、辰巳晃子、和中明生
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 第125回日本解剖学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中 達英、奥田 洋明、寺田 雄紀、新城 武明、西村 和也、石西 綾美、竹村 晶子、辰巳 晃子、和中 明生
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
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 疼痛の予防及び/又は治療用医薬組成物、並びに、疼痛抑制物質のスクリーニング方法	発明者 田中達英、和中明生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願 2 0 2 0 - 1 9 8 1 4 7 号	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	辰巳 晃子 (Tatsumi Kouko) (90208033)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	
研究分担者	和中 明生 (Wanaka Akio) (90210989)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	

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
---------	---------