

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 15日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790645

研究課題名（和文） マイクロRNAによるミクログリア活性化制御の解明

研究課題名（英文） Analysis of microRNA-mediated microglial activation

研究代表者

齊藤 秀俊（SAITOH HIDETOSHI）

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90444794

研究成果の概要（和文）：

神経傷害後の脊髄でマイクロRNAの発現量をマイクロアレイ技術を用いて網羅的に解析した。また同時に脊髄内遺伝子発現情報をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。解析の結果、炎症反応に関連する遺伝子群で時間依存的な発現増加を示すデータが得られた。この中で、転写因子 *mafb* については病態形成時早期から脊髄のミクログリア細胞に局限してその発現がみられ疼痛発症過程に関与することを見出した。

研究成果の概要（英文）：

This study found expressional change in some of microRNA and messengerRNA after peripheral nerve injury. In the predicted candidates for pain-related molecules, this study demonstrated that transcription factor “*mafb*” is important factor for development of neuropathic pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：疼痛の発生・増強、機序神経障害性疼痛、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

血液中にある白血球は、侵襲から体を守る免疫系の代表的な細胞である。しかし、脳などの中枢神経系への白血球の出入りは厳しく制限されており、病気や怪我などで血管が損傷したときに限られる。そこで、白血球の代わりに脳内で免疫防御を担っているのが、グリア細胞の一種、ミクログリアである。ミクログリアは通常は突起を多数伸ばして周囲の細胞に接触しては、脳内に異常がないかを監視しているが、ひとたび神経細胞に異常が起こると、障害部位に移動し、細胞の形を変え、増殖し、神経細胞の修復を手助けする成長因子や、腫瘍細胞や細菌を殺す因子等を放

出する。さらには、死んでしまった脳細胞を貪食して、脳内を清掃する役目もある。しかしながら、免疫細胞としてのミクログリアの働きは諸刃の剣であり、腫瘍細胞や細菌を殺すために放出されたサイトカインやタンパク質分解酵素、活性酸素類は時として、正常な神経細胞を傷つけ、さらには神経栄養因子でさえ、神経細胞を変性させ神経回路に悪影響を及ぼすこともある。つまり、外部環境の変化によって引き起こされるミクログリアの機能変化のメカニズムを解明し、これを制御することは、様々な中枢神経系疾患の病因や症状を理解し、その改善につながるが予想される。神経障害性疼痛は、物理的な傷害や腫瘍を原

因とする神経の障害等によって引き起こされる難治性の疼痛であるが、これまで申請者の属する研究室では、神経障害性疼痛モデル動物を用い、この疾病の発症に対するミクログリアの関与を世界に先駆けて証明してきた。さらに近年、申請者を含めた幾つかのグループから、神経傷害時に脊髄内で引き起こされる遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した結果が報告されており、神経障害性疼痛発症に関与すると考えられる数多くの関連遺伝子が探索されてきている。このうち、申請者らは既に、DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現変化解析により、脊髄ミクログリアの P2Y₁₂ 受容体が神経障害性疼痛発症メカニズムに関与し、この阻害薬によってモデル動物の痛みが軽減されることを明らかにしてきた。

マイクロ RNA の標的遺伝子は多岐にわたり、細胞の増殖・発生・分化、アポトーシス・代謝などの様々な調節機構に深く関与していることが知られ、また近年では、癌、生活習慣病、感染症などのヒト疾患の原因と密接に関わっている可能性を示唆する事例が多く報告されている。またマイクロ RNA の発現自体も疾患マーカーになり得る可能性が示唆されている。マイクロ RNA に関する研究の現状は未だ初期段階であり、まずは様々な条件におけるマイクロ RNA の発現解析で研究競争が行われるものと予想されるため、神経障害性疼痛の分野においても世界に先駆けた網羅的解析を行うことは、世界における日本の疼痛研究のプライオリティー向上に大きく寄与すると考えられる。また網羅的解析によって見出されるデータは通常多数の研究対象因子を見出すことになり、本研究により、今後さらに派生してゆく研究が多数生みだされると考えられる。神経障害性疼痛に限らず、ミクログリアの活性化は様々な神経疾患において病態との関連性が明らかになりつつある。本研究の成果によりミクログリアの活性化におけるマイクロ RNA の役割が明らかになれば、その他多数の神経疾患疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症など、今後我が国が直面する超高齢化社会の大きな負担となる疾患に対しても、医薬品の創製へ貢献できる可能性がある。

2. 研究の目的

申請者が知識を蓄積してきた神経障害性疼痛モデルにおいて、これまで行ってきた個々の遺伝子発現変化に加え、新たにマイクロ RNA 発現の網羅的解析データを得る。さらに、申請者の主な解析対象であるミクログリ

アの活性化時における遺伝子発現変化にマイクロ RNA という新しいキーワードを導入することによって、複雑なミクログリアの機能変化メカニズムの解明を図る。また、これら遺伝子発現制御様式の解明によって神経障害性疼痛発症のキーポイントを見出し、効果的な治療戦略を探索する。

3. 研究の方法

(1) 疼痛モデルとして、既に申請者の属する研究室で確立されている、マウスの後肢を主に支配する L4-6 脊髄神経の内 L4 脊髄神経(ラットを用いる場合は L5)のみを切断する神経障害性疼痛モデル動物を用いる。疼痛閾値の低下が確認された動物の脊髄組織をサンプルとして、脊髄神経傷害側と非傷害側に分けてマイクロ RNA を抽出、精製する。神経傷害側と非傷害側の発現パターンをマイクロアレイ技術を用いて網羅的に解析し、両者間で特徴的な発現変化を示したマイクロ RNA 種を見出す。解析によって抽出されたマイクロ RNA 種については Taqman プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法を用いてより詳細な発現変化パターンを定量的に解析する。

(2) で得られたマイクロ RNA の配列情報から標的となりうる遺伝子をホモロジー検索によって選択する。標的候補遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法によって解析する。

(3) (2) で得られた結果を踏まえ、疼痛関連候補遺伝子に注目し、病態モデル動物における遺伝子発現を免疫組織学的解析によって行った。さらに、脊髄腔内へカテーテルを留置し、脊髄組織に対する siRNA 投与を行った。

組換え DNA 実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」及び「研究開発等に係る遺伝子組換え生物等の第二種使用等に当たって執るべき拡散防止措置等を定める省令」等の法令、並びに「九州大学遺伝子組換え実験指針」、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」及び「九州大学遺伝子組換え実験安全管理細則」を遵守し、事前に機関実験計画書への承認を受けた。

動物実験については、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」、「九州大学動物実験規則」及び「九州大学動物実験規則実施細則」を遵守し実験計画書の承認を受けてから実施した。

4. 研究成果

マウスを用いて神経障害性疼痛モデル動物を作成し、動物の脊髄組織をサンプルとして神経傷害側と非傷害側に分けてRNAを抽出した。術後0, 0.5, 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14, 21, 28日のそれぞれの時間において損傷側、非損傷側のマイクロRNA発現パターンをマイクロアレイ技術を用いて網羅的に解析した。また同時に同じRNAサンプルを用いて脊髄内遺伝子発現情報をDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。解析の結果、ケモカインシグナリングに関連する遺伝子群25個で一過性または時間依存的な発現増加を示すデータが得られた。サイトカインシグナルを含めると53個、転写因子を含む核内タンパク質をコードする遺伝子は39個で発現上昇が見られた。この中には未だ公に研究報告のない遺伝子も含まれており、新規疼痛関連遺伝子候補として重要な情報を得ることができた。miR1224のターゲット遺伝子と予測される転写因子 *mafB* については病態形成時早期からマイクログリアに限局してその発現がみられた(図1)。

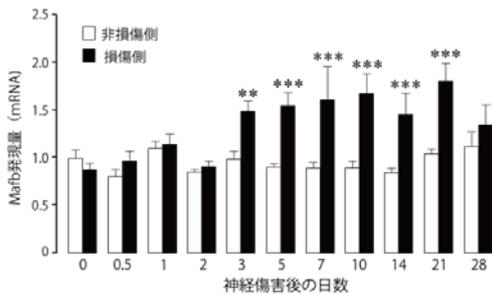


図1 転写因子 *Mafb* mRNA 発現量の変化

脊髄マイクロRNAの発現は全体的に発現量や変化率の低いものであったが、20%以上の発現増加を示すものが10種、20%以上の発現低下を示すものが4種挙げることができた。

先の実験結果で *mafB* に注目し病態モデルでの解析を行った結果、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄組織中では一部のマイクログリアの核内で、核内転写因子の一つである *MafB* が、脊髄マイクログリアの活性化と相関して発現増加することを見出した(図2)。

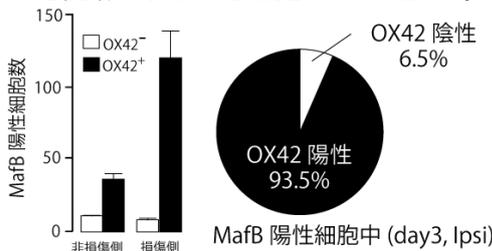


図2 *Mafb* 陽性細胞とマイクログリアマーカータンパク質 OX42 の発現割合

末梢神経切断後、一部の脊髄マイクログリアの核内で *MafB* 発現は顕著に増加しており、*MafB* 陽性マイクログリアは、末梢神経損傷後1日目から観察され、増殖マーカーおよび活性化表現型マーカー CD68 の局在と一致していた。培養マイクログリアにおいて siRNA によって *Mafb* 遺伝子をノックダウンすると、痛みに関連した遺伝子の発現レベルが低下し、疼痛症状が軽減されることを見出した(図3)。

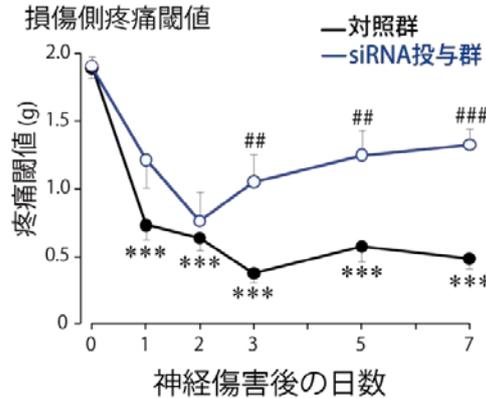


図3 転写因子 *Mafb* の発現量を抑制した時に見られる疼痛寛解作用

傷害を受けた後根神経より産生放出されるケモカインの一つである CCL21 は、in vitro および in vivo 両方の試験においてマイクログリアの *MafB* 発現を増強した。本研究結果は、*MafB* は末梢神経傷害後の活性化マイクログリアに誘導され、疼痛発症に関与する重要な転写因子であることを示唆している。

マイクロアレイ解析結果より明らかにしたケモカイン受容体 CCR5 について詳細に疼痛発症への関与を追究した結果、CCR5 のリガンドである CCL3 の髄腔内投与によって疼痛行動が惹起されることを見出した。この作用は2相性であり、5時間程度持続する急性の痛みの後に、翌日から数日続く疼痛がみられる。急性の痛みは CCR1 阻害薬によって抑制されるが、翌日からの痛みは抑制しない。逆に CCR5 阻害薬は急性の痛みは抑制しないが、翌日からの痛みを抑制することを見出した。CCR5 の RNA 発現は in situ hybridization 法を用いた解析により脊髄マイクログリアに発現し、CCR1 は神経細胞に発現していることが示唆された。さらに、CCR5 阻害薬は神経障害後の疼痛モデルにおいて疼痛寛解作用を示すことを見出した。

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 5 件)

- ① Takahiro Masuda, Makoto Tsuda, Ryohei Yoshinaga, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Keiko Ozato, Tomohiko Tamura, Kazuhide Inoue. "IRF8 Is a Critical Transcription Factor for Transforming Microglia into a Reactive Phenotype." *Cell Reports*, 2012, 1(4):334-40.
- ② Uesugi A, Kataoka A, Tozaki-Saitoh H, Koga Y, Tsuda M, Robaye B, Boeynaems JM, Inoue K., "Involvement of protein kinase D in uridine diphosphate-induced microglial macropinocytosis and phagocytosis." *Glia*. 2012, 60(7):1094-105.
- 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, 8(2):301-10.
- ④ Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K., "Purinergic system, microglia and neuropathic pain." *Curr Opin Pharmacol*. 2012, 12(1):74-9.
- ⑤ Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K., "Platelet-activating factor and pain." *Biol Pharm Bull*. 2011, 34(8):1159-62.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 齊藤秀俊, 津田誠, 山下智大, 井上和秀, "P2X4 受容体のマイクログリア膜トラフィック制御", 第 86 回日本薬理学会年会
- ② 小嶋ちなみ, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀, "CCL21 による脊髄マイクログリアの MafB 発現誘導", 第 86 回日本薬理学会年会
- ③ 川田竜, 齊藤秀俊, 増田隆博, 津田誠, 井上和秀, "転写因子 MafB は末梢神経損傷後の神経障害性疼痛発症に寄与する" 第 86 回日本薬理学会年会
- ④ 増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 岩本祥佑, 西山晃, 西本奈央, 齊藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀, "IRF8-IRF5 軸は神経障害性疼痛発現を担う P2X4 受容体高発現マイクログリアを誘導する" 第 86 回日本薬理学会年会
- ⑤ 西本奈央, 増田隆博, 富山大輔, 吉永遼平, 田村智彦, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀, "転写因子 IRF8 欠損による ATP 誘発マイクログリアケモタキシスの抑制", 第 86 回日本薬理学会年会
- ⑥ 落石龍太郎, 津田誠, 永田健一郎, 矢野貴之, 井上智之, 齊藤秀俊, 井上 和秀,

"パクリタキセル誘発慢性疼痛における脊髄内 CCL3 の関与", 第 86 回日本薬理学会年会

- ⑦ 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀, 初代培養マイクログリアにおける P2Y12 受容体を介したケモカインの発現制御, 第 54 回日本神経化学学会大会
- ⑧ 上杉歩未, 片岡彩子, 齊藤秀俊, 津田誠, 井上和秀, UDP 誘発性のマイクログリアによるマクロビノサイトーシスへの PKD の関与, 第 54 回日本神経化学学会大会
- ⑨ 増田潤哉, 齊藤秀俊, 米田聡介, 津田 誠, 井上和秀, 神経障害性疼痛モデルにおいて脊髄マイクログリア特異的に発現する転写因子 MafB の役割, 第 64 回日本薬理学会西南部会
- ⑩ 米田聡介, 増田潤哉, 齊藤秀俊, 津田 誠, 井上和秀, 神経障害性疼痛におけるマイクログリアの転写因子 MafB の役割, 第 39 回薬物活性シンポジウム
- ⑪ 齊藤秀俊, 宮田広行, 津田 誠, 井上和秀, 神経障害性疼痛におけるマイクログリア P2Y12 受容体の関与, 第 39 回薬物活性シンポジウム

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

www.yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 秀俊 (SAITOH HIDETOSHI)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：90444794