「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

H25 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

(A)「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
・転写調節因子を介した炎症性サイトカイン産生能活性化メカニズムの解析と神経障害性疼痛
・貪食刺激によるミクログリアの機能変化の解析

(B)「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

(C)「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:
(1)T 細胞活性化制御による神経障害性疼痛慢性化の抑制に関する実験
(2)マルチニューロン電気生理的活動と二光子励起レーザー顕微鏡による
ミクログリアのイメージング解析を同時に行う新たな 3D 解析システムの開発と応用

§２．研究実施の概要

神経障害性疼痛モデルの脊髄では、ケモカイン CCL3 およびその受容体 CCR5 が発現増加した。ミクログリアの P2X7 受容体刺激により CCL3 が産生・放出されることを既に報告していることから、CCL3 と痛みの関係を調べた結果、CCL3 脊髄腔内投与により、一過性の強い痛みに続き、数日持続する痛みが認められた。前者は CCR1 受容体阻害剤、後者は CCR5受容体阻害剤でそれぞれ抑制された。さらに、CCL3に対する中和抗体あるいはCCR5受容体の阻害剤 maraviroc（抗 HIV 薬）の髄腔内投与により神経障害による疼痛が抑制されることも見出した（A-1）。一方、神経障害性疼痛モデルの脊髄内において、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 の顕著な発現増加が観察された。VNUT 欠損マウスでは、神経損傷後の疼痛行動が有意に抑制された。更なる検討で脊髄神経細胞に発現する VNUT が疼痛発症に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。すでに、転写調節因子 IRF8 が神経損傷に起因するミクログリアの活性化に関与することは報告したが、同じファミリーに属す IRF5 が神経障害性疼痛モデルの脊髄内において発現増加することが明らかになった。脊髄 IRF5 の機能解明を進めた結果、IRF5 は脊髄内でミクログリア特異的に持続的な発現を示し、その発現は IRF8 が直接制御していることが明らかになった。さらに、IRF5 は細胞外マトリックス分子フィブロネクチンの刺激依存的に活性化し、P2X4 受容体の発現を直接誘導することが明らかになった。また、IRF5 欠損マウスにおいては、野生型マウスに比べ、神経損傷後の痛み行動が顕著に抑制され、さらに疼痛発症後の野生型マウス脊髄腔内に IRF5 siRNA を投与したところ、IRF5 の発現抑制に伴って疼痛症状の改善がみられた。以上により、持続的な脊髄 IRF5 の活性化が慢性炎症状態の形成および神経障害性疼痛発症に重要な役割を果たしていることが明らかになった（A-2）。

これまでのスクリーニングの結果、複数の GPCR や免疫系の ITAM に関連する分子群が神経損傷に応答しミクログリアに発現することが明らかになった。これらの主要なもののノックアウトマウスを入手し検討を続けているが、現在までに、ある受容体（X）のノックアウトでは運動神経損傷後のミクログリアの活性化期間が短くなり損傷運動神経の細胞死が抑制された。このことから、この受容体を介するシグナルは神経損傷後のミクログリアの活性化の遷延（慢性化）に関係していると考えられた。また、慢性疲労や線維筋痛症などの複数の慢性ストレスモデルを検討したところ、脊髄後角でミクログリア活性化により知覚異常が惹起されていることが示唆された。

末梢神経障害に伴い、脾臓に分布する樹状細胞によるカテプシン S 依存的な抗原提示により CD4+T 細胞が活性化され IFN-γ を産生する Th1 細胞に分化成熟することが明らかとなった。さらに、分化成熟した Th1 細胞が脊髄後角へ浸潤し、IFN-γ を介してミクログリアを再活性化することが慢性痛への移行に重要であることが示唆された。

大脳皮質体性感覚野において、ミクログリアの内在性分子時計で制御される $P2Y_{12}$ 受容体ならびにカテプシン S が皮質ニューロンのシナプス活動の日内リズム形成に関与することが示唆された。また、二光子励起レーザー顕微鏡を用いたイメージング解析により大脳

皮質体性感覚野に分布するミクログリアの突起伸縮速度に昼夜差が認められた。

§3. 成果発表等

(3－1)　原著論文発表

論文詳細情報（国際）

A-1

Matsushita K, Tozaki-Saitoh H, Kojima C, Masuda T, Tsuda M, Inoue K, Hoka S."C-C chemokine receptor type 5 is an important pathological regulator in the development and maintenance of neuropathic pain", Anesthesiology, 2014 Feb 28. [Epub ahead of print]. (DOI: 10.1097 /ALN.0000000000000190)

A-2

Masuda T, Iwamoto S, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Nishiyama A, Mak TW, Tamura T, Tsuda M, Inoue K. "Transcription factor IRF5 drives P2X4R^{+} reactive microglia gating neuropathic pain", Nature Communications (in press)

B-1

Konishi H, Matsumoto S, Namikawa K, Kiyama H, N-terminal Cleaved Pancreatitis-Associated Protein-III (PAP-III) Serves as a Scaffold for Neurites and Promotes Neurite Outgrowth, *J Biol Chem*, 288(15):10205-13, (2013) (DOI: 10.1074/jbc.M112.395301)

B-2

Natividad MMJ, Hayes C, Motta J-P, Jury J, Galipeau HJ, Philip V, Rodenas CG, Kiyama H, Bercik P, and Verdu EF, Differential induction of antimicrobial REGIII by intestinal microbiota and Bifidobacterium breve NCC2950, *Appl Environ Microbiol* 79(24):7745-7754, (2013) (DOI:10.1128/AEM.02470-13).

B-3

Tokizane K, Konishi H, Yasui M, Ogawa T, Sasaki K, Minamino N, Kiyama H, Continuous stress promotes expression of VGF in melanotroph *via* suppression of dopamine, *Mol Cell Endocrinol* 372(1-2): 49-56, (2013) (DOI:org/10.1016/j.mce.2013.03.012)

B-4

Taguchi T, Yasui M, Kubo A, Abe M, Kiyama H, Yamanaka A, Mizumura K, Nociception originating from the crural fascia in rats, *Pain* 154(7):1103-1114, (2013) (DOI: 10.1016/j.pain.2013.03.017)

B-5

Jung JY, Shin YH, Konishi H, Lee SJ, Kiyama H, Possible ATP release through

lysosomal exocytosis from primary sensory neurons, *Biochem Biophys Res Commun* 430(2):488-493, (2013) (DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.12.009.)

C-1

Wu Z, Sun L, Hashioka S, Yu S, Schwab C, Okada R, Hayashi Y, Patrick L McGeer PL, Nakanishi H, "Differential pathways for interleukin-1b production activated by chromogranin A and amyloid β in microglia" , Neurobiol Aging Vol. 34, No. 12, pp2715-2725, 2013 (10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.018. Epub 2013 Jul 4)

C-2

Fumiko Takayama, Zhou Wu, Hong Ma HM, Okada R, Yoshinori Hayashi, Hiroshi Nakanishi H, "Possible involvement of aiPLA$_2$ in the phosphatidylserine-containing liposomes induced production of PGE$_2$ and PGD$_2$ in microglia", J Neuroimmunol Vol. 262, No 1-2, pp. 121-124, 2013 (DOI: 10.1016/j.jneuroim.2013.06.011. Epub 2013 Jul 11)

C-3

Yoshinori Hayashi, Satoru Koyanagi, Nooki Kusunose, Fumiko Takayama , Ryo Okada, Zhou Wu, Ryo Okada, Shigehiro Ohdo , Hiroshi Nakanishi, "Diurnal spatial rearrangement of microglial processes through the rhythmic expression of P2Y$_{12}$ receptors", J Neurol Disord 1:2, 2013 (DOI: 10.4172/jnd.1000120)

C-4

Zhou Wu, Aiqin Zhu, Fumiko Takayama, Ryo Okada, Yicong Liu, Yuka Harada, Shizheng Wu, Hiroshi Nakanishi, "Brazilian green propolis suppresses the hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF-kB activation in microglia", Oxid Med Cell Longev 2013: 906726 (DOI: 10.1155/2013/906726. Epub 2013 Aug 1)

C-5

Yoshinori Hayashi Y, Satoru Koyanagi , Naoki Kusunose, Ryo Okada, Zhou Wu, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kiyoharu Ukai, Shinichi Kohsaka, Kazuhide Inoue, Shigehiro Ohdo, Hiroshi Nakanishi, "The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S", Sci Rep 3, 2744, 2013 (DOI: 10.1038/srep02744)

C-6

Yicong Liu, Zhou Wu, Xinwen Zhang, Junjun Ni, Weixian Yu, Yanmin Zhou, Hiroshi Nakanishi, " Leptomeningeal cells transduce peripheral macrophages inflammatory signal to microglia in response to Porphyromonas gingivalis LPS", Mediators inflamm 2013: 407562 (DOI: 10.1155/2013/407562. Epub 2013 Dec 2)

C-7

Xinwen Zhang, Zhou Wu, Yoshinoru Hayashi, Ryo Okada R, Hiroshi Nakanishi, "Peripheral role of cathepsin S in Th1 cell-dependent transition of nerve injury-induced acute pain to a chronic pain state." J Neurosci, Vol 34, No. 8, pp. 3013-3022, 2014 (DOI:

0.1523/JNEUROSCI.3681-13.2014）

（3－2） 知財出願

①平成 25 年度特許出願件数（国内 0 件）
②CREST 研究期間累積件数（国内 2 件）