

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10563

研究課題名(和文)ニコチンシグナルを介したマクロファージ依存的炎症性疾患の新規治療戦略

研究課題名(英文) Novel therapeutics for macrophage-driven inflammatory diseases via nicotinic acetylcholine receptor signaling

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージのフェノタイプ制御に及ぼすニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)シグナルの影響を精査し、神経障害性疼痛を含む慢性炎症疾患の治療に繋がる研究を行った。神経障害性疼痛を担う炎症性マクロファージにはnAChRが発現しており、nAChRリガンドの処置により炎症性因子の産生が抑制されることをin vivoおよびin vitroにおける各種解析から証明した。さらにnAChRリガンドを投与することで、神経障害性疼痛病態が改善することも明らかにしている。従って、nAChRシグナルを介した炎症性マクロファージの制御は慢性炎症疾患の治療に有用な薬物療法として期待される。

研究成果の概要(英文)：We determined the effects of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) signaling on regulation of macrophage phenotypes that contribute to chronic inflammatory disease such as neuropathic pain. Macrophages underlying neuropathic pain express nAChR, and nAChR ligands suppressed the production of inflammatory mediators in vivo and in vitro. Moreover, it is important that administration of nAChR ligands improved neuropathic pain. In conclusion, regulation of inflammatory macrophages through nAChR signaling may be effective pharmacotherapy for the relief of chronic inflammatory diseases.

研究分野：薬理学

キーワード：慢性炎症 マクロファージ フェノタイプ サイトカイン ニコチン受容体 神経障害性疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

炎症反応の中心的存在であるマクロファージは、炎症初期において病原体や異常細胞を破壊する一方、炎症後期では傷害組織の修復および炎症の収束に関与する。通常、急性炎症は組織の修復に伴う炎症反応の収束により特徴付けられ、生体の恒常性維持に不可欠の要素である。しかしながら、収束機構の破綻により炎症が慢性化すると、組織のリモデリングに基づく長期的機能変調をきたす。近年、慢性炎症は様々な慢性疾患の分子基盤であると理解されつつある。

マクロファージは周囲環境に応じて様々なフェノタイプに転化する。正常な生理的反応の範疇に属する急性炎症において、これらのフェノタイプ転化は適切に制御されているが、慢性炎症時にはマクロファージのフェノタイプ制御機構が破綻すると考えられている。我々は、末梢神経傷害に基づく神経障害性疼痛の分子基盤において、炎症性(M1)マクロファージが重要な役割を担うことを明らかにしており、マクロファージのフェノタイプ制御機構を標的とした治療戦略の確立を目指している。

ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)は5量体のサブユニットから構成されるリガンド開口型カチオンチャネルである。nAChRは末梢組織、神経系および免疫系など様々な細胞に発現し、生体の恒常性維持に重要な役割を有している。近年、マクロファージに発現するnAChRが抗炎症作用を示すとの知見が注目されており、悪性腫瘍、潰瘍性大腸炎、敗血症や多発性硬化症などのM1マクロファージ依存性炎症性疾患がnAChRアゴニストであるニコチンの投与により改善することも報告されている。また申請者らも末梢神経傷害モデル動物において、ニコチンがM1マクロファージの抑制を介して神経障害性疼痛を軽減することを明らかにしている。実際に様々な難治性疾患の分子基盤を担うM1マクロファージの抑制薬としてnAChRの有用性が示唆されているにも関わらず、その分子機構の詳細や創薬への応用についてはあまり十分な検討がなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、マクロファージのフェノタイプ制御に及ぼすnAChRシグナルの影響を分子・細胞・個体レベルにて精査し、神経障害性疼痛を含む各種炎症性疾患の治療に繋がる知見の提供を目指す。具体的には、1) nAChRシグナル感受性に基づく炎症性疾患の特性評価、2) 炎症性疾患の分子基盤を担うマクロファージフェノタイプの検討、3) nAChRを介したマクロファージフェノタイプ制御の分子機構解明、4) nAChRシグナル依存性フェノタイプ変化に基づく炎症性疾患の治療戦略提示、について検討を進めることで、学術的意義の高い研究を展開する。

## 3. 研究の方法

坐骨神経傷害：ICR系雄性マウス(20-25g)を用い、イソフルラン麻酔下にて後肢坐骨神経の約1/3を縫合系できつく結紮した。使用薬物はPBSまたは生理食塩水に溶解し、投与量を10  $\mu$ lとして坐骨神経周囲に局所投与した。

フローサイトメトリー：坐骨神経組織から細胞を抽出し、マクロファージ特異的分子に対する抗体を用いて細胞を蛍光標識した。蛍光強度を指標とし、総イベント数における浸潤マクロファージの割合を定量した。

細胞培養：マウス腹腔より採取したマクロファージまたはマウスマクロファージ細胞株(J774A.1)をウシ胎児血清入りのDMEMにて培養した。

RT-PCR：坐骨神経組織または培養細胞より総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。

ウェスタンブロッティング：坐骨神経組織または培養細胞より抽出したタンパク質をアクリルアミドゲルにて電気泳動し、PVDF膜に転写した。標的分子の特異的抗体を用いて反応させ、化学発光によりバンドを検出した。

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。

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von Freyフィラメント(0.02-2.0g)で刺激し、up-down法に従って機械的痛覚閾値を評価した。

## 4. 研究成果

傷害坐骨神経におけるマクロファージの浸潤：フローサイトメトリー解析により、傷害後の坐骨神経におけるCD11bおよびF4/80陽性マクロファージの集積が認められた。浸潤した免疫細胞中におけるマクロファージの割合は経時的に増加し、傷害14日後においては75%に達していた。(図1)

nAChRシグナルによる炎症性マクロファージ(in vivo)：傷害坐骨神経におけるRT-PCR解析により、M1マクロファージのマーカー分子であるinterleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、CC-chemokine ligand 3(CCL3)、およびinterferon regulatory factor 5(IRF5)の発現が増加した。nAChR $\alpha$ 4 $\beta$ 2サブタイプ特異

的アゴニストである TC-2559 (20 nmol) を傷害坐骨神経周囲に反復局所投与すると、マクロファージにおける IRF5 の発現が減少すると共に、神経障害性疼痛症状である機械的アロディニアが改善した。(図2)

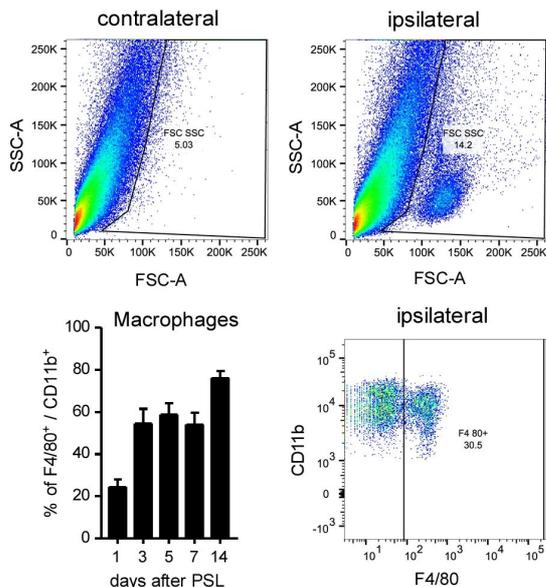


図1: 傷害坐骨神経におけるマクロファージの浸潤

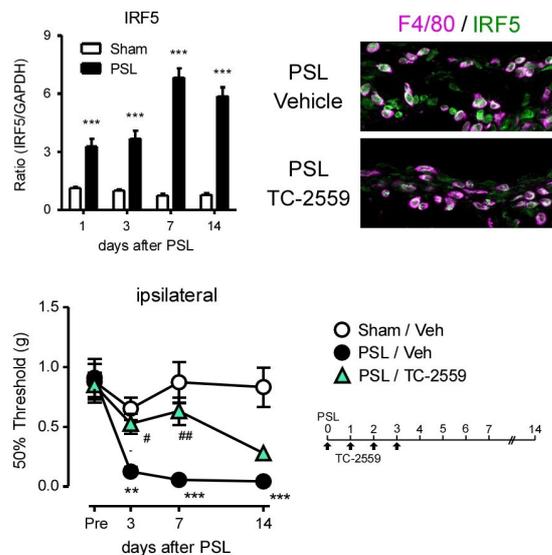


図2: 炎症性マクロファージ抑制効果 (in vivo)

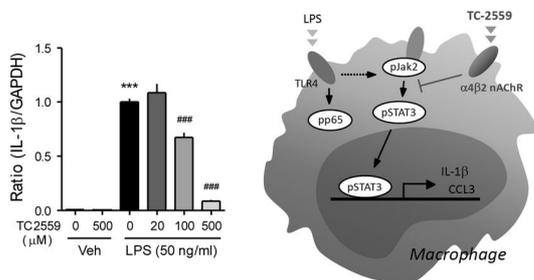


図3: 炎症性マクロファージ抑制効果 (in vitro)

nAChR シグナルによる炎症性マクロファージ抑制効果 (in vitro): 腹腔マクロファージおよび細胞株において、リポ多糖 (LPS) 誘発性の IL-1 $\beta$  および CCL3 発現増加が TC-2559 (500  $\mu$ M) の処置により減少した。TC-2559 により M1 分子の減少作用は、Jak2-STAT3 シグナル経路の阻害に基づくこともウェスタンブロット解析から明らかにした。(図3)

マクロファージのフェノタイプ変化に及ぼす影響: 傷害坐骨神経において、M2 (抗炎症性) マーカー分子である IRF4 の発現変化は IRF5 と比較すると僅かであり、TC-2559 投与の影響をあまり受けなかった。細胞細胞での検討においても、nAChR リガンドは M1 分子を減少させるものの、arginase1 や CD206 などの M2 分子の発現には影響しなかった。

nAChR リガンドによる神経障害性疼痛抑制効果: TC-2559 に加え、sazetidinaA など異なる  $\alpha$ 4 $\beta$ 2 アゴニストを用いた検討においても、炎症性マクロファージの抑制作用に基づく機械的アロディニアの改善効果が認められた。この効果は、局所投与のみならず全身投与によっても認められた。さらに重要な点として、nAChR アゴニストは病態の慢性期においても有効であることが明らかになった。(図4)

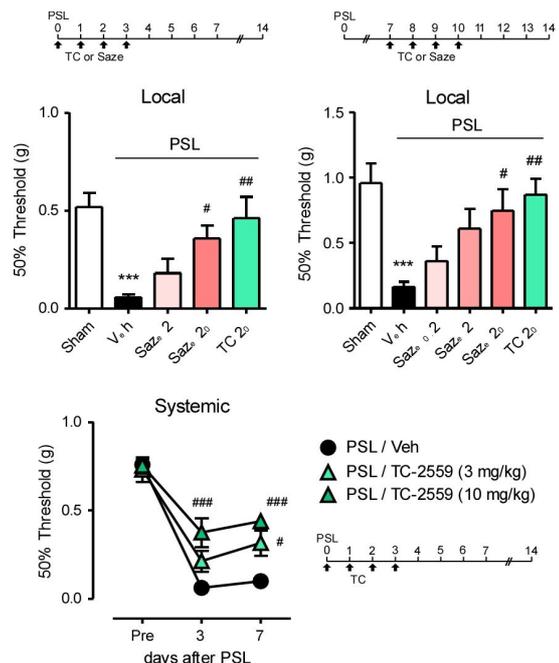


図4: nAChRリガンドによる神経障害性疼痛治療効果

まとめ: 本研究の結論として、nAChR 受容体シグナルは炎症性マクロファージを抑制し、神経障害性疼痛などの慢性疾患を改善することを明らかにした。nAChR シグナルは M1 マクロファージを抑制するものの、M2 への転化には殆ど影響しないことも見出し

た。M1 分子による過剰な炎症反応の制御が、様々な炎症性疾患の改善に繋がると考えられる。

#### 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 4 件)

1. Kiguchi N, Kobayashi D, Saika F, Matsuzaki S, Kishioka S. Inhibition of peripheral macrophages by nicotinic acetylcholine receptor agonists suppresses spinal microglial activation and neuropathic pain in mice with peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation*. 2018;15(1):96.
2. Kiguchi N, Kobayashi D, Saika F, Matsuzaki S, Kishioka S. Pharmacological Regulation of Neuropathic Pain Driven by Inflammatory Macrophages. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11). pii: E2296.
3. Kiguchi N, Ding H, Peters CM, Kock ND, Kishioka S, Cline JM, Wagner JD, Ko MC. Altered expression of glial markers, chemokines, and opioid receptors in the spinal cord of type 2 diabetic monkeys. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1863(1):274-283.
4. Kiguchi N, Sakaguchi H, Kadowaki Y, Saika F, Fukazawa Y, Matsuzaki S, Kishioka S. Peripheral administration of interleukin-13 reverses inflammatory macrophage and tactile allodynia in mice with partial sciatic nerve ligation. *J Pharmacol Sci*. 2017;133(1):53-56.

[学会発表](計 5 件)

1. 木口倫二、小林大地、雑賀史浩、松崎伸介、岸岡史郎。神経傷害後の末梢マクロファージによる脊髄ミクログリア調節作用。第 131 回日本薬理学会近畿部会 2017 年 11 月。
2. 木口倫二、雑賀史浩、小林大地、松崎伸介、岸岡史郎。傷害神経に浸潤するマクロファージは脊髄ミクログリアの活性化を調節する。第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会。2017 年 9 月。
3. 雑賀史浩、木口倫二、松崎伸介、岸岡史郎。マクロファージ上で発現する  $\alpha 4\beta 2$  ニコチン性アセチルコリン受容体活性化による神経障害性疼痛の緩和。第 90 回日本薬理学会年会。2017 年 3 月。
4. 木口倫二、Huiping Ding、雑賀史浩、松崎伸介、岸岡史郎、Mei-Chuan Ko。2 型糖尿病発症カニクイザルの脊髄後角に

おけるケモカイン発現変動。生理学研究  
所研究会「痛みの理解を目指した先端的  
アプローチ」。2017 年 1 月。

5. 木口倫二、雑賀史浩、松崎伸介、岸岡史郎。ニコチン性アセチルコリン受容体リガンドの末梢投与は神経障害性疼痛を改善する。第 5 回ニューロカンファレンス  
和歌山。2017 年 1 月。

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

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

##### (2)研究分担者

雑賀史浩 (SAIKA, Fumihiro)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：10644099

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

##### (3)連携研究者

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

##### (4)研究協力者

小林大地 (KOBAYASHI, Daichi)  
和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員