

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21791469

研究課題名（和文）

アディポサイトカインの担う難治性疼痛形成におけるエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名（英文）

Epigenetic regulation underlying development of chronic pain caused by adipokines

研究代表者

木口 倫一（NORIKAZU KIGUCHI）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：90433341

研究成果の概要（和文）：アディポカインであるレプチンがマクロファージに作用し、ケモカインであるマクロファージ炎症性タンパク質（MIPs）の発現を増加させた。MIPs は傷害後の末梢神経においても発現増加しており、MIP シグナルを阻害すると神経障害性疼痛ならびに神経炎症が抑制された。さらに MIP の発現増加にはプロモーター領域におけるヒストンアセチル化が関与することを見出した。結論として、アディポカインはヒストン修飾などのエピジェネティクス調節を介して炎症性細胞におけるケモカイン発現を増加させ、神経障害性疼痛の形成に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Leptin, an adipokine, up-regulated the chemokine macrophage inflammatory proteins (MIPs) in macrophages. The expression of MIPs was increased in the injured peripheral nerves, and the blockade of MIPs signaling prevented nerve injury-induced neuropathic pain and neuroinflammation. Moreover, MIPs expression was enhanced by the overacetylation of histones. In conclusion, adipokines play key roles in the development of neuropathic pain, accompanied by epigenetic augmentation of chemokine expressions in inflammatory cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：アディポサイトカイン、エピジェネティクス、ケモカイン

1. 研究開始当初の背景

難治性疼痛は神経系の傷害や慢性炎症により惹起される。その分子基盤には、炎症の発生・維持を担う免疫細胞やグリア細胞の活性化が重要な役割を果たしており、特にこれらの細胞機能に研究の焦点が当てられてきた。しかしながら、依然として明らかにされていない点が多く、更なる検討が必要とされている。

申請者らの研究グループは、難治性疼痛の新たな発現因子として脂肪細胞由来の液性因子であるアディポサイトカイン（アディポカイン）の存在に着目した。末梢神経周囲に分布する脂肪細胞が神経傷害により活性化され、放出されたレプチンが神経炎症の誘導を介して神経障害性疼痛を増悪させることを明らかにした（*Proc Natl Acad Sci USA*. 2009）。これは生活習慣病の基盤分子が難治

性疼痛の形成にも関与するという概念を新たに導く発見であった。さらにレプチンはマクロファージを含む種々の免疫細胞に直接作用し、サイトカイン・ケモカインの発現を調節することが報告されている。申請者らの予備的検討においても、レプチンがマクロファージにおける炎症性メディエーターの発現を増加させることを確認している。

これらの知見より、従来の免疫細胞およびグリア細胞と末梢神経とのクロストークにおいて、新たに脂肪細胞が放出するアディポカインが介在するネットワークの存在が示唆された。

2. 研究の目的

本研究ではアディポカインの担う難治性疼痛形成における、エピジェネティクス制御機構の関与を検証する。難治性疼痛の病態に密接に関連する組織学的病変としては、各種サイトカインの発現変動を主軸とした神経変性や組織リモデリングが挙げられるが、これらの分子基盤には共通して遺伝子発現の調節が必要不可欠である。近年ではゲノムの塩基配列やクロマチン構造の直接的修飾を介して遺伝子発現を調節するエピジェネティクス制御機構が注目されており、慢性炎症を伴う疾患とエピジェネティクス変化との関連を示唆する報告も散見される。アディポカインシグナルに基づく難治性疼痛形成機構においてもエピジェネティクス制御が関与する可能性は高く、本研究により難治性疼痛の理解に新たな知見を提供できると考えられる。

3. 研究の方法

細胞培養: マウスマクロファージ細胞株である J774A.1 および RAW267、シュワン細胞株である TR6Bcl 細胞を FBS 含有 DMEM 培地にて培養した。レプチンは PBS に溶解し、FBS 非存在下にてこれら細胞株に処置した。

神経障害性疼痛モデル: 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液量を 10 μ l とし局所投与した。

von Frey テスト: 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。

Hargreaves テスト: 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。

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。

クロマチン免疫沈降: 坐骨神経をホルマリン固定後にホモジナイズし、ヒストン-DNA 複合体を調整した。ヒストン H3 抗体またはリジン残基 (K9) アセチル化ヒストン H3 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 反応により、ヒストン H3 のアセチル化を評価した。

4. 研究成果

マクロファージにおけるレプチン依存的ケモカイン発現増加

神経障害性疼痛の形成因子であるレプチンを培養マクロファージまたは培養シュワン細胞に処置すると、炎症性サイトカインであるインターロイキン-1 β (IL-1 β) ならびに炎症性ケモカインであるマクロファージ炎症性タンパク質-1 α (MIP-1 α)、MIP-1 β 、MIP-2 の mRNA 発現が増加した。またレプチンはこれらの細胞において Jak2-STAT3 経路を活性化した。レプチンによる炎症性メディエーターの発現増加はいずれも Jak2-STAT3 経路の阻害薬 (AG490) により抑制された (図 1)。

図1: マクロファージにおけるレプチン依存的ケモカイン発現増加

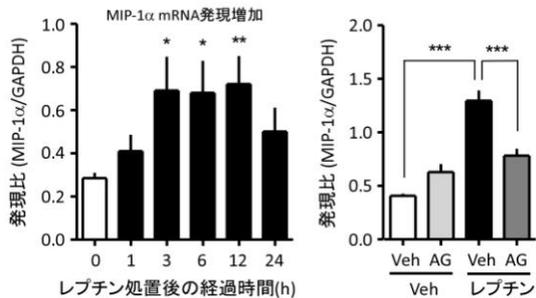
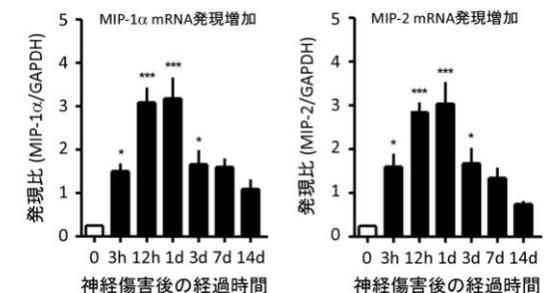


図2: 傷害末梢神経におけるケモカインリガンド発現増加



傷害末梢神経におけるケモカインリガンドおよびその受容体発現増加

傷害後の坐骨神経において、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-2 の mRNA 発現増加が認められた (図 2)。免疫組織化学解析の結果、MIP-1 α および MIP-1 β は傷害により活性化されたシュワン細胞ならびに傷害坐骨神経に集積す

るマクロファージに局在していた。一方で、MIP-2はマクロファージおよび好中球において発現増加していた。さらにこれらの受容体であるCCR1、CCR5、CXCR2のmRNA発現も同様に傷害坐骨神経において増加しており、その受容体発現細胞はリガンド発現細胞と同一であった。

ケモカインシグナルによる神経障害性疼痛調節機構

MIPsの中和抗体ならびにそれぞれの受容体阻害薬等を用いてMIPsシグナルを阻害すると、神経傷害により誘発される触アロディニアおよび熱痛覚過敏が减弱した(図3)。神経障害性疼痛の抑制効果と相関して、MIPsシグナルの阻害は傷害神経におけるマクロファージ、好中球およびリンパ球の集積を減少させ、さらに炎症性サイトカイン(IL-1 β 、腫瘍壊死因子)やケモカイン(MIP-1 α 、MIP-1 β)の発現増加も抑制した。さらにリコンビナントMIPsを坐骨神経周囲に局所投与すると、上記の炎症性メディエーターの発現増加に伴い、長期的な神経障害性疼痛様行動が惹起された。

図3:ケモカインシグナルによる神経障害性疼痛の調節

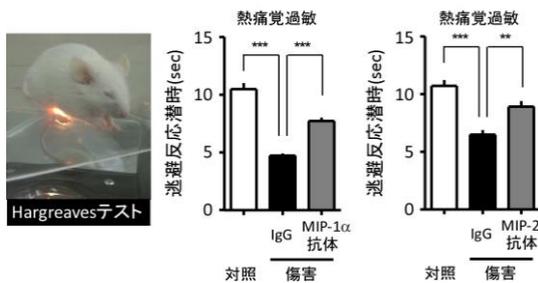
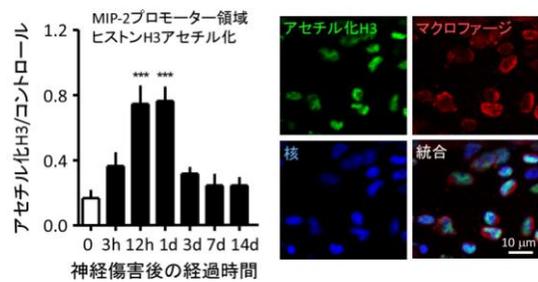


図4:ケモカイン発現増加におけるエピジェネティクス調節機構



ケモカイン発現増加におけるエピジェネティクス調節機構

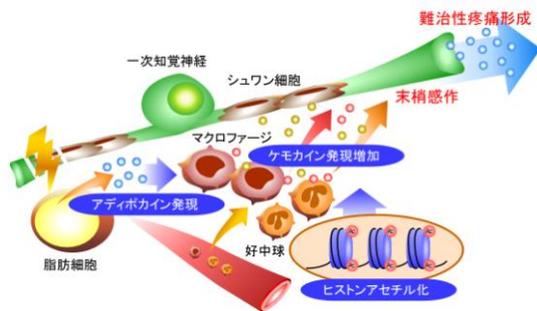
コアヒストンを形成するヒストンH3の9番目のリジン残基がアセチル化されると、遺伝子転写は促進的に調節される。クロマチン免疫沈降法により、MIPsのプロモーター領域におけるヒストン修飾変化を解析した。MIP-1 α およびMIP-2のプロモーター領域において、ヒストンH3(K9)のアセチル化亢進が認められた。免疫組織化学により、傷害神経においてアセチル化ヒストンH3が増加

しており、それらはマクロファージおよび好中球の核に局在することを見出した。ヒストンアセチル化酵素の阻害薬であるアナカリン酸を全身投与すると、傷害坐骨神経におけるMIPsの発現増加ならびに神経障害性疼痛の形成が抑制された。

まとめ

難治性疼痛の責任分子であるレプチン依存的なメディエーターとしてMIPsに着目し、末梢神経炎症に基づく神経障害性疼痛との関連を明らかにした。さらにその発現変動はヒストンのアセチル化に依存しており、薬理的アプローチに基づくヒストン修飾調節が難治性疼痛の新規治療標的となる可能性が示唆された。

図5:アディポカイン依存的難治性疼痛とエピジェネティクス制御



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12件)

- ① 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.*, 340(3), 577-587, 2012. (査読有り)
- ② Kiguchi N, Kobayashi Y, Kishioka S: Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 12(1), 55-61, 2012. (査読無し, 招待)
- ③ 木口倫一、岸岡史郎: 神経炎症が関与する末梢神経障害性疼痛のメカニズム. *ペインクリニック*, 32(10), pp1499-1509, 真興交易(株), 2011年10月. (査読無し)
- ④ Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S: Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 beta up-regulation. *Pain*, 149(2), 305-315,

2010. (査読有り)
- ⑤ **Kiguchi N**, Kobayashi Y, Maeda T, Saika F, Kishioka S: CC-chemokine MIP-1 α in the spinal cord contributes to nerve injury-induced neuropathic pain. *Neurosci. Lett.*, 484(1), 17-21, 2010. (査読有り)
- ⑥ **Kiguchi N**, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S: Activation of extracellular signal-regulated kinase in sciatic nerve contributes to neuropathic pain after partial sciatic nerve ligation in mice. *Anesth. Analg.*, 109(4), 1305-1311, 2009. (査読有り)
- ⑦ Maeda T, **Kiguchi N**, Kobayashi Y, Ikuta T, Ozaki M, Kishioka S: Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106(31), 13076-13081, 2009. (査読有り)
- ⑧ **Kiguchi N**, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S: Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 384(3), 311-315, 2009. (査読有り)

[学会発表] (計 20 件)

- ① 木口倫一, 小林悠佳, 岸岡史郎: Macrophage inflammatory proteins produce peripheral neuroinflammation leading to neuropathic pain. 第 85 回日本薬理学会年会, 2012 年 3 月 14 日, 京都.
- ② 木口倫一, 小林悠佳, 岸岡史郎: MIP-2 が担う神経障害性疼痛形成機構における好中球の役割. 第 120 回日本薬理学会近畿部会, 2011 年 11 月 11 日, 京都.
- ③ **Kiguchi N**, Kobayashi Y, Kishioka S: Augmentation of MIP-2/CXCR2 axis due to histone H3 acetylation in injured peripheral nerves contributes to neuropathic pain. Italian-Japanese International Seminar for Neurosciences, September 1, 2011, Sendai.
- ④ 木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎: Up-regulation of MIP-2 and its receptor through histone acetylation involves in nerve injury-induced neuropathic pain. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月, 誌上開催.
- ⑤ **Kiguchi N**, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S: Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the pathogenesis of neuropathic pain. Neuroscience 2010, SfN's 40th annual meeting, November 14, 2010, San Diego, CA.
- ⑥ **Kiguchi N**, Maeda T, Kobayashi Y, Kishioka S: Role of macrophage inflammatory

protein-1 in the pathogenesis of neuropathic pain. Molecular Targets for Novel Pain Therapeutics, September 24, 2010, Parghelia (VV), Calabria, Italy.

- ⑦ **Kiguchi N**, Maeda T, Kobayashi Y, Saika F, Kishioka S: Macrophage inflammatory protein-1 alpha plays a key role in the development of neuropathic pain. New Perspectives in Neuroscience: Joint Meeting of Young Italian and Japanese Neuroscientists, September 21, 2010, Naples, Italy.
- ⑧ 木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 深澤洋滋, 岸岡史郎: Macrophage inflammatory protein-1 α mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury. Neuro2010, 2010 年 9 月 2 日, 神戸.
- ⑨ 木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎: 神経障害性疼痛形成における MIP-2 の役割. 第 31 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2010 年 8 月 27 日, 名古屋.
- ⑩ 木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎: Leptin enhances IL-1 β and MIP-1 α expression in murine macrophages. 第 83 回日本薬理学会年会, 2010 年 3 月 16 日, 大阪.
- ⑪ 木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎: CC ケモカイン MIP-1 α は末梢神経傷害後のアロディニア形成を促進する. 第 30 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム, 2009 年 8 月 28 日, 東京.
- ⑫ 木口倫一, 前田武彦, 小林悠佳, 岸岡史郎: MIP-1 α の介在する神経障害性疼痛形成機構におけるマクロファージの役割. 第 115 回日本薬理学会近畿部会, 2009 年 6 月 26 日, 金沢.

[図書] (計 1 件)

- ① **Kiguchi N**, Maeda T, Kobayashi Y, Saika F, Kishioka S: Involvement of inflammatory mediators in neuropathic pain caused by vincristine. *Int. Rev. Neurobiol.*, 85, pp179-190, 2009.

[その他]

ホームページ等

<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igakubu/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