

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-512213

(P2019-512213A)

(43) 公表日 令和1年5月16日(2019.5.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	2 G 0 4 5
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50 P	4 B 0 2 9
G O 1 N 33/68 (2006.01)	G O 1 N 33/68	4 B 0 6 3
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 C 0 8 4
G O 1 N 33/15 (2006.01)	G O 1 N 33/15 Z	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-543653 (P2018-543653)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月7日 (2017.3.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年10月9日 (2018.10.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/055354
 (87) 国際公開番号 WO2017/153424
 (87) 国際公開日 平成29年9月14日 (2017.9.14)
 (31) 優先権主張番号 EP16305257.4
 (32) 優先日 平成28年3月8日 (2016.3.8)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511025226
 ユニヴェルシテ デクスーマルセイユ
 UNIVERSITE D' AIX-MA
 RSEILLE
 フランス、エフ-13284 マルセイユ
 セデックス 07、ブルパール シャ
 ルル リヴォン、ジャルダン ドュ ファ
 ロ、58
 Jardin du Pharo, 58
 , Bid Charles Livon
 , F-13284 Marseille
 cedex 07, France

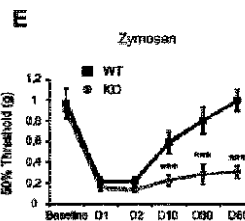
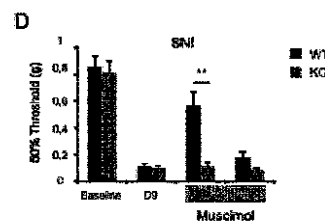
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 急性疼痛から慢性疼痛への変質を予測するためのMYO1A及び疼痛の治療のためのMYO1Aの使用

(57) 【要約】

本発明は、急性疼痛から慢性疼痛への変質のバイオマーカーとしての、及び治療ターゲットとしてのMyo1aの同定に関する。特に、本発明は、傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するための製品及び方法に関し、哺乳動物、好ましくはヒト被験体に特に適切である。より具体的には、本発明は、好ましくはバイオマーカーとしてMYO1A遺伝子を使用して、傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価することに関する。本明細書では、本発明者らは、MYO1Aに特異的な結合試薬、それを含有する組成物、デバイス、キット及び動物モデルを提供し、慢性疼痛を患う被験体の素因を評価するためのそれらの使用をさらに記載する。本発明はまた、慢性疼痛を診断、予防、管理又は治療するための製品及び方法に関する。

FIGURE 2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するためのバイオマーカーとしての、Myosin IA (Myo1a) をコードする DNA、Myo1a をコードする mRNA 又は Myo1a タンパク質の使用。

【請求項 2】

機能的 Myo1a を発現する Myo1a ホモ接合 (Myo1a^{+/+}) 参照被験体において観察された発現と比較した、被験体における Myosin IA (Myo1a) の欠如、発現減少又は非機能的発現が、該被験体が傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因である、請求項 1 に記載の使用。

10

【請求項 3】

傷害誘発性慢性機械的疼痛が炎症性慢性機械的疼痛、神経因性慢性機械的疼痛又は術後慢性機械的疼痛である、請求項 1 又は 2 に記載の使用。

【請求項 4】

傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価する *in vitro* 方法であって、該被験体の生物学的サンプルから得られた Myo1a 核酸配列を分析する (典型的には、配列決定する) 工程を含み、配列番号: 1 で特定されている Myo1a 野生型核酸配列と比較した、該被験体における Myo1a 核酸配列の変化の検出が、該被験体が傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有することを示すのに対して、変化の欠如が、該被験体が傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有しないことを示す、方法。

20

【請求項 5】

生物学的サンプルが血液、血漿又は血清サンプルである、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛の予防又は治療に使用するための、Myo1a をコードする DNA、Myo1a をコードする mRNA 又は Myosin IA タンパク質のアゴニスト。

【請求項 7】

Myosin IA タンパク質のアゴニストと、薬学的に許容し得る担体とを含む、組成物。

30

【請求項 8】

被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛の予防又は治療に使用するための、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

被験体が哺乳動物、好ましくはヒトである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の使用、請求項 4 若しくは 5 に記載の方法、請求項 6 に記載の使用のための Myo1a をコードする DNA、Myo1a をコードする mRNA 若しくは Myosin IA タンパク質のアゴニスト、又は請求項 8 に記載の使用のための組成物。

【請求項 10】

支持体上に固定化された Myo1a 遺伝子の全部又は一部に結合する少なくとも 1 つの相補的核酸を含む、デバイス。

40

【請求項 11】

傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するためのキットであって、該被験体の生物学的サンプルから得られた Myo1a 核酸を配列決定するためのオリゴヌクレオチドを含む、キット。

【請求項 12】

疼痛を予防、軽減又は治療するための薬物候補の *in vitro* 又は *ex vivo* スクリーニング方法であって、Myo1a 機能的発現を活性化若しくは刺激し又は逆に低減若しくは抑制する薬物候補の能力を決定することを含み、該能力が確認された場合には、該薬物候補を、Myo1a アゴニストとして、及び疼痛を予防、軽減若しくは治療するための薬物候補

50

として、又は逆に Myo1a アンタゴニストとして同定する、方法。

【請求項 13】

Myo1a モデュレーター及び/又は疼痛を予防、軽減若しくは阻害するための薬物をスクリーニングするための、Myo1a KO (Myo1a^{-/-}) 動物モデルの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、急性疼痛から慢性疼痛への変質のバイオマーカーとしての、及び治療ターゲットとしての Myo1a の同定に関する。特に、本発明は、傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するための製品及び方法
10
に関し、哺乳動物、好ましくはヒト被験体に特に適切である。より具体的には、本発明は、好ましくはバイオマーカーとして MYO1A 遺伝子を使用して、傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価することに関する。本明細書では、本発明者らは、MYO1A に特異的な結合試薬、それを含有する組成物、デバイス、キット及び動物モデルを提供し、慢性疼痛を患う被験体の素因を評価するためのそれらの使用をさらに記載する。本発明はまた、慢性疼痛を診断、予防、管理又は治療するための製品及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

疼痛は、一般に、急性及び慢性に分類される。急性疼痛は短期間型であり、身体の完全性の維持に必須であるのに対して、慢性疼痛は、通常の治癒時間を超えて持続し、健康に悪影響を及ぼす。慢性炎症性疼痛又は神経因性疼痛は、高消耗性長期間型感覚異常、例えば痛覚過敏症、異痛症及び自発性疼痛を生じさせる (Munro et al., 2009)。これらの症候は、末梢神経系及び中枢神経系の両方における疼痛経路の異常に長い感作の結果として起こり、疼痛伝達回路における促進の増加又は抑制の喪失のいずれかを引き起こす (Sandkuhler, 2009; Zeilhofer et al., 2012)。炎症及び神経傷害の状況では、様々な機構を介して、脊髄抑制の低下が起こる。これらとしては、抑制性グリシンレセプターのプロスタグランジン E₂ 媒介性抑制 (Ahmadi et al., 2002; Harvey et al., 2004; Muller et al., 2003; Zeilhofer et al., 2012) 及び塩化カリウム排出輸送体 KCC2 の脳由来神経栄養
30
因子 (BDNF) 媒介性ダウンレギュレーション (これは、塩化物の恒常性を不安定化して GABA 作動性及びグリシン作動性抑制機能を変化させる) (Coull et al., 2005; Coull et al., 2003; Zeilhofer et al., 2012) が挙げられる。より最近の研究では、急性及び傷害誘発性持続性疼痛のコントロールに関与する脊髄 (SC) 興奮性及び抑制性介在ニューロンの異なるサブセットを伴ういくつかの微小回路が解明された (Bourane et al., 2015a; Bourane et al., 2015b; Duan et al., 2014; Foster et al., 2015; Peirs et al., 2015; Petitjean et al., 2015)。まとめると、これらのデータは、傷害誘発性急性疼痛の発症をコントロールする末梢性感作及び中枢性感作の両方の基礎となる分子機構及び細胞機構が公知であることを実証している。しかしながら、急性疼痛から慢性疼痛への移行をトリガーする分子事象及び細胞事象に関する知識は依然として限られている。例えば
40
、一般的な外科手術、例えば乳腺手術及び胸部手術、脚切断並びに冠状動脈バイパス後の個体の約 10 ~ 50 % では、急性術後疼痛後、続いて持続性疼痛が起こることが十分に立証されている (Gilron et al., 2013; Kehlet et al., 2006)。これらの患者の一部のみが慢性術後疼痛 (CPSP) を発症する経緯及び理由は不明である。臨床では、CPSP の発症を予測するいくつかのリスク因子が示唆されている。これらとしては、年齢、性別、手術の種類、誘発疼痛性刺激に対する患者の応答の術前評価及び術後評価、並びに CPSP を発症する遺伝的感受性が挙げられる (Kehlet et al., 2006)。

【0003】

慢性疼痛の発症、予防及び治療に関する情報の欠如を考慮すると、その適切な管理を可能にする新たなバイオマーカーの同定に対する、及びその予防、減弱又は治療を可能にす
50

る新たな治療化合物に対する明確な必要性がある。

【発明の概要】

【0004】

発明の簡単な説明

驚くべきことに、本明細書では、本発明者らは、Myo1aの喪失又はその発現の変化が、傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因に関連することを初めて実証する。

【0005】

したがって、本発明の第1の目的は、傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するためのバイオマーカーとしての、Myo1a (Myo1a)、好ましくはMyo1a遺伝子をコードするDNA若しくはmRNA又はMyo1aタンパク質の使用に関する。

【0006】

本発明はまた、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するin vitro方法であって、該被験体の生物学的サンプルから得られたMyo1a核酸配列を分析する(典型的には、配列決定する)工程を含み、配列番号: 1で特定されているMyo1a野生型核酸配列と比較した、該被験体におけるMyo1a核酸配列の変化の検出が、該被験体が傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有することを示すのに対して、変化の欠如が、該被験体が傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有しないことを示す方法に関する。

【0007】

本発明のさらなる目的は、被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛の予防又は治療に使用するための、Myo1aをコードするDNA、Myo1aをコードするmRNA又はMyo1aタンパク質(「Myosin I A」)のアゴニストと、薬学的に許容し得る担体又は支持体と一緒にMyo1aタンパク質のアゴニストを含む組成物と、被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を予防又は治療するためのその使用とに関する。

【0008】

Myo1aモデュレーターのin vitro又はex vivoスクリーニング方法であって、Myo1a機能的発現及び/又は生物学的機能を活性化若しくは刺激し又は逆に低減若しくは抑制する薬物候補の能力を決定することを含み、該能力が確認された場合には、該薬物候補を、Myo1aアゴニスト(活性化剤)として、及び潜在的には疼痛を予防、軽減若しくは治療するための薬物候補として、又は逆にMyo1aアンタゴニスト(阻害剤)として同定する方法も本明細書に記載される。

【0009】

本明細書では、本発明者らは、Myo1aモデュレーター及び/又は疼痛を予防、軽減若しくは阻害するための薬物をスクリーニングするための、Myo1a KO(Myo1a^{-/-})動物モデルの使用可能性を明らかにする。

【0010】

本発明はまた、上記方法を実行するために適切なキット及びデバイス、例えば、支持体上に固定化されたMyo1a遺伝子若しくはMyo1a遺伝子座の全部若しくは一部に結合する少なくとも1つの相補的核酸、典型的にはMyo1a核酸を配列決定するためのオリゴヌクレオチドを含むデバイス、又は傷害誘発性慢性機械的疼痛若しくは炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するためのキットであって、該被験体の生物学的サンプルから得られたMyo1a核酸を配列決定するためのオリゴヌクレオチドを含むキットに関する。

【0011】

特定の態様では、本発明は、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するための、支持体上に固定化されたMyo1a遺伝子又は

10

20

30

40

50

Myo 1 a 遺伝子座の全部又は一部に結合する少なくとも1つの相補的核酸を含むデバイスの使用に関する。

【0012】

別の特定の態様では、本発明は、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するためのキットの使用であって、該キットが、該被験体の生物学的サンプルから得られたMyo 1 a 核酸を配列決定するためのオリゴヌクレオチドを含む使用に関する。

【0013】

本発明との関連では、被験体は、任意の哺乳動物被験体、特にヒト被験体である。

【0014】

発明の詳細な説明

疼痛は、実際の又は潜在的な組織損傷に関連する不快な知覚経験である。したがって、疼痛は、様々な傷害及び疾患の最も一般的な症候である。疼痛の異なる類が存在し、例えば、侵害受容性疼痛は、一般に、炎症性疼痛及び病学的疼痛（これは、神経系に対する損傷によって（すなわち、神経因性疼痛）、又はその異常機能によって（線維筋痛症、過敏性大腸症候群、緊張型頭痛などのような機能障害性疼痛）引き起こされる疾患状態である）と区別される。

【0015】

通常、疼痛は一時的であり、侵害刺激が除去されるか又は根本的な損傷若しくは病状が治癒するまで継続するだけであるが、関節リウマチ、末梢神経障害、ガン及び特発性疼痛（外傷若しくは病状の治癒後も持続する疼痛、又はいかなる明確な原因もなく生じる疼痛）などのいくつかの疼痛性症状は、数年間持続し得る。長期間継続する疼痛は慢性と称され、迅速に消す疼痛は急性と称される。伝統的には、急性疼痛と慢性疼痛との区別は、発症からの任意の時間間隔に依拠し；2つの最も一般的に使用されるマーカーは、疼痛の発症から3カ月及び6カ月であるが(Turk, Okifuji, Pain terms and taxonomies of pain; In: Bonica, Loeser, Chapman, Turk, Butler, Bonica's management of pain. Hagerstwon: Lippincott Williams & Wilkins, 2001)、急性疼痛から慢性疼痛への移行を12カ月とする理論家及び研究者もいる(Spanswick, Main, Pain management: an interdisciplinary approach. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000)。他では、30日未満継続する疼痛に急性が適用され、6カ月間を超える疼痛に慢性が適用され、1~6カ月継続する疼痛に亜急性が適用されている(Thienhaus, Cole, Classification of pain. In: Weiner, Pain management: a practical guide for clinicians. Boca Raton: CRC Press, 2002)。任意の固定期間を伴わない慢性疼痛の代表的な別の定義は、「予想される治癒期間を超えて延長する疼痛」である(Turk, Okifuji, 2001, Pain terms and taxonomies. In Loeser, Butler, Chapman, et al. Bonica's management of pain, Lippincott Williams&Wilkins. ISBN 0-683-30462-3)。慢性疼痛は、ガン性疼痛又は良性に分類され得る(Thienhaus, Cole, 2002, Classification of pain. In Weiner, Pain management: A practical guide for clinicians, American Academy of Pain Management, ISBN 0-8493-0926-3)。

【0016】

痛覚は、侵害受容器とも称される感覚神経によって脳に伝達される。侵害受容器は、熱的（加熱/冷却）、機械的及び化学的刺激などの複数の形態の侵害刺激又は強い刺激に回答し得るので、ポリモーダルであると考えられている。侵害受容器の感覚求心性線維は、多くの点で異種性である。例えば、感覚神経は、それらの直径及びミエリン形成の程度にしたがって、A、-、-及びC-線維に分類される。次いで、末梢からの感覚入力処理され、脊髄内の興奮性及び抑制性介在ニューロンを伴う複雑な回路によって、高次の脳領域に伝達される(Basbaum et al., 2009; Todd, 2010)。興奮と抑制との間のバランスは、正常な感覚機能の維持に重要あり、これらの回路の機能障害は、炎症性疼痛及び神経因性疼痛などの疼痛の発症につながる。

【0017】

10

20

30

40

50

疼痛の処置としては、局所麻酔剤（これは、神経伝達を遮断し、感覚及び疼痛に影響を与える）及び鎮痛剤（これは、疼痛を緩和し、さらに炎症の化学メディエーターの活性を妨げ得る）の使用が挙げられる。急性疼痛は、通常、鎮痛剤及び麻酔剤などの薬物療法によって管理される。しかしながら、慢性疼痛の管理は、はるかに困難である。加えて、外科病棟、集中治療室及び救急外来全体で、一般診療で、ガン性疼痛を含む全ての形態の慢性疼痛の管理で、並びに終末期ケアで、疼痛の不適切な処置が蔓延している。この怠慢は、新生児から虚弱高齢者に至る全年齢に及ぶ。選択される公知の鎮痛性分子にかかわらず、特に、神経因性疼痛、炎症性疼痛及び/又は慢性疼痛の処置が依然として不完全であることを考慮すると、改善された疼痛処置は現在まで依然として、患者によって強く必要とされている。

10

【0018】

本発明の目的は、施術者が疼痛処置を最適化するのを支援するために、慢性疼痛を発症しやすい被験体者間を区別することである。

【0019】

本発明との関連では、患者又は被験体は、動物、好ましくは脊椎動物、典型的には哺乳動物である。好ましい実施態様では、哺乳動物は、その年齢又は性別にかかわらず、ヒトである。さらに、哺乳動物は、動物、特に家畜又は繁殖動物、特にウマ、イヌ、ネコなどであり得る。

【0020】

本明細書では、本発明者らは、Myo1a KOマウスにおいて、短期間型の可逆的な炎症性疼痛、神経因性疼痛及び術後疼痛が不可逆的な慢性疼痛に変質することを実証するが、これは、発生病変の病因にかかわらず、Myo1aの喪失が、マウスが慢性疼痛を発症する素因となることを示している。行動学的薬理学を使用して、本発明者らは、炎症及び神経傷害の状況において、Myo1a KOマウスが、GABA_A-Rアゴニストであるムシモールの鎮痛効果に対して選択的に非感受性であったことを見出したが、これは、Myo1aの喪失がイオンチャンネル型GABA作動性シグナリングを損なったことを実証している。したがって、SC切片における電気生理学的記録により、炎症条件下において、Myo1a KOマウスでは、第II層介在ニューロンの興奮性グルタミン酸作動性活性のムシモール誘発性増加が完全に消失したことが実証された。不偏RNAディープシーケンシングスクリーニングを使用して、本発明者らは、DRG及びSCニューロンの両方においてGABA_A-R (GABRA2)の2サブユニットの選択的アップレギュレーションを明らかにした。まとめると、これらのデータは、イオンチャンネル型GABA作動性シグナリングの選択的变化を介した傷害誘発性慢性疼痛及び炎症誘発性慢性熱的疼痛の発症の予測遺伝的因子としてMyo1a遺伝子を同定している。

20

30

【0021】

本明細書では、本発明者らは、傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するためのバイオマーカー（又は予測遺伝的因子）としての、Myosin IA (Myo1a)をコードする核酸配列、典型的にはMyo1a、好ましくはMyo1a遺伝子をコードするDNA又はmRNAの使用を記載する。機械的疼痛又は熱的疼痛は、機械的若しくは熱的な異痛症（刺激によって引き起こされる疼痛であり、通常は痛みを伴わない）又は痛覚過敏症（刺激に対する過度の反応であり、通常は疼痛を伴う）であり得る。

40

【0022】

傷害誘発性慢性機械的疼痛は、典型的には、炎症性慢性機械的疼痛、神経因性慢性機械的疼痛及び/又は術後慢性機械的疼痛である。これら3つの古典的に区別される種類の疼痛はそれぞれ、傷害によってトリガーされる（すなわち、組織損傷に関連する）。より具体的には、本発明との関連では：

- 炎症性慢性機械的疼痛は、組織損傷及び免疫細胞の浸潤に関連する；

【0023】

- 神経因性慢性機械的疼痛は、神経系に影響を及ぼす傷害によってトリガーされ、神経系

50

に対する実際の損傷を伴うものでもよいし、又は伴わないものでもよい（すなわち、神経は、腫瘍によって浸潤若しくは圧迫され得、瘢痕組織によって絞扼され得、又は感染によって炎症が起こり得る）。疼痛は、多くの場合、燃焼性、灼熱性又は電気ショック性を有する。持続性異痛症はまた、神経因性疼痛の共通の特徴である。疼痛は、任意の損傷組織の明らかな治癒後も数カ月又は数年間持続し得る。

【0024】

神経因性疼痛の例としては、ヘルペス後（又は帯状疱疹後）神経痛、反射性交感神経性ジストロフィー／灼熱痛（神経外傷）、ガン性疼痛の成分、幻肢痛、絞扼神経障害（例えば、手根管症候群）及び末梢神経障害（広範囲の神経損傷）が挙げられる。末梢神経障害の多くの原因のうち、糖尿病が最も一般的であるが、この症状はまた、慢性的なアルコール使用、他の毒素への曝露（多くの化学療法を含む）、ビタミン欠乏及び多種多様な他の病状によって引き起こされ得る。この症状の原因が診断されないままであることは珍しいことではない；並びに

10

【0025】

- 術後慢性機械的疼痛は、手術中に生じた組織損傷から直接生じる。

【0026】

Myo1a 遺伝子は、ミオシンスーパーファミリーのメンバーである Myosin-1a（本明細書では「Myo1a」とも特定される）をコードする。このタンパク質は、非従来型のミオシンである。それは、従来型の骨格筋 myosin-1（MYH1）と混同されるべきではない。非従来型のミオシンは、従来型のミオシンに特徴的な基本ドメインを含有し、それらのテイルドメインによってクラスメンバーとさらに区別される。それらは、アクチンベースの分子モーターとして機能する。Myosin IA は、脊髄のニューロンにおいて[より具体的には、本明細書では「腰部 L T M R」とも特定される成体腰部後根神経節（DRG）由来の L T M R ニューロンにおいて]、及び腸の特定領域のニューロンにおいて発現されることが公知である。Myosin IA はまた、三叉神経において発現される (Tyska, M.J. et al.)。

20

【0027】

Myo1a 遺伝子は、高度に多型であると同定されている。予想よりも多くの変異体が実際に観察された（同義：予想 153.1、観察 158、z = -0.25、ミスセンス：予想 363.9、観察 405、z = -1.05）。

30

【0028】

本発明の典型的な実施態様では、機能的 Myosin Ia (Myo1a) を発現する Myo1a ホモ接合 (Myo1a^{+/+}) 参照被験体において観察された発現と比較した、被験体における Myosin IA (Myo1a) の欠如、発現減少若しくは欠如又は非機能的発現は、被験体が傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因である。

【0029】

機能的 Myosin Ia を発現する参照被験体は、Myo1a ホモ接合 (Myo1a^{+/+}) 被験体である。参照被験体の Myo1a 遺伝子は、配列番号：1 又はその機能的変異体からなる。配列番号：1 の機能的 Myo1a 変異体は、機能的 Myosin Ia（配列番号：2）をコードする。機能的 Myo1a 変異体は、例えば限定されないが、配列番号：3（イヌ）及び配列番号：5（ネコ）などの配列番号：1 のオルソログから選択され得る。

40

【0030】

Myosin IA の非機能的発現は、典型的には、後根神経節（DRG）及び脊髄における GABA レセプター（GABA-R）の 2 サブユニットの選択的アップレギュレーションに関連し、当業者によって間接的に検出され得る。同様に、被験体における GABA 作動性シグナリングの変化の検出は、Myosin IA の発現を検証する理由、又は前記被験体における Myo1a を配列決定する理由となる。

【0031】

50

タンパク質、典型的にはMyosin Iaを検出又は定量するために当業者が使用可能な方法は当業者に周知であり、本明細書において以下でさらに特定されている。

【0032】

傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価する好ましい方法は、該被験体の生物学的サンプルから得られたMyo1a核酸配列を分析する（好ましくは、配列決定する）工程を含むin vitro方法であり、配列番号：1で特定されているMyo1a野生型核酸配列と比較した、該被験体におけるMyo1a核酸配列の変化の検出は、該被験体が傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有することを示すのに対して、変化の欠如は、該被験体が傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有しないことを示す。

10

【0033】

核酸配列の変化は、機能的Myo1aを発現するMyo1aホモ接合（Myo1a⁺/⁺）参照被験体において観察された発現と比較したMyo1a核酸の異常発現（典型的には、発現減少、低減又は欠如）、又は核酸によってコードされるタンパク質（Myo1a）の異常（典型的には、非機能的）発現若しくは活性の原因となる。

【0034】

典型的には、核酸配列の変化は、Myo1a遺伝子、典型的にはDNA、cDNA又はRNAのレベルで決定され得る。好ましくは、検出は、遺伝子座の全部若しくは一部を配列決定することによって、又は遺伝子座の全部若しくは一部の選択的ハイブリダイゼーション若しくは増幅によって実施される。より好ましくは、遺伝子座特異的増幅は、変化同定工程前に行われる。

20

【0035】

変化した核酸又は遺伝子座は、典型的には、遺伝子座のコード領域及び/又は非コード領域において突然変異又は突然変異の組み合わせを含む核酸又は遺伝子座配列である。

【0036】

突然変異は、典型的には、点突然変異、又は2つ以上の残基（塩基）の欠失若しくは挿入である。

【0037】

点突然変異は、ある塩基を別の塩基と交換する置換（すなわち、余分な塩基が核酸配列の新たな場所に挿入される挿入）であり得る。点突然変異は、ミスセンス突然変異（これは、単一のヌクレオチドが異なるアミノ酸の置換を引き起こすように変化する点突然変異である）又はナンセンス突然変異、例えばフレームシフト突然変異（これは、転写mRNAにおける未成熟終止コドン又はナンセンスコドン、及び切断型又は不完全型タンパク質産物をもたらす）である。

30

【0038】

欠失は、遺伝子座のコード部分又は非コード部分における2つ以上の残基の任意の領域、例えば2つの残基から遺伝子又は遺伝子座全体を包含し得る。典型的な欠失は、より小さな領域、例えば約50個未満の連続する塩基対のドメイン（イントロン）又は反復配列又はフラグメントに影響を及ぼすが、より大きな欠失も起こり得る。挿入は、遺伝子座のコード部分又は非コード部分における1つ又は複数の残基の付加を包含し得る。挿入は、典型的には、遺伝子座における1～50個の塩基対の付加を含み得る。再構成は、配列の逆位を含む。遺伝子座の変化は、終止コドン、フレームシフト突然変異、アミノ酸置換、特定のRNAスプライシング又はプロセッシング、産物の不安定性、切断型ポリペプチドの産生などをもたらし得る。

40

【0039】

本発明との関連で遭遇する全ての場合において、突然変異は、機能的タンパク質産物の産生を停止若しくは減少させるか、又は非機能的タンパク質産物をもたらす。突然変異は、典型的には、機能喪失型突然変異である。

【0040】

50

Myosin Iaの機能的発現に影響を及ぼさない変異又は多型は、当業者によって、核酸配列の変化として同定されないであろう。

【0041】

本発明との関連では、「Myo1a遺伝子座」は、Myo1aコード配列、Myo1a非コード配列（例えば、イントロン）、転写及び/又は翻訳をコントロールするMyo1a調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー/サイレンサー領域、ターミネーター、5'UTR、3'UTRなど）、全ての対応する発現産物、例えばMyo1aRNA（例えば、mRNA）；並びにMyo1a遺伝子の（5'UTR領域に隣接する）開始コドンの上流の20kb領域、好ましくは15.3kb領域及び（3'UTR領域に隣接する）非翻訳領域の下流の20kb領域、好ましくは14.1kb領域の周辺配列を含む、細胞又は生物における全ての配列又は産物を表す。特定の実施態様では、ほとんどの変化は、プロモーター配列中にない。

10

【0042】

特定の実施態様では、変化したMyo1a核酸は、少なくとも1つの点突然変異、好ましくは一塩基多型（SNP）、例えば機能喪失型SNP、すなわち核酸によってコードされるタンパク質の欠如又は異常（非機能的）発現の原因となるSNPを含むMyo1a野生型核酸である。Myo1a野生型核酸はまた、いくつかの一塩基多型（SNP）を含み得る。

【0043】

Myo1aを含む目的のゲノム領域において第1のSNPが同定されたら、この第1のSNPと連鎖不平衡にある他のさらなるSNPが同定され得る。実際、慢性疼痛素因表現型に関連する第1のSNPと連鎖不平衡にある任意のSNPは、この形質に関連するであろう。したがって、所定のSNPと慢性疼痛素因表現型との間の関連が実証されたら、この特定領域におけるSNPの密度を増加させるために、この形質に関連するさらなるSNPの発見は非常に重要であり得る。所定のSNPと連鎖不平衡にあるさらなるSNPの同定は、（a）複数の個体由来の第1のSNPを含むか又はその周辺のゲノム領域由来のフラグメントを増幅すること；（b）前記第1のSNPを有するか又はその周辺のゲノム領域において第2のSNPを同定すること；（c）前記第1のSNPと第2のSNPとの間で連鎖不平衡分析を行うこと；及び（d）前記第1のマーカと連鎖不平衡にあるものとして前記第2のSNPを選択することを伴う。工程（b）及び（c）を含む部分組み合わせも企図される。連鎖不平衡にあるこれらのSNPもまた、本発明の方法において、より具体的には、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価する方法において使用され得る。

20

30

【0044】

慢性疼痛素因表現型の原因となる遺伝子座における突然変異は、慢性疼痛素因表現型を示す患者由来の遺伝子座の配列と、（配列番号：1又はその機能的変異体含有すると上記で定義される）参照患者由来の遺伝子座の配列とを比較することによって同定され得る。同定されたSNP又はMyo1a遺伝子のSNPの関連に基づいて、同定された遺伝子座は、突然変異についてスキャンされ得る。好ましい実施態様では、遺伝子座の機能的領域、例えばエクソン及びスプライス部位、プロモーター及び他の調節領域は、突然変異についてスキャンされる。好ましくは、慢性疼痛素因表現型を示す患者は、慢性疼痛素因表現型に関連することが示された突然変異又は突然変異アレルを有し、参照患者は、慢性疼痛素因表現型に関連する突然変異又は突然変異アレルを有しない。このような突然変異を検出するために使用される方法は、一般に、以下：慢性疼痛素因を示す患者及び参照患者由来の遺伝子座のDNAサンプルから、慢性疼痛素因表現型に関連するSNP又はSNP群を含む目的の遺伝子座の領域を増幅する工程；慢性疼痛素因表現型を示す患者及び参照患者由来のMyo1a遺伝子のDNA配列を比較する工程；慢性疼痛素因表現型を示す患者に特異的な突然変異を決定する工程を含む。

40

【0045】

特定の実施態様では、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症す

50

る被験体の素因を評価する方法は、以下：(a) 該被験体から Myo 1 a DNA、cDNA 又は RNA、好ましくは DNA の試験サンプルを得る工程、(b) 該試験サンプルと、好ましくは少なくとも 1 つの突然変異、典型的には点突然変異、例えば一塩基多型 (SNP) を含む変化したターゲット Myo 1 a 核酸配列に相補的であり、それに特異的にハイブリダイゼーションする少なくとも 1 つの核酸プローブとを接触させて、ハイブリダイゼーションサンプルを形成する工程、(c) 該ターゲット核酸配列と該核酸プローブとの特異的ハイブリダイゼーションが起こるために十分な条件下で、該ハイブリダイゼーションサンプルを維持する工程、及び (d) 該変化したターゲット核酸配列と該核酸プローブとの特異的ハイブリダイゼーションが存在するかを検出する工程を含む in vitro 方法であり、このような特異的ハイブリダイゼーションは、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を示す。

10

【0046】

傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価する本明細書に記載される好ましい方法のほとんどは、生物学的サンプル(これは、典型的には、被験体の血液サンプル、血漿サンプル又は血清サンプルである)の細胞から得られた核酸に対して実施される。

【0047】

あまり好ましくないが、変化はまた、Myosin IA ポリペプチド(例えば、前駆タンパク質及び成熟タンパク質)のレベルで決定され得る。

【0048】

特定の核酸の異常(特に、低い又は欠如)発現、又は対応する Myosin IA ポリペプチド若しくはタンパク質の異常発現を決定することを目的とする特定の技術の例は、本明細書に詳述される。

20

【0049】

核酸における変化の存在は、以下でさらに説明されるように、当技術分野の方法、例えば制限消化、配列決定、(例えば、ヌクレオチドアレイ上に存在する核酸プローブとの)選択的ハイブリダイゼーション及び/又は選択的増幅を使用して、当業者によって容易に検出され得る。

【0050】

遺伝子における変化はまた、変化した RNA 発現の存在を決定することによって検出され得る。変化した RNA 発現は、変化した RNA 配列の存在、変化した RNA スプライシング又はプロセシングの存在、変化した RNA 量の存在などを含む。これらは、当技術分野で公知の様々な技術によって、例えば、RNA の全部若しくは一部を配列決定することによって、又は前記 RNA の全部若しくは一部の選択的ハイブリダイゼーション若しくは選択的増幅によって検出され得る。

30

【0051】

Myo 1 a などのターゲット核酸の異常発現の存在は、特に、ターゲット核酸配列内にハイブリダイゼーションするように設計されたプローブを使用して、リアルタイム定量逆転写 PCR (qRT-PCR) によって検出され得る(O' Driscoll L. et al., 1993 及び Yajima T. et al, 1998 を参照のこと)。

40

【0052】

さらなる変法では、前記方法は、目的の遺伝子によってコードされるポリペプチド又はタンパク質の変化した発現の存在を検出することを含む。変化したポリペプチド発現は、変化したポリペプチド配列の存在、変化したポリペプチド量の存在、変化した組織分布の存在などを含む。これらは、当技術分野で公知の様々な技術によって、例えば、配列決定及び/又は特定のリガンド(例えば、抗体)に対する結合によって検出され得る。

【0053】

特定の実施態様では、異常タンパク質発現の検出は、正常タンパク質をコードする mRNA の細胞レベルを測定することによって、当業者によって容易に実施され得、コントロール又は基準レベルと比較して減少したレベルは、異常タンパク質発現と相関する。

50

【0054】

配列決定は、当技術分野で周知の技術を使用して、自動シーケンサーを使用して行われ得る。配列決定は、完全な遺伝子座に対して、又はより好ましくはその特定のドメイン、典型的には、有害な突然変異又は他の変化を有することが公知であるか又は疑われるものに対して実施され得る。

【0055】

増幅は、核酸複製を開始させるように機能する相補的核酸配列間の特異的ハイブリッドの形成に基づく。増幅は、当技術分野で公知の様々な技術にしたがって、例えばポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、鎖置換増幅（SDA）及び核酸配列ベース増幅（NASBA）によって実施され得る。これらの技術は、市販の試薬及びプロトコルを使用して実施され得る。好ましい技術は、アレル特異的PCR又はPCR-SSCPを使用する。増幅は、通常、反応を開始するために、特定の核酸プライマーの使用を必要とする。目的の遺伝子座由来の配列を増幅するために有用な核酸プライマーは、前記遺伝子座のターゲット領域に隣接する遺伝子座の一部と特異的にハイブリダイゼーションすることができ、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有する被験体では、前記ターゲット領域が変化している。

10

【0056】

本発明の別の特定の目的は、Myo1a遺伝子又は目的の遺伝子座（周辺領域を含む）由来の配列を増幅するために有用な核酸プライマーにある。このようなプライマーは、好ましくは、遺伝子座における核酸配列に相補的であり、それに特異的にハイブリダイゼーションする。特定のプライマーは、前記遺伝子座のターゲット領域に隣接する遺伝子座の一部と特異的にハイブリダイゼーションすることができ、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有する被験体では、前記ターゲット領域が変化している。SNPを含むターゲット領域を増幅するために使用され得るプライマーは、それらの配列に基づいて、又はMyo1a遺伝子のゲノム配列に基づいて設計され得る。

20

【0057】

本発明はまた、核酸プライマーであって、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有する特定の被験体において変化しているMyo1a遺伝子座コード配列（例えば、遺伝子又はRNA）の一部に相補的であり、それに特異的にハイブリダイゼーションする核酸プライマーに関する。これに関して、本発明の特定のプライマーは、Myo1a遺伝子座又はRNAの変化した配列に特異的である。このようなプライマーを使用することによって、増幅産物の検出は、遺伝子座における変化の存在を示す。対照的に、増幅産物の欠如は、特定の変化が検討サンプル中に存在しないことを示す。

30

【0058】

本発明はまた、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価する方法における、上記で言及される及び本明細書で特定される核酸プライマー又は核酸プライマーペアの使用に関する。

【0059】

ハイブリダイゼーション検出方法は、核酸配列変化を検出するように機能する相補的核酸配列間の特異的ハイブリッドの形成に基づく。特定の検出技術は、野生型（又はその機能的変異体）若しくは変化した遺伝子又は対応するRNAに特異的な核酸プローブの使用と、それに続くハイブリッドの存在の検出とを伴う。プローブは懸濁液中にあり得るか、又は（核酸アレイ又はチップ技術のように）基材若しくは支持体上に固定化され得る。プローブは、典型的には、ハイブリッドの検出を容易にするために標識される。

40

【0060】

これに関して、本発明の特定の実施態様は、被験体由来のサンプルと、変化したMyo1a遺伝子座に特異的な核酸プローブとを接触させること、及びハイブリッドの形成を評価することを含む。

【0061】

特に好ましい実施態様では、前記方法は、サンプルと、それぞれ野生型Myo1a遺伝

50

子座及びその様々な変化形態に特異的なプローブのセットとを同時に接触させることを含む。この実施態様では、サンプル中の遺伝子座における様々な形態の変化の存在を直接検出することが可能である。また、単一の被験体又は様々な被験体由来の様々なサンプルは、並行して処置され得る。

【0062】

本発明との関連では、プローブは、Myo1a遺伝子又はRNA（のターゲット部分）に相補的であり、それに特異的にハイブリダイゼーションすることができるポリヌクレオチド配列であって、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因となる遺伝子アレル（「突然変異アレル」）に関連する突然変異を検出するために適切なポリヌクレオチド配列を指す。

10

【0063】

プローブは、好ましくは、特定のMyo1a遺伝子、RNA又はそのターゲット部分に完全に相補的である。プローブは、典型的には、8~1000、例えば10~800、より好ましくは15~700、典型的には20~500ヌクレオチド長の一本鎖核酸を含む。より長いプローブも使用され得ると理解すべきである。本発明の好ましいプローブは、変化を有するMyo1a遺伝子座又はRNAの領域に特異的にハイブリダイゼーションし得る8~500ヌクレオチド長の一本鎖核酸分子である。

【0064】

本発明の方法は、変化した（例えば、突然変異した）Myo1a遺伝子又はRNAに特異的な核酸プローブ（すなわち、前記変化したMyo1a遺伝子又はRNAに特異的にハイブリダイゼーションする核酸プローブであって、前記変化を欠くMyo1a遺伝子又はRNAに本質的にハイブリダイゼーションしない核酸プローブ）を用いる。

20

【0065】

特異性は、ターゲット配列へのハイブリダイゼーションが、非特異的ハイブリダイゼーションによって生成されたシグナルと区別され得る特異的シグナルを生成することを示す。完全に相補的な配列は、本発明のプローブを設計するために好ましい。しかしながら、特異的シグナルが非特異的ハイブリダイゼーションと区別され得る限り、特定のミスマッチが許容され得ると理解すべきである。

【0066】

本発明はまた、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価する方法における、上記に記載される及び本明細書で特定される核酸プローブの使用に関する。

30

【0067】

上記で示されているように、Myo1a遺伝子座における変化はまた、目的のタンパク質（Myosin IA）を発現する組織のサンプルにおけるMyo1aポリペプチド配列又は発現レベルの変化についてスクリーニングすることによって検出され得る。タンパク質を検出するために、免疫組織化学（例えば、生検）、イムノプロット（特に、ウエスタンプロット）、プロテオミクス、又は目的のタンパク質（Myosin IA）に対する抗体ベースのバイオセンサー、及び当業者に公知の任意の他の方法が、目的の被験体由来のMyosin IAを含有する生物学的サンプルに適用され得る。

40

【0068】

サンプルと、特定の核酸配列によってコードされるMyosin IAに特異的なリガンドとを接触させ、複合体の形成を決定することも記載されている。

【0069】

異なる種類のリガンド、例えば特定の抗体が使用され得る。特定の実施態様では、サンプルと、特定の核酸によってコードされるMyosin IAに特異的な抗体とを接触させ、複合体の形成を決定する。このような複合体を検出するための様々な方法、例えばELISA、ラジオイムノアッセイ（RIA）及び免疫酵素アッセイ（IEMA）が使用され得る。

【0070】

50

本発明との関連では、抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、及び実質的に同じ抗原特異性を有するそのフラグメント又は誘導体を表す。フラグメントとしては、F a b、F a b' 2、C D R領域などが挙げられる。誘導体としては、一本鎖抗体、ヒト化抗体、多機能性抗体などが挙げられる。特定の遺伝子によってコードされるポリペプチドに特異的な抗体は、前記ポリペプチドに選択的に結合する抗体（すなわち、前記ポリペプチド又はそのエピトープ含有フラグメントに対して生じる抗体）を表す。他の抗原に対する非特異的結合が起こり得るが、ターゲットポリペプチドに対する結合はより高い親和性で起こり、非特異的結合と確実に区別され得る。

【0071】

傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価する本発明の方法は、好ましくは、任意の外科手術の前に被験体に対して実施される。

【0072】

傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するためのキットであって、被験体由来のサンプルにおける、M y o 1 a 遺伝子座若しくは対応するポリペプチド若しくはタンパク質；M y o 1 a 遺伝子若しくは対応するポリペプチド若しくはタンパク質発現及び／又はM y o 1 a 遺伝子活性の変化の存在を検出するための製品及び試薬を含むキットも開示される。

【0073】

このようなキットは、任意の核酸、典型的には任意のプライマー、任意のプライマーペア及び／若しくは任意の核酸プローブ（野生型及び突然変異体）；本発明に記載される任意のリガンド、好ましくは抗体；並びに／又は支持体上に固定化されたこのような核酸及び／若しくはリガンドを含む任意のデバイスを含む。本明細書に記載されるキットは、ハイブリダイゼーション、増幅又は抗原-抗体免疫応答を実施するための試薬及び／又はプロトコールをさらに含み得る。これらのキットは、本明細書に記載される方法に使用すべきマイクロアレイであって、定量PCR又は多重化技術によって読み取られるマイクロアレイをさらに含み得る。特定のデバイスは、支持体上に固定化されたM y o 1 a 遺伝子又はM y o 1 a 遺伝子座の全部又は一部に結合する少なくとも1つの相補的核酸、好ましくはいくつかの相補的核酸を含む。

【0074】

特定のキット、典型的には、傷害誘発性慢性機械的疼痛又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する被験体の素因を評価するためのキットは、以下のキットである：

- 被験体の生物学的サンプルから得られたM y o 1 a 核酸を配列決定するためのキットであって、核酸配列、典型的にはオリゴヌクレオチド、例えばプライマー又はプライマーペアを含むキット；

- 被験体の生物学的サンプル、典型的には血液サンプルにおける被験体のM y o 1 a 遺伝子の異常な／変化した発現を検出するためのキットであって、(i) 少なくとも1つのプライマーペアと、(i i) M y o 1 a の発現の定量的検出を可能にする少なくとも1つの標識／検出可能（例えば、蛍光）プローブ、例えば2つの異なるプローブと、(i i i) コントロール集団におけるM y o 1 a に対応するコントロール定量的発現値を提供するリフレットとを含むキット；並びに

- 被験体の生物学的サンプル、典型的には血液サンプルにおける被験体のM y o 1 a 遺伝子の異常な／変化した発現を検出するためのキットであって、(i) 少なくとも1つのプライマーペアと、(i i) 少なくとも2つの異なる標識プローブ（野生型アレルを認識する第1のプローブ、及びM y o 1 a の突然変異アレルを認識する第2のプローブ）とを含むキット。

【0075】

被験体がM y o s i n I a を発現しないか又は異常に発現する（すなわち、M y o s i n I a を不十分に発現するか又は非機能的ミソシンI a を発現する）場合、本発明者らは、疼痛を予防又は治療するために、「疼痛の適合処置」を被験体に適用しなければならないことを本明細書で示す。実際、本発明者らは、前記被験体において傷害誘発慢性疼

10

20

30

40

50

痛が確立されたら、前記疼痛は、アルカロイド、特にGABA_A-Rアゴニスト、例えばムシモールによって回復させることができず、不可逆的になることを発見した。

【0076】

本発明との関連では、被験体における疼痛を「処置」又は「処置する」という用語は、本発明による適切な化合物又は組成物の適用又は投与後に、本明細書に記載される被験体における任意の形態の疼痛、又は疼痛に関連する任意の疾患若しくは症状（特に、疼痛に関連する任意の炎症症状又は神経障害症状）、又はこのような疾患若しくは症状の任意の症候を遅延させ、安定化し、根治し、治癒し、緩和し、軽減し、変化させ、改善し、向上させ、修正し、又は影響を与えることを表す。「処置」又は「処置する」という用語はまた、（任意の傷害、病状又は症状に関連し得る）疼痛の処置における成功、例えば、疼痛を改善し、寛解させ、その進行若しくは重症度を遅延させ、安定化し、その症候を低減し、又は被験体に対してそれをより許容性にするための任意の指標（任意の客観的又は主観的なパラメータを含む）を指す。疼痛を「処置する」という用語はまた、疼痛耐性を増加させ、及び/又は感知される疼痛を減少させることを含む。特定の実施態様では、本発明の方法、化合物及び組成物は、疼痛耐性を増加させるための、及び/又は感知される疼痛を減少させるためのものである。本明細書で使用される場合、「疼痛耐性」という用語は、感情的に及び/又は身体的な破綻前に、被験体が感知及び我慢し得る疼痛の量を指す。疼痛耐性は、疼痛閾値（疼痛をもたらすために必要な最少刺激）と区別される。本明細書で使用される場合、「疼痛耐性の増加」は、一般に、例えば被験体への適切な化合物又は組成物の投与後に、被験体が、以前の状態と比較して優れた疼痛耐性を発達させ得る（すなわち、感知される疼痛がより少ない）状況を指す。

10

20

【0077】

本発明との関連では、被験体における疼痛に関する「予防する」又は「予防」は、本発明による適切な化合物又は組成物の適用又は投与後に、被験体が任意の種類の疼痛を獲得するリスクの可能性（又は、それに対する感受性）を少なくとも減少させることを指す。例えば、「予防する」は、被験体において、典型的には、慢性疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛の素因を有すると同定されたが、疼痛の症候をまだ経験していない又は示していない被験体において、疼痛、典型的には慢性疼痛の臨床症候の少なくとも1つを発症させないことを含む。

【0078】

本発明の疼痛の適合処置は、典型的には、Myo1aをコードする核酸配列（典型的には、DNA又はmRNA）及び/又はMyosin 1aタンパク質のアゴニストを被験体に外生的供給、例えば投与することを伴う。投与は、例えば、髄腔内（i.t.）投与であり得る。

30

【0079】

したがって、本発明の目的は、本明細書で定義される被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛の予防又は治療に使用するための、Myo1aをコードする核酸配列（典型的には、DNA又はmRNA）及び/又はMyosin 1aタンパク質のアゴニスト（Myo1aは機能的Myo1aである）に関する。

40

【0080】

本発明では、「Myosin 1aタンパク質のアゴニスト」という用語は、野生型Myosin IAタンパク質の生物学的機能を活性化若しくは刺激することができるか、又は機能的に変化したMyosin IAタンパク質の機能を回復させることができる任意のタンパク質を表すために使用される。このようなアゴニストは、対応する野生型タンパク質の特性を示す（特に、野生型Myosin IAタンパク質の生物学的機能を活性化若しくは刺激することができるか、又は機能的に変化したMyosin IAタンパク質の機能を回復させることができる）天然若しくはリコンビナントタンパク質又はタンパク質フラグメントであり得る。

【0081】

50

本発明はまた、被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び／又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を予防又は治療するための組成物、典型的には医薬組成物を調製するための、Myo1aをコードするDNA、Myo1aをコードするmRNA又はMyosin1aタンパク質のアゴニスト（Myo1aは機能的Myo1aである）に関する。

【0082】

本発明はさらに、Myo1aをコードするDNA、Myo1aをコードするmRNA又はMyosin1aタンパク質のアゴニストと、薬学的に許容し得る担体又は支持体とを含む組成物、典型的には、被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び／又は炎症誘発性慢性熱的疼痛の予防又は治療に使用するための組成物に関する。

【0083】

全ての本発明において使用可能な適切な賦形剤、希釈剤又は担体は、例えば、生理食塩水、等張液、滅菌溶液又は緩衝液などから選択され得る。それらは、安定化剤、甘味剤及び／又は界面活性剤などをさらに含み得る。それらは、それ自体が公知のガレヌス技術を使用することによって、アンプル、フラスコ、錠剤又はカプセルの形態で製剤化され得る。

【0084】

本発明はまた、疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び／又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を予防又は治療するための方法であって、前記製品から選択される少なくとも1つの化合物を、それを必要とする被験体、典型的には哺乳動物、特にヒトに投与することを含む方法に関する。

【0085】

治療又は予防を必要とする被験体は、処置された被験体であって、上記方法にしたがって、傷害誘発性慢性機械的疼痛及び／又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を発症する素因を有すると同定された被験体である。

【0086】

本発明はまた、

- 疼痛の素因を有すると同定された被験体における急性疼痛から慢性疼痛への変質、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び／又は炎症誘発性慢性熱的疼痛の発生を予防することができる化合物をスクリーニング又は選択するためのin vitro、in vivo又はex vivo方法であって、試験化合物の存在下で、特定の細胞、組織又は動物モデルによるMyo1aの発現を評価する工程を含み、該試験化合物に曝露又は接触されていないコントロール細胞、組織又は動物モデルと比較した、該特定の細胞、組織又は動物モデルによる機能的Myo1aの発現の増加が、疼痛の素因を有すると同定された被験体における急性疼痛から慢性への変質、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び／又は炎症誘発性慢性熱的疼痛の発生を予防する前記化合物の能力を示す方法、

- 変化したMyo1a核酸、変化したMyo1a核酸発現、又は対応するMyosinIAタンパク質の変化した／異常な発現若しくは活性を有する被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び／又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を予防又は治療するために使用可能な化合物をスクリーニングするためのin vitro、in vivo又はex vivo方法であって、(i)前記変化した若しくは異常なMyosinIAタンパク質の機能的発現を回復させ、(ii)前記タンパク質の発現若しくは活性を誘導若しくは増加させ、又は(iii)前記タンパク質のアゴニストリガンドの発現若しくは活性を誘導若しくは増加させる試験化合物の能力をin vitro、in vivo又はex vivoで決定することを含む方法。

- Myo1aモデュレーターのin vitro、in vivo又はex vivoスクリーニング方法であって、Myo1a機能的発現及び／又は生物学的機能を活性化若しくは刺激し又は逆に低減若しくは抑制する薬物候補の能力を決定することを含み、該能力が確認された場合には、該薬物候補を、Myo1aアゴニスト（活性化剤）として、及び潜在的には疼痛を予防、軽減若しくは治療するための薬物候補として、又は逆にMyo1aアンタゴニスト（阻害剤）として同定する方法、並びに

- 疼痛を予防、軽減又は治療するための薬物候補のin vitro又はex vivoスクリーニング

10

20

30

40

50

方法であって、Myo1a機能的発現を活性化若しくは刺激し又は逆に低減若しくは抑制する薬物候補の能力を決定することを含み、該能力が確認された場合には、該薬物候補を、Myo1aアゴニストとして、及び疼痛を予防、軽減若しくは治療するための薬物候補として、又は逆にMyo1aアンタゴニストとして同定する方法を提供する。

【0087】

本明細書に記載されるスクリーニング方法の1つを用いて同定された化合物は、本発明との関連では、被験体における疼痛、特に傷害誘発性慢性機械的疼痛及び/又は炎症誘発性慢性熱的疼痛を予防又は治療するために使用され得る。

【0088】

本明細書では、本発明者らはさらに、機能喪失型突然変異が傷害後に不可逆的疼痛状態をもたらす最初の動物モデルMyo1a KO (Myo1a^{-/-}) マウスを記載する。このマウスモデルは、Tyska et al. (2005)に記載されている。

【0089】

したがって、本発明の目的は、Myo1aモデュレーター及び/又は疼痛を予防、軽減若しくは阻害するための薬物をスクリーニングのためのこのようなMyo1a KO (Myo1a^{-/-}) 動物モデルの使用に関する。

【0090】

このモデルは、慢性疼痛の発症及び確立を予防するための適切な薬理的療法を設計するために使用され得る。

【0091】

このモデルはさらに、急性疼痛から慢性疼痛への移行をトリガーする細胞機構及び分子機構の理解を深めるための研究において使用するための実験ツールとして使用され得る。

【0092】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の実験セクションに示されているが(図1~8及び表1~4を参照のこと)、これは、本出願の範囲を限定するものではなく例示であるとみなされるべきである。

【図面の簡単な説明】

【0093】

【図1】LTMRリッチなMyo1aの喪失は、傷害誘発性急性機械的疼痛を慢性疼痛に変質させる。(A~C)成体腰部後根神経節(DRG)におけるMyo1a発現ニューロンの特性評価。Myo1aアンチセンスプローブ(赤色)を使用したISH、並びにそれに続く抗GINIP(青色)抗体及びIB4(緑色)(A)又は抗Ret抗体(青色)(C)を用いた二重免疫標識。(B)Myo1a(赤色)及びTrkBアンチセンスプローブ(緑色)を使用した二重ISH。スケールバー:100µm。(D~E)E15及び新生(P0)DRG及びSC組織におけるISH(赤色)によるMyo1a発現の分析。スケールバー:50µm(D)及び100µm(E)。(F)成体SC組織に対する、Myo1aプローブを使用した(白色、左パネル)又はプローブなしの(右パネル)ISH。破線領域は、SCの第I~III層を画定する。(G)(β -アクチンと比べた)成体DRG及びSCにおけるMyo1a転写産物の定量。データは、3回の独立した実験の平均±SEMを表す。(H~J)カラギーナン誘発性炎症(WTではn=11及びKOではn=13)(H)、CCI手術(WTではn=9及びKOではn=10)(I)及び足切開手術(WTではn=10及びKOではn=10)(J)後のWT及びKOMマウスの機械的応答。データは、各群について平均±SEMとして示されている(*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001)(図5~7も参照のこと)。

【図2】Myo1a KOマウスでは、ムシモール及びジアゼパム媒介性鎮痛作用が損なわれる。(A~D)SNI手術、並びに示されている時点におけるSNC80 10nmol、DAMGO 0.2nmol(A)、パクロフェン 0.1µg、TAF4 2µg(n=マウス6匹/遺伝子型)(B)、タウリン 40µgの髄腔内投与後、プレガバリン 3mg/kg(n=マウス8匹/遺伝子型)の腹腔内投与後(C)及びムシモール 0.15µg(n

10

20

30

40

50

=マウス 8匹/遺伝子型) (D) の髄腔内投与後のWT及びKOマウスの機械的応答。
 (E~G) ザイモサン誘発性炎症 (n = マウス 9匹/遺伝子型) (E)、並びに示されて
 いる時点におけるムシモール 0.15 µg、SNC80 10 nmol (n = マウス 9匹/
 遺伝子型) (F) 及びDZP 0.09 mg/kg (G) (n = マウス 7匹/遺伝子型) 後の
 WT及びKOマウスの機械的応答。データは、各群について平均 ± SEMとして示されて
 いる (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; ns: 非有意)

【図3】WT及びMyo1a KOマウス由来のDRG及びSC組織の転写分析は、Gabra2発現の増加を明らかにする。(A) WTと比べたKOマウスのDRG (DE遺伝子 97個) 及びSC (DE遺伝子 31個) ニューロンにおいてディファレンシャルに発現される (DE) 遺伝子の数 (偽発見率 5%) を表すベン図。DRGにおいてのみディ
 10
 ファレンシャルに発現される遺伝子は赤色で表されており (遺伝子 84個)、SCのみ
 については青色で表されており (遺伝子 18個)、又はDRG及びSCニューロンの両
 方については黄色で表されている (遺伝子 13個)。(B) DRG及びSCニューロン
 の両方におけるDE遺伝子のヒートマップ図であり、発現増加を示す遺伝子は赤色で示さ
 れており、発現減少を示すものは緑色で示されている。スケールは、WTと比べた、KO
 マウスにおいて観察された発現のLog₂変化倍率を表す。(C) WT及びKOマウス由
 来のDRG及びSC組織におけるWdfy1、Gabra2及びNnt転写産物の定量。
 データは、KO対WTの平均変化倍率 ± SEMを表す (n = 独立した実験 3回)。(D)
 20
) WT (左) 及びKO (右) マウス由来のL5 DRG (上パネル) 及び腰部SC (下
 パネル) における、ISH (赤色) によって評価したGabra2転写産物発現。スケール
 バー: 100 µm。(E) WT (左) 及びKO (右) マウス由来の腰部SCの後角におけ
 るGABRA2タンパク質発現 (緑色) を示す免疫染色。スケールバー: 50 µm。(F)
) WT及びKOマウス由来のSCの第I~III層におけるGABRA2免疫蛍光強度の
 定量。データは、KO対WTの平均変化倍率 ± SEMを表す (n = 独立した実験 3回)
 。(G) WT (左) 及びKO (右) マウスの腰部SCの後角におけるGABRA1タンパ
 ク質発現 (赤色) を示す免疫染色。スケールバー: 50 µm。(表1~4も参照のこと)

【図4】ザイモサン炎症後のMyo1a KOマウスでは、EPSC頻度のムシモール誘
 発性増加が喪失する。(A) 解離C-LTMRにおけるムシモール誘発性電流 (Musc
) の全細胞記録の代表的なトレース。(B) WT: Taf a 4⁺ / V e n u s⁺ 及びKO:
 30
 Taf a 4⁺ / V e n u s⁺ マウス由来のC-LTMRにおいて記録された、示されている
 用量のMuscのバス適用後の電流振幅 (平均 ± SEM)。記録された細胞の数は、ヒス
 トグラムに示されている。(C~F) ナイブ (C~D) 及びザイモサン炎症WT及びK
 Oマウス (E~F) におけるMusc適用後の第II層介在ニューロンにおける自発性E
 PSCの全細胞記録。左パネル: ACSF下 (黒色のトレース)、5 µM Muscの灌流
 後 (青色のトレース) 及び洗浄中 (褐色のトレース) に得られたEPSCの代表的なトレ
 ース。中央パネル: 左パネルに示されている実験のEPSC間隔 (秒単位) の累積分布。
 左へのMusc / 青色曲線のシフト (C、D、E中央パネル) は、EPSC頻度の可逆的
 増加を示すことに留意する。右パネル: ACSF下、5 µM Muscの灌流後及び洗浄中
 における正規化EPSC頻度 (平均 ± SEM)。ザイモサン炎症マウス由来の切片では、
 40
 Muscの効果がないことに留意する。記録された細胞の数は、右パネルに示されてい
 る (* p < 0.05; ** p < 0.01; ns: 非有意)。(図8も参照のこと)。

【図5】MYO1Aの非存在下では、成体DRGニューロンの生存、特異化、中枢神経支
 配及び末梢神経支配は損なわれない。(A~B) WT及びKOマウス由来の成体腰部L4
 DRG切片上に現れた総PGP9.5⁺ (A) 及び示されているサブセット (B) の細
 胞数。データは、3回の独立した実験の平均絶対値 (A) 又はPGP9.5ニューロンの
 平均% (B) ± SEMを表す。遺伝子型間で、統計学的有意差は観察されなかった。(C
 ~E) Myo1a KOマウスでは、SCの感覚ニューロン神経支配が保存されている。
 抗CGRP (赤色、C)、GINIP (青色、C~E)、IB4 (緑色、D) 及び抗PK
 50
 C (赤色、E) を用いたWT (上パネル) 及びKO (下パネル) マウス由来のSC横断

切片の免疫染色。スケールバー：100 μm 。(F~G) Myo1a KOマウスでは、有毛皮膚の感覚ニューロン神経支配が保存されている。抗PGP9.5(赤色、F)及び抗S100(赤色、G)を用いたWT(上パネル)及びKO(下パネル)マウス由来の有毛皮膚切片の免疫染色。スケールバー：有毛皮膚神経支配を示すPGP9.5及びS100：50 μm 。表皮神経支配を示すPGP9.5：15 μm 。(図1に関連)。

【図6】MYO1Aの非存在下では、C-LTMR及びA-LTMRの電気生理学的特性が保存されている。(A~D) C-LTMRの電気生理学的特性。(A~B) グラフは、WT及びKO C-LTMRの電気容量及び静止膜電位を示す。(C) 脱分極電流パルス(50 pA、1000 ms)に対するWT及びKO C-LTMRの応答を示す代表的なトレース。(D) グラフは、WT(黒色)及びKO C-LTMR(灰色)の振幅(10 pA、1000 ms)を増加させる電流工程を脱分極させることによって誘発される活動電位(AP)の数を表す。(E~I) A-LTMRの電気生理学的特性。WT及びKO A-LTMRの細胞電気容量(上パネル)及び静止膜電位(下パネル)は、Eに示されている。脱分極(F~G上パネル)又は過分極(F~G下パネル)電流注入(それぞれ1000 ms、0.1 nA又は-0.1 nA)によって、APを誘発した。(F) 図は、WT(黒色)及びKO(赤色) A-LTMRについて得られた代表的なトレースを示す。(G) 曲線は、それぞれ脱分極電流注入中(上パネル)又は過分極電流注入後(下パネル)の注入電流の関数としてAP発火の確率を表す。過分極パルスの終了時に観察されたAPリバウンドは、A-LTMRの特徴である。(H) -60 mVの保持電位による体細胞の段階的な機械的刺激によって誘発した、WT(黒色)及びKO(赤色) A-LTMRにおける代表的な機械的活性化(MA)電流。(I) ピーク振幅(Iピーク)を正規化して、電流/プローブ変位曲線を得た。曲線は、プローブ変位の関数として正規化ピーク電流(Iピーク)を示す。WTとKO A-LTMRの間では、平均正規化振幅に差異はない。C-LTMR及びA-LTMRの遺伝子型間で、統計学的有意差は観察されなかった。データは、平均 \pm SEMとして表されている。(図1に関連)。

【図7】ナイーブMyo1a KOマウス及びMyo1a^{+/+}マウスの行動特性評価並びに傷害後熱及び機械的過敏症。オープンフィールド(A)及びロータロッド(B：時間及びC：速度)試験におけるWT及びKOの行動。足の冷却(D：アセトン試験)及び有害な熱(E：ホットプレート試験)に対する熱感受性は、遺伝子型間で差異を示さない。(F) グラフは、ホルマリン試験におけるWT及びKOマウス疼痛行動を示す。ヒストグラムは、第1段階及び第2段階における応答持続時間を表す。この試験では、KOマウスが応答持続時間の増加を示すことに留意する(* * * p < 0.001)。(G~H) ハーグリーブス試験において、カラギーナン誘発性炎症(G)及び足切開手術(H)後のWT及びKOマウスの熱過敏症を決定した(* * * p < 0.001、ns：非有意)。(I) カラギーナン誘発炎症後のWT、Myo1a^{+/+}及びKOマウスの機械的応答(* * * p < 0.001、Myo1a^{+/+}対WT)。(J) ピククリン(10 μL 中0.01 μg)の髄腔内注射後のWT及びKOマウスの機械的応答(ns：非有意)。データは、各群について平均 \pm SEMとして示されている。(図1に関連)。

【図8】Myo1a KOナイーブ又は炎症マウスにおけるSC第II層ニューロンの受動特性、能動特性及びシナプス特性の電気生理学的特性評価。(A~F) グラフは、ナイーブ下における、並びにカラギーナン(Carra.)及びザイモサン(Zymo.)誘発性炎症におけるWT及びKOマウス由来のSC第II層介在ニューロンの平均膜電位(A)、膜抵抗(B)、電気容量(C)、-25 pAの過分極パルスに対するサグ比(D)、-25の電流パルスに対するリバウンドAPの数(E)及び+25 pAの電流パルスに対するAPの数(F)を表す。記録された細胞の数は、ナイーブ：WT 16個及びKO 26個、Carra.：WT 29個及びKO 23個並びにZymo.：WT 10個及びKO 12個である。(G) グラフは、ナイーブ下における、並びにCarra.及びZymo.誘発性炎症におけるWT及びKOマウスのSC第II層介在ニューロンにおいて記録されたペアパルス比を示す。記録された細胞の数は、ナイーブ：WT 19個及びKO 33個、Carra.：WT 9個及びKO 13個並びにZymo.：WT 9個及びKO

10

20

30

40

50

9個である。データは、各群について平均±SEMとして示されている。遺伝子型間で、有意差は観察されなかった。(図4に関連)。図1A、B、C、D、E、図3D、E、G及び図5C、D、E、F、Gは、それぞれ2回示されている(コントラストが異なる色を示す同一図)。

【実施例】

【0094】

実験パート

材料及び方法

マウス

標準的な飼育条件(23℃、湿度40%、明周期12時間、並びに飼料及び水へのフリーアクセス)下で、マウスを維持した。この研究において使用したマウスの数並びにストレス及び苦痛を最小化するように、特に努力した。全てのプロトコールは、動物実験に関する欧州連合の推奨にしたがっている。

【0095】

Myo1a KOマウスは、Tyska et al., 2005 (Tyska et al., 2005)によって作製されたものである。コントロール野生型(WT)C57BL/6マウスを自家繁殖した。それぞれWT及びMyo1a KOマウスをTafa4^{Venus/Venus} (Delfini et al., 2013)及びMyo1a^{+/-}:Tafa4^{+/-Venus}マウスと交配することによって、WT:Tafa4^{+/-Venus}及びMyo1a KO:Tafa4^{+/-Venus}マウスを作製した。

【0096】

組織学

in situハイブリダイゼーション(ISH)及び免疫染色のための成体後根神経節(DRG)及び脊髄(SC)標本を得るために、ケタミン/キシラジンの混合物でマウスを深麻酔し、次いで、パラホルムアルデヒド4%の氷冷0.1Mリン酸緩衝溶液(4%PFA)で経心灌流した。氷冷4%PFAで組織をさらに24時間固定した。新生P0マウスを屠殺し、氷冷PBSで迅速に洗浄し、摘出し、氷冷4%PFAで24時間固定した。E15胚を氷冷PBS中に収集し、氷冷4%PFAで24時間固定した。成体背部有毛皮膚を切除し、氷冷4%PFAで2時間固定した。GABRA1及びGABRA2免疫染色では、腰部SC(L1-L3)を迅速に切開し、氷冷4%PFAで30分間固定した。凍結保護のために、標本を30%(w/v)スクロース溶液に移してから、OCT封入剤で凍結させた。標準的なクリオスタット(Leica)を使用して、12µm凍結切片(DRG)及び18~20µm凍結切片(SC、E15及びP0)を得た。

【0097】

in situハイブリダイゼーション

遺伝子特異的PCRプライマー及び成体マウスDRG由来のcDNAテンプレートを使用して、ジゴキシゲニン標識Myo1a及びGabra2アンチセンスプローブ並びにフルオレセイン標識TrkBプローブを合成し、(Reynders et al., 2015)に記載されているように、in situハイブリダイゼーション又はダブルin situハイブリダイゼーションを行った。プローブ合成に使用したプライマーは、以下に列挙されている：

【化1】

Myo1a F1: GAAAATACTTCCGGTCAGGTG

Myo1a R1: CAAGGGTTCTTCATCTCTGAGT

Myo1a F2: TACCAGTGGGAAGTGCAAGAAGT

Myo1a R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGACACTACGAAGTTCTGCTCCAG

Gabra2 F1/F2: ACTTGGTTACTTTTGGGCTGT

Gabra2 R1: TGATTGAAGTGAGCTGAAAGGT

Gabra2 R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGGAACATCCTTTCATGGTGACTCA

TrkB-F1: CTGAGAGGGCCAGTCACTTC,

TrkB-R1: CATGGCAGGTCAACAAGCTA,

TrkB-F2: CAGTGGGTCTCAGCACAGAA,

TrkB-R2+T7: TAATACGACTCACTATAGGGCTAGGACCAGGATGGCTCTG

10

【0098】

免疫染色

ラット抗G I N I P (1 : 5 0 0、Mocrich laboratory)、ヤギ抗R e t (1 : 5 0 0、R&D Systems)、ウサギ抗T r k A (1 : 1 0 0 0、Dr. L. Reichardt, University of Californiaからの寄贈)、ヤギ抗T r k C (1 : 5 0 0、R&D Systems)、ウサギ抗C G R P (1 : 1 0 0 0、ImmunoStar)、ウサギ抗P K C (1 : 5 0 0、Santa Cruz)、ウサギ抗P G P 9 . 5 (1 : 2 0 0、Thermo Scientific)、ウサギ抗S 1 0 0 (1 : 1 0 0 0、Darko)、ウサギ抗G A B R A 2 (1 : 2 0 0 0、Synaptic Systems)及びモルモット抗G A B R A 1 (1 : 1 0 0 0、Synaptic Systems)を用いて、免疫組織染色を行った。InvitrogenのAlexa Fluor 488コンジュゲートI B 4を使用して、I B 4標識を行った。AxioImager Z1 (Zeiss)蛍光顕微鏡下で観察する前に、スライドをImmuMount (Thermo Scientific)でマウントした。Photoshopソフトウェアを使用して、コントラストを調整した。

20

【0099】

W TとM y o 1 a K Oとの間のG a b r a 2発現の比較では、同じ露出パラメータを使用して画像を取得し、コントラストを等しく調整した。

30

【0100】

S C及び皮膚神経支配並びにG A B R A染色では、LSM-780共焦点顕微鏡(Zeiss)を使用して画像取得を実施し、W T及びM y o 1 a K O標本間で、同じピンホール口径、レーザー強度及びゲインパラメータに配慮した。

【0101】

細胞数及び統計分析

Gaillard et al., 2014に記載されているように、成体W T及びM y o 1 a K Oマウス由来の腰部L 4 D R Gにおいて、D R Gニューロンの合計及び一部をカウントした。簡潔に言えば、L 4 D R Gの12 μm連続切片を6つのスライド上に分配し、これらを異なるマーカー(パンニューラルマーカーP G P 9 . 5を含む)に供した。このアプローチにより、本発明者らは、全てのカウントをニューロンの総数(P G P 9 . 5)に換算することができた。各遺伝子型について、3回の独立した実験を実施した。データは、平均±平均の標準誤差(S E M)として示されている。

40

【0102】

G A B R A 2 蛍光強度

ImageJソフトウェアを使用して、W T及びM y o 1 a K O S C切片の第I~III層において、G A B R A 2発現に関連する1mm²当たりの蛍光強度(関心領域におけるピクセルの平均蛍光)を決定した。各遺伝子型について、3回の独立した実験を実施し、S

50

C切片 5 ~ 10 個を分析し、Myo1a KO対WT標本の蛍光強度の変化倍率を計算した。

【0103】

薬物

SNC80 (Tocris Bioscience)を100mM HCl溶液に溶解し、DAMGO (Sigma Aldrich)を生理食塩水(0.9% NaCl)に溶解し、バクロフェン(Sigma Aldrich)をH₂O (pH 7.6)に溶解し、リコンビナントヒトTAF4 (R&D Systems)を生理食塩水に溶解し、ジアゼパム(DZP, Roche)を10%ジメチルスルホキシド(DMSO)/90%生理食塩水に溶解し、ムシモール(Tocris Bioscience)、タウリン(Sigma Aldrich)、ピククリン(Sigma Aldrich)及びプレガバリン(Sigma Aldrich)をリン酸緩衝液(PB、50 mM、pH 7.4)に溶解した。

10

【0104】

プレガバリンを除いて、髄腔内(intrathecal) (i.t)注射によって、全ての薬物を投与した。投与量は、図の凡例に示されている。プレガバリンを腹腔内(i.p)注射した。図の凡例に示されているように、機械的刺激に対する応答を薬物投与後30分から6時間まで記録した。

【0105】

行動試験及び統計分析

8 ~ 12週齢のMyo1a KO及びWT雄において、全ての行動分析を行った。全ての実験を室温(約22℃)で行った。全ての実験の前に、動物を試験環境に1時間順化させた。試験中、実験者は、マウスの遺伝子型について把握していなかった。試験動物の数は、図の凡例のセクションに示されている。全てのエラーバーは、SEMを表す。二元配置反復測定ANOVAとそれに続くボンフェローニ事後検定を使用して、全ての統計分析を行った。Gaillard et al., 2014 (Gaillard et al., 2014)に記載されているように、オープンフィールド、ロータロッド、ホットプレート及びホルマリン試験を行った。

20

【0106】

アセトン試験

アセトン液滴蒸発アッセイ(Hulse et al., 2012)を使用して、無害な皮膚冷却に対するナイーブマウスの感受性を評価した。1mlシリンジを使用して、1滴のアセトンを左後足に適用した。アセトン適用直後に、尻込み/疼痛のような行動の持続時間(秒)を合計2分間記録した。この試験を2回繰り返し、尻込み/疼痛行動の平均持続時間を計算した。

30

【0107】

熱過敏症

カラギーナン炎症の前後及び足切開手術後に、Gaillard et al., 2014に記載されているようにハグリーブス試験を使用して、後足熱過敏症を決定した。カラギーナン炎症性疼痛モデルでは、炎症後1日から60日までのいくつかの時点(凡例を参照のこと)において、試験を実施した。足切開疼痛モデルでは、炎症後1日から30日までのいくつかの時点(凡例を参照のこと)において、試験を実施した。

【0108】

機械的閾値

炎症、神経障害及び足切開手術の前並びにそれらの後のいくつかの時点において、以前に記載されているように(Gaillard et al., 2014)、アップダウン法によるフォンフライフィラメントを使用して、足底面の機械的閾値を決定した。

40

【0109】

傷害誘発性疼痛モデル

カラギーナン及びザイモサンA誘発性炎症

30Gニードルシリンジを使用して、H₂O中1%カラギーナンを含有する溶液(重量/体積、Sigma) 20 µl又は0.9% NaCl中ザイモサン-A 0.06 mgを含有する溶液(重量/体積、Sigma) 20 µlを左後足の足底側に皮下注射した。

【0110】

50

カラギーナン誘発性炎症では、炎症前、並びに炎症後1時間から60日までのいくつかの時点(凡例を参照のこと)において、機械的閾値を決定した。ザイモサン炎症では、注射前、1日目及び60日目までのいくつかの時点(凡例を参照のこと)において、機械的閾値を決定した。加えて、炎症前、1日目及び2日目、薬物投与の前後において、ザイモサンモデルにおける機械的閾値を測定した。

【0111】

慢性絞扼傷(CCI)

ケラチン/キシラシン麻酔マウスにおいて、モノクリル再吸収性縫合糸繊維(6-0, Ethicon, Piscataway, NJ, USA)を使用して、総坐骨神経周辺で緩く結んだ3箇所(約1mm間隔)を実施することによって(Bennett and Xie, 1988)、片側末梢単神経障害を誘発した。神経はほとんど識別不可能な程度に狭窄したので、神経上膜血管系を通る循環は阻害されなかった。手術後、加温チャンバーにおいて動物を回復させ、次いで、それらを飼育ケージに戻した。CCI前、及び手術後3日から60日までのいくつかの時点(凡例を参照のこと)において、機械的閾値を測定した。

【0112】

足切開

Brennan (1999)に記載されているように、足切開疼痛モデルを実施した。簡潔に言えば、ケタミン/キシラジンでマウスを麻酔し、踵の近位端から2~5mmの右後足の足底面に5mm縦切開を実施した。次いで、鉗子を用いて足底筋肉を慎重に持ち上げ、筋起始をインタクトに保ちながら、刃物を用いて縦方向に切開した。6.0シルクモノフィラメント(Ethicon, Piscataway, NJ, USA)を使用して、1回の水平マットレス縫合で創傷を閉鎖し、ベタジン軟膏で創傷部位を覆った。手術後、加温チャンバーにおいて動物を回復させ、それらを飼育ケージに戻した。傷害後6時間から手術前及び手術後60日まで(凡例を参照のこと)、機械的閾値を決定した。

【0113】

神経部分傷害(SNI)

(Shields et al., 2003)に記載されているように、神経部分傷害手術を実施した。簡潔に言えば、ケタミン/キシラジンの混合物でマウスを麻酔し、坐骨神経の三尖弁の位置で皮膚及び大腿筋を介して切開を行った。6.0シルクフィラメント(Ethicon, Piscataway, NJ, USA)を使用して、総腓腹神経及び総腓骨神経を結紮し、脛骨神経をインタクトに保ちながら切断した。手術後、加温チャンバーにおいて動物を回復させ、次いで、それらを飼育ケージに戻した。手術後7日目、9日目及び14日目、薬物投与の前後において、機械的閾値を測定した。

【0114】

RNA抽出

ケタミン/キシラジンの混合物でマウスを深麻酔し、RNA Later (Qiagen) 5~10mLで経心灌流した。L3~L5 DRG及びSCを迅速に解剖し、製造業者の説明書にしたがってRNeasy Micro Kit (Qiagen)を使用して、RNAを抽出した。品質コントロールのために、RNAをRNA NanoChip (Agilent)にロードし、2100 Bioanalyzer system (Agilent technology)を用いて処理した。

【0115】

ハイスループットシーケンシング及び分析

それぞれマウス2~3匹から、WT及びMyo1a KO DRG及びSC RNAを2回反復の実験で抽出した。TruSeq RNA Sample Preparation Kit (Illumina)を使用して、RNA-seqライブラリーを調製した。Agilent DNA1000 chipsを使用して、濃度及びフラグメントサイズについて、全てのライブラリーを検証した。HiSeq 2000 (Illumina)によって配列決定を実施し、RTA (Illumina)を使用してベースコールを実施し、FastQC (FASTQC, 2010)及びRSeQC (Wang et al., 2012)を使用して品質コントロールを実施した。デフォルト値を使用したSubread (Liao et al., 2013) (C version 1.4.6-p2)を使用して、配列をmm10ゲノムに固有にマッピングした。featureCounts (Liao et al., 20

10

20

30

40

50

14) (C version 1.4.6-p2)を使用して、遺伝子エクソン (G R C m 3 8 . p 4 遺伝子アセンブリ) にマッピングしたリードをカウントした。偽発見率 (F D R) カットオフ 5 % を使用したDESeq2 BioConductor R package (Love et al., 2014)を使用し、生物学的複製物からのエクソンカウントを使用して、ディファレンシャルな遺伝子発現を実施した。

【 0 1 1 6 】

q R T - P C R

Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen)を使用して、各サンプルから得られたRNAをcDNAに変換した。qPCR Sybr-Green master mix (ThermoFisher)を使用して定量PCR (q P C R) によって、遺伝子発現を評価した。StepOne qPCR装置 (Applied Biosystems)において、サンプルを40サイクルにわたってランした。標準的な Ct 又は Ct 法を使用して - アクチンに対する正規化によって、各遺伝子をコードする転写産物の相対量を決定した。

【 0 1 1 7 】

全ての実験を3回反復で実施し、データは、Myo1a KO対WTの転写産物発現レベルの変化倍率 (平均 ± S E M) を表す。qPCRに使用したプライマー配列は、

【 化 2 】

Myo1a F: CTACGAGCAGCTTCCCATCT

Myo1a R: CCACATTTGCCAAAGCATAG

Gabra2 F: ACAAAAAGAGGATGGGCTTG

Gabra2 R: TCATGACGGAGCCTTTCTCT

Wfdy1 F: AAAGGCCGGACTCCTC

Wfdy1 R: TGAGCTGCAGGTAGCACAGT

Nnt F: CCTGGTGGCACCTTCGTA

Nnt R: CTGAGCCCAGGTACATGATTT

である。

【 0 1 1 8 】

D R Gニューロンの解離及び培養

成体WT、Myo1a KO、WT : T a f a 4 + / V e n u s 及びMyo1a KO : T a f a 4 + / V e n u s マウスを深麻酔し (ケタミン / キシラジン) 、 D R G を迅速に解剖し、氷冷HBS S - g l u (H B S S 1 x (Gibco) 、 0 , 1 M D - グルコース (Sigma) 、 5 0 m M H E P E S (Gibco) 、 p h 7 , 4) に収集し、2 mg / ml 1 型コラゲナーゼ (G i b c o) 及び5 mg / ml ディスパーゼ (両方ともGibco製) を使用した37 °C における20分間の酵素消化に2回供した。HBS S - g l u でD R G を2回洗浄し、N B c 培地 (N B c : Neurobasal (Gibco) 、 1 % (v / v) B 2 7 (Gibco) 、 1 0 0 0 U / ml ペニシリン (Invitrogen) 、 1 0 0 0 μ g / ml ストレプトマイシン (Invitrogen)) に再懸濁した。直径が漸減する3つの針先 (ゲージ18、21、26) を通すことによって、単細胞懸濁液を得た。細胞をポリオルニチン - ラミニンコーティングディッシュにプレーティングし、37 °C で1 ~ 2時間維持してから、10 ng / ml ニューロトロフィン4 (N T 4 、 Peprotech) 及び2 ng / ml グリア細胞株由来神経栄養因子 (G D N F 、 Invitrogen) を追加した。live Venus fluorescenceによってC - L T M R を同定し、「ロゼット」様形態によってA d - L T M R を同定した (Dubreuil et al , 2004) 。プレーティング後、パッチクランプ記録を18 ~ 30時間実施した。

【 0 1 1 9 】

培養D R Gにおける電気生理学

Axopatch 200B amplifierを使用して、電気生理学的記録を実施した。pCLAMP 10.5 (Molecular Devices) によって、データを分析した。

30

40

50

【0120】

C - L T M R 及び A - L T M R の全細胞記録

134 KCl、1 MgCl₂、4.8 CaCl₂、10 HEPES、4 Mg - ATP、0.4 Na - GTP 及び 10 EGTA (pH 7.3) (mM単位) を含有する KCl ベースの溶液を充填した 1 ~ 2 M ピペットを用いて、培養 C - L T M R のパッチクランプ記録を実施した。105 K アスパラギン酸塩、10 NaCl、27 KCl、4 Mg - ATP、0.4 Na - GTP、5 クレアチン - リン酸塩 (ナトリウム塩)、1 CaCl₂、10 EGTA、1 MgCl₂、10 HEPES (KOH で pH 7.2、約 329 mOsm) (mM単位) を含有する KCl ベースの溶液を充填した 1 ~ 3 M ピペットを用いて、培養 A - L T M R のパッチクランプ記録を実施した。

10

【0121】

140 NaCl、4 KCl、2 MgCl₂、2 CaCl₂、10 HEPES 及び 10 グルコース (pH 7.4) (mM単位) を含有する標準外液で、ニューロンを流速 2 ~ 3 ml / 分で灌流した。

【0122】

GABA_A レセプターアゴニストであるムシモール (Tocris Bioscience) のストック溶液を水で調製し、所望の濃度で外液に溶解した。ムシモールを 10 秒間バス適用した。

【0123】

機械的活性化電流

水平から 45 度の角度で配置し、機械的プローブとして使用した圧電 - 電動アクチュエータ (Step Driver PZ-150 M; Burleigh) に取り付けられた密封先端熱加工ガラスマイクロピペットを用いて、機械的刺激を実現した。pClamp software (Molecular Devices) によって、細胞へのプローブの下降運動を駆動した。A - L T M R の全パッチクランプ記録と同じ溶液を用いて、-60 mV の保持電位で電圧固定機械的活性化電流を記録した。機械的刺激のベースラインは、機械的活性化電流を誘導するプローブ変位 - 0.5 μm の距離として μm 単位で定義した。

20

【0124】

後根が付着した脊髄切片からの全細胞パッチクランプ記録

全細胞記録のために、幼若 (P24 ~ P45) Myo1a KO 及び WT マウス由来の後根が付着した横断脊髄切片を調製した。簡潔に言えば、ペントバルビタール (200 mg / kg) を使用して動物を麻酔し、氷冷含酸素低カルシウム人工脳脊髄液 (ACSF; mM単位: NaCl 101; KCl 3.8; MgCl₂ 18.7、MgSO₄ 1.3; KH₂PO₄ 1.2; HEPES 10; CaCl₂ 1; グルコース 1) で灌流し、次いで、断首した。脊柱及び周辺筋肉を迅速に摘出し、氷冷含酸素 ACSF に浸漬した。椎弓切除後、脊髄を徐々に摘出し、その腰部を小 3% アガロースブロックに入れた。Leica VTS1000 vibratome を使用して脊髄切片 (厚さ 300 μm) を切断し、95% O₂ - 5% CO₂ で少なくとも 1 時間平衡化した加温 (31 °C) ACSF (mM単位: NaCl 130.5; KCl 2.4; CaCl₂ 2.4; NaHCO₃ 19.5; MgSO₄ 1.3; KH₂PO₄ 1.2; HEPES 1.25; グルコース 10; pH 7.4) に移してから、パッチクランプ記録を開始した。加温 (31 °C) ACSF に浸した記録チャンバーに脊髄切片を入れた。multiclamp 2B (Molecular devices) を使用して、Olympus BX51 顕微鏡のコントロール下で、電気生理学的測定を実施した。C ベースのピペット溶液 (mM単位: メタンシルホン酸 Cs 120; CsCl 20; CaCl₂ 0.1; MgCl₂ 1.3; EGTA 1; HEPES 10; GTP 0.1; cAMP 0.2; ロイペプチン 0.1; Na₂ATP 3; D - マンニトール 77; pH 7.3) をパッチピペット (7 ~ 11 μl) に充填した。Master 8 (A.M.P. Instrument Ltd) stimulator に接続されたガラス吸引電極を使用して、後根を刺激した。典型的には、1 組の高持続時間 (500 μs) 高強度刺激 (350 μA) を使用して、記録切片においてほとんどの一次求心性繊維をリクルートした。全ての薬物は、Sigma から購入した。コルモゴルフ・スミルノフ検定を使用して、各細胞について、EPSC 頻度の統計比較を評価した。

30

40

50

【0125】

結果

Myo1a KOマウスでは、傷害誘発性急性機械的疼痛は慢性疼痛に変質する。

最近の研究において、本発明者らは、成体C-LTMRでは、Myo1aが高濃縮されていることを確認した(Reynders et al., 2015)。共発現分析により、GINIP⁺/IB4-C-LTMRでは、Myo1aが実際に発現されていたが(図1A)、TrkBによってマーキングしたA-LTMR、及びA-RET⁺-LTMRの一部においても、その発現が起こっており(図1B及び1C)、ペプチド作動性TrkA⁺及び固有受容性TrkC⁺ニューロンから完全に除外されていた(データは示さず)ことが示された。発生レベルでは、Myo1aは、E15の大型DRGニューロンの一部において発現され(図1D)、その発現は、出生時のDRGニューロンの大部分に及ぶ(図1E)。in situハイブリダイゼーション及びq-RT-PCRによって確認されるように、発生中のSC及び成体におけるMyo1a発現レベルは、ほとんど検出不可能である(図1D~G)。

10

【0126】

感覚生理学におけるMYO1Aの役割についての知見を得るために、本発明者らは、Myo1a KOマウスを分析しようとした(Tyska et al., 2005)。これらのマウスは生存能力があり、繁殖力があり、記載されている摂動の大部分は、この非定型ミオシタンパク質が高発現される腸内生物学に関連していた(Kravtsov et al., 2012; Mazzolini et al., 2012)。しかしながら、体性感覚系におけるMYO1Aの役割については、全く不明であった。

20

【0127】

MYO1Aの喪失がDRGニューロン発達を変化させたかを試験するために、本発明者らは、一連の定量的及び定性的分析を実施した。本発明者らは、WT及びMyo1a KOマウスの間で、腰部DRGニューロンの総数又はTrkA⁺、TrkB⁺、TrkC⁺、RET⁺及びTH⁺ニューロンの数に差異がないことを見出した(図5A及び5B)。解剖学的レベルでは、SC切片に対する二重及び三重染色実験により、ペプチド作動性GRP⁺及び一部の非ペプチド作動性GINIP⁺求心性神経は、SCの後角におけるこれらの各層への正常な中心投影を示したことが示された(図5C~E)。末梢では、PGP9.5及びS100染色により、全てのDRGニューロン及び毛包神経支配LTMRの正常な末梢ターゲット神経支配が明らかになった(図5F及び1G)。最後に、MYO1Aの喪失がDRGニューロンのニューロン興奮性に影響を及ぼすかを試験するために、本発明者らは、培養C-LTMR及びD-ヘアA 機械的受容器においてパッチクランプ記録を実施した。Myo1a KOマウスをTafa4^{venus}マウスと交配させることによってC-LTMRを可視化し、それらのロゼット様形状によってD-ヘアニューロンを同定した。両タイプのニューロンでは、2つの遺伝子型間で、受動的及び内因的電気特性に差異はなかった(図6A~G)。さらに、本発明者らは、圧電駆動機械的刺激に対する、WT及びMyo1a KOマウス由来の培養D-ヘアニューロンの感受性に差異はなかったことを見出した(図6H及び6I)。まとめると、これらのデータは、DRGニューロンの生存、分子成熟、解剖学的構成及び電気生理学的特性のために、MYO1Aが不要であることを実証している。

30

40

【0128】

体性感覚におけるMYO1Aの役割についての知見を得るために、本発明者らは、急性及び傷害条件下で、Myo1a KOマウスを一連の体性感覚試験に供した。オープンフィールド試験及びロータロッド試験では、Myo1a KOマウスは正常な行動を示したが(図7A~C)、ホットプレート試験では、有害な熱刺激の感知能力に差異はなく、アセトン試験に対して正常な応答を示した(図7D及び7E)。次いで、本発明者らは、急性条件及び3つの異なる病理学的条件(カラギーナン誘発性炎症、慢性絞扼傷モデル(CCI)(Bennett and Xie, 1988)及びブレナン試験(Brennan, 1999))下で、それらのマウスの機械的感受性を試験した。基本条件において、及び傷害後のいくつかの時点において、アップダウン法を使用して、機械的感受性を試験した(図1F~H)。3つのパラダイ

50

ムの全てにおいて、2つの遺伝子型間で、ベースラインレベルにおける機械的閾値は類似していた(図1F~H)。カラギーナンの足底内注射は、両遺伝子型において、炎症1時間後から機械的閾値の大幅な低下を誘導した(図1F)。印象的なことに、炎症3日後、WTマウスはベースラインレベルに戻ったのに対して、Myo1a KOマウスでは、機械的過敏症が炎症60日後まで延長したが、これは、可逆的な急性炎症誘発性機械的疼痛が長期間型の不可逆的な慢性疼痛に変質することを実証している。神経傷害及び術後モデルでは、同じ行動反応が観察された。WTマウスでは、CCI誘発性機械的過敏症の有意な回復が30日目に始まり、約40日目にベースラインレベルに戻ったのに対して、Myo1a KOマウスでは、カラギーナ誘発性炎症と同様に、機械的過敏症がCCI60日後まで持続した(図1G)。最後に、プレナン試験において、Myo1a KOマウスでは、切開誘発性機械的過敏症は不可逆的であったのに対して、WTマウスでは、それは10日間未満持続した(図1H)。ハーグリーブス試験を使用してカラギーナン及びプレナンパラダイムにおいて、熱過敏症を評価した。カラギーナンモデルにおいて、Myo1a KOマウスでは、熱過敏症が延長したが、炎症後60日目にベースラインレベルに戻った(図7G)。しかしながら、プレナンモデルでは、WT及びMyo1a KOマウス間で術後誘発性熱過敏症に差異はなかった(図7H)。最後に、Myo1a KOマウスは、両段階中に、ホルマリン誘発性防衛行動の有意な増強を示した(図7F)。まとめると、これらのデータは、Myo1a KOマウスが傷害誘発性慢性機械的疼痛を発症する素因を有することを実証しており、急性疼痛から慢性疼痛への移行をトリガーする機構を

10

20

【0129】

MYO1Aの喪失は、イオンチャンネル型GABA作動性シグナリングを特異的に変化させる

傷害誘発性慢性疼痛は、SCにおける興奮性神経伝達と抑制性神経伝達との間の不均衡によって引き起こされ、同時に起こる過度の疼痛は、オピオイド、GABA及びグリシンレセプターアゴニスト、カルシウムチャンネルアンタゴニスト並びに本発明者らが最近同定したTAF4などの様々な化合物によって一時的に回復され得ることが十分に確立されている。Myo1a KOマウスでは、これらのシグナル伝達経路のどれが機能不全であるか解明するために、本発明者らは、神経部分傷害(SNI)神経因性疼痛モデル(Decosterd and Woolf, 2000)を使用して、これらの化合物の鎮痛効果を試験した。SNIモデルは非常に再現性があり、長期間型の不可逆的な機械的疼痛を誘発するので、それを選択した。このパラダイムを使用して、本発明者らは、及び μ オピオイドレセプターアゴニストであるSNC80及びDAMGO(図2A)、GABA_Bレセプターアゴニストであるバクロフェン及びTAF4(図2B)、²電位依存性カルシウムチャンネル阻害剤であるプレガバリン並びにグリシンレセプターアゴニストであるタウリン(図3C)の髄腔内(IT)投与が、両遺伝子型におけるSNI誘発性機械的過敏症を有意に回復させたことを示した。しかしながら、WTマウスとは対照的に、Myo1a KOマウスでは、GABA_Aアゴニストのムシモールの髄腔内投与は、SNI誘発性機械的疼痛を完全に回復させることができなかった(図2D)。ザイモサンA誘発性炎症性疼痛モデルにおいても、ムシモールの鎮痛効果に対するMyo1a KOマウスの耐性が確認された(Witschi et al., 2011)。本発明者らは、Myo1a KOマウスでは、ザイモサン誘発性炎症が長期の不可逆的な機械的過敏症ももたらしたことを初めて示した(図2E)。ムシモール又はGABA_A-R陽性アロステリックモデュレーターであるジアゼパム(DZP)の髄腔内投与は、WTマウスにおけるザイモザン誘発性機械的過敏症を大きく回復させたが、Myo1a KOマウスに対しては効果がなかった(図2F及び2G)。重要なことに、SNC80の注射は、両遺伝子型における機械的疼痛を大きく回復させた(図2H)。まとめると、これらのデータは、傷害誘発性慢性機械的疼痛を発症するMyo1a KOマウスの素因が、イオンチャンネル型GABA作動性抑制性神経伝達の選択的障害に起因することを実証している。

30

40

50

【 0 1 3 0 】

MOY1Aの喪失は、DRG及びSCニューロンの両方におけるGABRA2の選択的アップレギュレーションをもたらした

末梢神経系及び中枢神経系の両方において、GABA作動性抑制の喪失は、いくつかの手段によって変化され得ることが十分に確立されている。これらとしては、GABA_A-Rのサブユニット組成の変化、GABAレベルの変化、GABA放出確率及びシナプス間隙からのその除去速度、並びにGABA媒介性抑制を興奮に切り替える塩化物勾配の変化が挙げられる(Sandkuhler, 2009)。Myo1a KOマウスでは、これらの機構のどれが影響を受けるか解明するために、本発明者らは、不偏RNAディープシーケンシングスクリーニングを使用した。WT及びMyo1a KOマウスのDRG及びSCニューロンから調製したポリA mRNAの生物学的複製物を、全エクソームカバレッジの平均250倍に相当する非常に高い配列決定深度(複製物当たり平均 1.12×10^6 のエクソームマッピングリード)へのハイスループットシーケンシングに供した(表1)。

10

【表1】

表1: WT及びMyo1a KOマウスのDRG及びSCから調製したポリA mRNAのRNA-seqからのリードマッピングの要約。

サンプル	mm10マッピング リードの数	GRCm38 エクソーム リードの数	エクソームカバレッジ
DRG WT Rep1	122510851	106555838	245
DRG WT Rep2	140298326	123170138	283
SC WT Rep1	135383211	101181431	269
SC WT Rep2	144363915	111158063	270
DRG KO Rep1	135001904	117077396	232
DRG KO Rep2	134291994	117408042	255
SC KO Rep1	114549363	85518826	196
SC KO Rep2	172249718	134362629	309

20

30

【 0 1 3 1 】

Myo1a発現の喪失により非常に有意にディファレンシャルに発現された(DE)遺伝子をコールし($< 5\% \text{ FDR}$; $< p = 0.00025$)、DRGニューロンではDE遺伝子98個(図3A及び表2)及びSCニューロンではDE遺伝子32個(図3A及び表3)を同定した。

【表 2】

表2: Myo1a KO対WTマウスのDRGにおいてディファレンシャルに発現された遺伝子。

ENSEMBL ID	遺伝子記号	塩基 平均数	変化倍率 (log2)	P値	FDR
ENSMUSG000000073643	Wdfy1	5136	1.4483	1.50E-100	2.83E-96
ENSMUSG000000025401	Myo1a	5484	1.0095	1.23E-52	1.16E-48
ENSMUSG000000000560	Gabra2	7946	0.9382	2.66E-39	1.67E-35
ENSMUSG000000097971		2742	0.8108	2.95E-25	7.95E-22
ENSMUSG000000106106		148956	0.8048	1.19E-26	4.49E-23
ENSMUSG000000025453	Nnt	2624	0.7605	1.98E-24	4.15E-21
ENSMUSG000000030218	Mgp	5295	0.7179	1.54E-21	2.91E-18
ENSMUSG000000029994	Anxa4	3385	0.6051	2.34E-16	3.40E-13
ENSMUSG000000096768	Erdr1	1546	0.5945	5.44E-15	6.42E-12
ENSMUSG000000063796	Slc22a8	924	0.5634	2.67E-15	3.36E-12
ENSMUSG000000068735	Trp53i11	2239	0.5412	2.84E-12	2.82E-09
ENSMUSG000000067258		91347	0.5395	4.55E-26	1.43E-22
ENSMUSG000000026051	1500015010Rik	1291	0.5024	6.81E-11	5.36E-08
ENSMUSG000000039323	Igfbp2	1958	0.4813	8.38E-10	6.33E-07
ENSMUSG000000025479	Cyp2e1	683	0.4812	1.80E-11	1.54E-08
ENSMUSG000000035299	Mid1	1810	0.4674	2.01E-09	1.46E-06
ENSMUSG000000033174	Mg11	16530	0.4672	9.92E-19	1.56E-15
ENSMUSG000000067786	Nnat	3299	0.4433	1.55E-08	9.73E-06
ENSMUSG000000035202	Lars2	73887	0.4406	1.58E-24	3.72E-21
ENSMUSG000000096887	Gm20594	2825	0.4329	8.18E-09	5.51E-06
ENSMUSG0000000652957	Gas1	2350	0.4325	3.22E-08	1.84E-05
ENSMUSG000000086324		10780	0.3914	8.20E-12	7.37E-09
ENSMUSG000000050010	Shisa3	3037	0.3892	6.50E-07	0.000306659
ENSMUSG000000030310	Slc6a1	2324	0.3826	1.06E-06	0.00047432
ENSMUSG000000076281		11261	0.3769	9.76E-09	6.35E-06
ENSMUSG000000024990	Rbp4	925	0.3703	6.33E-08	3.51E-05
ENSMUSG000000024610	Cd74	16282	0.3662	4.00E-11	3.28E-08
ENSMUSG000000095304	Plac9a	2818	0.3574	3.65E-06	0.001437537
ENSMUSG000000034353	Ramp1	353	0.3540	7.15E-08	3.86E-05
ENSMUSG000000003949	Hlf	2753	0.3461	1.01E-05	0.003815587
ENSMUSG000000070867	Trabd2b	670	0.3439	6.03E-07	0.000292135
ENSMUSG000000026062	Slc9a2	691	0.3367	1.47E-06	0.000629062
ENSMUSG000000024650	Slc22a6	533	0.3353	2.51E-08	1.53E-05
ENSMUSG000000021136	Smoc1	2669	0.3300	2.58E-05	0.008398485
ENSMUSG000000018459	Slc13a3	1856	0.3298	1.99E-05	0.006818336
ENSMUSG000000046402	Rbp1	1715	0.3195	2.10E-05	0.007083368
ENSMUSG000000026904	Slc4a10	1783	0.3177	3.36E-05	0.010570455
ENSMUSG000000088609		1505	0.3136	6.23E-05	0.016789981
ENSMUSG000000053279	Aldh1a1	1808	0.3118	6.94E-05	0.018120573
ENSMUSG000000045573	Penk	1389	0.3107	7.10E-05	0.018120573
ENSMUSG000000037820	Tgm2	2261	0.3101	5.00E-05	0.01392036
ENSMUSG000000009587	Fxyd5	2354	0.3098	6.50E-05	0.017271687
ENSMUSG000000030862	Cpxm2	986	0.3098	3.83E-05	0.011660881
ENSMUSG000000035000	Dpp4	537	0.3094	7.29E-07	0.000335707
ENSMUSG000000040055	Gjb6	917	0.3094	3.65E-06	0.001437537
ENSMUSG000000030351	Tspan11	1267	0.3076	3.96E-05	0.011853792
ENSMUSG000000017897	Eya2	1715	0.3068	9.01E-05	0.021259308
ENSMUSG000000042436	Mfap4	782	0.3040	3.51E-05	0.010876582
ENSMUSG000000030717	Nupr1	958	0.2989	9.87E-05	0.022729069
ENSMUSG000000095079		473	0.2989	3.15E-08	1.84E-05
ENSMUSG000000040569	Slc26a7	992	0.2974	5.01E-05	0.01392036

10

20

30

40

ENSMUSG00000033152	Podxl2	4785	0.2956	1.38E-05	0.004833264
ENSMUSG00000037166	Ppp1r14a	1716	0.2954	0.000149427	0.032427353
ENSMUSG00000074634	Gm7120	1731	0.2919	0.000192622	0.038281175
ENSMUSG00000029163	Emilin1	928	0.2901	0.000139094	0.03053603
ENSMUSG00000056174	Col8a2	1923	0.2885	0.000179303	0.036013163
ENSMUSG00000032334	Lox11	1376	0.2869	0.000153495	0.03256157
ENSMUSG00000040170	Fmo2	1928	0.2863	0.00024733	0.047648949
ENSMUSG0000004885	Crabp2	688	0.2843	2.88E-05	0.00921269
ENSMUSG00000042190	Cmk1r1	542	0.2839	8.89E-05	0.021259308
ENSMUSG00000062515	Fabp4	836	0.2773	2.22E-05	0.007350468
ENSMUSG00000040938	Slc16a11	249	0.2724	3.57E-06	0.001437537
ENSMUSG00000025784	Clec3b	748	0.2704	8.47E-05	0.020760793
ENSMUSG00000022595	Lypd2	551	0.2658	0.000246368	0.047648949
ENSMUSG00000039004	Bmp6	1187	0.2634	0.000161683	0.033837805
ENSMUSG00000066687	Zbtb16	822	0.2630	4.37E-05	0.012694785
ENSMUSG00000041598	Cdc42ep4	7427	0.2581	8.96E-05	0.021259308
ENSMUSG00000021943	Gdf10	518	0.2573	0.000115563	0.025974121
ENSMUSG00000030278	Cidec	367	0.2471	1.15E-05	0.004174341
ENSMUSG00000033152	Podxl2	4785	0.2956	1.38E-05	0.004833264
ENSMUSG00000037166	Ppp1r14a	1716	0.2954	0.000149427	0.032427353
ENSMUSG00000074634	Gm7120	1731	0.2919	0.000192622	0.038281175
ENSMUSG00000029163	Emilin1	928	0.2901	0.000139094	0.03053603
ENSMUSG00000056174	Col8a2	1923	0.2885	0.000179303	0.036013163
ENSMUSG00000032334	Lox11	1376	0.2869	0.000153495	0.03256157
ENSMUSG00000040170	Fmo2	1928	0.2863	0.00024733	0.047648949
ENSMUSG0000004885	Crabp2	688	0.2843	2.88E-05	0.00921269
ENSMUSG00000042190	Cmk1r1	542	0.2839	8.89E-05	0.021259308
ENSMUSG00000062515	Fabp4	836	0.2773	2.22E-05	0.007350468
ENSMUSG00000040938	Slc16a11	249	0.2724	3.57E-06	0.001437537
ENSMUSG00000025784	Clec3b	748	0.2704	8.47E-05	0.020760793
ENSMUSG00000022595	Lypd2	551	0.2658	0.000246368	0.047648949
ENSMUSG00000039004	Bmp6	1187	0.2634	0.000161683	0.033837805
ENSMUSG00000066687	Zbtb16	822	0.2630	4.37E-05	0.012694785
ENSMUSG00000041598	Cdc42ep4	7427	0.2581	8.96E-05	0.021259308
ENSMUSG00000021943	Gdf10	518	0.2573	0.000115563	0.025974121
ENSMUSG00000030278	Cidec	367	0.2471	1.15E-05	0.004174341
ENSMUSG00000048373	Fgfbp1	344	0.2441	1.37E-05	0.004833264
ENSMUSG00000065037	Rn7sk	263	0.2439	2.69E-06	0.001128964
ENSMUSG00000036256	Igfbp7	12145	0.2434	7.10E-05	0.018120573
ENSMUSG00000027447	Cst3	35343	0.2354	5.12E-07	0.000261486
ENSMUSG00000079507	H2-Q1	249	0.2312	4.37E-05	0.012694785
ENSMUSG00000026879	Gsn	56839	0.2300	3.81E-06	0.001466965
ENSMUSG00000025417	Fip4k2c	10331	0.2280	7.92E-05	0.019666363
ENSMUSG00000065911		199	0.2206	1.09E-05	0.004034884
ENSMUSG00000027656	Wisp2	241	0.2017	5.61E-05	0.015352478
ENSMUSG00000037185	Krt80	281	0.2002	0.000169408	0.034765482
ENSMUSG00000065824		148	0.1683	0.000163095	0.033837805
ENSMUSG00000045532	Clql1	210	0.1552	0.000106576	0.024242748
ENSMUSG0000007877	Tcap	148	-0.1666	0.000226999	0.044643191
ENSMUSG00000038670	Mybpc2	306	-0.2179	7.50E-05	0.018874355
ENSMUSG00000040621	Gemin8	460	-0.2428	0.000172846	0.035089631
ENSMUSG00000026950	Neb	633	-0.2461	0.000153087	0.03256157
ENSMUSG00000029361	Nos1	8545	-0.2462	0.000131891	0.02929533
ENSMUSG00000061816	Myl1	304	-0.2927	5.37E-07	0.000267047
ENSMUSG00000074217	2210011C24Rik	1767	-0.3002	9.12E-05	0.021259308
ENSMUSG00000079316	Rab9	4067	-0.3168	4.63E-05	0.013245887
ENSMUSG00000040586	Odf1	1418	-0.3790	1.09E-06	0.000480185
ENSMUSG00000044377		4354	-0.3974	2.42E-07	0.000126731
ENSMUSG00000090015	Gm15446	839	-0.4313	3.89E-09	2.72E-06
ENSMUSG00000061723	Tnnt3	964	-0.4816	5.81E-13	6.45E-10
ENSMUSG00000079317	Trappc2	7140	-0.4942	6.99E-12	6.60E-09
ENSMUSG00000025373	Rnf41	11954	-0.5169	1.00E-15	1.35E-12
ENSMUSG00000082286		3866	-0.5219	1.19E-12	1.24E-09
ENSMUSG00000040565	Btaf1	4110	-0.6499	4.26E-19	7.31E-16
ENSMUSG00000056999	Ide	13039	-0.6774	1.37E-32	6.46E-29

10

20

30

40

50

【表 3】

表3: Myo1a KO対WTマウスのSCにおいてディファレンシャルに発現された遺伝子。

ENSEMBL ID	遺伝子記号	塩基平均数	変化倍率 (log2)	P値	FDR
ENSMUSG000000073643	Wdfy1	6789	1.8765	2.26E-100	6.80E-96
ENSMUSG000000039253	Fn3krp	992	1.3973	1.48E-38	1.49E-34
ENSMUSG000000000560	Gabra2	14817	1.2075	4.81E-40	7.24E-36
ENSMUSG000000025401	Myo1a	197	0.8047	6.00E-17	3.01E-13
ENSMUSG000000025453	Nnt	3738	0.7752	4.79E-16	1.86E-12
ENSMUSG000000095562		1577	0.6142	1.28E-08	3.51E-05
ENSMUSG000000090691		879	0.5521	2.12E-07	0.00042566
ENSMUSG000000025436	Xrcc6bpl	1357	0.5228	4.04E-07	0.000715195
ENSMUSG000000096768	Erdrl	657	0.4864	3.27E-06	0.004691284
ENSMUSG000000090546	Cdrl	29092	0.4828	4.22E-08	9.78E-05
ENSMUSG000000091754		781	0.4448	3.45E-05	0.034653432
ENSMUSG000000096904		1088	0.4284	4.22E-05	0.040987861
ENSMUSG000000041773	Encl	3722	0.4158	5.83E-06	0.007634036
ENSMUSG000000044676	Zfp612	13786	0.3611	1.04E-05	0.012508737
ENSMUSG000000022995	Enah	14357	0.3407	3.20E-05	0.033173553
ENSMUSG000000025373	Rnf41	8435	-0.4051	1.14E-05	0.013223275
ENSMUSG000000024011	Pil6	2591	-0.4148	5.20E-05	0.048885646
ENSMUSG000000000711	Rab5b	9824	-0.4175	1.21E-06	0.002024553
ENSMUSG000000063681	Crb1	165	-0.4385	1.51E-06	0.002400311
ENSMUSG000000025044	Msr1	283	-0.4410	1.22E-05	0.013604768
ENSMUSG000000025400	Tac2	1034	-0.4635	1.85E-05	0.019871035
ENSMUSG000000044377		4306	-0.4653	4.67E-06	0.00638975
ENSMUSG000000040586	Ofd1	1271	-0.4771	1.04E-05	0.012508737
ENSMUSG000000023764	Sfil	2276	-0.4851	1.70E-06	0.002555659
ENSMUSG000000079316	Rab9	3373	-0.5152	2.99E-07	0.000563214
ENSMUSG000000031342	Gpm6b	193529	-0.5227	1.91E-07	0.00041017
ENSMUSG000000079317	Trappc2	11463	-0.5444	1.61E-08	4.05E-05
ENSMUSG000000040565	Btafl	3689	-0.6525	2.85E-12	8.59E-09
ENSMUSG000000056999	Ide	9557	-0.6808	4.93E-16	1.86E-12
ENSMUSG000000023795		1367	-0.7991	3.97E-14	1.33E-10
ENSMUSG000000090015	Gm15446	1500	-0.8872	3.91E-18	2.35E-14
ENSMUSG000000082286		5152	-1.2830	2.63E-38	1.98E-34

10

20

30

40

【0132】

DE 遺伝子の大部分が、Myo1a が正常に発現される DRG ニューロンに固有であったことは驚くべきことではないが (図 1A ~ G)、少数 (14 個) の DE 遺伝子は、DRG 及び SC ニューロンの両方においてデレギュレーションされており、DE 遺伝子 18 個が SC ニューロンに固有であった (図 3A 及び 3B)。RNA seq データを確認するために、本発明者らは、定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) を使用して、両組織においてディファレンシャルに発現された少数の遺伝子に注目した。Myo1a KO マウスでは、両組織において、Nnt、Gabra2 及び Wdfy1 は非常に有意な増加を示した (図 3C)。しかしながら、本発明者らは、ダウンレギュレーションされた遺伝子のディファレンシャルな発現を確認することができなかった (データは示さず)。

【0133】

本発明者らの行動実験によって明らかになったイオンチャネル型 GABA 作動性神経伝達の Myo1a KO マウス選択的变化により、本発明者らは Gabra2 遺伝子に注目した。Gabra2 は、Myo1a KO マウスにおいて発現の変化を示した唯一の GABA レセプターサブユニットであった (表 4)。

【表 4】

表4:

GABA _A サブユニット	平均発現レベル (FPKM)				
	DRG		脊髄		
	WT	KO	WT	KO	
GABRA1	3707	3710	3761	3445	10
GABRA2	2271	5867	4131	12799	
GABRA3	817	835	7977	8092	
GABRA4	85	72	2620	2589	
GABRA5	381	391	5615	6421	
GABRA6	0	0	8	2	
GABRB1	359	417	4383	4562	
GABRB2	692	601	1574	1736	20
GABRB3	6225	6225	14167	15023	
GABRG1	2227	2082	2613	2827	
GABRG2	4193	4227	8822	9244	
GABRG3	136	187	656	689	
GABRD	34	29	35	48	
GABRE	44	38	50	36	
GABRP	1	1	6	2	30
GABRQ	12	22	365	365	

【 0 1 3 4 】

qRT-PCRの結果を補足するために、本発明者らは、in situハイブリダイゼーション及び免疫組織化学を使用した。in situハイブリダイゼーションを使用して、本発明者らは、DRGでは、Gabra2のアプレギュレーションがかなり明確であり、大きなサイズのニューロンにおけるアプレギュレーションは、SCよりも非常に強いことを見出した(図3D)。免疫組織化学を使用して、本発明者らは、一次求心性終末及び局所介在ニューロンが混在するSCの後角では、Gabra2のアプレギュレーションがGABRA2タンパク質の有意な増加を伴っていたことを確認した(図3E及び3F)。重要なことに、GABRA2の選択的アプレギュレーションと一致して(表4)、本発明者らは、2つの遺伝子型間で、GABRA1(1サブユニット)の免疫応答性に差異はないことを見出した(図3G)。最後に、GABRA2のアプレギュレーションがGABA_A-R機能に影響を与えるかを試験するために、本発明者らは、培養WT及びMyo1a KO Venus発現C-LTMRにおいて全細胞パッチクランプ記録を実施した。本発明者らは、両遺伝子型において、漸増濃度のムシモールのバス適用が同様の電流振幅をトリガーしたことを見出したが(図4A及び4B)、これは、GABRA2のアプレギュレーションが、その選択的アゴニストであるムシモールに応じてGABA_A-R応答を変化させなかったことを実証している。

【 0 1 3 5 】

炎症 Myo1a KOマウスでは、第II層介在ニューロンの興奮性グルタミン酸作動性活性のムシモール誘発性増加が大幅に損なわれる。

ムシモールの鎮痛効果に対する Myo1a KOマウスの非感受性を合理的に説明するために、本発明者らは、SC切片に対する全細胞パッチクランプ記録を使用した。最初に、急性条件下及び炎症後（カラギーナン及びザイモサン）の内部第II層ニューロンの一連の電気生理学的特性の徹底的な特性評価により、WTマウス及び Myo1a KOマウス間で差異はないことが明らかになった（図8）。次いで、本発明者らは、急性条件下及びザイモサン炎症後において、WT及び Myo1a KOマウスの第II層ニューロンにおける自発性興奮性シナプス後電流（sEPSC）に対するムシモールのバス適用の発生率を調査した。これらの条件下では、2つの遺伝子型間で、sEPSCの全平均振幅は類似していた（データは示さず）。ナীবWTマウスでは、左方向へのsEPSC間隔累積分布曲線のシフトによって示されているように、5 μ Mムシモールのバス適用は、sEPSC頻度の有意な増加を誘導した（図4C）。ザイモサンで炎症を起こしたWTマウス由来の切片では、この効果はほぼ倍増した（図4E）。興味深いことに、Myo1a KOマウス由来のナীব切片では、ムシモールは、sEPSC頻度の劇的な544%の増加を誘導した（図4D）。しかしながら、ムシモールのバス適用はsEPSC頻度に対して効果がなかったように、ザイモサン炎症KOマウスから得られた切片では、この効果は完全に喪失したが（図4F）、これは、本発明者らが、傷害後におけるムシモールの鎮痛効果に対する Myo1a KOマウスの非感受性を観察したことをさらに裏付けている（図2D及び2F）。

【0136】

結論

これらの実験では、本発明者らは、MYO1Aの喪失が、可逆的な傷害誘発性急性疼痛を長期間型の不可逆的な疼痛に変質させたことを示した。2つの炎症性疼痛モデル、1つの神経因性疼痛モデル及び1つの術後疼痛モデルにおいて、この疼痛の慢性化は機械的感受性に対して選択的であったが、これは、MYO1Aの喪失が、個体が傷害誘発性慢性疼痛を発症する素因となることを示唆しており、これらのマウスが、急性疼痛から慢性疼痛への移行をトリガーする細胞機構及び分子機構を解明するための理想的な動物モデルであることを示している。実際、本発明者らは、Myo1a KOマウスにおける傷害誘発性機械的過敏症は、オピオイド、パクロフェン、プレガバリン、TAF4A及びタウリンによって一時的に回復され得るが、ムシモール及びジアゼパムによって回復され得ないので、MYO1Aの喪失は、イオンチャネル型GABA作動性シグナリングを選択的に損なったことを見出した。本発明者らはまた、MYO1Aの喪失が、GABA_A-Rの2サブユニットの構成的アップレギュレーションをもたらしたことを見出したが、これは、このサブユニットの発現の変化が傷害誘発性疼痛の慢性化の過程に関与する可能性を示唆している。

【0137】

慢性疼痛は深刻かつ高度に不均質な医療問題であり、罹患率は世界人口の20~30%で変動する(Bouhassira et al., 2008; Breivik et al., 2006)。慢性疼痛を発症する個体がごく一部であることを考慮すると、遺伝的因子の寄与が想定されている(Belfer et al., 2015; Devor, 2004; Macrae, 2008; Tegeder et al., 2006; Voscopoulos and Lema, 2010)。本明細書では、本発明者らは、4つの異なる疼痛パラダイムを使用して、Myo1a KOマウスが傷害後に不可逆的な慢性疼痛を発症したことを示したが、これは、MYO1Aの喪失と慢性疼痛の発症との因果関係を実証している。非常に重要なことに、本発明者らは、炎症の状況下において、Myo1a^{+/+}マウスにおけるMyo1a遺伝子の1コピーの喪失が、長期間型の不可逆的な機械的疼痛を誘発したことを見出したが、これは、傷害誘発性慢性疼痛を発症する素因遺伝子としてのMyo1aの寄与をさらに裏付けている（図7I）。

【0138】

行動薬理学を使用して、本発明者らは、Myo1a KOマウスでは、ムシモールによ

って傷害誘発性機械的過敏症を回復させることができないことを示した。このイオンチャンネル型 GABA 作動性シグナリング障害は、電気生理学的記録によってさらに実証され、本発明者らは、急性条件下では、ムシモールが、第 I 層介在ニューロンの興奮性グルタミン酸作動性活性の劇的な増加を誘発したのに対して、炎症後、この効果が完全に消失したことを示した。本発明者らはまた、ナイーブ WT 及び Myo1a KO マウスでは、GABA_A-R ビククリン (bicuculline) の選択的アンタゴニストが同様の機械的過敏症を誘発したことを示したが (図 7 J)、これは、急性条件下の Myo1a KO マウスでは、GABA_A-R が機能的であることを実証している。まとめると、これらのデータは、傷害が脊髄 GABA_A-R の活性状態から不活性状態へのシフトを引き起こし、Myo1a KO マウスにおけるイオンチャンネル型 GABA 作動性神経伝達をさらにサイレンシングして慢性疼痛の発症をもたらすことを示している。この現象に対する説得力のある 1 つの説明は、Myo1a KO マウスでは、傷害が GABA_A-R の大規模なインターナリゼーションを誘導するというものである。実際、致命的な難治性痙攣性てんかん重積状態 (SE) が実験的に誘発された動物では、エンドサイトーシスの増強に起因するシナプス GABA_A-R の減少が観察されている (Naylor et al., 2005; Terunuma et al., 2008)。興味深いことに、表面レセプターのこの減少は、ベンゾジアゼピン感受性サブユニットを含有する GABA_A-R を主にターゲティングし、これにより、ベンゾジアゼピンに対する SE 患者の薬理耐性及び発作の非終結性の両方が説明される。注目すべきことに、本発明者らは、傷害条件下では、Myo1a KO マウスはムシモール及び DZP に対して完全に非感受性であり、これらの同じ条件下において、傷害誘発性機械的過敏症が確立されると、これらのマウスでは、それが不可逆的になることを実証した。

10

20

【0139】

観察された表現型に対する別の可能な説明は、本発明者らの RNA ディープシーケンシングデータによるものであった。本発明者らは、MYO1A の喪失が、安定状態の DRG 及び SC ニューロンの両方において Gabra2 の大規模かつ選択的なアップレギュレーションを伴っていたことを見出したが、これは、この発現の変化が、観察された傷害誘発性疼痛の慢性化に関与する可能性が高いことを示している。本発明者らは、gabra2 のアップレギュレーションが GABRA2 タンパク質の有意な増加をもたらしたことを確認したが、Myo1a KO CLTMR では、この増加は、ムシモール誘発性電流の振幅に対して効果がない。GABRA2 が、DRG 及び SC ニューロンにおいてディファレンシャルに発現される唯一の GABA_A-R サブユニットであったことを考慮すると、本発明者らのデータは、GABRA2 のアップレギュレーションが、より多くの GABA_A-R が 2 サブユニットを含有する方向にバランスをシフトさせることに寄与する可能性が高いことを示唆している。この場合、2 及び 1 は、DRG において発現される主なサブユニットであるので、大きなサイズの一次求心性ニューロンでは、2 / 1 比が主に影響を受けるであろう (図 3 D を参照のこと)。

30

【0140】

この仮説と一致して、最近の研究では、難治性痙攣性てんかん重積状態及び難治性てんかんを有する患者は、1 含有レセプターを犠牲にして、有意に多くの 2 含有 GABA_A-R を有することが実証された (Loddenkemper et al., 2014)。2 含有 GABA_A-R が、他の サブユニットを含有する GABA_A-R よりも、過剰なインターナリゼーションをする傾向があるかを調べる将来の研究が必要である。

40

【0141】

結論として、傷害条件下の Myo1a KO マウスにおける GABA_A-R 機能を損なう正確な機構は解明されなかったが、本発明者らは、機能喪失型突然変異が傷害後に不可逆的な疼痛状態をもたらす最初のマウスモデルを記載する。本発明者らはまた、傷害誘発性慢性疼痛の発症の予測遺伝的因子として Myo1a 遺伝子を真剣に検討すべきであることを強く主張し、イオンチャンネル型 GABA 作動性系が、急性疼痛から慢性疼痛への移行に寄与する主な機構であると指摘する。本発明者らの研究はまた、(i) 急性疼痛から慢性疼痛への移行をトリガーする分子機構及び細胞機構の理解を深めるために、並びに (i

50

i) 慢性疼痛の確立を予防するための「アラカルト」薬理的療法を設計するために使用することができる強力な前臨床動物モデルを提供する。

【 0 1 4 2 】

参考文献

【表 5】

Ahmadi, S., Lippross, S., Neuhuber, W.L., and Zeilhofer, H.U. (2002). PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 5, 34-40.

Belfer, I., Dai, F., Kehlet, H., Finelli, P., Qin, L., Bittner, R., and Aasvang, E.K. (2015). Association of functional variations in COMT and GCH1 genes with postherniotomy pain and related impairment. *Pain* 156, 273-279.

10

Bennett, G.J., and Xie, Y.K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33, 87-107.

Bouhassira, D., Lanteri-Minet, M., Attal, N., Laurent, B., and Touboul, C. (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136, 380-387.

Bourane, S., Duan, B., Koch, S.C., Dalet, A., Britz, O., Garcia-Campmany, L., Kim, E., Cheng, L., Ghosh, A., Ma, Q., and Goulding, M. (2015a). Gate control of mechanical itch by a subpopulation of spinal cord interneurons. *Science* 350, 550-554.

20

Bourane, S., Grossmann, K.S., Britz, O., Dalet, A., Del Barrio, M.G., Stam, F.J., Garcia-Campmany, L., Koch, S., and Goulding, M. (2015b). Identification of a spinal circuit for light touch and fine motor control. *Cell* 160, 503-515.

Braathen, G.J., Hoyer, H., Busk, O.L., Tveten, K., Skjelbred, C.F., and Russell, M.B. (2015). Variants in the genes DCTN2, DNAH10, LRIG3, and MYO1A are associated with intermediate Charcot-Marie-Tooth disease in a Norwegian family. *Acta neurologica Scandinavica*.

30

Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10, 287-333.

Brennan, T.J. (1999). Postoperative Models of Nociception. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 40, 129-136.

Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., and Yaksh, T.L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53, 55-63.

Coull, J.A., Beggs, S., Boudreau, D., Boivin, D., Tsuda, M., Inoue, K., Gravel, C., Salter, M.W., and De Koninck, Y. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-1021.

40

Coull, J.A., Boudreau, D., Bachand, K., Prescott, S.A., Nault, F., Sik, A., De Koninck, P., and De Koninck, Y. (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424, 938-942.

Decosterd, I., and Woolf, C.J. (2000). Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158.

50

Delfini, M.C., Mantilleri, A., Gaillard, S., Hao, J., Reynders, A., Malapert, P., Alonso, S., Francois, A., Barrere, C., Seal, R., *et al.* (2013). TFAFA4, a chemokine-like protein, modulates injury-induced mechanical and chemical pain hypersensitivity in mice. *Cell Rep* 5, 378-388.

Devor, M. (2004). Evidence for heritability of pain in patients with traumatic neuropathy. *Pain* 108, 200-201; author reply 202.

Donaudy, F., Ferrara, A., Esposito, L., Hertzano, R., Ben-David, O., Bell, R.E., Melchionda, S., Zelante, L., Avraham, K.B., and Gasparini, P. (2003). Multiple mutations of MYO1A, a cochlear-expressed gene, in sensorineural hearing loss. *Am J Hum Genet* 72, 1571-1577. 10

Duan, B., Cheng, L., Bourane, S., Britz, O., Padilla, C., Garcia-Campmany, L., Krashes, M., Knowlton, W., Velasquez, T., Ren, X., *et al.* (2014). Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* 159, 1417-1432.

Eisenberger, T., Di Donato, N., Baig, S.M., Neuhaus, C., Beyer, A., Decker, E., Murbe, D., Decker, C., Bergmann, C., and Bolz, H.J. (2014). Targeted and genomewide NGS data disqualify mutations in MYO1A, the "DFNA48 gene", as a cause of deafness. *Hum Mutat* 35, 565-570.

FASTQC (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data v. 0.11.3 (http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/, 2010). 20

Foster, E., Wildner, H., Tudeau, L., Haueter, S., Ralvenius, W.T., Jegen, M., Johannssen, H., Hosli, L., Haenraets, K., Ghanem, A., *et al.* (2015). Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. *Neuron* 85, 1289-1304.

Gaillard, S., Lo Re, L., Mantilleri, A., Hepp, R., Urien, L., Malapert, P., Alonso, S., Deage, M., Kambrun, C., Landry, M., *et al.* (2014). GINIP, a Galphai-interacting protein, functions as a key modulator of peripheral GABAB receptor-mediated analgesia. *Neuron* 84, 123-136. 30

Gilron, I., Jensen, T.S., and Dickenson, A.H. (2013). Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. *The Lancet Neurology* 12, 1084-1095.

Harvey, R.J., Depner, U.B., Wassle, H., Ahmadi, S., Heindl, C., Reinold, H., Smart, T.G., Harvey, K., Schutz, B., Abo-Salem, O.M., *et al.* (2004). GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 304, 884-887.

Hulse, R.P., Donaldson, L.F., and Wynick, D. (2012). Differential roles of galanin on mechanical and cooling responses at the primary afferent nociceptor. *Mol Pain* 8, 41. 40

Kehlet, H., Jensen, T.S., and Woolf, C.J. (2006). Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention. *Lancet* 367, 1618-1625.

Kravtsov, D.V., Caputo, C., Collaco, A., Hoekstra, N., Egan, M.E., Mooseker, M.S., and Ameen, N.A. (2012). Myosin Ia is required for CFTR brush border membrane trafficking and ion transport in the mouse small intestine. *Traffic* 13, 1072-1082.

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2013). The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res* 41, e108. 50

Liao, Y., Smyth, G.K., and Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30, 923-930.

Loddenkemper, T., Talos, D.M., Cleary, R.T., Joseph, A., Sanchez Fernandez, I., Alexopoulos, A., Kotagal, P., Najm, I., and Jensen, F.E. (2014). Subunit composition of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors in status epilepticus. *Epilepsy research* 108, 605-615.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15, 550.

Macrae, W.A. (2008). Chronic post-surgical pain: 10 years on. *Br J Anaesth* 101, 77-86. 10

Mazzolini, R., Dopeso, H., Mateo-Lozano, S., Chang, W., Rodrigues, P., Bazzocco, S., Alazzouzi, H., Landolfi, S., Hernandez-Losa, J., Andretta, E., *et al.* (2012). Brush border myosin Ia has tumor suppressor activity in the intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 1530-1535.

Muller, F., Heinke, B., and Sandkuhler, J. (2003). Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience* 122, 799-805.

Munro, G., Ahring, P.K., and Mirza, N.R. (2009). Developing analgesics by enhancing spinal inhibition after injury: GABAA receptor subtypes as novel targets. *Trends Pharmacol Sci* 30, 453-459. 20

Naylor, D.E., Liu, H., and Wasterlain, C.G. (2005). Trafficking of GABA(A) receptors, loss of inhibition, and a mechanism for pharmacoresistance in status epilepticus. *J Neurosci* 25, 7724-7733.

Peirs, C., Williams, S.P., Zhao, X., Walsh, C.E., Gedeon, J.Y., Cagle, N.E., Goldring, A.C., Hioki, H., Liu, Z., Marell, P.S., and Seal, R.P. (2015). Dorsal Horn Circuits for Persistent Mechanical Pain. *Neuron* 87, 797-812.

Petitjean, H., Pawlowski, S.A., Fraine, S.L., Sharif, B., Hamad, D., Fatima, T., Berg, J., Brown, C.M., Jan, L.Y., Ribeiro-da-Silva, A., *et al.* (2015). Dorsal Horn Parvalbumin Neurons Are Gate-Keepers of Touch-Evoked Pain after Nerve Injury. *Cell reports* 13, 1246-1257. 30

Reynders, A., Mantilleri, A., Malapert, P., Rialle, S., Nidelet, S., Laffray, S., Beurrier, C., Bourinet, E., and Moqrich, A. (2015). Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs. *Cell reports*.

Sandkuhler, J. (2009). Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89, 707-758.

Reynders, A., Mantilleri, A., Malapert, P., Rialle, S., Nidelet, S., Laffray, S., Beurrier, C., Bourinet, E., and Moqrich, A. (2015). Transcriptional Profiling of Cutaneous MRGPRD Free Nerve Endings and C-LTMRs. *Cell reports*. 40

Shields, S.D., Eckert, W.A., 3rd, and Basbaum, A.I. (2003). Spared nerve injury model of neuropathic pain in the mouse: a behavioral and anatomic analysis. *J Pain* 4, 465-470.

Tegeder, I., Costigan, M., Griffin, R.S., Abele, A., Belfer, I., Schmidt, H., Ehnert, C., Nejjim, J., Marian, C., Scholz, J., *et al.* (2006). GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. *Nat Med* 12, 1269-1277.

Terunuma, M., Xu, J., Vithlani, M., Sieghart, W., Kittler, J., Pangalos, M., Haydon, P.G., Coulter, D.A., and Moss, S.J. (2008). Deficits in phosphorylation of GABA(A) receptors by intimately associated protein kinase C activity underlie compromised synaptic inhibition during status epilepticus. *J Neurosci* 28, 376-384.

Tyska, M.J., Mackey, A.T., Huang, J.D., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Mooseker, M.S. (2005). Myosin-1a is critical for normal brush border structure and composition. *Mol Biol Cell* 16, 2443-2457.

Voscopoulos, C., and Lema, M. (2010). When does acute pain become chronic? *Br J Anaesth* 105 Suppl 1, i69-85.

10

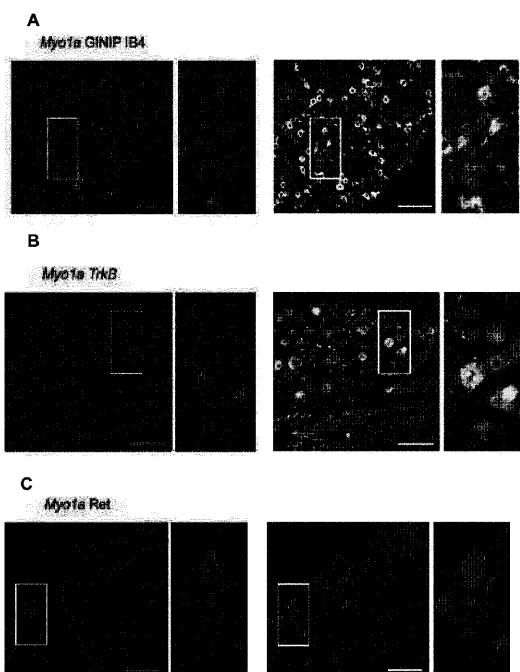
Wang, L., Wang, S., and Li, W. (2012). RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 28, 2184-2185.

Witschi, R., Punnakkal, P., Paul, J., Walczak, J.S., Cervero, F., Fritschy, J.M., Kuner, R., Keist, R., Rudolph, U., and Zeilhofer, H.U. (2011). Presynaptic alpha2-GABAA receptors in primary afferent depolarization and spinal pain control. *J Neurosci* 31, 8134-8142.

Zeilhofer, H.U., Wildner, H., and Yevenes, G.E. (2012). Fast synaptic inhibition in spinal sensory processing and pain control. *Physiol Rev* 92, 193-235.

20

【 図 1 - 1 】



【 図 1 - 2 】

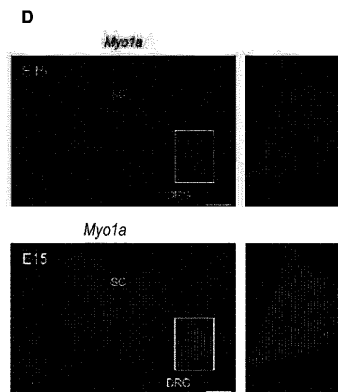
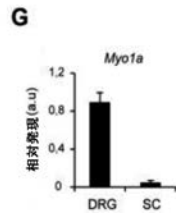
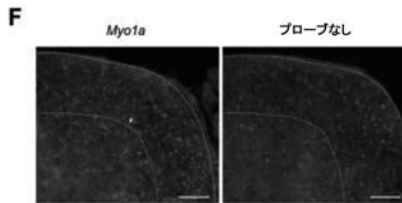
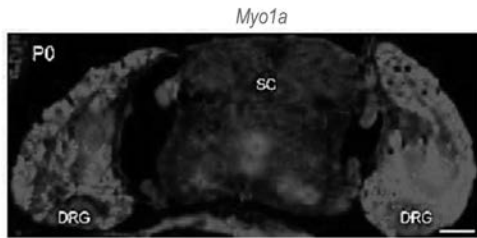
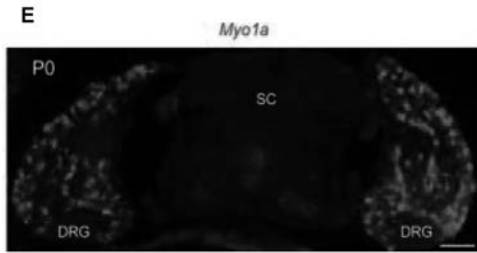


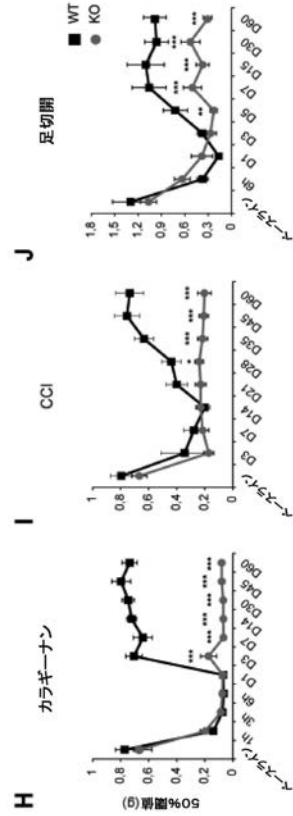
FIGURE 1 (Following)

FIGURE 1

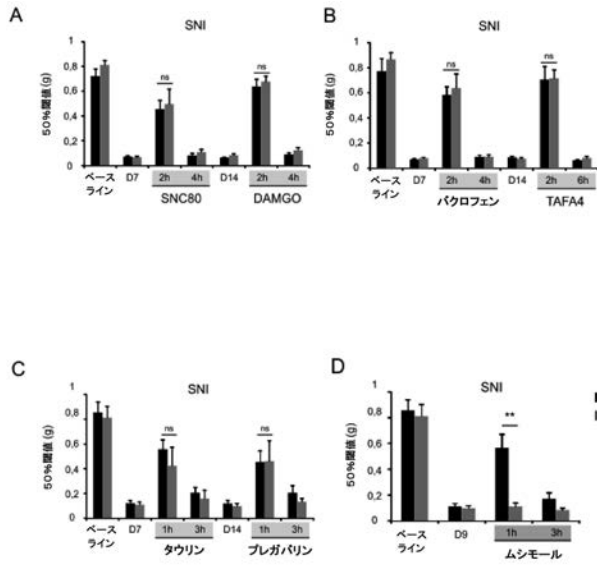
【 図 1 - 3 】



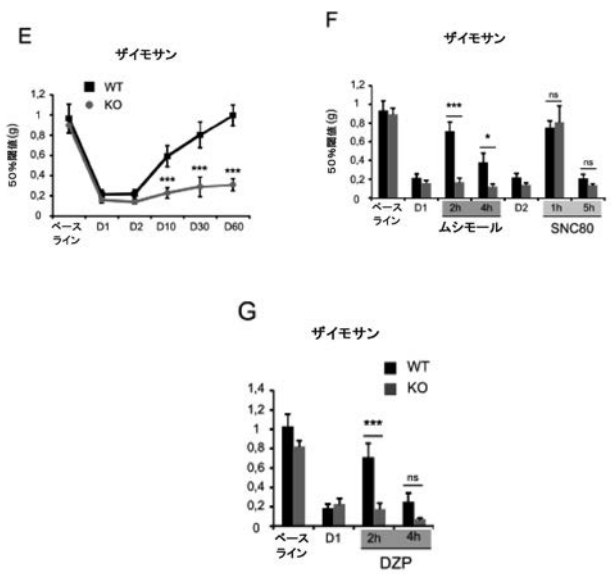
【 図 1 - 4 】



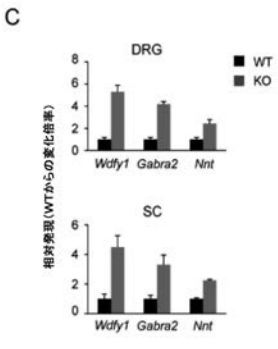
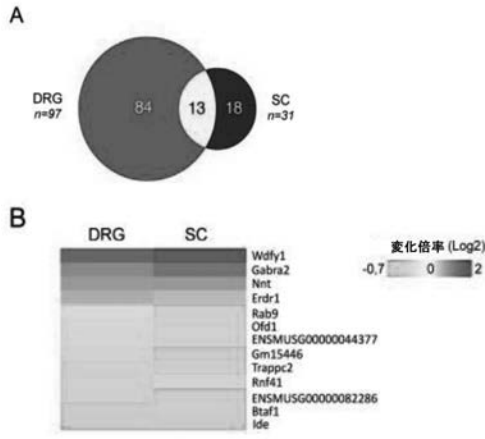
【 図 2 - 1 】



【 図 2 - 2 】



【 図 3 - 1 】



【 図 3 - 2 】

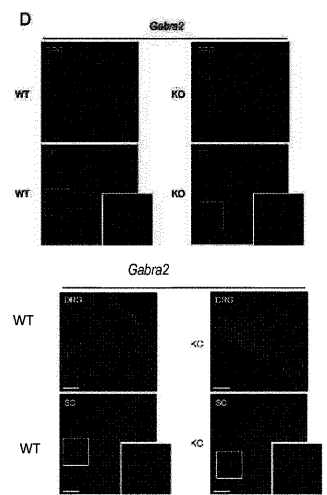
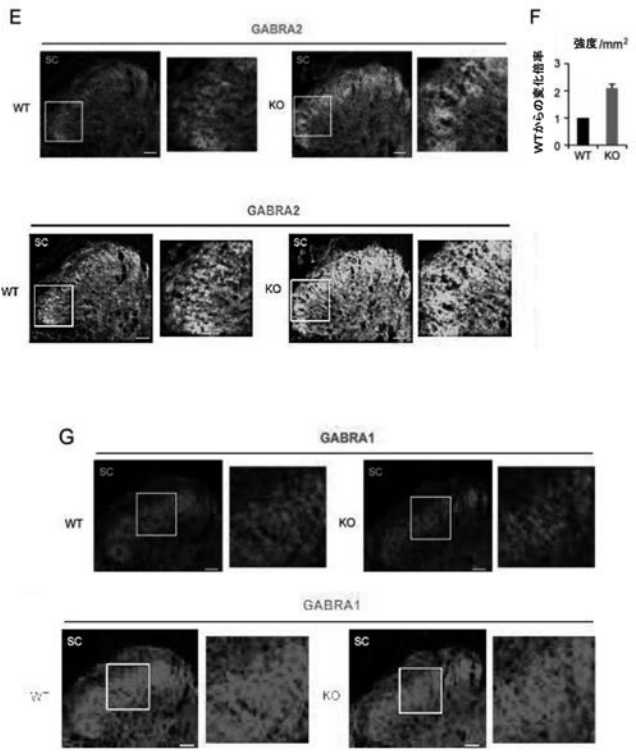
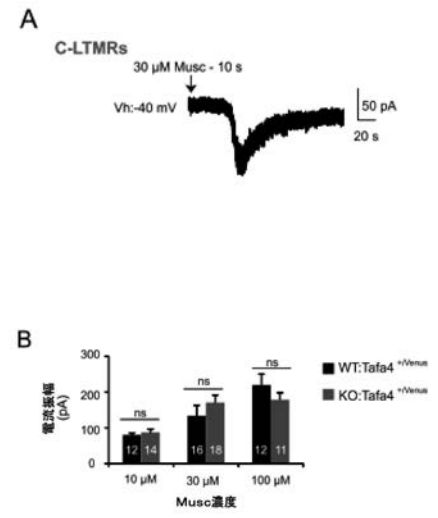


FIGURE 3 (Following)

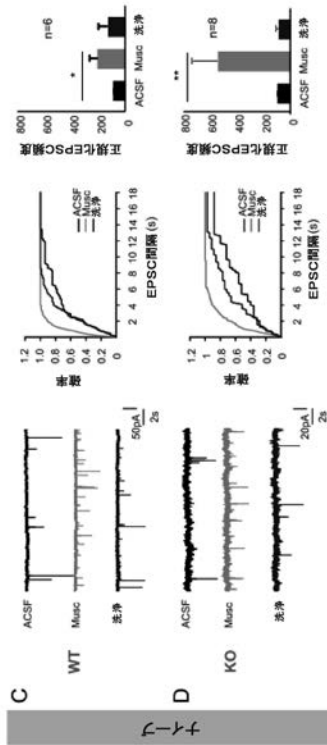
【 図 3 - 3 】



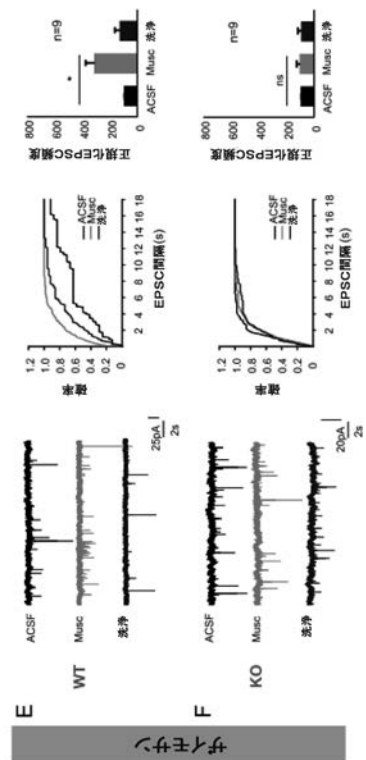
【 図 4 - 1 】



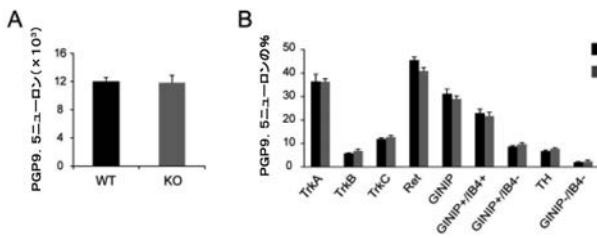
【 図 4 - 2 】



【 図 4 - 3 】



【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】

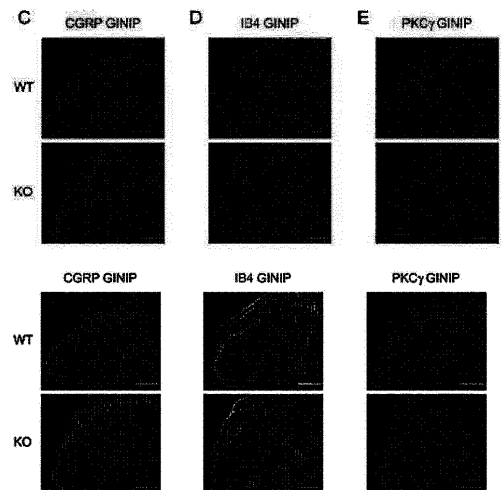
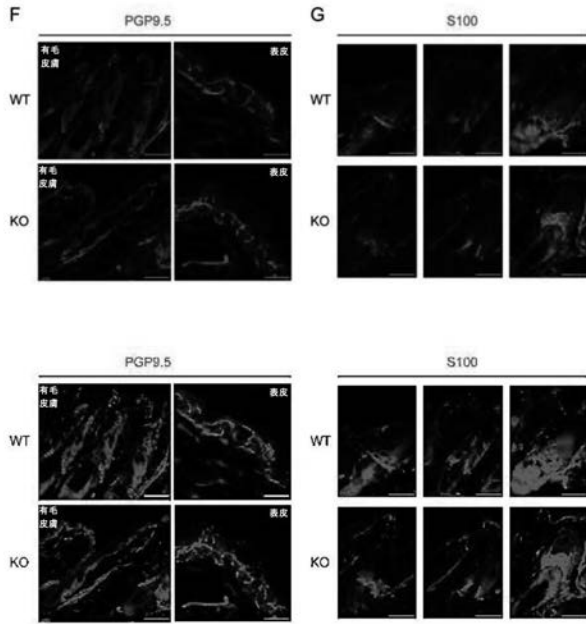
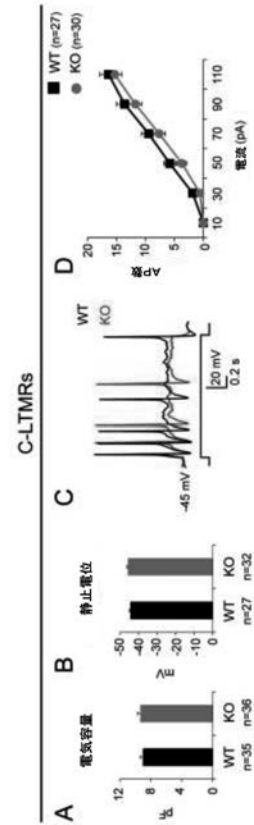


FIGURE 5 (Following)

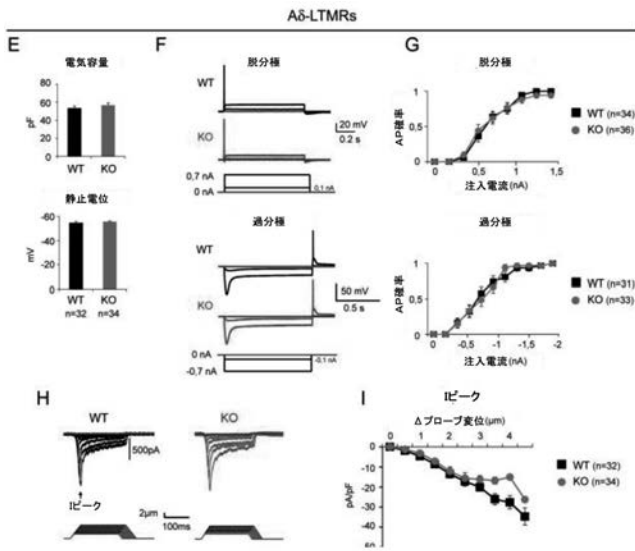
【 図 5 - 3 】



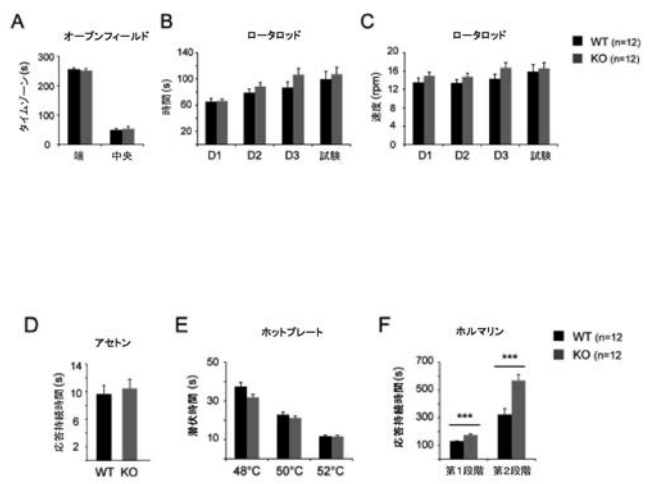
【 図 6 - 1 】



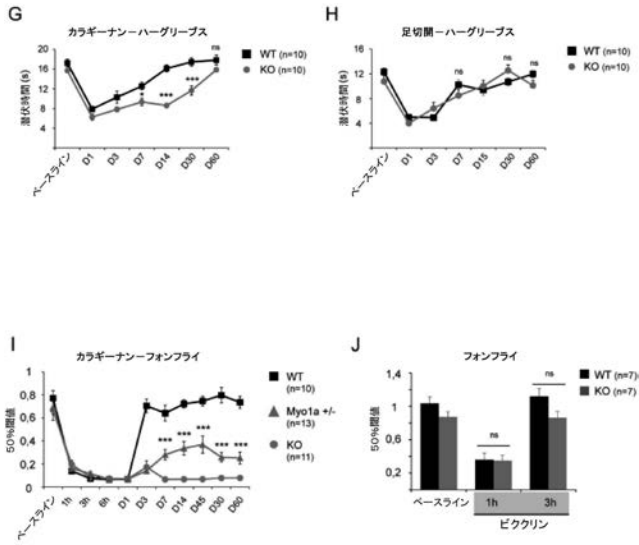
【 図 6 - 2 】



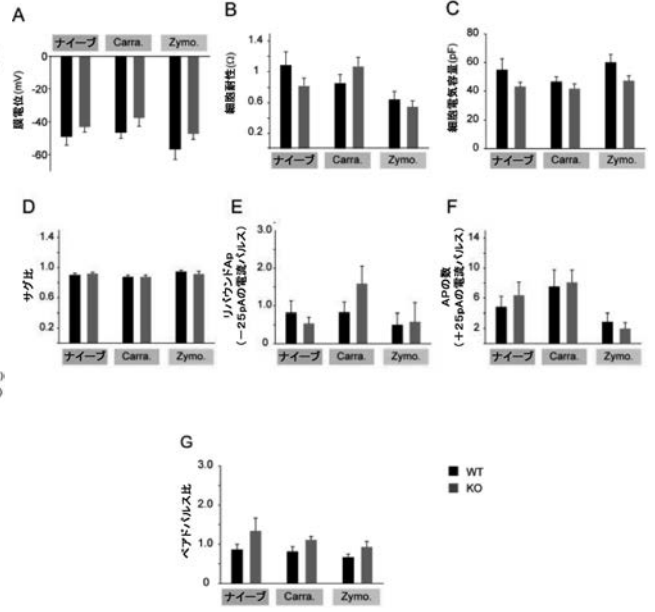
【 図 7 - 1 】



【 図 7 - 2 】



【 図 8 】



【 配 列 表 】

2019512213000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/055354

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68 A61K31/7088 A61K31/713 G01N33/50 A01K67/027 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q A61K G01N A01K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/016475 A2 (GEN HOSPITAL CORP [US]; BAYER AG [DE]; WOLF CLIFFORD [US]; D URSO DON) 27 February 2003 (2003-02-27) page 598 pages 13,15,17	6-9,12 1-5,13
A	-----	
X	WO 2004/044178 A2 (GENENTECH INC [US]; SMITH VICTORIA [US]) 27 May 2004 (2004-05-27) pages 2-3,23	7
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 17 May 2017		Date of mailing of the international search report 01/06/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Knudsen, Henrik

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/055354

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRANCESCA DONAUDY ET AL: "Multiple Mutations of MYO1A, a Cochlear-Expressed Gene, in Sensorineural Hearing Loss", AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS, vol. 72, no. 6, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 1571-1577, XP055297482, US ISSN: 0002-9297, DOI: 10.1086/375654 abstract -----	10,11
X	JUNG HO KIM: "Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer", WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY, vol. 20, no. 15, 1 January 2014 (2014-01-01), page 4230, XP055271940, CN ISSN: 1007-9327, DOI: 10.3748/wjg.v20.i15.4230 page 4235, right-hand column, paragraph 3 -----	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/055354

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03016475	A2	27-02-2003	
		AU 2002324700 A1	03-03-2003
		CA 2457819 A1	27-02-2003
		EP 1478772 A2	24-11-2004
		US 2007015145 A1	18-01-2007
		WO 03016475 A2	27-02-2003

WO 2004044178	A2	27-05-2004	
		AU 2003295511 A1	03-06-2004
		CA 2503621 A1	27-05-2004
		EP 1578940 A2	28-09-2005
		US 2004146907 A1	29-07-2004
		WO 2004044178 A2	27-05-2004

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/47 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 Q 1/6883 (2018.01)	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/6883	Z
C 1 2 Q 1/6834 (2018.01)	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/6874 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6834	Z
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/6874	Z
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	C 1 2 M 1/00	A
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
	A 6 1 P 29/00	
	A 6 1 K 38/17	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . P H O T O S H O P

(71) 出願人 595040744

サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シャンティフィック
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
フランス国、75016 パリ、リュ・ミシェル・アンジュ 3

(74) 代理人 110001508

特許業務法人 津国

(72) 発明者 モクリッチ、アブデルアジズ

フランス国、13009 マルセイユ、パティマン・ル・ミストラル、リュ・アンリ・トマシ 7
4

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA35 AA40 CA25 CA26 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02
4B029 AA07 BB11 BB15 BB20 CC01 FA15
4B063 QA01 QA13 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QQ79 QR32 QR35
QR48 QR55 QR62 QR72 QR77 QR82 QS25 QS34 QS36 QX01
4C084 AA02 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA25 NA14
ZA081 ZB212 ZC412
4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 EA50 FA74

专利名称(译)	使用MYO1A预测急性疼痛转变为慢性疼痛和使用MYO1A治疗疼痛		
公开(公告)号	JP2019512213A	公开(公告)日	2019-05-16
申请号	JP2018543653	申请日	2017-03-07
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	Université de Strasbourg - 马赛中心法国国家，香提网络点击		
发明人	モクリッチ, アブデルアジズ		
IPC分类号	C12N15/12 G01N33/50 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/15 C07K14/47 C12Q1/6883 C12Q1/02 C12Q1/6834 C12Q1/6874 C12M1/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P43/00 A61P25/04 A61P29/00 A61K38/17		
CPC分类号	A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/0356 A61K31/7088 A61K31/7105 A61K31/711 A61K31/713 A61P25/04 A61P29/00 C12Q1/6883 C12Q2600/112 C12Q2600/118 C12Q2600/136 C12Q2600/156 C12Q2600/158 G01N33/5088 G01N2800/2842 C12Q1/025		
FI分类号	C12N15/12.ZNA G01N33/50.P G01N33/68 G01N33/53.M G01N33/15.Z G01N33/50.Z C07K14/47 C12Q1/6883.Z C12Q1/02 C12Q1/6834.Z C12Q1/6874.Z C12M1/00.A A61K45/00 A61K48/00 A61P43/00.111 A61P43/00.105 A61P25/04 A61P29/00 A61K38/17		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB15 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/FA15 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA25 4C084/NA14 4C084/ZA081 4C084/ZB212 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2016305257 2016-03-08 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及鉴定Myo1a作为用于将急性疼痛转化为慢性疼痛并作为治疗靶标的生物标志物。特别地，本发明涉及用于评估受试者易患损伤诱发的慢性机械性疼痛和/或促炎性慢性热痛的倾向的产品和方法，特别是在哺乳动物，优选为人类受试者中。适当的。更具体地，本发明优选地使用MYO1A基因作为生物标记物来评估受试者发展为损伤诱导的慢性机械性疼痛和/或促炎性慢性热痛的倾向。关于本文提供了对MYO1A具有特异性的结合试剂，包含其的组合物，装置，试剂盒和动物模型，其用于评估患有慢性疼痛的受试者的易感性。进一步描述的使用。本发明还涉及用于诊断，预防，控制或治疗慢性疼痛的产品和方法。

FIGURE 2

