「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」
平成22年度採択研究代表者

H24 年度
実績報告

井上　和秀

九州大学大学院薬学研究院・教授

脳内免疫担当細胞ミクログリアを主軸とする慢性難治性疼痛発症メカニズムの解明

§1. 研究実施体制

(1)「井上」グループ

①研究代表者:井上　和秀　(九州大学大学院薬学研究院・教授)

②研究項目

・各種神経障害モデルを利用した脊髄後角の慢性炎症状態の把握

・細胞外ヌクレオチドシグナル系による脊髄後角ミクログリア均等分布の破綻と炎症の慢性化メカニズムの解明

・慢性炎症に連動したニューロン機能と痛覚伝達系の変調メカニズムの解明

・3次元ゲル培養系を用いたミクログリアおよびアストロサイトの動態解析

・貪食刺激によるミクログリアの機能変化の解析

(2)「木山」グループ

① 主たる共同研究者:木山　博資　(名古屋大学大学院医学研究科、教授)

② 研究項目

・神経障害疼痛モデルでの炎症・免疫系メディエーターの発現プロファイリング

(3)「中西」グループ

① 主たる共同研究者:中西　博　(九州大学大学院歯学研究院、教授)

② 研究項目:

・ ミクログリアの神経シナプス伝達に及ぼす炎症性サイトカイン・ケモカインならびにヌクレオチドの放出による化学的ならびに物理的影響の解析

・ ミクログリアの活性化メカニズムの解析

§2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3－1)に対応する)

末梢神経損傷後に活性化するグリア細胞(特にミクログリア)とその活性化因子である細胞外ヌクレオチドによる慢性炎症のメカニズムを特定し，最終的には慢性炎症が神経機能異常および慢性疼痛を引き起こす仕組みを明らかにすることを目的に研究を行った。

直接的な神経損傷を加えずして恒常的な疼痛症状が生じる線維筋痛症モデル動物を用いて、脊髄後角におけるミクログリアの活性化状態を観察したところ、細胞体の肥大化など典型的な活性化形態を呈していた。一方、神経完全切断モデル（脊髄において安定的かつ顕著なミクログリアの活性化をもたらし、強力な痛みを誘発する）の脊髄ミクログリアにおいて、転写調節因子 IRF8 が神経障害性疼痛に関連する多くの液性因子・各種受容体の発現を制御することで、神経障害性疼痛発症に深く関わっていることを明らかにしたが(Masuda *et al.*, Cell Rep., 1:334-40, 2012)、同様に線維筋痛症モデル動物の脊髄ミクログリアにおいても IRF8 の顕著な発現増加が観察された。そこで、線維筋痛症モデル動物における痛み症状に、IRF8 を高発現した脊髄ミクログリアが関与するか否か明らかにするため、IRF8 欠損マウスを用いて検討した。その結果、野生型マウスで見られる痛み行動が、IRF8 欠損マウスではほぼ完全に消失した。以上の結果から、繊維筋痛症発症には IRF8 を発現した脊髄ミクログリアが重要な役割を果たしていると考えられる。

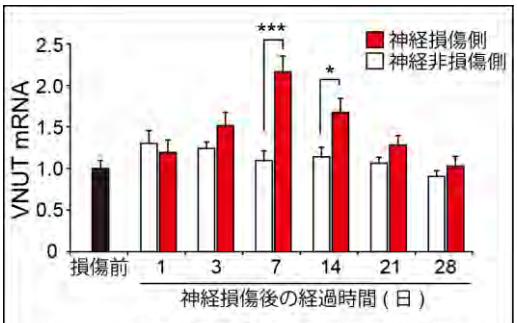

図１．神経損傷後の脊髄内 VNUT の発現変化

次に、脊髄における細胞外ヌクレオチドの供給メカニズムを明らかにするため、ヌクレオチドの放出に重要な小胞型ヌクレオチドトランスポーター VNUT に着目し、神経完全切断モデルの脊髄における発現量を解析したところ、神経損傷側脊髄内で顕著な発現増加が観察された(図１)。そこで、VNUT siRNA を作製し、モデル動物の脊髄内に投与することで、神経損傷後の痛覚閾値の低下に対する VNUT の役割について検討した。その結果、神経損傷を起因とする疼痛閾値の低下が、VNUT siRNA の投与により顕著に抑制された。つまり、末梢神経損傷後の脊髄内で発現増加する VNUT が神経障害性疼痛発症に重要な役割を果たすことが示唆されたことから、今後は *in situ* hybridization 法および細胞種特異的 VNUT 欠損マウス(飼育・交配中) 等を用いて疼痛発症に関与する VNUT 発現細胞種の特定を進めると同時に、ウィルスベクター

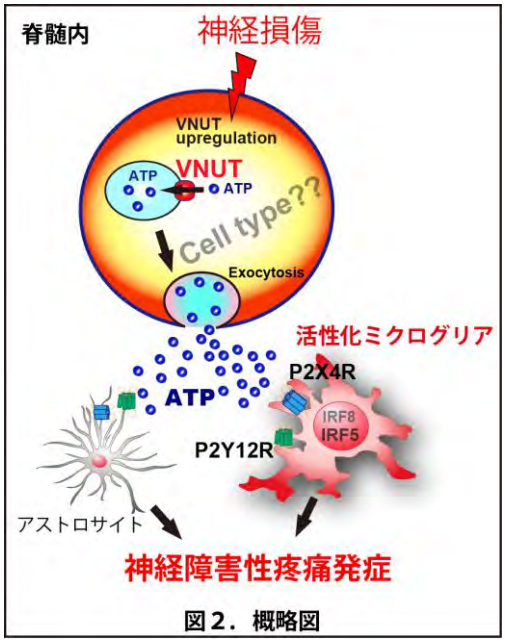

図２．概略図

を用いた遺伝子導入実験や VNUT 欠損マウスを用いて、神経障害性疼痛発症および脊髄炎症の慢性化に至る仕組みの解明を目指す(図２)。

また、同モデル動物の脊髄ミクログリアにおいて、IRF8 と同様に発現増加する転写調節因子として IRF5 を見出し、さらにその発現はミクログリアに限局していることが明らかになった。しかし、IRF5 の中枢神経系における役割については全くの不明であることから、今後はその役割について詳細に検討する。さらに、ミクログリアの貪食シグナル受容体である P2Y6 受容体に関しては、神経障害後の脊髄内において顕著な発現増加が観察され、その受容体下流シグナル分子として PKD が重要な役割を果たしていることを明らかにした (A-7)。今後は、脊髄における P2Y6 受容体の役割について詳細に解析すべく、欠損マウスを導入し現在飼育・交配を進めている。

脊髄後角でのミクログリアの活性化が慢性疼痛につながることは研究代表者らの研究で明らかであるが、ミクログリアの活性化を引き起こす ATP の放出メカニズムについては複数の可能性が示唆されている。本研究ではその可能性のひとつとして、障害を受けた一次知覚神経細胞のリソゾームを介する放出の可能性を明らかにした。培養した後根神経節細胞のリソゾームには ATP が存在し、リソゾームの開口放出を薬剤で促進することにより ATP が放出されることを示した。(B—1)

また、神経損傷モデル実験で得られた分子のうち、神経障害・炎症に関連する分子であると考えられる PAP-III/Reg-III (pancreatitis associated protein / regenerating gene III)については、その機能が不明であった。本研究ではその機能の一端を明らかにした。PAP-III は神経が障害を受けた時に発現し、損傷部位で分泌される。分泌された PAP-III の N 末はトリプシン様の酵素で直ちにプロセッシングを受ける。プロセッシングにより、PAP-III は重合し不溶性の線維状の構造をとる。この線維状構造物は神経軸索が再生する上で足場を提供する可能性があることを *in vitro* で証明した。(B—2)

プロファイリングの一貫としてマクロファージやモノサイト等の細胞とミクログリアとの間で DNA アレーを行ない、ミクログリアで比較的発現が多い分子に着目し、神経障害によるそれらの発現変化を検討した。本実験では、免疫炎症系に深く関わっている分子群が神経障害に応答してミクログリアで発現上昇していることが明らかになっており、現在これらのノックアウトマウスを用いてこれらの免疫炎症関連分子が慢性疼痛にいかに関わっているのかを解明を継続中である。

<u>1) 脊髄ミクログリアの産生するカテプシン B の炎症性疼痛における役割に関する研究</u>

カテプシン B 欠損ならびに特異的阻害剤(CA074Me)の脊髄腔内注入は炎症性疼痛の発症をほぼ完全に抑制することを見出した。一方、神経障害性疼痛はカテプシン B 欠損による影響を受けなかった。また、興味深いことにクロモグラニン A 刺激は NLRP3 インフラマソーム非依存的にカテプシン B により直接的にプロカスパーゼ 1 を活性化し IL-1β 産生分泌を誘導した。さらにクロモ

グラニン A は髄腔内注入によりカテプシン B 依存的に疼痛を誘導した。また、末梢炎症に伴い後根神経節ニューロンにおけるクロモグラニン A の増大が認められた。これらの結果より、末梢炎症に伴い後根神経節ニューロンで増大したクロモグラニン A はカテプシン B 依存的に脊髄ミクログリアにおける IL-1β 産生を誘導し、炎症性疼痛の発症に重要な役割を果たすことが強く示唆された（孫ほか, J Neurosci, 32, 11330-11342, 2012）。さらに、クロモグラニン A は TLR4 ならびに CD14 を介して NF-κB 経路を活性化し、プロ IL-1β ならびにプロカテプシン B 産生を誘導することを明らかにした（武ほか、再投稿中）。

2） ミクログリア分子時計によるシナプス強度調節に関する研究

脳内ではミクログリア特異的に発現している $P2Y_{12}$ レセプターならびにカテプシン S がミクログリアに発現する時計遺伝子の制御下にあり、どちらの分子の発現も覚醒期（午後 9 時）に最大となり、睡眠期（午前 9 時）に最小となることを見出した。さらに、$P2Y_{12}$ レセプターの阻害あるいはカテプシン S の欠失により、大脳皮質体性感覚野におけるミクログリアの突起伸縮ならびにシナプス強度の日内リズムが消失することを明らかにした（林ほか、投稿中）。これらの結果より、覚醒時に発現の増大した $P2Y_{12}$ レセプターの働きでミクログリアの突起を ATP の濃度勾配に沿って活動性の高いシナプス部に伸展すると考えられる。さらに、ミクログリアの突起から分泌されるカテプシン S は細胞外プロテオリシスによる細胞外マトリックス修飾により樹状突起スパインを退縮させ、最終的には睡眠期におけるシナプス強度の低下を引き起こすことが示唆された。睡眠期におけるシナプス強度の低下はシナプス可塑性や安定化において重要な役割を果たすことが知られており、ミクログリアが正常な脳機能の維持において不可欠である可能性も考えられる。現在、神経障害性ならびに炎症性疼痛の慢性化における大脳皮質体性感覚内ミクログリア分子時計の変容の可能性について解析中である。

§3. 成果発表等

（3－1） 原著論文発表

●論文詳細情報

1. K. Kuboyama, M. Tsuda, M. Tsutsui, Y. Toyohara, H. Tozaki-Saitoh, H.Shimokawa, N. Yanagihara and K. Inoue. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. Mol Pain 7:50 2011
2. Kataoka A, Koga Y, Uesugi A, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Inoue K.Involvement of vasodilator-stimulated phosphoprotein in UDP-induced microglial actin aggregation via PKC- and Rho-dependent pathways. Purinergic Signal. 2011 May 13. [Epub ahead of print]
3. Toyomitsu E, Tsuda M, Yamashita T, Tozaki-Saitoh H, Tanaka Y, Inoue K. CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. Purinergic Signal. 2012 Jan 6. [Epub ahead of print]
4. K. Ohsawa and S. Kohsaka, “Dynamic Motility of Microglia: Purinergic Modulation of Microglial Movement in the Normal and Pathological Brain”, Glia, Volume 59, Issue 12, pp.1793-1799, 2011 (DOI: 10.1002/glia.21238)
5. K. Ohsawa, T. Sanagi, Y. Nakamura, E. Suzuki, K. Inoue, S. Kohsaka, ”Adenosine A3 receptor is involved in ADP-induced microglial process extension and migration”, Journal of Neurochemistry, 2012 (DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07693.x)
6. H. Kumamaru, H. Saiwai, K. Kobayakawa, K. Kubota, N. van Rooijen, K. Inoue, Y. Iwamoto and S. Okada. Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures. Journal of Neuroinflammation 2012, 9:116 doi:10.1186/1742-2094-9-116 Published: 31 May 2012
7. Uesugi A, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Robaye B, Boeynaems JM, Inoue K. (2012) Involvement of protein kinase D in uridine diphosphate-induced microglial macropinocytosis and phagocytosis. Glia 60:1094-105 (DOI: 10.1002/glia.22337)
8. Toyomitsu E, Tsuda M, Yamashita T, Tozaki-Saitoh H, Tanaka Y, Inoue K. CCL2 promotes P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. Purinergic Signal. 2012 Jun;8(2):301-10. doi: 10.1007/s11302-011-9288-x. Epub 2012 Jan 6.
9. T. Masuda*, M. Tsuda*, R. Yoshinaga, H. Tozaki-Saitoh, K. Ozato, T. Tamura, K. Inoue. IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. Cell Rep. 2012 Apr 19;1(4):334-40
10. Igawa T, Higashi S, Abe Y, Ohkuri T, Tanaka H, Morimoto S, Yamashita T, Tsuda M, Inoue K, Ueda T. Preparation and characterization of a monoclonal antibody against the refolded and functional extracellular domain of rat P2X4 receptor. J Biochem. 2013 Mar;153(3):275-82. doi: 10.1093/jb/mvs143. Epub 2012 Dec 7.

11. M. Nakaya, M. Tajima, H. Kosako, A. Hashimoto, M. Ohba, S. Komiya, N. Tani, M. Nishida, H. Taniguchi, Y. Sato, M. Matsumoto, M. Tsuda, K. Inoue, and H.Kurose. GKR6-deficient mice exhibit reduced recycling of senescent red blood cells and impaired apoptotic cell clearance causing autoimmunity. Nature Communications. In press
12. Matsumoto S, Konishi H, Maeda R, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2011) Analysis on expression of the regenerating gene (Reg) family members Reg-IIIβ and Reg-IIIγ in the mouse during development, J Comp Neurol, vol.520, No.3, pp.479-94, 2012 (DOI: 10.1002/cne.22705.)
13. Kiryu-Seo S and Kiyama H, "The nuclear events guiding successful nerve regeneration", Front. Mol. Neurosci. Vol.4, 53, 2011 (DOI: 10.3389/fnmol.2011.00053)
14. Jung JY, Shin YH, Konishi H, Lee SJ, Kiyama H (2012) Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons, Biochem Biophys Res Commun 2013 Jan 11;430(2):488-93.(DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.009)
15. Konishi H, Matsumoto S, Namikawa K, Kiyama H, (2013) N-terminal Cleaved Pancreatitis-Associated Protein-III (PAP-III) Serves as a Scaffold for Neurites and Promotes Neurite Outgrowth, J Biol Chem, in press
16. Yoshinori Hayashi, Kodai Kawaji, Li Sun, Xinwen Zhang, Kiyoshi Koyano, Takeshi Yokoyama, Shinichi Kohsaka, Kazuhide Inoue and Hiroshi Nakanishi, "Microglial Ca^{2+}-activated K^{+} channels are possible molecular targets for the analgesic effects of S-ketamine on neuropathic pain" Journal of Neuroscience, Vol 31, No. 48, pp. 17370-17382, 2011 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4152-11.2011)
17. Jun Yamada, Hiroshi Nakanishi, Shozo Jinno, "Diffrential involvement of perinuronal astrocytes and microglia in synaptic stripping after hypoglossal axotomy, Neuroscience, Vol. 182, pp. 1-10, 2011 (DOI: 10.1016/j.neuroscience.2011.03.030)
18. Li Sun, Zhou Wu, Yoshinori Hayashi, Christoph Peters, Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Hiroshi Nakanishi, "Microglial cathepsin B contributes to the initiation of peripheral inflammation-induced chronic pain", Journal of Neuroscience, Vol 32, No. 33, pp. 11330-11342, 2012 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0677-12.2012)
19. Xia Liu, Zhou Wu, Yoshinori Hayashi, Hiroshi Nakanishi, "Age-dependent neuroinflammatory responses and deficits in long-term potentiation in the hippocampus during systemic inflammation," Neuroscience, Vol. 216, pp. 133-142, 2012 (DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.04.050)

（3－2） 知財出願

① 平成 24 年度特許出願件数（国内 0 件）

② CREST 研究期間累積件数（国内 0 件）