

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830048

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛におけるエピジェネティックサイレンシングの統合的理解

研究課題名(英文) Integrative understanding of epigenetic silencing in neuropathic pain

## 研究代表者

内田 仁司 (Uchida, Hitoshi)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：30549621

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)：本研究代表者は、神経損傷に起因する神経障害性疼痛の分子基盤において、転写抑制因子NRSFを介する遺伝子サイレンシングの重要性を見出してきた。本研究では、神経損傷後の脊髄後根神経節において発現増加する、NRSF転写共役因子およびエピジェネティクス修飾酵素を見出した。さらに、神経障害性疼痛における末梢性・全身性のモルヒネ鎮痛効果低下の分子基盤として、ヒストン脱アセチル化酵素の機能的関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have previously provided evidence that epigenetic gene silencing via neuron restrictive silencer factor (NRSF) is important in nerve injury-induced neuropathic pain. The present study revealed that injury induced the expressions of co-factors of NRSF and histone modifying enzymes in the primary afferents. Also, we showed that histone deacetylase inhibitors ameliorated morphine resistance in neuropathic pain via cancellation of the epigenetic silencing of mu opioid receptor gene.

研究分野：分子神経科学

キーワード：神経障害性疼痛 エピジェネティクス NRSF 脊髄後根神経節 遺伝子発現 転写共役因子

## 1. 研究開始当初の背景

急性疼痛には生体に対する警告信号という生理的意義があるが、慢性疼痛にはそのような役割は無く、それ自体が治療に必要な病態として捉えるべきである。これまでの国内外の研究から、末梢神経損傷に起因する慢性疼痛(神経障害性疼痛)の分子基盤は、長期的な遺伝子発現を介した疼痛伝達経路の可塑的機能変調であると考えられるようになった。これまでに本研究代表者は、神経障害性疼痛の分子基盤において、エピジェネティック修飾が重要な役割を果たすことを見出してきた(Uchida et al., 2010, Neuroscience; Uchida et al., 2010, J Neurosci; Uchida et al., 2013, Neuroscience)。具体的には、神経損傷後の一次知覚神経では転写抑制因子 NRSF (neuron-restrictive silencer factor) の発現が増加し、ヒストン脱アセチル化を介して疼痛関連遺伝子群( $Na_v1.8$ ,  $\mu$ オピオイド受容体(MOP)など)の発現を抑制し、神経障害性疼痛の特徴である無髄C線維の機能消失(知覚鈍麻)とモルヒネ抵抗性を誘発することを解明した。また、本研究代表者が所属していた研究室(長崎大学医歯薬学総合研究科創薬薬理学 植田弘師 教授研究室)では、ヒストン脱アセチル化(HDAC)酵素阻害薬が、神経損傷後における $Na_v1.8$ の遺伝子発現低下を抑制し、知覚鈍麻を改善することを報告している(Matsushita et al., 2013, Br J Pharmacol)。さらに、他の研究グループは、神経損傷後におけるNRSFの長期的発現増加に加えて、新たな標的遺伝子( $K_v7.2$ )の発現低下とその機能的役割を報告している(Rose et al., 2011, Pain)。

## 2. 研究の目的

これまでの国内外の研究から、NRSFはハブとして機能し、mSin3やCoRESTをはじめとする、多様な共役因子と複合体を形成し、化学的に安定なエピジェネティクス修飾(DNAメチル化やヒストンメチル化)を介して、長期的な遺伝子サイレンシングを誘導することが明らかになっている(Ooi and Wood, 2007, Nat Rev Genet)。しかしながら、神経損傷性の神経障害性疼痛におけるNRSFを介するエピジェネティックサイレンシングの分子基盤、特に転写共役因子およびエピジェネティクス修飾酵素との関連性については、その殆どが未解明であり、重要な研究課題が残されている。

そこで本研究では、NRSF転写共役因子およびエピジェネティクス修飾酵素に焦点を当て、神経損傷後におけるNRSFを軸とした遺伝子サイレンシングの分子基盤を解明するとともに、転写抑制機構に基づいて、NRSF標的遺伝子群を分類化する。さらに、神経障害性疼痛に対するエピジェネティクス制御化合物の有用性を明らかにし、新たな治療戦略の基盤形成を目指す。

## 3. 研究の方法

本研究では、坐骨神経の部分結紮による神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、以下の分子生物学的および行動学的解析を行った。

(1) 神経損傷後の脊髄後根神経節(dorsal root ganglion, DRG)におけるNRSF転写共役因子群およびエピジェネティクス修飾酵素群のmRNA発現レベルの経日的変化を明らかにするために、定量的リアルタイムPCR解析を行った。

(2) DRGにおける転写共役因子の標的遺伝子を同定するために、次世代シーケンサーを用いたChIP-seq解析を試みた。

(3) 神経損傷性の神経障害性疼痛におけるモルヒネ抵抗性に対するエピジェネティクス制御化合物の有用性を検討するために、HDAC阻害薬トリコスタチンA(TSA)またはバルプロ酸(VPA)を腹腔内に投与した。その機能解析では、モルヒネを足蹠皮下あるいは皮下に投与し、それぞれ末梢性鎮痛と全身性鎮痛を評価するとともに、MOPの遺伝子発現レベルを定量的リアルタイムPCR法にて解析した。

## 4. 研究成果

(1) 神経損傷後のDRGにおける、NRSF共役因子のmRNA発現レベルの経日的変化を定量的リアルタイムPCR法にて解析したところ、神経損傷7日後では、特定の共役因子Aの発現が有意に増加することを見出した。また、NRSFは、mSin3やCoRESTを介して、主にHDAC1およびHDAC2をリクルートすることが知られている。神経損傷1日後では、HDAC1およびHDAC2のいずれの発現レベルも変化が認められなかったが、神経損傷7日後ではHDAC2の発現レベルのみ約1.2倍上昇することが見出された。NRSF標的遺伝子であるMOPのNRSF結合配列(NRSE)には、HDAC1は結合せず、HDAC2が結合することが報告されており(Kim et al., 2006, Nucleic Acids Res)。神経損傷後におけるNRSFによるMOP遺伝子の長期的な発現抑制については、HDAC2の発現増加が関与する可能性が考えられる。また、これ以外のHDACについては、HDAC6,9,10の発現レベルが神経損傷1日後から7日後まで持続して発現上昇することが観察された。神経障害性疼痛における、これらのHDACとNRSFの連関の機能的役割については、今後の解析課題である。

(2) 次世代シーケンサーを用いたエピジェネティクス解析では、均一な断片化ゲノムDNAを得る必要がある。そこで、超音波処理器(Covaris, エムエス機器)を用いて、DRGより抽出したゲノムDNAの断片化条件を詳細に検討した。しかしながら、条件を最適化することができず、検討を継続している。

(3) 上記(1)の結果から、NRSFによるMOP遺伝子のサイレンシングにおけるHDACの

機能的関与を評価するために、HDAC 阻害薬 TSA および VPA を用いた解析を行った。

TSA (1 mg/kg) を腹腔内に単回投与すると、DRG におけるヒストン H3 および H4 のアセチル化の亢進が投与 1 時間後から観察された。そこで、神経損傷を行う 1 時間前、およびその翌日から 1 日 1 回 TSA (1 mg/kg) を腹腔内に投与した。以前の報告(Uchida et al., 2010, J Neurosci) と一致して、コントロール溶媒処理群では、損傷 7 日後において、モルヒネ (30 nmol) を足蹠皮下に投与することによる末梢性鎮痛効果がほぼ完全に消失していた。この神経損傷による末梢性モルヒネ鎮痛の消失は、TSA 投与により顕著に回復した。一方、非損傷マウスの末梢性モルヒネ鎮痛に対して、TSA は影響を及ぼさなかった。この結果は、アンチセンスオリゴによる NRSF のノックダウン解析結果(Uchida et al., 2010, J Neurosci) と一致している。

神経損傷後では、モルヒネ (1 mg/kg) 皮下投与による全身性の鎮痛効果が顕著に低下し、この低下には末梢性モルヒネ鎮痛の欠如が深く関与することが報告されている (Rashid, 2004, J Pharmacol Exp Ther)。そこで、神経損傷後の全身性モルヒネ鎮痛の欠如が、TSA により改善するかどうかの検討を行った。その結果、神経損傷後の全身性モルヒネ鎮痛の低下は、TSA 投与により顕著に回復した。同様に、他の HDAC 阻害薬である VPA (200 mg/kg) を 1 日 1 回腹腔内投与すると、神経損傷後における全身性モルヒネ鎮痛の消失が顕著に回復した。一方、非損傷マウスの全身性モルヒネ鎮痛に対して、TSA および VPA は影響を及ぼさなかった。

さらに、TSA および VPA 処理は、神経損傷後の DRG における MOP の遺伝子発現低下を有意に抑制した。行動学的解析結果と一致して、これらの化合物は、非損傷マウスの DRG における MOP の遺伝子発現レベルに対して、影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、神経損傷後の末梢性ならびに全身性のモルヒネ鎮痛の欠如において、HDAC が機能的に関与することが強く示唆された。また、神経障害性疼痛の治療において、HDAC 阻害薬がモルヒネの鎮痛補助薬として有用である可能性が考えられる。

また、これまでの予備的解析において、神経損傷後の MOP NRSE では、H3K9 のジメチル化が亢進することを見出している。最近、ジメチル化酵素 G9a が神経損傷後における MOP 発現低下に寄与することが示されており (Zhang et al., 2016, J Biol Chem) 今後は G9a の関与に基づく標的遺伝子の分類化を行うことも重要な課題であると考えられる。

#### 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 3 件)

1. Uchida H, Matsushita Y, Araki K, Mukae T, Ueda H  
Histone deacetylase inhibitors relieve morphine resistance in neuropathic pain after peripheral nerve injury.  
J Pharmacol Sci, 128, 208-211, 2015. (査読あり)  
DOI: 0.1016/j.jphs.2015.07.040.
2. Ueda H, Uchida H  
Epigenetic modification in neuropathic pain.  
Curr Pharm Des, 21, 849-867, 2015. (査読あり)  
DOI:10.2174/1381612820666141027113923
3. Uchida H, Nagai J, Ueda H  
Lysophosphatidic acid and its receptors LPA1 and LPA3 mediate paclitaxel-induced neuropathic pain in mice.  
Mol Pain, 10, 71, 2014. (査読あり)  
DOI: 10.1186/1744-8069-10-71.

[学会発表](計 5 件)

1. 内田仁司、植田弘師  
慢性疼痛とエピジェネティクス  
第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 19 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
2. 内田仁司、植田弘師  
神経障害性疼痛誘発因子リゾホスファチジン酸によるミエリン関連遺伝子の転写抑制機構  
第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 19 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)
3. 内田仁司、迎武紘、植田弘師  
断続的冷温負荷による線維筋痛症モデルに対するドネペジルの疼痛改善作用  
第 67 回日本薬理学会西南部会、2014 年 11 月 23 日、産業医科大学ラマツィーニホール(福岡県・北九州市)
4. 内田仁司、植田弘師  
創薬に向けた線維筋痛症モデル動物の病態解析と治療戦略  
日本線維筋痛症学会第 6 回学術集会、2014 年 9 月 14 日、JA 長野県ビル(長野県・長野市)
5. 内田仁司、濱田将徳、植田弘師  
神経障害性疼痛原因分子 LPA による脱髄とアセチル化修飾  
第 36 回日本疼痛学会、2014 年 6 月 21 日、KKR ホテル大阪(大阪府・大阪市)

[図書](計 0 件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）  
該当なし

取得状況（計 0 件）  
該当なし

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内田 仁司 (UCHIDA, Hitoshi)  
新潟大学・脳研究所・助教  
研究者番号：30549621

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし