

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890148

研究課題名（和文） IRF をターゲットとしたミクログリアによる  
神経障害性疼痛発現メカニズムの解明

研究課題名（英文） Role of interferon regulatory factor (IRF) family transcription factor  
in microglial activation and neuropathic pain.

研究代表者

増田 隆博 (MASUDA TAKAHIRO)

九州大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：80615287

研究成果の概要（和文）：

神経損傷時にミクログリア細胞を活性化状態へと移行させる遺伝子制御メカニズムの解明を目的として、転写因子 interferon regulatory factor (IRF) に着目し、詳細な解析を行った。その結果、神経損傷時に、IRF8 および IRF5 が脊髄ミクログリアで発現増加し、P2X4 受容体などの疼痛関連因子の発現増加を介してミクログリアを活性化状態へと移行させ、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。

研究成果の概要（英文）：

We identify the interferon regulatory factor (IRF) member IRF8-IRF5 axis as a critical transcriptional regulator of microglia involved in converting into a P2X4R<sup>hi</sup> reactive phenotype, which drives neuropathic pain following peripheral nerve injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：ミクログリア、神経障害性疼痛、IRF、転写因子、中枢性疾患、P2X4 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

近年、神経障害性疼痛発症における中枢免疫担当細胞ミクログリアの重要な役割が明らかになっている。神経損傷後、脊髄ミクログリアは機能分子の発現変化を伴って活性化状態へと移行し、生理活性物質の過剰な産

生・放出（もしくは神経細胞への物理的な接触）を介して脊髄後角神経の過剰興奮を引き起こし、それが原因となり異常な疼痛が発症するということを明らかにしてきた (*Nature* 424, 778-783, 2003; *Nature* 438, 1017-1021, 2005; *PNAS* 106, 8032-8037, 2009)。しかし、

①どのタイミングで、どういった因子がミクログリアを活性化状態へと移行させるのか？②どういった細胞内もしくは細胞間メカニズムでその活性化状態を維持するのか？というミクログリア細胞のフェノタイプ決定メカニズムは未解決であった。

我々は、末梢神経損傷後、脊髄ミクログリアが多く活動性関連遺伝子の発現変化を伴って活性化状態へと移行することを踏まえ、ある転写因子が活性化状態への誘導を担っているのではないかという仮説に立てた。そこで、神経障害性疼痛モデル動物の脊髄サンプルを用い、網羅的マイクロアレイ解析を行い、脊髄内で発現変化する遺伝子群の同定を行った。その結果、神経障害性疼痛モデル動物の脊髄内で発現誘導される転写因子を数種類見出すことに成功し、その中で IRF8 が脊髄ミクログリアの過活動状態への移行に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

転写因子 IRF8 を切り口とした研究成果を基盤として、以下の課題に焦点を置き、未解決課題である「ミクログリアの活性化状態形成・維持メカニズム」の全容解明を目指した。

(1) IRF 転写因子ネットワークによるミクログリアの活性化状態形成・維持メカニズムの解明： IRF8 は、脊髄内でミクログリアの活性化状態への移行に重要な役割を果たし、疼痛発症に関与することが示唆されたが、その詳細な分子機構は明らかになっていない。培養ミクログリア細胞に IRF8 を遺伝子導入することで、他の IRF 転写因子(IRF1, 5, 7, 9) の発現増加が誘導されたことから(未発表データ)、IRF8 を含めたこれら IRF 転写因子ファミリーが単独もしくは互いに協調して、ミクログリアの過活動状態への移行・維持に何らかの役割を果たしていると推察された。そ

こで本研究で、ミクログリアにおける IRF8 と他の IRF 転写因子ファミリーの関係性を明確にし、さらにそれぞれの IRF 転写因子ファミリーの役割解明を目指した。

(2) IRF 転写因子ファミリーを発現増加した脊髄ミクログリアによる神経障害性疼痛発症メカニズムの解明： IRF8 を過剰発現したミクログリアが、神経障害性疼痛発症に重要な役割を果たすことが明らかになり、上記のように、IRF8 によって発現誘導されることが示唆された IRF1, 5, 7, 9 が、何らかの形で疼痛行動発現にも重要な役割を果たしているものと推察される。そこで、IRF 転写因子ファミリーの神経障害性疼痛発症への関与の有無およびそのメカニズム解明を目指し、細胞レベルおよび動物個体レベルで詳細な検討を行うことを目指した。

## 3. 研究の方法

ミクログリア細胞に対する高い遺伝子導入効率を確認できたレンチウィルスを用いて各 IRF 転写因子ファミリーの発現変化を誘導し、それら転写因子によって発現制御されている遺伝子群の特定、および細胞の動的・機能的な活動変化を観察することで、ミクログリア過活動状態形成・維持メカニズムにおける役割の解明を目指した。また同時に、IRF8 と他の IRF 転写因子ファミリーの神経障害性疼痛発症に対する役割の解明を目指し、細胞レベル及び動物個体レベルでのアプローチで詳細な解析を行った。

## 4. 研究成果

初めに、培養ミクログリア細胞に対して IRF8 分子を強制発現させ、他の IRF 転写因子ファミリーの発現変化を検討した。その結果、IRF8 の発現増加に伴い、IRF1, IRF5, IRF7 および IRF9 の顕著な発現増加が観察された。そこで特に顕著な発現変化が観察された

IRF5 に関して、神経障害性疼痛モデル動物の脊髄内における発現変化について検討したところ、末梢神経損傷後、損傷側脊髄内で強力かつ持続的な発現増加が観察された。次に、脊髄における IRF5 の発現細胞種を特定するため、in situ hybridization 法を用いて検討した。その結果、IRF5 mRNA 由来のシグナルは、神経細胞やアストロサイトには全く観察されず、ミクログリアが細胞種特異的に IRF5 を発現していることが明らかになった。一方、神経損傷に由来する IRF5 の発現増加は、IRF8 欠損マウスの脊髄内においてはほぼ完全に消失したことから、IRF8 が IRF5 の発現を制御していると考えられた。そこで IRF8 が直接 IRF5 の発現制御を担っているか否か明らかにするため、クロマチン免疫沈降法やルシフェラーゼアッセイ法等を用いて詳細に解析した。その結果、IRF8 が IRF5 のプロモーター領域に結合し、直接発現制御していることが明らかになった。

次に、脊髄ミクログリアに発現する IRF5 が疼痛発症に寄与するか否か検討するため、IRF5 の siRNA を作製し、神経障害性疼痛モデル動物の脊髄腔内に投与した。その結果、脊髄 IRF5 の発現抑制に伴い、神経障害に起因する疼痛行動が顕著に抑制されたことから、ミクログリアに発現する IRF5 が疼痛発症に寄与していると考えられた。そこで、培養ミクログリア細胞を用いて、IRF5 の役割について検討した。その結果、疼痛発症に重要な役割を果たしている P2X4 受容体の発現増加に IRF5 が深く関与している可能性が示唆された。以上の結果から、末梢神経損傷後、脊髄ミクログリアで発現増加した IRF8 は、さらに IRF5 を発現誘導し、これら IRF8-IRF5 軸が P2X4 受容体などの疼痛関連因子の発現誘導を介してミクログリアを活性化状態へと移行させ、神経障害性疼痛発症に重要な役

割を果たしていると考えられる。

本研究は、神経障害性疼痛を含めた種々の中枢性疾患発症に寄与していることが明らかになっているミクログリアの活性化状態への移行に重要な役割を果たしている細胞内シグナルとして IRF 転写因子ネットワークを特定したという点で非常に有用な研究であると考えられる。近年、神経障害性疼痛以外にも、アルツハイマー病や多発性硬化症など様々な中枢性疾患においても、活性化状態ミクログリアはその病巣部で認められ、極めて重要な役割を果たしていることが明らかになっていることから、本研究で得られた成果は、神経障害性疼痛のみならず、他の中枢性疾患をターゲットとした研究分野への波及効果も非常に大きいと期待される。また IRF 転写因子ファミリーは、末梢免疫細胞をターゲットとした研究分野においては、多くの重要な研究成果が報告されているものの、中枢神経系における役割が全く明らかになっていなかったため、IRF 転写因子ファミリーの新たな概念を提唱することができるものと期待する。

#### 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 2 件)

① Tsuda M Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2013), Microglial regulation of neuropathic pain, **Journal of Pharmacological Sciences**, 121: 89-94, 査読有

(DOI: 10.1254/jphs.12R14CP)

② Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K (2012) IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. **Cell Reports** 1:334-40, 査読有

(DOI: 10.1016/j.celrep.2012.02.014)

〔学会発表〕（計 11 件）

① Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Iwamoto S, Nishiyama A, Nishimoto N, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Inoue K, IRF8-IRF5 軸は神経障害性疼痛発現を担う P2X4 受容体高発現ミクログリアを誘導する、第 86 回日本薬理学会年会、福岡、2013 年 3 月 21 日～23 日

② Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K. IRF8 is a critical transcription factor required for transforming microglia into a reactive phenotype after nerve injury, Neuroscience2012, ニューオリンズ（アメリカ）, 2012 年 10 月 13 日～17 日

③ Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Inoue K. IRF8 transcription factor directs microglia to be a hyperactive phenotype driving neuropathic pain, EuroGlia2011、プラハ（チェコ）、2011 年 9 月 17 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://yakkou.phar.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

増田 隆博 (MASUDA TAKAHIRO)

九州大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：80615287

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：