

microRNA クラスター miR-17-92 による神経障害性疼痛の制御

坂井 敦, 鈴木 秀典

1. はじめに

神経障害性疼痛は外傷やがん, 糖尿病, HIV や帯状疱疹などの感染症, 化学療法薬, 虚血性障害など非常に多岐にわたる体性感覚神経系の障害に起因し, 時に慢性に経過する難治性の疼痛疾患である. 近年の研究の進歩により治療法は改善してきたが, いまだ十分な鎮痛効果が得られることは少なく, 鎮痛薬の副作用も治療の大きな妨げとなっている. 神経障害性疼痛の主な要因の一つに, 感覚神経の興奮性上昇やシナプス伝達の増強による侵害情報伝達の亢進がある¹⁾. これらの分子基盤として, 活動電位の発生や伝搬に必須なナトリウムチャンネルおよび神経伝達物質の放出に重要なカルシウムチャンネルの発現もしくは機能の上昇が知られている. 一方, 活動電位の終息および静止膜電位形成に重要なカリウムチャンネルは発現・機能低下することが示されている. 神経障害に伴うこれらチャンネルの発現・機能変化の分子メカニズムに関しては不明な点が多いが, 近年 microRNA による調節が重要な役割を担っていることが明らかとされてきた. 実際に microRNA とその標的分子が疼痛治療の有望な標的となることが示されてきている. 筆者らは神経障害性疼痛において microRNA クラスター miR-17-92 が電位依存性カリウムチャンネルを制御していることを見いだしたので²⁾, 痛みと microRNA に関するその他の最新の知見とともに紹介したい.

2. microRNA と痛み

microRNA は約 21~25 塩基長の短い RNA であり, タンパク質をコードしない非コード RNA の一種である. ほとんどの microRNA は mRNA と同様にゲノムから RNA ポリメラーゼ II による転写によって primary microRNA とし

て産生され, RNase III 様酵素である Drosha と Dicer により 2 段階で切断されることにより短い二本鎖の RNA となる³⁾. 二本鎖 RNA は AGO を含む RNA 誘導サイレンシング複合体 (RNA-induced silencing complex: RISC) に取り込まれたのち, 一本鎖となり, 成熟した microRNA として機能するようになる. したがって, 成熟 microRNA の発現は primary microRNA の転写活性のみでなく, Drosha や Dicer によるプロセッシング効率によっても調節を受ける. 特に, fused in sarcoma protein (FUS) や heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) のような RNA 結合タンパク質は特定の primary microRNA への結合を介して Drosha の結合や活性を調節することで, 成熟 microRNA の発現に影響することが知られている⁴⁾. 一般的に, 成熟 microRNA は 5' 末端側の 2~8 番目の塩基配列 (シード配列) を介して標的となる mRNA の 3' 非翻訳領域を認識し, タンパク質への翻訳抑制や mRNA の分解促進によりタンパク質発現を抑制する.

神経障害性疼痛を含むさまざまな疼痛病態下において, 多くの microRNA が感覚神経系において発現変化し, 病態に関与することが明らかにされてきた⁵⁾. たとえば, 筆者らは侵害刺激や触刺激・温度刺激のようなさまざまな感覚刺激を検出し, 脊髄へと伝達する一次感覚神経において, miR-7a の発現低下が電位依存性ナトリウムチャンネル $\beta 2$ サブユニットの発現上昇を介して神経障害性疼痛に寄与することを明らかにした⁶⁾. 一方で, 末梢神経傷害は脊髄以降の中枢神経系にも影響することも示されており, 脊髄後角に発現する miR-103 は末梢神経傷害により発現低下し, L 型電位依存性カルシウムチャンネルである $Ca_v1.2$ の発現上昇を介して神経障害性疼痛に寄与することが報告されている⁷⁾.

3. microRNA クラスター miR-17-92

約 40% の microRNA は 3 kb の範囲内に複数 (通常 2~3) の microRNA を含むクラスターを形成している⁸⁾. microRNA クラスターは生物種を超えて保存されていることが多く, クラスターを形成することの機能的な重要性がうかがわれる. その中でも, miR-17-92 クラスターは 1 kb 以下の primary microRNA 上に 6 種もの microRNA (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-92a) が集中している非常に特徴的な microRNA クラスターである (図 1)⁹⁾. miR-17-92 のノック

日本医科大学・薬理学 (〒113-8602 東京都文京区千駄木 1-1-5)

MicroRNA cluster miR-17-92 modulates the neuropathic pain

Atsushi Sakai and Hidenori Suzuki (Department of Pharmacology, Nippon Medical School, 1-1-5 Sendagi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8602, Japan)

本論文の図版はモノクロ (冊子版) およびカラー (電子版) で掲載.

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900524

© 2018 公益社団法人日本生化学会

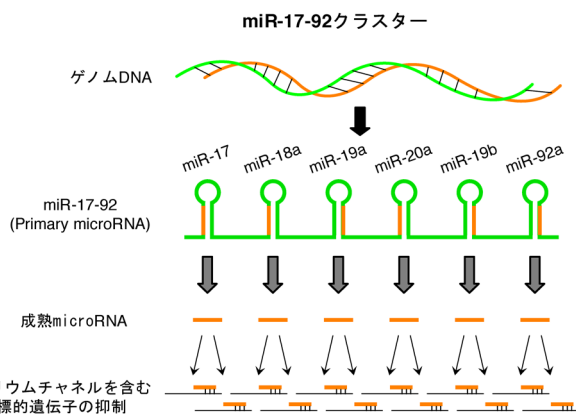


図1 miR-17-92クラスターの概略

miR-17-92クラスターには6種類のmicroRNAがゲノムから転写されてできた同一primary microRNA上に存在している。各成熟microRNAはそれぞれに対応する標的遺伝子の翻訳を抑制することで多くの遺伝子のタンパク質発現に影響を与える。

アウトマウスは肺の低形成や心室中隔欠損を起こし、生後まもなく死に至る。また、oncomiR-1との別名があるように、さまざまながん細胞において発現上昇が観察され、がん抑制作用のあるPTENやTGF β 経路などの抑制を介して発がん性に働くことが知られている。また、腫瘍組織において血管新生を増強することも報告されている。免疫系においては、miR-17-92の欠損によりプロB細胞からプレB細胞への分化が阻害され、過剰発現によりB細胞リンパ腫が誘発される。さらに、自閉症やアルツハイマー病のようなさまざまな神経精神疾患においても発現異常がみられている。しかしながら、神経精神疾患における病態生理学的意義に関してはほとんど明らかになっていない。

4. miR-17-92クラスターによる神経障害性疼痛の制御

筆者らは第5腰椎脊髄神経を結紮することにより神経障害性疼痛を発症したラットを用いて、一次感覚神経の細胞体が存在する後根神経節においてマイクロアレイを用いて網羅的にmicroRNAの発現解析を行い⁶⁾、miR-17-92クラスターに含まれる6種すべてのmicroRNAが神経結紮後1日後より少なくとも4週にわたって、長期的に発現上昇することを見いだした。一方で、第5腰椎脊髄神経の支配領域である後肢足底に完全フロイントアジュバントを注入することにより惹起した炎症性疼痛モデルラットにおいては疼痛が同程度にもかかわらず、miR-17-92クラスターの発現は変化しなかったことから、神経障害性疼痛に選択的な変化であることが明らかになった。

miR-17-92クラスターの神経障害性疼痛に対する関与を検討するために、血清型6のアデノ随伴ウイルスベクターを用いて一次感覚神経特異的に遺伝子導入を行った。健常

ラットにmiR-17-92の発現を上昇させることで、物理的的刺激に対する痛覚閾値が低下することが明らかとなった。一方で、熱刺激に対する疼痛反応には影響がみられなかった。この疼痛発症に寄与するmicroRNAを同定するために、miR-17-92クラスターに属する各microRNAを個別に発現上昇させたところ、miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-92aの4種のmicroRNAによりそれぞれ疼痛が惹起された。さらに、これらのmicroRNAに対するアンチセンスRNAをウイルスベクターにより導入して機能阻害を行ったところ、神経障害性疼痛が長期的に緩和されることが明らかとなり、一次感覚神経におけるmiR-17-92の作動メカニズムの解明が神経障害性疼痛の治療に結びつく可能性が示された。

5. miR-17-92クラスターによる電位依存性カリウムチャンネルの調節

microRNAは主にmRNAの翻訳抑制に従事し、必ずしもmRNAの発現低下を伴わないが、持続的な翻訳抑制はP bodyを介するmRNAの分解につながる事が知られている。そのため、疼痛に関わるmiR-17-92の標的遺伝子を探索するために、神経結紮により発現低下するmRNAに着目した。過去に報告された遺伝子発現マイクロアレイ(GEO accession GSE24982)において発現低下していたmRNAのうち、約20%もの遺伝子がmiR-17-92クラスター中で疼痛に関与する4種類のmicroRNAの標的となることがTargetScanにより予測された。特に活動電位発生後の形質膜の再分極に携わり、神経細胞の電気的興奮性の調節にきわめて重要な役割を担っている電位依存性カリウムチャンネルサブユニットとその調節サブユニットが多く含まれることが明らかになった(図2)。実際に、標的候補のカリウムチャンネルサブユニットは一次感覚神経に発現しており、疼痛を含む感覚受容と関連することが報告されている¹⁰⁾。このような背景から、疼痛に関わるmiR-17-92の標的遺伝子として電位依存性カリウムチャンネルの検討を行った。

miR-17-92と標的候補の電位依存性カリウムチャンネルサブユニットの一次感覚神経における発現分布を比較検討した。後根神経節の薄切凍結切片からレーザーマイクロダイセクション法により単一の一次感覚神経細胞を採取し、miR-17-92と電位依存性カリウムチャンネルサブユニットおよび神経細胞亜型マーカー分子の遺伝子発現を同時に測定した。また、マイクロダイセクションを用いることで遺伝子発現と神経細胞の形態情報を併せて解析することが可能となった。一次感覚神経は細胞体の大きさが不均一であり、一般的に小型の細胞はC線維を形成し、主に鈍い侵害刺激情報を伝えるのに対し、中型や大型の細胞はそれぞれ鋭く早い侵害刺激情報を伝えるA δ 線維や触刺激情報を伝えるA β 線維を主に形成することが知られている。miR-17-92は小

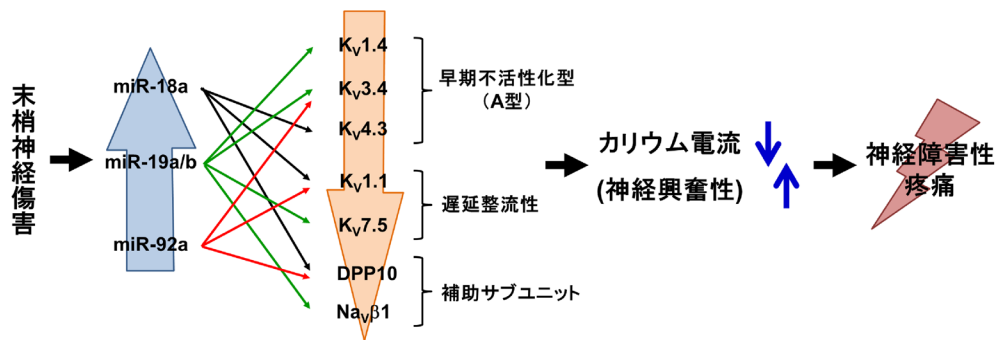


図2 miR-17-92による神経障害性疼痛の制御

末梢神経傷害によって一次感覚神経におけるmiR-17-92の発現量が上昇するが、miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-92aの4種が神経障害性疼痛に寄与する。これらのmicroRNAの標的遺伝子としてA電流を構成する早期不活性化カリウムチャンネル ($K_v1.4$, $K_v3.4$, $K_v4.3$) やその機能を正に調節する補助サブユニット (DPP10, $Na_v\beta1$)、遅延整流性カリウムチャンネル ($K_v1.1$, $K_v7.5$) が存在し、その発現低下がカリウム電流の低下ひいては神経障害性疼痛につながると考えられる。

型から大型のいずれの一次感覚神経においても発現がみられ、複数の標的カリウムチャンネルサブユニットと高い共発現を示していた。次に、ルシフェラーゼアッセイを用いて、miR-17-92が標的カリウムチャンネルの3'非翻訳領域を直接認識することが明らかになった。また、miR-17-92クラスターおよび疼痛に関わる各microRNAを一次感覚神経で過剰発現させると、標的カリウムチャンネルサブユニットのmRNA発現は低下した。これらのことから、miR-17-92クラスターは電位依存性カリウムチャンネル遺伝子を直接認識することにより発現抑制することが明らかとなった。

電気生理学的に、miR-17-92によるカリウム電流に対する影響を検討した。miR-17-92の標的カリウムチャンネルの α サブユニットのうち、 $K_v1.4$ と $K_v3.4$, $K_v4.3$ は活動電位の発生に伴って急速に活性化される一過性のカリウム電流 (A電流) に寄与する。A電流を形成するカリウムチャンネルとして $K_v1.4$ と $K_v3.4$ および $K_v4.1\sim4.3$ が知られている。また、DPP10と $Na_v\beta1$ は K_v4 ファミリーの機能を正に調節することが報告されていることから、miR-17-92は特にA電流に強く影響する可能性が予測される。したがって、小型の一次感覚神経においてパッチクランプ法により電位依存性の総カリウム電流と薬理的にA電流を抑制した電流成分から総カリウム電流、A電流、A電流以外のカリウム電流を抽出した。まず、末梢神経傷害による影響を調べたところ、総カリウム電流とA電流、A電流以外のカリウム電流のすべてで電流密度の低下がみられた。次に、健常ラットにおいてmiR-17-92を発現上昇させたところ、総カリウム電流とA電流に有意な低下がみられ、A電流以外のカリウム電流には大きな影響はみられなかった。これらのことから、miR-17-92クラスターは特にA電流の調節において重要な役割を有していることが明らかになった。これまでにヒストンメチル転移酵素であるG9aが複数の電位依存性カリウムチャンネルのプロモーター領域にお

いてヒストンのメチル化を誘導し、発現を低下させることが報告されているが¹¹⁾、さらに転写後においてmiR-17-92クラスターがカリウムチャンネルのタンパク質発現を調節していることが示された。すなわち、クラスターに含まれるmicroRNAそれぞれが個別に類似の機能を有する複数のタンパク質を制御することで病態生理学的に大きな効果を生み出していた (図2)。

最後に、miR-17-92による電位依存性カリウムチャンネルの機能低下と神経障害性疼痛との関連を検討した。miR-17-92の標的カリウムチャンネル α サブユニットのタンパク質発現は神経障害性疼痛モデルラットの後根神経節において低下していたが、miR-17-92の機能阻害により、その低下は抑制された。miR-17-92の機能を阻害することにより、電気生理学的にも神経障害性疼痛でみられたカリウム電流の低下が回復した。miR-17-92の遺伝子導入による疼痛はそれぞれ $K_v4.3$ および K_v7 チャンネル修飾薬であるNS5806やflupirtineの投与により緩和された。同様に、神経障害性疼痛もこれらのカリウムチャンネル修飾薬により緩和され、特に両薬物を併用することで、より強い鎮痛作用が得られた。以上より、miR-17-92クラスターおよびその複数の標的遺伝子が神経障害性疼痛の病態に関わるのみでなく、鎮痛標的にもなりうることが明らかとなった。

6. miR-183-96-182クラスターによる疼痛の制御

miR-17-92と同様に、別のmicroRNAクラスターであるmiR-183-96-182も神経障害性疼痛における役割が報告されている¹²⁾。miR-183-96-182クラスターはmiR-17-92とは逆に末梢神経傷害により一次感覚神経において発現が低下する。それにより、電位依存性カルシウムチャンネルの副サブユニットである $\alpha2\delta-1$ と $\alpha2\delta-2$ の発現が上昇することが報告されている。興味深いことに、電位依存性カルシウム

チャンネル $\alpha 2\delta$ サブユニットは神経障害性疼痛に対する鎮痛薬として用いられているプレガバリンの分子標的であり、microRNA クラスターによる遺伝子発現調節が臨床における薬物の効果発現にも重要である可能性が考えられる。

7. 細胞外microRNAによる疼痛の制御

近年、microRNAがエクソソームのような細胞外小胞に含まれるなどして細胞外に放出され、細胞間コミュニケーションの一翼を担うことが示されてきている¹³⁾。疼痛に関して、let-7bが一次感覚神経から放出され、Toll-like receptor 7を介して痛覚過敏を起こすことが報告されている¹⁴⁾。筆者らはmiR-21が神経障害性疼痛において一次感覚神経で発現上昇し、疼痛に関わることを示したが¹⁵⁾、そのメカニズムは不明なままであった。最近、一次感覚神経で発現上昇したmiR-21はエクソソームに内包された形で細胞外へと放出され、後根神経節における炎症性マクロファージの浸潤・活性化を起こすことが報告されている¹⁶⁾。miR-17-92クラスターのmicroRNAも細胞外に存在することが報告されている¹⁷⁾。筆者らは神経障害性疼痛においても放出が増加していることを見いだしており（未発表）、疼痛との関連を検討中である。

8. おわりに

上述のとおり、microRNAクラスターが神経障害性疼痛の病態に深く関わり、治療標的となりうるようになってきた。しかしながら、現状ではヒトにおいてRNA分子を標的とした核酸医薬等を感覚神経系へ効率よくかつ安全に送達することは困難である。すなわち、新たな薬物送達システムの開発が求められており、エクソソームのような生体に内在する細胞外小胞やウイルスベクターのような薬物担体の開発が活発となっている。microRNAクラスターは電位依存性カリウムチャンネルのように機能的に関連するタンパク質群を一括して発現調節している可能性があり、プロモーター活性の抑制やprimary microRNAの成熟化の阻害などにより特定のタンパク質を狙い撃ちにする従来の薬物とは概念の異なる治療標的分子として期待される。また、サイズの異なる非コードRNAである長鎖非コードRNA (long non-coding RNA : lncRNA) の病態生理学的な重要性も明らかとされつつあることから、今後非コードRNAを標的とした治療戦略の開発が期待される。

文 献

1) Tibbs, G.R., Posson, D.J., & Goldstein, P.A. (2016) Voltage-gated ion channels in the PNS: Novel therapies for neuropathic pain? *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 522–542.

2) Sakai, A., Saitow, F., Maruyama, M., Miyake, N., Miyake, K., Shimada, T., Okada, T., & Suzuki, H. (2017) MicroRNA cluster miR-17-92 regulates multiple functionally related voltage-gated potassium channels in chronic neuropathic pain. *Nat. Commun.*, **8**, 16079.

3) Herrera-Carrillo, E. & Berkhout, B. (2017) Dicer-independent processing of small RNA duplexes: Mechanistic insights and applications. *Nucleic Acids Res.*, **45**, 10369–10379.

4) Creugny, A., Fender, A., & Pfeffer, S. (2018) Regulation of primary microRNA processing. *FEBS Lett.*, **592**, 1980–1996.

5) Sakai, A. & Suzuki, H. (2015) Emerging roles of microRNAs in chronic pain. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **888**, 17–39.

6) Sakai, A., Saitow, F., Miyake, N., Miyake, K., Shimada, T., & Suzuki, H. (2013) miR-7a alleviates the maintenance of neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain*, **136**, 2738–2750.

7) Favereaux, A., Thoumine, O., Bouali-Benazzouz, R., Roques, V., Papon, M.-A., Salam, S.A., Drutel, G., Léger, C., Calas, A., Nagy, F., et al. (2011) Bidirectional integrative regulation of $Ca_v1.2$ calcium channel by microRNA miR-103: Role in pain. *EMBO J.*, **30**, 3830–3841.

8) Altuvia, Y., Landgraf, P., Lithwick, G., Elefant, N., Pfeffer, S., Aravin, A., Brownstein, M.J., Tuschl, T., & Margalit, H. (2005) Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 2697–2706.

9) Mogilyansky, E. & Rigoutsos, I. (2013) The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death Differ.*, **20**, 1603–1614.

10) Trantoulas, C. & McMahon, S.B. (2014) Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.*, **37**, 146–158.

11) Laumet, G., Garriga, J., Chen, S.-R., Zhang, Y., Li, D.-P., Smith, T.M., Dong, Y., Jelinek, J., Cesaroni, M., Issa, J.-P., et al. (2015) G9a is essential for epigenetic silencing of K^+ channel genes in acute-to-chronic pain transition. *Nat. Neurosci.*, **18**, 1746–1755.

12) Peng, C., Li, L., Zhang, M.-D., Gonzales, C.B., Parisien, M., Belfer, I., Usoskin, D., Abdo, H., Furlan, A., Häring, M., et al. (2017) miR-183 cluster scales mechanical pain sensitivity by regulating basal and neuropathic pain genes. *Science*, **356**, 1168–1171.

13) van Niel, G., D'Angelo, G., & Raposo, G. (2018) Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 213–228.

14) Park, C.-K., Xu, Z.-Z., Berta, T., Han, Q., Chen, G., Liu, X.-J., & Ji, R.-R. (2014) Extracellular microRNAs activate nociceptor neurons to elicit pain via TLR7 and TRPA1. *Neuron*, **82**, 47–54.

15) Sakai, A. & Suzuki, H. (2013) Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **435**, 176–181.

16) Simeoli, R., Montague, K., Jones, H.R., Castaldi, L., Chambers, D., Kelleher, J.H., Vacca, V., Pitcher, T., Grist, J., Al-Ahdal, H., et al. (2017) Exosomal cargo including microRNA regulates sensory neuron to macrophage communication after nerve trauma. *Nat. Commun.*, **8**, 1778.

17) Burgos, K.L., Javaherian, A., Bompreszi, R., Ghaffari, L., Rhodes, S., Courtright, A., Tembe, W., Kim, S., Metpally, R., & van Keuren-Jensen, K. (2013) Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing.

RNA, **19**, 712–722.

著者寸描

●坂井 敦 (さかい あつし)

日本医科大学医学部薬理学講師, 博士 (医学).

■略歴 2002年東京医科歯科大学医学部保健衛生学科検査技術学専攻卒業, 04年同大学院保健衛生学研究科博士 (前期) 課程修了, 日本医科大学薬理学助手, 10年日本医科大学大学院博士 (医学) 取得, 13年より現職.

■研究テーマと抱負 疼痛疾患を含む難治性の神経疾患に興味をもっており, 特に非コードRNAの機能解析を中心とした研究を通して新たな治療法の開発につながる基礎研究をしていきたいです.

■ウェブサイト <http://www2.nms.ac.jp/nms/pharmacol/>

■趣味 お酒, ラーメン, 料理, ベイスターズ.

●鈴木 秀典 (すずき ひでのり)

日本医科大学大学院医学研究科薬理学分野教授. 医学博士.

■略歴 1980年東京医科歯科大学医学部卒業, 86年同大学院医学研究科修了, 89年東京医科歯科大学医学部薬理学講座助手, 95年日本医科大学薬理学講座講師, 98年同助教授, 2001年同教授. 現在に至る.

■研究テーマと抱負 教室の大きな研究テーマは神経精神疾患病態の解明を通して新しい作用機序に基づいた薬物開発の基盤を探索することです. 分子生物学, 電気生理学, 動物行動学など多様な研究手法を駆使して課題解決に取り組みたいと思っています.

■ウェブサイト <http://www2.nms.ac.jp/nms/pharmacol/>

■趣味 美術館巡り.