

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 15 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592356

研究課題名(和文) ヒストンによる末梢感作を介した慢性疼痛制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of chronic pain via histone-dependent peripheral sensitization

研究代表者

木口 倫一 (Kiguchi, Norikazu)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90433341

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛の分子基盤解明を目的とし、核タンパク質であるヒストンの役割に着目した。末梢神経傷害後にはマクロファージなどの免疫細胞が浸潤し、ケモカインに代表される種々の疼痛増悪因子を産生する。これらの発現はヒストンのアセチル化やメチル化修飾に基づいて生じることを明らかにした。またヒストン修飾を受けたマクロファージは疼痛増悪に關与する性質に変化しており、薬物処置によりそのマクロファージを沈静化させると慢性疼痛が改善することを見出した。結論として、マクロファージにおけるヒストン修飾変化が慢性疼痛病態の鍵であり、新たな治療標的として期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on the roles of histone, a nuclear protein, in molecular mechanisms of chronic pain. Immune cells including macrophages were accumulated in the injured nerves, and they produced pain-facilitating molecules such as chemokines. We found that these expressions were mediated by modification (acetylation and methylation) of histones. Moreover, macrophages were polarized into pain-facilitating phenotype by histone modification. We demonstrated that inhibition of these types of macrophages by pharmacological treatment was able to improve chronic pain. Taken together, histone modification in macrophages might be key machinery of chronic pain, and it will be candidate of novel therapeutic target.

研究分野：薬理学、神経科学

キーワード：慢性疼痛 神経障害性疼痛 ヒストン マクロファージ ケモカイン エピジェネティクス 炎症 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性疼痛は神経系の傷害や機能異常に基づいて発症し、通常の鎮痛薬に抵抗性を示すために治療が難航する。疼痛伝達経路における慢性神経炎症が病態の分子基盤を担うという概念が確立しつつあるものの、その詳細は依然として不明である。有効な治療戦略の確立を見据えた慢性神経炎症の分子基盤解明が、現状での最重要課題である。

(2) 傷害末梢神経には好中球、マクロファージおよびリンパ球などの免疫細胞が浸潤し、炎症性メディエーターを介して慢性疼痛に密接に関与する(図1)。申請者らはこれまでに傷害末梢神経における慢性神経炎症を担うサイトカイン・ケモカイン(マクロファージ炎症性タンパク質)を同定しており、それらが慢性疼痛に重要な役割を果たすことを世界に先駆けて報告してきた(*PAIN* 2010; *Curr Opin Pharmacol*, 2012)。またこれらの発現変動はプロモーター領域におけるヒストンのアセチル化(エピゲノム修飾)により調節されることも明らかにしている(*JPET* 2012)。末梢感作を担うサイトカイン・ケモカインネットワークの調節機構ならびに種々の標的細胞応答を含めた総合的理解を深めることにより、慢性疼痛研究の飛躍的な発展が期待できる。

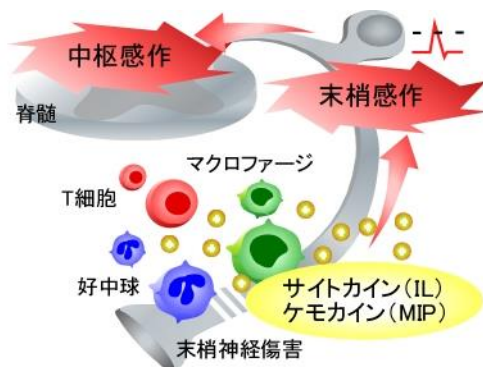


図1: 免疫細胞の浸潤と末梢神経炎症

2. 研究の目的

(1) 本研究では、慢性疼痛の新規責任分子としてのヒストンの役割に着目した。エピゲノム修飾に基づくサイトカインの発現調節に加え、細胞外に遊離したヒストンの標的細胞への直接作用を評価し、ヒストンが担う末梢感作の総合的理解を目的とした。

(2) 5種類に大別されるコアヒストン(H2A, H2B, H3, H4)およびリンカーヒストン(H1)はヌクレオソームの構成因子であり、クロマチン構造のダイナミクスを直接的に制御する。近年、悪性腫瘍や自己免疫疾患を含む慢性炎症性疾患の分子基盤としてエピゲノム修飾の注目度が高まっている。さらに申請者らの研究成果に基づく、慢性疼痛を担うサイトカイン・ケモカインの発現変動にもヒス

トン修飾の密接な関与が示唆される。さらにヒストンは炎症時に細胞外へと遊離され、細胞傷害効果や炎症の増悪を示すといった新たな役割も最近明らかにされている。

(3) 上記のように、炎症反応を担うヒストンの役割は多彩であり、末梢感作における関与もこれまでの知見から十分に伺える。ヒストンの直接的および間接的作用に基づく慢性神経炎症の制御機構を解明し、慢性疼痛の新規治療戦略を確立する。

3. 研究の方法

(1) 坐骨神経部分結紮: ICR系雄性マウス(20-25 g)を用い、ペントバルビタール麻酔下にて後肢坐骨神経の約1/3を縫合糸できつく結紮した。使用薬物はPBSまたはDMSOに溶解し、坐骨神経周囲に投与量を10 µlとして局所投与した。

(2) RT-リアルタイムPCR: 坐骨神経より総RNAを抽出し、cDNAを作製した。SYBR Greenの蛍光強度を指標とした定量的リアルタイムPCRを行い、各々のmRNA発現を定量化した。

(3) 組織化学解析: 深麻酔下にて4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、摘出した坐骨神経の凍結組織切片を作成した。各々の特異的抗体を用いて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて目的タンパク質の発現を評価した。

(4) クロマチン免疫沈降: 坐骨神経よりヒストン-DNA複合体を調整した。アセチル化およびメチル化ヒストンH3特異的抗体を用いて免疫沈降を行い、DNAを抽出した。プロモーター領域に特異的なプライマーを用いたPCRにより、ヒストン修飾を評価した。

(5) 疼痛行動評価: 金網上で馴化させたマウスの後肢足底中央を屈曲圧0.07 gまたは0.16 gのvon Freyフィラメントで刺激し、逃避反応を示した回数増加により触アロディニアを評価した。強化ガラス板上で馴化させたマウスの後肢足底中央に放射熱を照射し、逃避反応を示すまでの潜時の短縮により熱痛覚過敏を評価した。

4. 研究成果

(1) 傷害末梢神経における種々の炎症性因子発現増加: 部分結紮後の坐骨神経において、サイトカイン・ケモカインの発現をマイクロアレイにより網羅的に評価した。特にCC-chemokine ligand 3 (CCL3)およびCCL8の発現増加が突出しており(図2)、慢性疼痛に重要だとされているCCL2の発現増加も観察された。またこれらの受容体であるCC-chemokine receptor 1 (CCR1)、CCR2、CCR5の増加も同時に認められた。

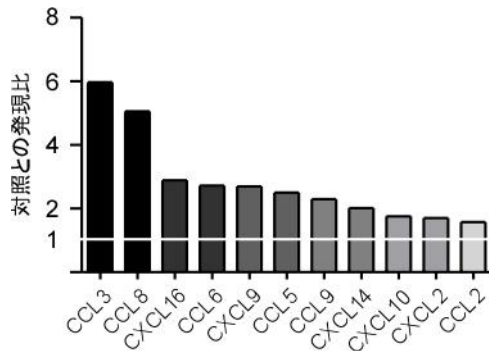


図2: 傷害坐骨神経におけるケモカイン発現

(2) ケモカインの発現増加におけるヒストン修飾の関与: CCL2、CCL3 および CCL8 のプロモーター領域におけるヒストン修飾を評価すると、いずれも遺伝子転写を促進的に制御するヒストン H3 のアセチル化 (K9) やトリメチル化 (K4) が認められた。ヒストンアセチル化阻害薬を用いると、CCL やその受容体の発現増加が抑制された。

(3) マクロファージにおけるヒストン依存的ケモカイン発現増加: 傷害坐骨神経における組織化学的解析により、CCL は骨髄由来マクロファージに高発現することが示された。これらの CCL 発現マクロファージの核内において、アセチル化ならびにトリメチル化ヒストンの増加が観察されたことより、ヒストン修飾とケモカイン発現の直接的関与が裏付けられた (図 3)。

緑: アセチル化ヒストンH3
赤: マクロファージ 青: 核

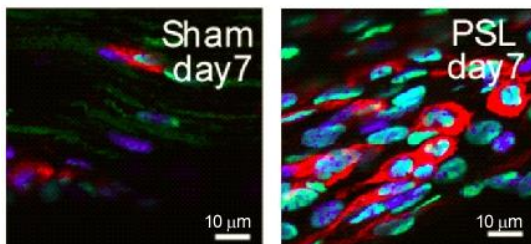


図3: 浸潤マクロファージにおけるヒストン修飾

(4) ヒストン修飾とマクロファージフェノタイプ変化: ヒストン修飾依存的に CCL やサイトカインを高発現するマクロファージは、CD86 を発現するなど炎症性 (M1) マクロファージの特性を有していた。M1 マクロファージに interleukin-4 (IL-4) を処置すると、CCL の発現低下と共に、Arginase や CD206 を高発現する抑制性 (M2) マクロファージへのフェノタイプシフトが観察された。

(5) 炎症性マクロファージが担う慢性疼痛の病態基盤: 傷害末梢神経において炎症の増

悪に関与する M1 マクロファージを IL-4 やニコチン性アセチルコリン受容体作動薬により抑制すると、神経傷害後に生じる触アロディニアおよび熱痛覚過敏が抑制された。マクロファージ欠損モデルを用いた実験においても同様の結果が得られており、ヒストン修飾変化を伴った M1 マクロファージの重要性が示唆された。

(6) 結論: 末梢神経傷害時に骨髄より浸潤するマクロファージではヒストン修飾変化が生じており、CCL を含む種々の炎症性因子を高発現する。ヒストン修飾に依存した炎症性マクロファージへの転化、ならびにそれらが産生するケモカイン・サイトカインが慢性疼痛の末梢性分子基盤であることを本研究において明らかにした (図 6)。さらにこれらを標的とした薬理的アプローチによる治療戦略の可能性も同時に示唆している。

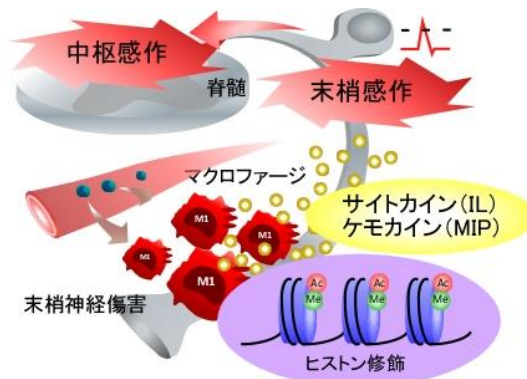


図4: ヒストン修飾に基づく慢性疼痛分子基盤

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 10 件)

① Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Sakaguchi H, Maeda T, Kishioka S: Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain* 2015; 156(4): 684-693. 査読有. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000097.

② Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S: Peripheral alpha4beta2 nicotinic acetylcholine receptor signaling attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia after nerve injury in mice. *Acta Physiol* 2015; 213(2): 462-471. 査読有. doi: 10.1111/apha.12437.

③ Kiguchi N, Saika F, Kobayashi Y, Kishioka S: Epigenetic regulation of CC-chemokine ligand 2 in nonresolving inflammation. *Biomol Concepts* 2014; 5(4):

265-273. 査 読 有 .
doi:10.1515/bmc-2014-0022.

④ Kiguchi N, Kobayashi Y, Kadowaki Y, Fukazawa Y, Saika F, Kishioka S: Vascular endothelial growth factor signaling in injured nerves underlies peripheral sensitization in neuropathic pain. *J Neurochem* 2014; 129(1): 169-178. 査読有. doi: 10.1111/jnc.12614.

⑤ 木口 倫一, 岸岡 史郎: 傷害末梢神経におけるヒストン修飾は神経障害性疼痛を調節する. *Pain Research* 2014; 29(1): 9-16. 査読有. https://www.jstage.jst.go.jp/browse/pain/29/1/_contents/-char/ja/

⑥ Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Kishioka S: Epigenetic upregulation of CCL2 and CCL3 via histone modifications in infiltrating macrophages after peripheral nerve injury. *Cytokine* 2013; 64(3): 666-672. 査 読 有 . doi: 10.1016/j.cyto.2013.09.019.

⑦ Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T, Tominaga S, Nakamura J, Fukazawa Y, Ozaki M, Kishioka S: Activation of nicotinic acetylcholine receptors on bone marrow-derived cells relieves neuropathic pain accompanied by peripheral neuroinflammation. *Neurochem Int* 2012; 61(7): 1212-1219. 査 読 有 . doi: 10.1016/j.neuint.2012.09.001.

⑧ Saika F, Kiguchi N, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S: CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein-1 β participates in the induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Eur J Pain* 2012; 16(9): 1271-1280. 査 読 有 . doi: 10.1002/j.1532-2149.2012.00146.x.

⑨ Kiguchi N, Kobayashi Y, Maeda T, Fukazawa Y, Tohya K, Kimura M, Kishioka S: Epigenetic augmentation of the macrophage inflammatory protein 2/C-X-C chemokine receptor type 2 axis through histone H3 acetylation in injured peripheral nerves elicits neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2012; 340(3): 577-587. 査 読 有 . doi: 10.1124/jpet.111.187724.

⑩ Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S: Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 2012; 12(1): 55-61. 査 読 無 (招 待) . doi:

10.1016/j.coph.2011.10.007.

[学会発表] (計 17 件)

① 小林 悠佳, 他 : 末梢免疫細胞を標的とした神経障害性疼痛病態の解明、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場 (名古屋).

② 阪口 晴香, 他 : IL-13 はマクロファージのフェノタイプシフトによって神経障害性疼痛を緩和する、第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場 (名古屋).

③ 阪口 晴香, 他 : IL-13 は末梢神経傷害時の炎症性マクロファージを抑制する、第 126 回日本薬理学会近畿部会、2014 年 10 月 24 日、和歌山県 JA ビル (和歌山).

④ 木口 倫一, 他 : マクロファージを標的とした神経障害性疼痛治療戦略の検討、第 34 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2014 年 9 月 6 日、東京都医学総合研究所 (東京).

⑤ Kiguchi N, Kishioka S : Peripheral macrophages in long-lasting neuroinflammation and neuropathic pain、生体機能と創薬シンポジウム 2014、2014 年 8 月 29 日、近畿大学東大阪キャンパス (大阪).

⑥ 木口 倫一, 他 : IL-4 はマクロファージの機能調節を介して神経障害性疼痛を改善する、第 36 回日本疼痛学会、2014 年 6 月 21 日、KKR ホテル大阪 (大阪).

⑦ 岸岡 史郎, 他 : 神経障害性疼痛治療標的としての末梢ニコチン性アセチルコリン受容体、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、仙台国際センター (仙台).

⑧ 木口 倫一, 他 : IL-4 は炎症性マクロファージおよび神経障害性疼痛を抑制する、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日、仙台国際センター (仙台).

⑨ Kiguchi N, 他 : Histone H3 acetylations enhances chemokine expression leading to neuropathic pain、Asian Pain Symposium 2013、2013 年 12 月 18 日、岡崎カンファレンスセンター (岡崎).

⑩ 木口 倫一, 他 : 神経障害性疼痛における末梢性 VEGF シグナルの関与、第 33 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2013 年 9 月 6 日、神戸大学医学部会館 (神戸).

⑪ 木口 倫一, 岸岡 史郎 : 傷害末梢神経におけるヒストン修飾は神経障害性疼痛を調節する、第 35 回日本疼痛学会、2013 年 7 月 13

日、大宮ソニックシティ（さいたま）。

⑫木口倫一、他： マクロファージによる血管新生と神経障害性疼痛、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 22 日、福岡国際会議場（福岡）。

⑬ Kiguchi N、他： Macrophage inflammatory proteins contributing to neuropathic pain were upregulated by histone modifications after peripheral nerve injury、International Symposium for Neurosciences 2013、2013 年 2 月 26 日、東北薬科大学（仙台）。

⑭ Kiguchi N、他： Augmentation of the MIP-2/CXCR2 axis through histone H3 acetylation in injured peripheral nerves facilitates neuropathic pain.、Neuroscience 2012、2012 年 10 月 17 日、ニューオリンズ（アメリカ）。

⑮木口倫一、岸岡史郎： マクロファージ炎症性タンパク質は末梢神経炎症を介して神経障害性疼痛を惹起する、第 34 回日本疼痛学会、2012 年 7 月 21 日、熊本市国際交流会館（熊本）。

⑯木口倫一、他： 骨髄由来細胞におけるニコチン性アセチルコリン受容体シグナルの神経障害性疼痛改善効果、第 35 回日本神経科学大会、2012 年 9 月 19 日、名古屋国際会議場（名古屋）。

⑰木口倫一： Epigenetic Augmentation of the Macrophage Inflammatory Protein 2/C-X-C Chemokine Receptor Type 2 Axis through Histone H3 Acetylation in Injured Peripheral Nerves Elicits Neuropathic Pain、第 80 回和歌山医学会総会、2012 年 7 月 8 日、和歌山県立医科大学（和歌山）。

〔その他〕

和歌山県立医科大学医学部薬理学教室ホームページ

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakuibu/160416/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木口 倫一 (KIGUCHI, Norikazu)

和歌山県立医科大学医学部・講師

研究者番号： 90433341

(2) 研究分担者

岸岡 史郎 (KISHIOKA, Shiroh)

和歌山県立医科大学医学部・教授

研究者番号： 60137255

小林 悠佳 (KOBAYASHI, Yuka)

和歌山県立医科大学医学部・助教

研究者番号： 20511562

深澤 洋滋 (FUKAZAWA, Yohji)

関西医療大学保健医療学部・准教授

研究者番号： 70336882

(4) 研究協力者

阪口 晴香 (SAKAGUCHI, Haruka)