

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659827

研究課題名(和文) TOLL様受容体によるミトコンドリアDNAの誤認識に基づく慢性疼痛発症機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of endosomal Toll-like receptors in the development of neuropathic pain

研究代表者

中西 博(Hiroshi, Nakanishi)

九州大学・歯学研究科(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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子Unc93b1の点突然変異をもつ3dマウスではTLR3, TLR7ならびにTLR9のエンドソームへの移行が障害されており、これらのTLRのリガンドに対する応答が欠如している。この3dマウスを用い、TLRの神経障害性疼痛における役割を解析した結果、3dマウスは神経障害性疼痛に抵抗性を示した。また、野性型マウスでは末梢神経障害に伴ってIFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ ならびにTNF- $\alpha$ が有意に増大したが、3dマウスではIL-10ならびにArginase-1が有意に増大した。以上の結果より、末梢神経障害に伴って3dマウスではM2フェノタイプが誘導され、神経障害性疼痛に対して抵抗性を示すものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：3d mice have defective signaling via TLR3, TLR7 and TLR9 due to the mutation of Unc93b1. In this study, the roles of these receptors on the induction of neuropathic pain were elucidated using 3d mice. 3d mice had statistically significant higher pain threshold as comparison with that of wild-type mice. In wild-type mice, the mean expression levels of inflammatory molecules in the spinal cord were significantly increased following peripheral nerve injury. In contrast, the mean expression levels of anti-inflammatory molecules were significantly increased in the spinal cord of 3d mice following peripheral nerve injury. These observations suggest that spinal microglia of wild-type mice polarize to M1 phenotype following peripheral nerve injury through activation of TLR9. On the other hand, spinal microglia in 3d mice polarize to M2 phenotype following peripheral nerve injury, inducing resistance to neuropathic pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯学

キーワード：歯科薬理学 Toll様受容体 神経障害性疼痛

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内の小胞体に局在する Toll 様受容体 (TLR) ファミリーの TLR3、TLR7 ならびに TLR9 は病原体感染にともなってエンドソームに移行し、病原体由来の核酸に応答する。最近、TLR3、TLR7 ならびに TLR9 のリガンドに対する応答の欠如した変異 (3D) マウスが病原体感染には無関係の難治性慢性疼痛に抵抗性を示すことを見出した。TLR3 は 2 重鎖 RNA、TLR7 は 1 重鎖 RNA、TLR9 は 1 重鎖 DNA をそれぞれ特異的に認識することから、「細菌の DNA に構造の類似したミトコンドリア DNA が TLR9 のリガンドとなり活性化シグナルを誘導することで難治性疼痛を発症させる」という着想に至った。

### 2. 研究の目的

「ミトコンドリア DNA が TLR9 のリガンドとなり自然免疫システムを異常に活性化することで難治性慢性疼痛を引き起こす」という仮説に対するエビデンスを確立することを目的とする。

### 3. 研究の方法

遺伝子 Unc93b1 の点突然変異をもつ 3d マウスでは TLR3、TLR7 ならびに TLR9 のエンドソームへの移行が障害されており、このためこれらの TLR のリガンドに対する応答が欠如している。この 3d マウスを用いて疼痛に対する感受性を野生型マウスと比較した。

### 4. 研究成果

まず熱過敏性に対する比較を行った結果、後肢足裏の皮内への生理食塩水注入群では後肢を引っ込める潜時に有意な差は認められなかった。ところが、後肢足裏の皮内へのアジュバンド注入群では 3d マウスは野生型マウスに比べて有意に長い潜時を示した。さらに神経障害性ならびに炎症性疼痛モデルにおいて疼痛閾値の比較を行った。神経障害性疼痛は脊髄神経 L4 レベルでの切断により作成し、炎症性疼痛は後肢足裏の皮内へのアジュバンド注入により作成した。その結果、どちらの慢性疼痛モデルにおいても 3d マウスは野生型マウスに比べて有意に高い疼痛閾値を示した (図1)。

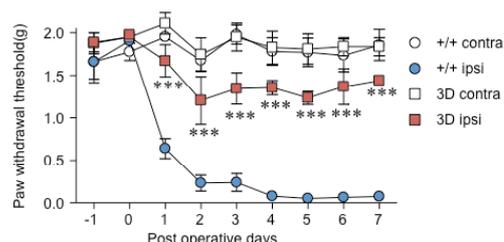


図1 野生型ならびに3dマウスの神経障害性疼痛閾値の経時的変化

抗Iba1抗体を用いたミクログリアの免疫染色の結果、野生型マウスでは神経障害に伴って脊髄後角ミクログリアは活性化して数の増大ならびに形態変化を示すが、3dマウスでは脊髄後角ミクログリアの活性化は有意低下していた (図2)。

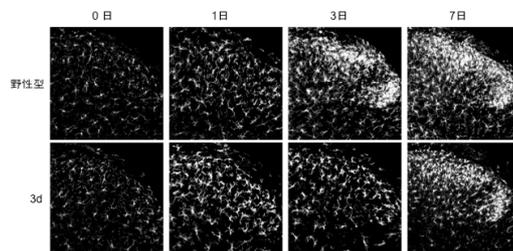


図2 野生型ならびに3dマウスの末梢神経障害に伴う脊髄後角におけるミクログリア形態の経時的変化

また、ミクログリアの活性化の指標として IL-1 $\beta$  の免疫染色を行った結果、脊髄後角ミクログリアにおける IL-1 $\beta$  の発現は野生型マウスでは認められたが 3d マウスでは認められなかった。また、脊髄後角において Unc93b1 は主にミクログリアに発現していた。次に、定量的 RT-PCR 法を用い、脊髄後角における炎症性分子 (IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  ならびに TNF- $\alpha$ ) ならびに抗炎症性分子 (IL-10 ならびに Arginase-1) の発現レベルを定量的に解析した。その結果、野生型マウスでは末梢神経障害に伴って IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  ならびに TNF- $\alpha$  の発現レベルが有意に増大したが、IL-10 ならびに Arginase-1 に変化は認められなかった。一方、3d マウスでは末梢神経障害に伴う炎症分子の発現レベルに変化はなかったが、IL-10 ならびに Arginase-1 の発現レベルが有意に増大した (図3)。

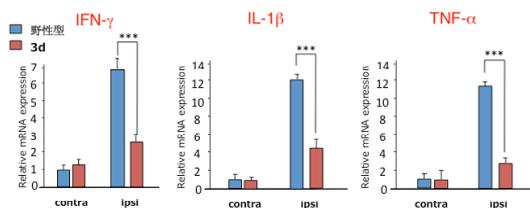


図3 野生型ならびに3dマウスの末梢神経障害に伴う炎症性分子の発現レベルの変化

次に TLR9 の内因性リガンドについて解析を行った結果、末梢神経障害に伴うミトコンドリア DNA の増加は認められなかったが、TLR9 のリガンドとなることが知られている HMGB1 が脊髄後角で増大することが示唆された。

以上の結果より、末梢神経障害に伴って増大した HMGB1 が脊髄ミクログリアに取り込まれ、TLR9 を活性化することで脊髄ミクログリアの M1 フェノタイプの誘導を引き起こすことが示唆された。一方、3d マウスでは M1 フェノタイプの誘導は抑制されており、M2 タイプの誘導が生じることで神経障害性疼痛に抵抗性を示すものと考えられる。

## 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 7件)

- ① Xinwen Zhang, Zhou Wu, Yoshinori Hayashi, Ryo Okada R, Hiroshi Nakanishi, “Peripheral role of cathepsin S in Th1 cell-dependent transition of nerve injury-induced acute pain to a chronic pain state.” *J Neurosci*, Vol 34, No. 8, pp. 3013-3022, 2014 (DOI: 0.1523/JNEUROSCI.3681-13.2014)
- ② Yicong Liu, Zhou Wu, Xinwen Zhang, Junjun Ni, Weixian Yu, Yanmin Zhou, Hiroshi Nakanishi, “Leptomeningeal cells transduce peripheral macrophages inflammatory signal to microglia in response to *Porphyromonas gingivalis* LPS”, *Mediators Inflamm* 2013: 407562 (DOI: 10.1155/2013/407562. Epub 2013 Dec 2)
- ③ Zhou Wu, Aiqin Zhu, Fumiko Takayama, Ryo Okada, Yicong Liu, Yuka Harada, Shizheng Wu, Hiroshi Nakanishi, “Brazilian green propolis suppresses the hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- $\kappa$ B activation in microglia”, *Oxid Med Cell Longev* 2013: 906726 (DOI: 10.1155/2013/906726. Epub 2013 Aug 1)
- ④ Fumiko Takayama, Zhou Wu, Hong Ma HM, Okada R, Yoshinori Hayashi, Hiroshi Nakanishi, “Possible involvement of aiPLA<sub>2</sub> in the phosphatidylserine-containing liposomes induced production of PGE<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub> in microglia”, *J Neuroimmunol* Vol. 262, No 1-2, pp. 121-124, 2013 (DOI:10.1016/j.jneuroim.2013.06.011. Epub 2013 Jul 11)
- ⑤ Zhou Wu, Li Sun, Sadayuki Hashioka, Yu S, Schwab C, Ryo Okada, Yoshinori Hayashi, Patrick L McGeer PL, Hiroshi Nakanishi, “Differential pathways for interleukin-1 $\beta$  production activated by chromogranin A and amyloid  $\beta$  in microglia”, *Neurobiol Aging* Vol. 34, No. 12, pp2715-2725, 2013 (10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.018. Epub 2013 Jul 4)
- ⑥ Li Sun, Zhou Wu, Yoshinori Hayashi, Christoph Peters, Makoto Tusuda, Kazuhide Inoue, Hiroshi Nakanishi, “Microglial cathepsin B contributes to the initiation of peripheral inflammation-induced chronic pain”, *Journal of Neuroscience*, Vol 32, No. 33, pp. 11330-11342, 2012 (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0677-12.2012)
- ⑦ Xia Liu, Zhou WU, Yoshinori Hayashi, Zhou Wu, Hiroshi Nakanishi, Age-dependent neuroinflammatory responses and deficits in long-term potentiation in the

hippocampus during systemic inflammation” *Neuroscience*, Vol. 216, pp. 133-142, 2012 (DOI:10.1016/j.neuroscience.2012.04.050)

[学会発表] (計 9件)

- ① 張 馨文、武 洲、林 良憲、中西 博、神経障害性疼痛の慢性化におけるカテプシン S の役割、第 87 回日本薬理学会年会、仙台国際センター、2014 年 3 月 19 日
- ② 岡田 亮、武 洲、倪 軍軍、中西 博、Batten 病モデルマウスにおける脳ペリサイトの消失と血液脳関門の破綻、第 66 回日本薬理学会西南部会、福岡大学、2013 年 11 月 16 日
- ③ 武 洲、中西 博、クロモグラニン A (CGA) によるミクログリアにおけるカテプシン B に依存した新規産生経路の解明、第 55 回歯科基礎医学学術大会、岡山コンベンションセンター、2013 年 9 月 22 日
- ④ 中西 博、“Microglial circadian clock controls diurnal changes in synaptic strength through microglia-synaptic interactions”、シンポジウム、Neuro2013、国立京都国際会館、2013 年 6 月 21 日
- ⑤ 中西 博、Microglial circadian clock controls microglia-synapse interactions in the healthy brain, in Symposium of “Why do microglia exist in the brain: As a target for treatment of neurological disorders”、シンポジウム、第 90 回日本生理学会大会、3 月 28 日、2013 年
- ⑥ 林 良憲、中西 博、Regulation of microglia-synapse interactions and synaptic strength by microglial circadian clock, in Symposium of “Roles of microglia and astrocytes in synaptic reorganization: New trends in glial research”、シンポジウム、第 86 回日本薬理学会年会、3 月 21 日、2013 年
- ⑦ 中西 博、ミクログリアの産生するカテプシン群の慢性疼痛における役割、平成年度生理研研究会「痛み研究の新たな展開」、教育講演、岡崎、12 月 13 日、2012 年
- ⑧ 中西 博、林 良憲、NMDA レセプターとミクログリア、CINP・NP2012 合同年会、シンポジウム：NMDA レセプター神経疾患の分子病態を探る、宇都宮、10 月 20 日、2012 年
- ⑨ 中西 博、ミクログリアの電気生理学的解析、包括型脳科学研究推進支援ネットワーク・夏のワークショップ、「グリア機能解析」チュートリアル、仙台、7 月 27 日、2012 年

〔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・歯学研究院・教授  
研究者番号：20155774

### (2) 研究分担者

林 良憲 (HAYASHI, Yoshinori)  
九州大学・歯学研究院・助教  
研究者番号：80582717

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：