

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05015

研究課題名(和文) ミクログリア極性分子スイッチとしてのプロテアーゼ反応に着目した疼痛炎症病態の制御

研究課題名(英文) Study on a microglial phenotypic switch with a focus on proteolytic response

研究代表者

中西 博 (Nakanishi, Hiroshi)

九州大学・歯学研究院・教授

研究者番号：20155774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：野性型マウス脳から単離したミクログリアでは脳損傷に伴ってM1様傷害性分子の発現が増大したが、カテプシンBあるいはE欠損マウス脳から単離したミクログリアでの発現は認められなかった。一方、M2様保護性分子の発現ピークは野性型マウスと比較しカテプシンBあるいはE欠損マウスのミクログリアでは早期に認められた。さらにNF-κBはミクログリアのリソソーム分画存在下で活性化され、このNF-κB活性化はカテプシンBあるいはE阻害剤により有意に抑制された。以上の結果より、活性化ミクログリアにおいてカテプシンEならびにBはNF-κBを持続的に活性化し、傷害性M1に転換する分子スイッチとして働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The mean mRNA levels of both M1 and M2 markers in microglia acutely isolated from the hippocampus of wild-type mice were gradually and significantly increased after brain injury. In contrast, the mean mRNA levels of M1 markers in microglia acutely isolated from the hippocampus of cathepsin B-deficient mice showed no significant change after brain injury. The mean mRNA levels of the M2 markers increased rather rapidly to reach a peak after brain injury and then returned to the control level. Furthermore, cathepsin E-dependent proteasomal system is involved in an early activation of NF-κB in microglia after brain injury. Autophagy caused a delayed but long-lasting activation of NF-κB through cathepsin B-mediated autophagy machinery in microglia. Therefore, a proteolytic relay through modulator actions of cathepsins E and B could work as a phenotypic switch in microglia along the M1-M2 phenotypic continuum through the dynamics of NF-κB activity.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ミクログリア カテプシン プロテアーゼ反応 分子スイッチ

### 1. 研究開始当初の背景

これまでリソソーム性タンパク質分解酵素のカテプシン群が限定分解による「モジュレーター作用」により疼痛炎症の発症・慢性化において重要性であることを明らかにしてきた。さらに慢性脳炎症では、ミクログリアにおいてカテプシン群が関与するオートファジー系プロテアーゼ反応が転写因子 NF-κB の活性化を誘導することを明らかにした。このためカテプシン群が神経傷害 (M1) 的ミクログリアに極性転換する「分子スイッチ」として働き、疼痛炎症の発症・慢性化に関わっているという着想に至った。

### 2. 研究の目的

カテプシン群がミクログリアの傷害性 (M1) あるいは保護性 (M2) の二極性を決定する「分子スイッチ」として働く可能性を明らかにし、「モジュレーター作用」の概念を「分子スイッチ」へとさらに発展させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

① IκBα 分解・NF-κB 活性化を誘導するカテプシンの同定、② ミクログリア極性モニタリングマウス創出によるミクログリア極性転換の生体イメージング解析、さらに③ 遺伝子欠損マウスならびに特異的阻害剤を用い、ミクログリア極性「分子スイッチ」としてのカテプシン群を標的とした疼痛炎症に対する創薬の可能性の検討を行う。

### 4. 研究成果

① ミクログリアの極性「分子スイッチ」としてのカテプシンの役割に関する解析：炎症性脳病態モデルにおいて野性型ならびにカテプシン群欠損マウス脳から単離したミクログリアを用い、極性マーカー遺伝子に対するプライマーを用いた定量的 RT-PCR を行った。その結果、野性型マウス脳から単離したミクログリアではオートファジーに伴って M1 様分子の iNOS、TNF-α ならびに IL-1β の発現は時間依存的に増大したが、カテプシン B あるいはカテプシン E 欠損マウス脳から単離したミクログリアでは M1 様分子の発現は認められなかった (図 1)。一方、M2 様分子の arginase1、IL-4 ならびに IL-10 の発現

は野性型マウス脳から単離したミクログリアでは 48 時間をピークに発現増大が認められた。ところが、カテプシン B あるいはカテプシン E 欠損マウス脳から単離したミクログリアでは 12 時間をピークに発現増大が認められた (図 1)。これらの実験結果より、カテプシン B ならびにカテプシン E が M1 様ミクログリアへの極性転換スイッチとしている可能性が示唆された。

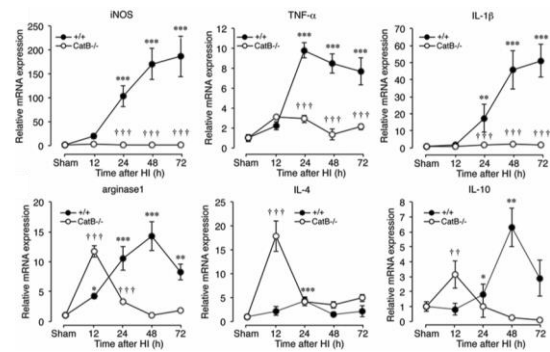


図 1

### ② オートファジー系プロテアーゼ反応により NF-κB 活性化に関与するカテプシンの解析

：ミクログリアのリソソーム分画存在下でリコンビナント IκBα をインキュベートした結果、時間依存的にリコンビナント IκBα 分解が観察された。さらに IκBα の分解はカテプシン E 阻害剤のペプスタチン A (PepA) あるいは特異的カテプシン B 阻害剤 (CA-074Me) により有意に抑制された (図 2)。これらの結果より、オートファジー系プロテアーゼ反応によりカテプシン E ならびにカテプシン B の IκBα 分解を介して NF-κB が活性化する可能性が示唆された。

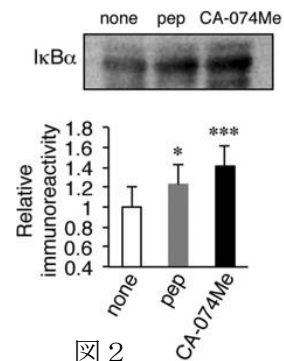


図 2

### ③ ミクログリアの産生するカテプシン群の疼痛炎症における役割の解明

：カテプシン B あるいはカテプシン E が炎症疼痛において保護性 (M2) から傷害性 (M1) への「分子スイッチ」として働くことが示唆された。しかし、カテプシン B ならびにカテプシン E

はニューロンならびにグリア細胞に分布しているため、このことを直接的に証明するのはミクログリア特異的にカテプシン B あるいはカテプシン E の発現を欠損あるいは低下させたマウスの作成が不可欠と考えられる。

先行実験として行ったカテプシン D の flox マウスと Nestin-Cre マウスをかけ合わせニューロン特異的にカテプシン D を欠損させたマウスにおいて、ニューロンに依然としてカテプシン D が検出された。これは周囲の細胞から産生分泌されたプロカテプシン D が細胞表面のマンノース 6-リン酸受容体を介してニューロン内に取り込まれ、リソソームに運ばれて成熟型のカテプシン D に変換したと考えられる。このためミクログリア特異的なカテプシン B あるいはカテプシン E 欠損マウスを作製しても周囲の細胞がミクログリアに欠損酵素を供給する可能性がある。このためミクログリア特異的なカテプシン B 欠損マウスを作成するにカテプシン B の flox マウスと CX3CR1-Cre マウスをかけ合わせるだけでは不十分で、さらに細胞膜に発現するマンノース 6-リン酸受容体を阻害する必要があると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Okada R, Zhang X, Harada Y, Wu Z, Nakanishi H. Cathepsin H deficiency in mice induces excess Th1 cell activation and early-onset of EAE through impairment of toll-like receptor 3 cascade. *Inflamm Res* 2018. doi:10.1007/s00011-018-1136-9.
- ② Liu Y, Wu Z, Nakanishi Y, Ni J, Hayashi Y, Takayama F, Zhou Y, Kadowaki T, Nakanishi H. Infection of microglia with *Porphyromonas gingivalis* promotes cell migration and inflammatory response through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2. *Sci Rep* 7(1): 11759, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-12173-1.

- ③ Wu Z, Ni J, Liu Y, Teeling JL, Takayama F, Collcutt A, Ibbett P, Nakanishi H. Cathepsin B plays a critical role in inducing Alzheimer's disease-like phenotypes following chronic systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* in mice. *Behav Brain Immun* 65: 350-361 2017. doi: 10.1016/j.bbi.2017.06.002.
- ④ Dekita M, Wu Z, Ni J, Zhang X, Liu Y, Yan X, Nakanishi H, Takahashi I. Cathepsin S is involved in Th17 differentiation through the upregulation of IL-6 by activating PAR-2 after systemic exposure to lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *Front Pharmacol* 8:470, 2017. doi:10.3389/fphar.2017.00470.
- ⑤ Takayama F, Zhang X, Hayashi Y, Wu Z, Nakanishi H. Dysfunction in diurnal synaptic responses and social behavior abnormalities in cathepsin S-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 490, 447-452, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.061.
- ⑥ Harada Y, Takayama F, Tanabe K, Ni J, Hayashi Y, Yamamoto K, Wu Z, Nakanishi H. Overexpression of cathepsin E interferes with neuronal differentiation of P19 embryonal teratocarcinoma cells by degradation of N-cadherin. *Cell Mol Neurobiol* 37, 437-443, 2017. doi: 10.1007/s10571-016-0376-x.
- ⑦ Ni J, Wu Z, Meng J, Zhu A, Zhong X, Wu S, Nakanishi H. The neuroprotective effects of Brazilian green propolis on neurodegenerative damage in human neuronal SH-SY5Y cells. *Oxid Med Cell Longev* 2017: 7984327, 2017. doi: 10.1155/2017/7984327.
- ⑧ Zhang X, Wu Z, Liu Y, Ni J, Deng C, Zhao B, Nakanishi H, He J, Yan X. Boi-ogi-to (TJ-20), a Kampo formula, suppresses the inflammatory bone destruction and expression of cytokines in the synovia of ankle joints of adjuvant arthritic rats. *Evid*

Based Complement Altemat Med  
2017:3679295, 2017.

doi: 10.1155/2017/3679295.

- ⑨ Hayashi Y, Morinaga S, Liu X, Zhang J, Wu Z, Yokoyama T, Nakanishi H. An EP2 agonist facilitates NMDA-induced outward currents and inhibits dendritic beading through activation of BK channels in mouse cortical neurons. *Mediators Inflamm* 2016, 5079597, 2016. doi: 10.1155/2016/5079597.
- ⑩ Hayashi Y, Morinaga S, Zhang J, Satoh Y, Meredith A, Nakata T, Wu Z, Kohsaka S, Inoue K, Nakanishi H. BK channels in microglia are required for morphine-induced hyperalgesia. *Nat Commun* 7: 11687, 2016. doi: 10.1048/incomms11697.
- ⑪ Takayama F, Hayashi Y, Wu Z, Liu Y, Nakanishi H. Diurnal dynamic behavior of microglia in response to infected bacteria through the UDP-P2Y<sub>6</sub> receptor system. *Sci Rep* 6: 30006, 2016. doi: 10.1038/srep30006.
- ⑫ Li X, Wu Z, Ni J, Liu Y, Meng J, Yu W, Nakanishi H, Zhou Y. Cathepsin B regulates collagen expression by fibroblasts via prolonging TLR2/NF-κB activation. *Oxid Med Cell Longev* 2016:7894247, 2016. doi: 10.1155/2017/7984327.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Liu Y, Wu Z, Nakanishi H. Porphyromonas gingivalis promotes cell migration and an inflammatory response of microglia through the gingipain-mediated activation of protease-activated receptor-2. 第22回グリア研究会. 2017年12月2日 (名古屋)
- ② Ni J, Wu Z, Nakanishi H. Increased expression and altered subcellular distribution of cathepsin B in microglia induces cognitive impairment through oxidative stress and inflammatory response during aging. 第22回グリア研究会. 2017年12月2日 (名古屋)

- ③ 武洲、中西博. 歯周病菌によるアルツハイマー様脳病態の発症と原因酵素としてのカテプシン群の役割. 第59回歯科基礎医学会学術大会 学術シンポジウム. 2017年9月17日 (塩尻)
- ④ 張競、林良憲、中西博. 皮膚ケラチノサイトのカテプシンEを介した神経障害性疼痛の慢性化メカニズムの解明. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017年9月17日 (塩尻)
- ⑤ Liu Y, Wu Z, Nakanishi H. Gingipains induce microglial migration through activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2). 95th Annual Meeting of International Association for Dental Research (IADR2017). 2017年3月24日 (サンフランシスコ)
- ⑥ 武洲、中西博. 歯周病と認知症：増悪機序の解明と今後の展望. 第90回日本薬理学会 年会企画シンポジウム. 2017年3月17日 (長崎)
- ⑦ Meng J, Ni J, Wu Z, Zhu A, Nakanishi H. IL-10 plays a pivotal role in anti-inflammatory effects of Rheum tanguticum in activated microglia. 第90回日本薬理学会年会. 2017年3月17日 (長崎)
- ⑧ Liu Y, Wu Z, Kadowaki T, Nakanishi H. The critical roles of gingipains in cell migration and inflammatory response of microglia through activation of protease-activated receptor-2 (PAR-2). 第90回日本薬理学会年会. 2017年3月17日 (長崎)
- ⑨ 中西博. 口内を清潔に保って認知症を防げ. 新学術領域「グリアアセンブリによる脳機能発達の制御と病態」公開シンポジウム. 2017年1月6日 (福岡)
- ⑩ Okada R, Harada Y, Wu Z, Yamasaki R, Nakanishi H. Possible involvement of cathepsin H in the negative regulation of T cell activation in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE).

第21回グリア研究会. 2016年12月3日  
(大阪)

- ⑪ Ni J, Wu Z, Nakanishi H. Microglia facilitate brain aging and cognitive impairment through cathepsin B-dependent oxidative and inflammatory responses. 第21回グリア研究会. 2016年12月3日 (大阪)
- ⑫ 孟ジェイ、武 洲、朱 愛琴、中西博. ミクログリアにおける産生分泌を介したRheum tanguticumの抗炎症作用. 第69回日本薬理学会西南部会. 2016年11月26日 (愛媛)
- ⑬ 劉 訳聡、武 洲、門脇知子、中西博. Arg-ならびにLys-gingipainによるprotease- activated receptor-2 (PAR-2)の活性化を介したミクログリアの細胞遊走誘導. 第69回日本薬理学会西南部会. 2016年11月26日 (愛媛)
- ⑭ Nakanishi H. Pathological role of cathepsins in chronic pain. XVth International Symposium on Protease, Inhibitors and Biological Control. 2016年9月20日 (スロベニア)
- ⑮ 武 洲、中西 博. 歯周病感染によるアルツハイマー様病態の誘発メカニズム. 第58歯科基礎医学会学術大会. サテライトシンポジウム. 2016年8月24日 (札幌)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：  
○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 博 (NAKANISHI HIROSHI)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号：20155774

(2) 研究分担者

武 洲 (TAKE HIRO)  
九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号：10420598

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )