

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06758

研究課題名（和文）真皮マクロファージにおける新規の炎症疼痛制御因子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analyses of a novel pain-modulating factor in dermal macrophage

研究代表者

和中 明生（Wanaka, Akio）

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90210989

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は疼痛鈍麻の表現型を示すトランスジェニックマウスを偶然発見し、このマウスのゲノム解析、mRNA解析からSNX25遺伝子が疼痛関連因子である可能性を考えた。SNX25ノックアウトマウスは上記マウスと同様に疼痛鈍麻の表現型を示すことからSNX25が責任因子であると確定した。コンディショナルノックアウトマウスを作成し、神経細胞ではなくマクロファージにおけるSNX25が痛覚を制御していることを見出した。SNX25はマクロファージ内で転写因子Nrf2のユビキチン化を抑制しており、これによってNrf2がNGFの産生を促すことで痛覚の閾値を低下させているメカニズムを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢の痛覚-触覚は神経線維が感知するという概念が一般的であるが、本研究では神経線維に近接して存在する免疫系細胞、マクロファージが神経線維の感度調節を行っているという新たな側面を見出した点で意義が大きい。マクロファージから分泌されるNGFは触覚から正常痛覚、痛覚過敏に至るあらゆる段階で作用していることを示した。SNX25と転写調節因子NRF2の物理的作用点を阻害するような低分子化合物が新たな鎮痛薬の候補となることを示唆した点でも社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：We found transgenic mice with a pain-less phenotype by chance, and based on genomic and mRNA analyses of these mice, we considered the possibility that the SNX25 gene was a pain-modulating factor. SNX25 was confirmed to be the responsible factor by analyzing SNX25 knockout mice. Conditional knockout mice were generated and found that SNX25 in macrophages, but not in neurons, regulates pain perception; SNX25 inhibits the ubiquitination of the transcription factor Nrf2 in macrophages, thereby identifying a mechanism whereby Nrf2 stimulates the production of NGF, thereby lowering the threshold for pain perception. The authors identified a mechanism by which Nrf2 lowers the pain threshold by stimulating the production of NGF.

研究分野：分子神経生物学

キーワード：痛覚 触覚 末梢神経 マクロファージ SNX25 NRF2 NGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は 2017 年にアストロサイト特異的な遺伝子操作を目的として導入したトランスジェニックマウス (Mlc1-TG マウス) が痛覚刺激に対する反応が鈍いことに気付いた。野生型のマウスではこのような痛覚鈍麻の表現型が認められないことから、トランスジェニックマウスにおける遺伝子操作、即ち巨大遺伝子カセットがゲノムに挿入されたことによって発生したものと推測した。2019 年からこのトランスジェニックマウスの遺伝子カセット挿入部位を中心としたゲノム解析を行い、第 8 染色体の長腕部分に遺伝子カセットが挿入されていることとこの挿入によって 3 種類の内在性遺伝子の発現が影響を受ける可能性を見出した。3 種類の遺伝子 (Snx25, Slc25a4 and Cfap97) は事実トランスジェニックマウスにおける mRNA 発現がほぼゼロとなっていた。我々は SNX25 ノックアウトマウスを導入し、ヘテロノックアウトマウスが上記トランスジェニックマウスと同様な痛覚鈍麻の表現型を呈することから SNX25 を原因遺伝子の候補として研究を進めた。SNX25 遺伝子の第 4 エクソンを Loxp サイトで挟んだ SNX25 floxed マウスを作成したところ、このマウスは正常痛覚を示した。末梢感覚神経特異的なコンディショナルノックアウト (cKO) マウスも正常痛覚を呈したので神経細胞以外の細胞が責任細胞と考えられた。ノックアウトマウスの骨髄を正常マウスに移植したところ、移植されたマウスに痛覚鈍麻の表現型が認められたことから骨髄由来の細胞が責任細胞と考えられた。皮膚に分布する骨髄由来細胞で末梢神経に近接する細胞としてマクロファージがあり、このマクロファージは CX3CR1 を高発現するという知見が報告されたので、CX3CR1-CreER マウスを用いてマクロファージ特異的なノックアウトマウスを作成することを計画した。

2. 研究の目的

(1) CX3CR1-CreER マウスを用いて真皮マクロファージ特異的に SNX25 遺伝子をノックアウトした場合の痛覚をコントロールマウスと比較検討することを主目的とした。
(2) また CX3CR1 遺伝子は末梢マクロファージだけではなく、中枢のミクログリアにも高発現するために上記 cKO マウスでは中枢ミクログリアの SNX25 遺伝子の変異も起こり、末梢マクロファージに対する効果と重なる可能性もあり、この両者を切り分ける必要がある。骨髄移植や末梢特異的な組換え実験を組み合わせることで切り分けることも目的とした。
(3) SNX25 遺伝子のノックアウトがなぜ痛覚鈍麻を引き起こすかについてはマクロファージからの NGF 分泌が影響を受けている可能性が考えられるので、この問題について生化学的に SNX25 遺伝子と NGF 分泌の関係、シグナル伝達経路について検討することも目的とした。
(4) マクロファージにおける SNX25 遺伝子の変異によって痛覚だけではなく、正常触覚も影響を受けている可能性が考えられるのでこの点についても検討する。

3. 研究の方法

(1) コンディショナルノックアウトマウスの作成

Advillin-Cre マウス (B6.Cg-Tg(Avii-Cre/ERT2)AJwo/J)、CX3CR1-CreER マウス (B6.129P2(C)-Cx3cr1^{tm2.1(Cre/ERT2)Jung/J}) は Jackson 研究所より購入した。これらのマウスと SNX floxed マウスを交配させることでそれぞれ末梢神経特異的、単球-マクロファージ特異的な cKO マウスを作成した。後者は Tamoxifen を 0.5mg/g の濃度で食餌に混ぜて 2 週間摂取させることで cKO を作成した。

(2) フォンフレイテスト

フォンフレイフィラメント (室町機械製、0.07、0.16、0.4、0.6、1、1.4、2、4g) を足底から 3 秒間押し当てて、足を素早く除けるか舐めるかの反応を示すまで細いものから太いフィラメントまでを順に検査した。反応を起こしたフィラメントの太さ (g 数) を痛覚閾値として記録した。

(3) フォルマリンテスト

足底に 5%-リン酸緩衝食塩水を 10 μ l 注入し、注入後の足上げ、足振り、舐めるなどの行動時間を測定し痛み行動として記録した。

(4) 骨髄移植

レシピエントマウスは移植の 7 日前、5 日前、3 日前にブスルファンを 30 μ g/g 体重の量、腹腔に投与し骨髄抑制を行った。ドナーマウスの大腿骨、脛骨から骨髄を採取し、リン酸緩衝食塩水に 1×10^6 個の濃度に調整してレシピエントマウスの尾静脈から注入した。

(5) 4-OH タモキシフェンの局所投与によるコンディショナルノックアウト

SNX25 Floxed マウスに対して水溶性のタモキシフェン代謝物である 4-OH tamoxifen (4-OHT) を 40ng/ μ l の濃度で 10 μ l を足底に注射した。この操作を 7 日間繰り返した後にフォンフレイテストなどの痛覚検査を施行した。

(6) 神経損傷性疼痛モデル

既報に従って神経損傷性疼痛モデルを作成した。マウスの坐骨神経を大腿下部で露出させ、総腓骨神経と脛骨神経を結紮した後に切断し、7日後に残存した伏在神経領域での痛覚テストを行った。

(7) タクティルテスト

フォンフレイフィラメントに変わってより細いフィラメント(0.004、0.008、0.01、0.04、0.07、0.4g)を用いて足の逃避行動を測定した。

(8) 経皮電気刺激による逃避行動の測定

マウスの測定に電気刺激装置を貼布し、5Hz、250Hz、2000Hzの周波数の電流を3秒間流して逃避行動を観察した。

(9) 生化学的実験

細胞への遺伝子強制発現系、PCRを用いて遺伝子発現量の半定量的検査、蛋白の発現量の定量検査、ウエスタンブロットなどは通常の方法に則って行った。

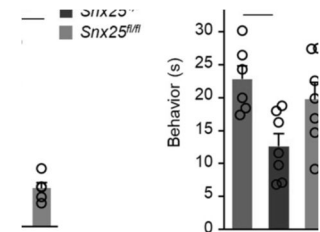
(10) 組織学的実験

組織、細胞における蛋白、遺伝子の局在は一般的な免疫組織化学法、蛍光抗体法に準じて行った。

4. 研究成果

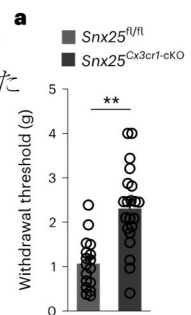
(1) 末梢神経特異的な SNX25cK0 マウスの検討

Advillin-Cre マウスと Snx25 Floxed マウスの交配によって作成した Advillin-cK0 マウスにおいてフォンフレイテストを施行した。コントロールとしては Snx25 Floxed マウスを用いた。結果として cK0 マウスとコントロールマウスの間で機械的刺激に対する反応閾値(痛覚閾値)には有意な差は認められなかった(右図)。



(2) 単球-マクロファージ特異的な Snx25cK0 マウスの検討

CX3CR1-CreER マウスと Snx25 Floxed マウスの交配によって作成した CX3CR1-cK0 マウスに2週間タモキシフェンを食餌経路で摂取させた後にフォンフレイテストを行った。コントロールとしては Floxed マウスに同じようにタモキシフェンを摂取させたものを用いた。フォンフレイテストでは CX3CR1-cK0 マウスでコントロールに比して、痛覚閾値が有意に上昇していた(右図)。

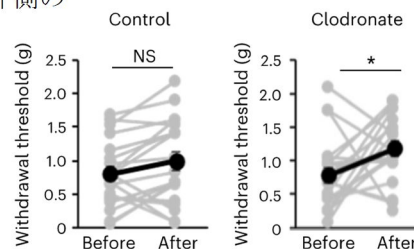


(3) 野生型のマウスは CX3CR1-cK0 マウスの骨髄移植を受けると痛覚鈍麻となる

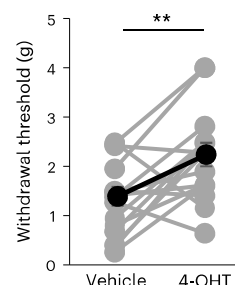
(2)の検討で CX3CR1-cK0 マウスが痛覚鈍麻の表現型を呈したが、CX3CR1 は中枢神経系のミクログリアでも発現しているため、cK0 の効果が末梢の単球-マクロファージによるものか、中枢神経系のミクログリアによるものかの違いを見分けることが不可能である。そこで CX3CR1-cK0 マウスから骨髄を採取し、野生型のマウスの移植を行った。移植前の野生型マウスはフォンフレイテストにおいて正常な痛覚閾値を示したのに対し、移植後では有意な痛覚閾値の上昇が認められたので、CX3CR1-cK0 マウスの痛覚鈍麻の表現型は単球-マクロファージにおける SNX25 遺伝子のノックアウトによるものであることが確認された。

(4)局所におけるマクロファージの除去、或いは CX3CR1 特異的な SNX25 のノックアウトは痛覚鈍麻の表現型をもたらす

(3) の検討をさらに確実にするために、野生型マウスの片側の足底皮膚にクロドロン酸リポソームを 7 日間連続で注入し、その処置の後フォンフレイテストを同側と反対側の足で行った。クロドロン酸リポソーム注入により組織内でのマクロファージはほぼ完全に除去されていることも組織検査で確認した。クロドロン酸リポソーム注入側の足では痛覚鈍麻となったのに対して、反対側の足では正常の痛覚閾値を示した(右図)。またリポソームのみ(クロドロン酸なし)の注入で同様の実験も行ったが、この場合は左右で痛覚閾値の差は認められなかった。



また CX3CR1-CreER:SNX25 floxed マウスにおいて片側足底に 4-OH タモキシフェンを注入することでこの側でのみマクロファージの SNX25 遺伝子をノックアウトする実験を行った。4-OH タモキシフェンを 5 日間連続で注入し、この処置を行った後に両側の足でフォンフレイを行ったところ、注入側で痛覚閾値の有意な上昇が認められた(右図)。これらの結果は末梢真皮におけるマクロファージが痛覚閾値を調節していること、そしてこの調節には SNX25 が関与していることを示している。



(5) SNX25 遺伝子はマクロファージからの NGF 産生を調節する。NGF は以前より感覚神経に作用して痛覚関連遺伝子の発現を増加させるということが知られており、逆に NGF が遺伝子変異などで欠失すると無痛症というような病態を引き起こすことも知られている。SNX25 遺伝子のノックアウトマウスで見られる痛覚鈍麻の表現型が NGF に由来するものであるか否かをノックアウトマウスと野生型マウスの皮膚組織での NGF 遺伝子の発現量を測定することで検定した。ヘテロノックアウトマウスは野生型マウスに比べて有意に NGF 遺伝子の発現が低いことが明らかとなった。さらに CX3CR1-cKO マウスの皮膚から FACS を用いてマクロファージを精製し、野生型の皮膚から採取したマクロファージと NGF 含量について比較したところ、cKO マウスのマクロファージは NGF 含量が有意に低下していた。

(6) 痛覚だけではなく通常触覚もマクロファージの SNX25 が調節している。フォンフレイテストは機械的刺激による痛覚を検定する検査であるが、より細かいフィラメントを用いることで痛みを起こさない軽微な刺激を与えるタクタイル(触覚)テストが可能である。我々はマクロファージの SNX25 が機械的刺激に対する痛覚だけではなく、触覚も制御している可能性を考えて、CX3CR1-cKO マウスを用いてタクタイルテストを行ったところ、コントロールである SNX25 floxed マウスに比して、cKO マウスでは触覚の閾値が高くなっていることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawabe Yoshie, Tanaka Tatsuhide, Isonishi Ayami, Nakahara Kazuki, Tatsumi Kouko, Wanaka Akio	4. 巻 47
2. 論文標題 Characterization of Glial Populations in the Aging and Remyelinating Mouse Corpus Callosum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochemical Research	6. 最初と最後の頁 2826 ~ 2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11064-022-03676-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takemura Shoko, Isonishi Ayami, Horii-Hayashi Noriko, Tanaka Tatsuhide, Tatsumi Kouko, Komori Takashi, Yamamuro Kazuhiko, Yamano Mariko, Nishi Mayumi, Makinodan Manabu, Wanaka Akio	4. 巻 162
2. 論文標題 Juvenile social isolation affects the structure of the tanycyte?vascular interface in the hypophyseal portal system of the adult mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	6. 最初と最後の頁 105439 ~ 105439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuint.2022.105439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakahara Kazuki, Okuda Hiroaki, Isonishi Ayami, Kawabe Yoshie, Tanaka Tatsuhide, Tatsumi Kouko, Wanaka Akio	4. 巻 127
2. 論文標題 Amino acid transporter Asc-1 (SLC7A10) expression is altered in basal ganglia in experimental Parkinsonism and L-dopa-induced dyskinesia model mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 102191 ~ 102191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jchemneu.2022.102191	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Tatsuhide, Okuda Hiroaki, Isonishi Ayami, Terada Yuki, Kitabatake Masahiro, Shinjo Takeaki, Nishimura Kazuya, Takemura Shoko, Furue Hidemasa, Ito Toshihiro, Tatsumi Kouko, Wanaka Akio	4. 巻 24
2. 論文標題 Dermal macrophages set pain sensitivity by modulating the amount of tissue NGF through an SNX25?Nrf2 pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 439 ~ 451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-022-01418-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tatsumi Kouko, Kinugawa Kaoru, Isonishi Ayami, Kitabatake Masahiro, Okuda Hiroaki, Takemura Shoko, Tanaka Tatsuhide, Mori Eiichiro, Wanaka Akio	4. 巻 14
2. 論文標題 Olig2-astrocytes express neutral amino acid transporter SLC7A10 (Asc-1) in the adult brain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00874-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwasa N, Matsui T, Iguchi N, Kinugawa K, Morikawa N, Sakaguchi Y, Shiota T, Kobashigawa S, Nakanishi M, Matsubayashi M, Nagata R, Kikuchi S, Tanaka T, Eura N, Kiriya T, Izumi T, Saito K, Kataoka T, Saito Y, Kimura W, Wanaka A, Nishimura Y, Mori E, Sugie K	4. 巻 15
2. 論文標題 Gene Expression Profiles of Human Cerebral Organoids Identify PPAR Pathway and PKM2 as Key Markers for Oxygen-Glucose Deprivation and Reoxygenation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2021.605030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Tatsuhide, Ohno Nobuhiko, Osanai Yasuyuki, Saitoh Sei, Thai Truc Quynh, Nishimura Kazuya, Shinjo Takeaki, Takemura Shoko, Tatsumi Kouko, Wanaka Akio	4. 巻 69
2. 論文標題 Large scale electron microscopic volume imaging of interfascicular oligodendrocytes in the mouse corpus callosum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2488 ~ 2502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.24055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Kazuya, Tanaka Tatsuhide, Takemura Shoko, Tatsumi Kouko, Wanaka Akio	4. 巻 16
2. 論文標題 SNX25 regulates proinflammatory cytokine expression via the NF- B signal in macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0247840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247840	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 達英、石西 綾美、辰巳 晃子、和中 明生
2. 発表標題 皮膚マクロファージはNGFレベルを調節することで痛覚を制御する
3. 学会等名 第65回日本神経化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中達英、和中明生
2. 発表標題 皮膚マクロファージは NGF レベルを調節することで痛覚を制御する
3. 学会等名 第127回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹村 晶子、石西 綾美、田中 達英、辰巳 晃子、和中 明生
2. 発表標題 「脳の窓」脳室周囲器官を介した脳と全身の情報交換機構
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 辰巳 晃子、絹川 薫、石西 綾美、奥田 洋明、竹村 晶子、田中 達英、和中 明生
2. 発表標題 淡蒼球におけるアストロサイトの多様性と運動刺激に対する形態変化について
3. 学会等名 第64回日本神経化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中 達英、和中 明生
2. 発表標題 皮膚マクロファージは NGF レベルを調節することで痛覚を制御する
3. 学会等名 第127回日本解剖学会総会、全国学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石西 綾美 (Isonishi Ayami) (10836018)	奈良県立医科大学・医学部・助教 (24601)	
研究分担者	辰巳 晃子 (Tatsumi Kouko) (90208033)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------