

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年～2010 年

課題番号：21791759

研究課題名（和文） マイクロ RNA を指標とした術後慢性疼痛の解明

研究課題名（英文） The roles of microRNAs in chronic postoperative pain

研究代表者

中井 國博 (NAKAI KUNIHIRO)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号：80362705

研究成果の概要（和文）：疼痛モデルであるラット脊髄挫滅モデルにおいて、脊髄の RB II-52 の発現およびセロトニン 2C 受容体の選択的スプライシングのバリエーションは、障害より尾側で変化を認めた。疼痛モデルである三叉神経絞扼モデルにおいてセロトニン 2C 受容体作動薬の投与によって疼痛閾値は上昇し、疼痛行動を抑制する効果があることが明らかになった。また、 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬いずれの投与によっても疼痛閾値は上昇し、疼痛行動を抑制する効果があることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In the rat spinal contusion model, RB II-52 expression and serotonin 2C receptor variant levels were altered at the caudal site of the injured spine. In chronic constriction injury to the infraorbital nerve of rats by loose ligatures, intrathecal administration of the serotonin 2C receptor agonists produced antiallodynic effects. In chronic constriction injury to the infraorbital nerve of rats by loose ligatures, intrathecal administration of both the α_1 -adrenoceptor agonist and the α_2 -adrenoceptor agonist produced antiallodynic effects.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：形成外科

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・形成外科

キーワード：マイクロ RNA、核小体低分子 RNA、脊髄挫滅モデル、RB II-52、選択的スプライシング、セロトニン 2C 受容体、アドレナリン受容体

1. 研究開始当初の背景

外傷後や術後に創傷治癒が終了した後に疼痛が遷延する症例に遭遇することがある。その患者の QOL は著しく損なわれているにもかかわらず、既存の鎮痛薬の組み合わせでは制御不能であることが多い。

マイクロ RNA はそれ自身では蛋白質をコードしない小さな RNA 分子であるが、蛋白質の翻訳阻害やターゲットになる RNA の安定性に関

与する。ひとつのマイクロ RNA で多くの遺伝子の発現に影響を及ぼすことが分かっている。疼痛に関与するマイクロ RNA を見出すことができれば新たな鎮痛治療の候補になりうると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 疼痛に関与するマイクロ RNA のターゲットになる遺伝子の候補を見出す。

(2) そのターゲット遺伝子がどのような役割を担っているかを検証する。

3. 研究の方法

(1) RBII-52 は核小体低分子RNAの1種である。セロトニン2C受容体の塩基配列に相同性を持つ52塩基の分子で、セロトニン2C受容体の選択的スプライシングに関与するといわれている。選択的スプライシングが起こると受容体としては機能を持たない形状へ変化してしまう。

疼痛モデルとしてラット脊髄挫滅モデルを使用した。ラット脊髄に錘を落下させて受傷させた。麻痺から回復した後、機械的刺激による疼痛閾値の低下を行動学的に確認した。麻痺から回復した術後2週間で疼痛行動を確認した脊髄についてRBII-52とセロトニン2C受容体のバリエーションの定量を real time PCR を用いて行った。

(2) RBII-52 に関与するセロトニン2C受容体についての疼痛効果を検証した。

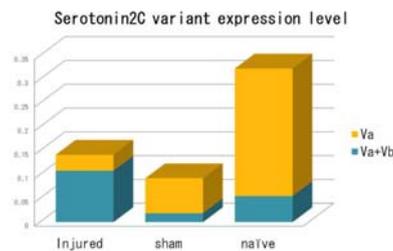
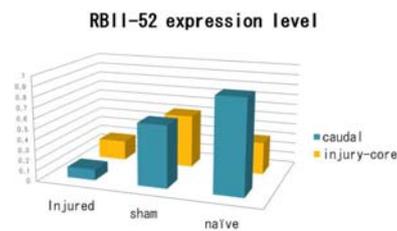
オスSDラットの眼窩下神経を麻酔下に5-0ナイロン糸で2ヶ所緩く結紮し、眼窩下神経絞扼モデルを作製した。モデル作製後に疼痛行動が出現した個体に対し、頸部脊髄くも膜下にチューブを挿入し留置した。手術から回復したことを確認して薬物投与実験を行った。セロトニン2C受容体作動薬MK212を頸部脊髄くも膜下に投与し疼痛行動の変化を分析した。また、セロトニン2C受容体拮抗薬RS-102221を投与することでセロトニン2C受容体作動薬MK212の効果が阻害されるかを分析した。疼痛行動の評価は von Frey filament を用いて薬物投与前より経時的に行った。

(3) 脊髄下行性疼痛抑制系においてセロトニンと密接に関係しているノルアドレナリンについても検証を行った。オスSDラットの眼窩下神経を麻酔下に5-0ナイロン糸で2ヶ所緩く結紮し、眼窩下神経絞扼モデルを作製した。モデル作製後に疼痛行動が出現した個体に対し、頸部脊髄くも膜下にチューブを挿入し留置した。手術から回復したことを確認して薬物投与実験を行った。 $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬 phenylephrine と $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬 clonidine を頸部脊髄くも膜下に投与し疼痛行動の変化を分析した。また、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬 prazosin と $\alpha 2$ アドレナリン受容体拮抗薬 yohimbine を投与することで $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬 phenylephrine と $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬 clonidine の効果が阻害されるかを分析した。疼痛行動の評価は von Frey filament を用いて薬物投与前より経時

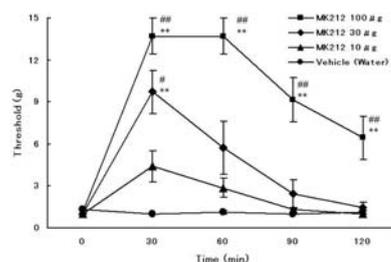
的に行った。

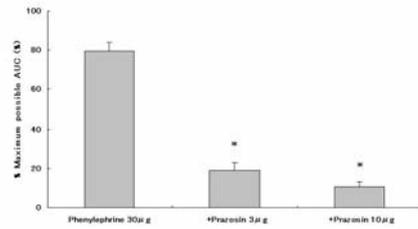
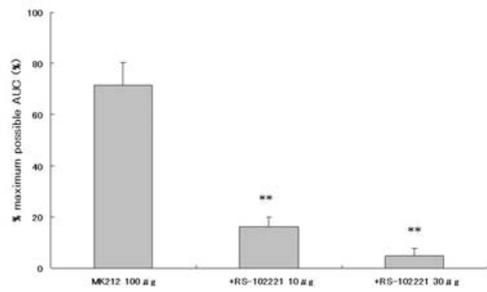
4. 研究成果

(1) ラット脊髄挫滅モデルにおいて、脊髄のRBII-52の発現およびセロトニン2C受容体の選択的スプライシングのバリエーションは、障害より尾側で変化を認めた。

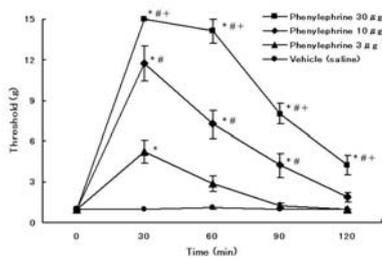
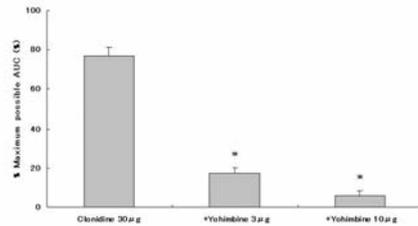


(2) 疼痛モデルである三叉神経絞扼モデルにおいてセロトニン2C受容体作動薬の投与によって疼痛閾値は上昇した。セロトニン2C受容体拮抗薬を投与することでセロトニン2C受容体作動薬の効果が阻害された。セロトニン2C受容体作動薬で疼痛行動を抑制する効果があることが明らかになった。

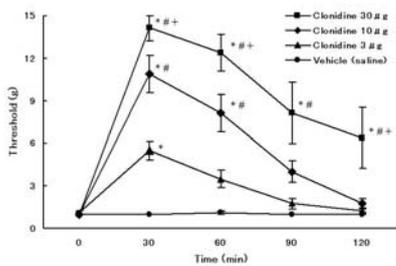




(3) 疼痛モデルである三叉神経絞扼モデルにおいて $\alpha 1$ と $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬いずれの投与によっても疼痛閾値は上昇した。 $\alpha 1$ アドレナリン受容体拮抗薬と $\alpha 2$ アドレナリン受容体拮抗薬を投与することで $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬と $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬の効果はそれぞれ阻害された。 $\alpha 1$ と $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬で疼痛行動を抑制する効果があることが明らかになった。



(4) 動物モデルを用いて、疼痛による脊髄レベルでの RB II-52 の発現およびセロトニン 2C 受容体の選択的スプライシングの変化を明らかにした。また、それに関与するセロトニン 2C 受容体作動薬、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬が疼痛行動を抑制することも明らかにできた。これらの関連は世界に先駆けた新しい知見であり、新規疼痛治療戦略の候補となることを見出すことができた。今後の研究の展望として以下の 3 つを考えている。



- ① RB II-52 に関与する RNA を核内に運搬する手段を確立する。
- ② RB II-52 に関与する RNA による受容体機能を変化させる選択的スプライシングの調整を検証する。
- ③ 動物モデルで RB II-52 による疼痛抑制効果を検証する。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nakai K, Nakae A, Oba S, Mashimo T, Ueda K.
5-HT_{2C} receptor agonists attenuate pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain.
Eur J Pain. 2010;14(10):999-1006. 査読有
- ② Nakai K, Nakae A, Oba S, Mashimo T, Ueda K.
P2X₄ receptor expression in a rat model of trigeminal neuropathic pain.
Neuroreport. 2010;21(8):559-63. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① K. NAKAI, A. NAKAE, S. OBA, K. YANO, K. HOSOKAWA, T. MASHIMO, K. UEDA.
Antiallodynic effects of serotonin 2C receptor agonists in a rat model of trigeminal neuropathic pain.
NEUROSCIENCE 2010
2010 年 11 月 16 日 San Diego, USA
- ② 中井國博、中江文、大場創介、矢野健二、細川互、真下節、上田晃一
眼窩下神経絞扼モデルにおけるアドレナリン受容体の関与
第 19 回日本形成外科学会基礎学術集会
2010 年 9 月 17 日 横浜
- ③ K. Nakai, A. Nakae, T. Tanaka, S Oba, M Shibata, T. Mashimo, K Ueda.
ANTIALLODYNIC EFFECTS OF SEROTONIN 2C RECEPTOR AGONISTS IN THE RAT ORO-FACIAL NEUROPATHIC PAIN MODEL

Third International Congress on
Neuropathic Pain
2010 年 5 月 29 日 Athens, Greece