

「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

H23 年度
実績報告

井上和秀

九州大学薬学研究院・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
- ・ROS シグナルを起因と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
- ・食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マトリックス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。末梢一次求心性神経は、機能の異なる数種類の神経線維で構成されており(図1)、何れの神経線維のダメージが脊髄後角での慢性炎症の原因であるか不明であることから、神経傷害の種類や程度が異なる複数の動物モデル(一次求心性神経完全切断による物理的神経傷害モデル、ヘルペスモデル、免疫性脱髄性神経疾患の EAN モデル、パクリタキセル抗がん剤誘発モデル、繊維筋痛症モデル)を用いて検討を行った。

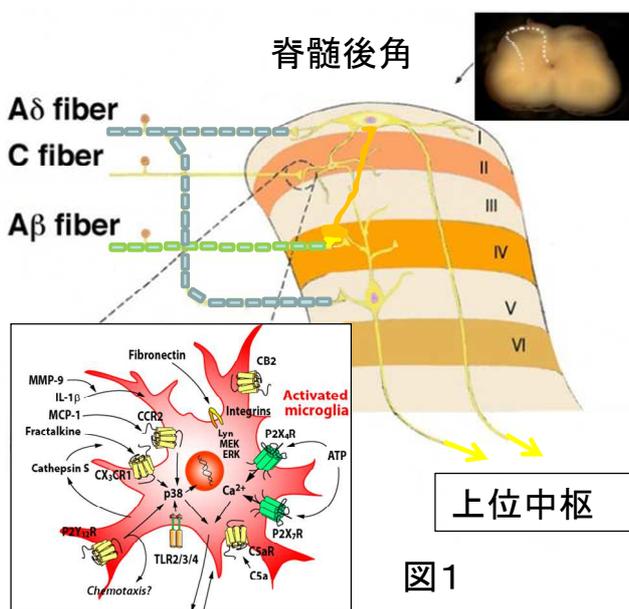


図1

その結果、すべての病態モデルでミクログリアの活性化が観察されたが、その程度と様式に差異が認められた(表1)。

表1 まとめ	ミクログリア 活性化の有無	活性化ミクログリアの分布	P2X4過剰発 現の有無
①物理的傷害: modified Chung model	+++	後角 表層>深層 内側>外側 前角でも活性化	+++
②ヘルペス: 帯状疱疹痛 モデル	+++	後角: ランダム ドット状 前角: ?	++
③免疫性脱髄性神経疾患 (ギラン・バレー症候群 など): EANモデル	+++	後角: びまん性 前角: ?	+++
④抗がん剤: パクリタキ セルモデル	++	初期前角(後肢運 動神経)、ついで 後角(びまん性)	— (別のATP受容 体の可能性)
⑤繊維筋痛症: 繰り返し 寒冷ストレス負荷モデル	++	3日寒冷モデルで は前角のみ、5日 寒冷モデルでは後 角も	—

さらに、物理的神経傷害モデル、ヘルペスモデルおよび EAN モデルでは P2X4 受容体過剰発現までが確認されたものの、抗がん剤誘発モデルおよび線維筋痛症モデルではその変化は認められなかった。また一次求心性神経完全切断による物理的神経傷害モデルでは、C 線維以外の神経が関与していることも明らかになったが、さらにどの神経かを特定するまでには至っていない。

また、神経障害後、ミクログリアを脊髄後角の Lamina II 付近に集積される誘引分子を検討するため、3次元ゲルによるミクログリアの単独培養系を作製し、アロディニア発症・形成期に脊髄後角で上昇するケモカインやヌクレオチドといった細胞間情報伝達物質の刺激によるミクログリアの動態解析を進めてきた。その結果、ATP 刺激によるミクログリアの突起伸長反応が、P2Y12 受容体のみならず Adenosine A3 受容体シグナルを介して調節されていることが明らかになった。Adenosine A3 受容体は、末梢神経損傷後の脊髄におけるヌクレオチド受容体発現パターンを解析した際、P2X4R や P2Y12R などこれまでに報告されている因子に加え、P2Y6R と共に新規に発現増加することが明らかになった因子であることから、脊髄後角ミクログリアの動態および慢性炎症に関与する新たなシグナル分子としての重要性が示唆される。そこで今後は、Adenosine A3 受容体を介したミクログリアの突起伸長における詳細なメカニズムおよび神経障害性疼痛発症における役割の解明を目指す。一方、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 に関しては、その発現パターンや細胞腫の解析に並行し、VNUT 欠損マウスを用いて、慢性疼痛行動解析を行った。その結果、VNUT 欠損マウスは正常状態において痛覚が過敏のため、神経損傷による更なる疼痛発現が不明確であり実験に使えないことが分かった。そこで今後は、VNUT siRNA を用いてノックダウン実験を行うなど別のアプローチで神経損傷後の痛覚閾値の低下に対する VNUT の役割を明確にする。

細胞内 ROS のシグナルは、NFkB の活性化による炎症性サイトカインの発現を誘導する一方、転写調節因子 Nrf2 に作用して抗酸化応答配列 (ARE) への結合を促進し、Nrf2-ARE 経路の活性化を引き起こす。Nrf2 経路の活性化はヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)などの抗酸化分子の発現を亢進し、その結果、酸化ストレスによる細胞傷害や炎症性サイトカインの発現が抑制される。ROS は貪食だけでなく活発な膜運動においても NADPH を介して産生されることから、ATP 刺激により運動能の亢進したミクログリアにおける Nrf2 経路の活性化について検討したところ、Nrf2 の核への移行および HO-1 蛋白質の増加が認められた。このような結果から、ATP 刺激直後のミクログリアでは、Nrf2/ARE 経路が活性化されることにより、運動能の亢進だけではなく、酸化ストレスに対する抵抗性の増大と炎症性サイトカイン産生能の抑制に働く機構が存在する可能性がある。今後は、Nrf2 経路の活性化に関与する ATP 受容体サブタイプを明らかにし、細胞内調節分子機構を解明する。一方、神経損傷後の脊髄における貪食シグナル分子の発現変化を解析した結果、貪食マーカーである CD68 や貪食シグナルの受容体となる TLR-4 や Mac-1、P2Y6R の顕著な発現増加が観察され、神経損傷後の脊髄内でミクログリアの貪食機能が亢進している可能性が示唆された。ミクログリアによる貪食作用は、炎症性サイトカイン誘発性と非誘発性の貪食作用に分類されるが、細胞死 (apoptosis) に陥った神経細胞のミクログリアによる貪食は炎症性サイトカイン放出

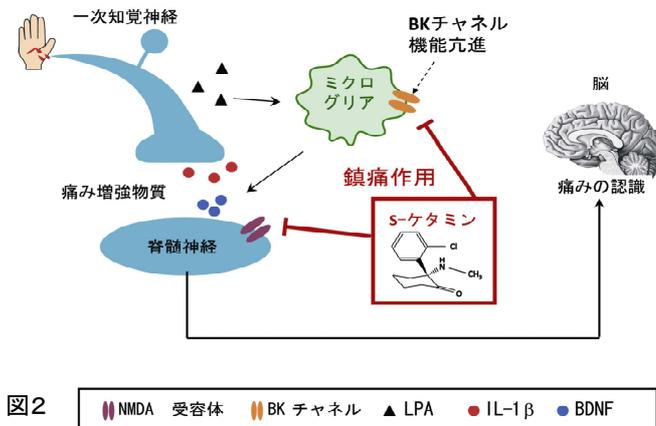
非誘発性で、その作用を担う受容体膜タンパク質 TREM2 のシグナルは炎症性メディエーターの産生を抑制すると考えられている。そこで、TREM2 の発現変化についても同様に検討したところ、神経損傷後の脊髄ミクログリアにおいて顕著な発現増加が観察された。これまで解析した食糧シグナル関連因子は、神経損傷後の脊髄内で自空間的に異なった発現パターンを示していることから、食糧作用を示したミクログリアの機能がすべて同一であるとは考えにくい。そこで今後は、こうした食糧シグナルがもたらすミクログリアの機能変化を明確にするため、単独細胞培養系で食糧シグナル受容体の刺激によって食糧作用を示したミクログリアを回収し、炎症性メディエーターや細胞機能分子の発現変化を詳細に解析する。こうした解析を通して、ミクログリアによる炎症環境の慢性化メカニズムの解明に繋げたい。

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については、舌下神経損傷モデルを用いて神経損傷時に中枢で発現変化する分子群の同定を以前おこない、多くのミクログリアで発現する G protein coupled receptor (GPCR) を同定した。そこで、今年度は、このスクリーニングで得られた GPCR を知覚神経障害である神経因性疼痛のモデルで再スクリーニングした。その結果、GRP84、GRP109 などのオルファン受容体や多くの受容体は神経因性疼痛モデルにおいて脊髄後角でも発現上昇していることが明らかになった。これらの多くはミクログリアに発現していると考えられ、神経因性の疼痛が生じている時には、従来知られている分子に加え多様な分子がミクログリアの活性化に関与している可能性が示された。また、同じく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、Siglec-H や TREM2 また DAP12 などの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た。これらの機能については、今後ノックアウトマウスなどを用いて慢性疼痛にいかに関わっているのかを解明したい。

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・炎症ともに関連する分子であると考えられる Reg-III (regenerating gene III) については、個体発生を含む全身での発現動態を検討し、気道や消化管上皮などの上皮では正常でも強く発現していることを同定した。これらの分子の発現調節は神経損傷特異的な転写調節メカニズムとどのように関わっているのかを明らかにすることにより神経損傷と炎症の接点の解明につながる研究に発展させたい。

脊髄ミクログリア BK チャネルの神経障害性疼痛における役割に関する研究では、Iba1-EGFP マウスより作製した脊髄標本を用い、ルシファーイエローを充填したパッチ電極を用いてシナプス活動を記録したニューロンの蛍光標識を行い、さらに、標識ニューロンに近接した GFP 可視化ミクログリアに微量電極を用いてピオチン化合物を細胞内注入し、ニューロン・ミクログリア間のシナプス部位における微細突起の三次元構造を解析した。その結果、神経障害に伴う脊髄ミクログリアにおいて Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルを介した外向き電流が誘導されることを見出した。薬理的な解析により、この Ca^{2+} 活性化 K^+ チャネルを介した外向き電流が BK チャネルを介したものであることを明らかにした。BK チャネル阻害剤 S-ケタミンは培養ミクログリアの活性化を有意に阻害し、脊髄腔内注入により神経障害性疼痛の発症を抑制した。これらの結果より、脊髄ミクログリアの BK チャネルは神経障害性疼痛の発症ならびに維持において重要な役割を果たすことが明らかとなっ

た(図2)。



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では、すでに典型的なリソソーム性システインプロテアーゼであるカテプシン B が、クロモグラニン A 刺激によってミクログリアで誘導される IL-1β 産生分泌に関与していることを明らかにしてきた(寺田 他: *Glia*, 58, 114-124, 2010)。IL-1β は疼痛シグナル伝達において重要な役割を担っていることから、今年度はカテプシン B の慢性疼痛における関与について解析した。その結果、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ペルゼ 1 を活性化し IL-1β 産生分泌を誘導した。これらの結果より、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いて IL-1β の産生を誘導し、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(生体の科学 62, 208-212, 2011; 孫ほか, 投稿中)。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- A-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
- A-2. 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]
- A-3. Keiko Ohsawa and Shinichi 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)
- A-4. Keiko Ohsawa, Tomomi Sanagi, Yasuko Nakamura, Eri Suzuki, Kazuhide Inoue, Shinichi 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)
- B-1. Matsumoto S, Konishi H, Maeda R, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2011) Analysis on expression of the regenerating gene (Reg) family members Reg-III β and Reg-III γ in the mouse during development, *J Comp Neurol*, vol.520, No.3, pp.479-94, 2012 (DOI: 10.1002/cne.22705.)
- B-2. 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)
- C-1. Yoshinori Hayashi, Kodai Kawaji, Li Sun, Xinwen Zhang, Kiyoshi Koyano, Takeshi Yokoyama, Shinichi Kohsaka, Kazuhide Inoue and Hiroshi Nakanishi, "Microglial Ca²⁺-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)
- C-2. Jun Yamada, Hiroshi Nakanishi, Shozo Jinno, "Differential 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)