

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25117013

研究課題名(和文)脳内ミクログリアによるシナプス制御機構と慢性疼痛

研究課題名(英文)Synaptic regulation by intracerebral microglia and chronic pain

研究代表者

井上 和秀(Inoue, Kazuhide)

九州大学・薬学研究院・特命教授

研究者番号：80124379

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 61,600,000円

研究成果の概要(和文)：ミクログリア特異的IRF8欠損マウスでは、社会的認識能が選択的に低下していることが認められた。また、正常では脳内の定位置で細胞突起を動かしているミクログリアが、IRF8欠損マウスでは細胞体ごと脳内を移動していることを見出した。また、時期特異的・ミクログリア特異的IRF8欠損マウスでも、同様の突起形成異常と形態変化が再現されることを見出し、IRF8がミクログリアの形態の維持に関する転写因子であることを明らかにした。ミクログリアの形態・機能異常が脳の回路形成に影響を及ぼして高次機能の発現に混乱をもたらし、ミクログリアの正常な活動が脳の回路形成や高次機能の維持にも寄与すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In microglial specific IRF8-deficient mice, it was recognized that the social recognition ability was selectively decreased. We also found that in IRF8 deficient mice microglial cell bodies moves within the brain although microglia in normal mice moves only processes. In addition, it was found that similar protrusion dysplasia and morphological change were reproduced in timing specific and microglia specific IRF8-deficient mice, and it was revealed that IRF8 is a transcription factor involved in maintaining microglial morphology. The microglia morphology and function abnormality affects the brain circuit formation and confuses the expression of higher-order functions, and it is considered that the normal activity of microglia also contributes to the maintenance of brain circuit formation and higher-order functions.

研究分野：神経化学・神経薬理学

キーワード：ミクログリア 神経障害性疼痛 発達障害 シナプスリモデリング in vivoイメージング

1. 研究開始当初の背景

痛みは危険を回避するための大切な感覚情報であるが、行き過ぎた痛みは抑えなければならない。世界にはモルヒネも効かない痛み「神経障害性疼痛」等に罹患する患者が2千万人以上も存在し、救われ難い痛みを苦しんでいる。詳細なメカニズムは不明であり、有効な治療法も確立されていなかった。このような状況の中、我々は、神経損傷後によって活性化した脊髄後角ミクログリアが、近接するニューロンの機能異常を誘発させ、難治性の慢性疼痛「神経障害性疼痛」を発症させることを発見した (Nature, 2003, 2005; PNAS 2009, EMBO J 2011; Cell Rep 2012)。一方、疼痛は、感覚そのものだけでなく、「情動」に対しても非常に大きな影響を及ぼし、また情動系脳領域を含む脳の発達障害が痛みを慢性化する大きな要因として考えられている。事実、慢性疼痛患者ではパニック障害や外傷性ストレス障害 (PTSD) の発生率が高く、慢性疼痛と精神疾患が併存している場合が多い。しかし、慢性疼痛と脳の発達障害の関連性についての神経科学的メカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では、幼弱期隔離マウスや繰返し社会的ストレス負荷マウスなどの障害モデル、母体免疫賦活化モデル、バルプロ酸妊娠期暴露モデル等、各種障害モデル動物を用いて、脳内ミクログリアの活性化を捉え、体性感覚、社会性・情動変化との相関・因果関係を解明する。そして、ミクログリアの活動がもたらすシナプスの形成・維持・剪定における変化、さらに疼痛を慢性化へ導くメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

実験動物はすべて九州大学動物実験規則に則り、九州大学動物実験委員会の審査・承認を受けた計画に沿って行った。IRF8 コンディショナルノックアウトマウスは、Cx3cr1-creER マウスと IRF8-flox マウスを交配させることにより作成した。ミクログリア、神経細胞可視化マウスは Cx3cr1-GFP マウスと Thy1-YFP マウスを交配させることにより作成した。

発達障害モデルとして、妊娠 11 日目の母体に Poly I:C、バルプロ酸を単回腹腔投与し、それぞれ母体免疫賦活化モデル、自閉症様発達障害モデルとした。幼少期ストレスモデルとしては、出生後 21 日目の離乳期から個別ケージに隔離して飼育を行った。社会敗北ストレスモデルマウスは、体格優位な ICR マウスの飼育ケージに 9 週齢の C57BL/6J マウスを 1 日 10 分間 10 日間同居させることにより作成した。単回のストレス負荷としては 2 時間のストレス負荷を行った。

神経障害性疼痛モデルマウスの作成は L4 脊髄神経を椎骨近傍で切断するモデルを用

い、von Frey フィラメントを用いた痛み閾値測定を行った。

ミクログリアと神経細胞を可視化したマウス (CX3CR1-EGFP と Thy1-EYFP の表現型) と二光子励起顕微鏡を用いて、神経突起とミクログリア突起の微細構造での相互作用等を中心にして解析を行った。解析の中では、プリズムミラーを用いた深部前頭前野・前帯状回イメージング、グリア長期イメージング用プロトコルを用いた体性感覚野イメージング、独自に設計した生体インプラントチャンパーを利用した脊髄イメージング手法を確立し in vivo レベルでイメージングを行った。観察プローブは独自に開発したウイルスベクターの椎骨間微量投与により、プロモーター制御による細胞種選択的発現を行った。

実験動物の社会性の評価には Crawley の 3 チャンバー式社会性テストを用いた。不安行動・自発行動についてオープンフィールド方を用いて評価を行った。物体認識・記憶能については新奇物体認識試験をおこなった。

4. 研究成果

本研究では、幼弱期隔離マウスや繰返し社会的ストレス負荷マウスなどの障害モデル、母体への Poly I:C やバルプロ酸投与による母体免疫賦活化モデル、バルプロ酸妊娠期暴露モデル等各種障害モデル動物を作成し、体性感覚、社会性・情動の異常を捉え、その異常と脳内ミクログリア活性化との相関を解明することを目的とした。

Poly I:C 投与による母体免疫賦活化モデルやバルプロ酸投与による自閉症様モデルマウスにおいては神経傷害後の疼痛発現に明確な差を見出すことはなかったが、幼弱期隔離マウスにおいては離乳直後の 6 週間隔離を行ったマウスで疼痛発症の程度が有意に増悪していた。いずれも脳内ミクログリアの形態学的活性化を検出することはなかった。前頭前皮質ミクログリアの活性化を誘導するとされる社会的敗北ストレスの、神経障害性疼痛に対する影響を検討したところ、病態モデル動物の痛み行動には有意な変化を見出さなかったが、疼痛回復期に、一過性の再ストレス負荷を行うことで痛み閾値の再低下が観察され、同様の現象が LPS 投与による炎症惹起によっても引き起こされた。この時、脊髄後角ミクログリアの再活性化が Iba1 免疫染色の増加により示唆されていることから、ストレスや炎症により疼痛病態の遷延化がミクログリアの再活性化によって引き起こされる可能性を示している。

次に、ミクログリアの正常発達に必須の転写因子である IRF8 のノックアウトマウスと、成熟後ミクログリアでの IRF8 の欠損を目的とした IRF8 コンディショナルノックアウトマウスを用いて人為的にミクログリアの異常を引き起こしたマウスを作成した。これらのマウスでは神経傷害後の疼痛は有意に抑制されていた。また、3 チャンバー式の社会

性行動試験を用い、マウスの社会性行動評価を行った結果、IRF8を欠損したミクログリアを持つ動物では、社会的新規対象認識能が選択的に低下していることが認められた。このマウスでは新奇物体認識能の低下は認められなかった。IRF8ノックアウトマウスを神経細胞・ミクログリア可視化マウスと交配し、大脳皮質のミクログリアを継続的に観察したところ、正常では脳内の定位置で細胞突起を動かしているミクログリアが、IRF8を欠損することで細胞体ごと脳内を移動していることを見出した。また、時期特異的・ミクログリア特異的なIRF8コンディショナルノックアウトマウスでも、同様の突起形成異常と形態変化が再現することを見出し、IRF8がミクログリアの形態の維持に關与する転写因子であることを明らかにした。これらのことから、ミクログリアの形態・機能異常が脳の回路形成に影響を及ぼして高次機能の発現に混乱をもたらすこと、また、ミクログリアの正常な活動が脳の回路形成や高次機能の維持にも寄与することが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 39 件)

Ochi-ishi R, Nagata K, Inoue T, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, *Inoue K. (2014) Involvement of the chemokine CCL3 and the purinoceptor P2X7 in the spinal cord in paclitaxel-induced mechanical allodynia. *Mol Pain* 10:53. 査読有

*Yasui M, Takashi M, Takeuchi S, Tokizane K, Tsuda M, Inoue K, Kiyama H. (2014) Continuous stress elicits mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation. *Glia* 62(9): 1407-17. 査読有

Masuda T, Iwamoto S, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Nishiyama A, Mak TW, Tamura T, *Tsuda M, *Inoue K. (2014) Transcription factor IRF5 drives P2X4R+-reactive microglia gating neuropathic pain. *Nat Commun.* 5: 3771. 査読有

Masuda T, Nishimoto N, Tomiyama D, Matsuda T, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Kohsaka S, Tsuda M, *Inoue K. (2014) IRF8 is a transcriptional determinant for microglial motility. *Purinergic Signal.* 10(3): 515-521. 査読有

Matsushita K, Tozaki-Saitoh H, Kojima C, Masuda T, Tsuda M, *Inoue K, Hoka S. (2014) Chemokine (C-C motif) receptor 5 is an important pathological regulator in the development and maintenance of neuropathic pain. *Anesthesiology* 120(6):

1491-503. 査読有

Kohro Y, Sakaguchi E, Tashima R, Tozaki-Saitoh H, Okano H, *Inoue K, *Tsuda M. (2015) A new minimally-invasive method for microinjection into the mouse spinal dorsal horn. *Sci Rep.* 5:14306. 査読有

Masuda T, Iwamoto S, Mikuriya S, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, *Tsuda M, *Inoue K. (2015): Transcription factor IRF1 is responsible for IRF8-mediated IL-1 expression in reactive microglia. *J Pharmacol Sci* 128(4): 216-220. 査読有

Shiratori-Hayashi M, Koga K, Tozaki-Saitoh H, Kohro Y, Toyonaga H, Yamaguchi C, Hasegawa A, Nakahara T, Hachisuka J, Akira S, Okano H, Furue M, Inoue K, *Tsuda M. (2015) STAT3-dependent reactive astrogliosis in the spinal dorsal horn underlies chronic itch. *Nat Med.* 21(8):927-31. 査読有

Igawa T, Abe Y, Tsuda M, Inoue K, Ueda T. (2015) Solution structure of the rat P2X4 receptor head domain involved in inhibitory metal binding. *FEBS Lett.* 589(6):680-6. 査読有

Nishimura A, Sunggip C, Tozaki-Saitoh H, Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Hirano K, Ide T, Boeynaems J.-M, Kurose H, Tsuda M, Robaye B, Inoue K, *Nishida M. (2016) Purinergic P2Y6 receptors heterodimerize with angiotensin AT1 receptors to promote angiotensin II-induced hypertension. *Sci Signal.* 9(411):ra7. 査読有

Yamashita T, Yamamoto S, Zhang J, Kometani M, Tomiyama D, Kohno K, Tozaki-Saitoh H, *Inoue K, *Tsuda M. (2016) Duloxetine inhibits microglial P2X4 receptor function and alleviates neuropathic pain after peripheral nerve injury. *PLoS One*, 11(10): e0165189. 査読有

Matsumura Y, Yamashita T, Sasaki A, Nakata E, Kohno K, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Imai T, Kuraishi Y, *Tsuda M, Inoue K. (2016) A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain. *Sci. Rep.* 6: 32461. 査読有

Masuda T, Ozono Y, Mikuriya S, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Iwatsuki K, Uneyama H, Ichikawa R, Salter MW, *Tsuda M, *Inoue K. (2016) Dorsal horn neurons release

extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. **Nat. Commun.** 7:12529. 査読有

Tashima R, Mikuriya S, Tomiyama D, Shiratori-Hayashi M, Yamashita T, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, *Tsuda M. (2016) Bone marrow-derived cells in the population of spinal microglia after peripheral nerve injury. **Sci. Rep.** 6: 23701. 査読有

Koyanagi S, Kusunose N, Taniguchi M, Akamine T, Kanado Y, Ozono Y, Masuda T, Kohro Y, Matsunaga N, Tsuda M, Salter MW, Inoue K, *Ohdo S. (2016) Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia. **Nat. Commun.** 7:13102. 査読有

*Tsuda M, Inoue K. (2016) Neuron-microglia interaction by purinergic signaling in neuropathic pain following neurodegeneration. **Neuropharmacology** 104:76-81. 査読有

Nakaya M, Watari K, Tajima M, Nakaya T, Matsuda S, Ohara H, Nishihara H, Yamaguchi H, Hashimoto A, Nishida M, Nagasaka A, Horii Y, Ono H, Iribe G, Inoue R, Tsuda M, Inoue K, Tanaka A, Kuroda M, Nagata S, Kurose H. (2017) Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction. **J Clin Invest** 127(1): 383-401. 査読有

Inoue K. (2017) Purinergic signaling in microglia in the pathogenesis of neuropathic pain. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.** 93(4): 174-182. 査読有

Tozaki-Saitoh H, Miyata H, Yamashita T, Matsushita K, *Tsuda M, *Inoue K. (2017) P2Y12 receptors in primary microglia activate nuclear factor of activated T-cell signaling to induce C-C chemokine 3 expression. **J Neurochem.** 141(1): 100-110. 査読有

Koga K, Kanehisa K, Kohro Y, Shiratori-Hayashi M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Furue H, Tsuda M. (2017) Chemogenetic silencing of GABAergic dorsal horn interneurons induces morphine-resistant spontaneous nocifensive behaviours. **Sci Rep.** 7(1):4739. 査読有

㊦ Kanehisa K, Shiratori-Hayashi M, Koga

K, Tozaki-Saitoh H, Kohro Y, Takamori K, Tsuda M. Specific activation of inhibitory interneurons in the spinal dorsal horn suppresses repetitive scratching in mouse models of chronic itch. (2017) **J Dermatol Sci.** S0923-1811(17)30135-4.

他 18 件

[学会発表](計 99 件)

Kazuhide Inoue. Microglia causing neuropathic pain after nerve injury. Invited, The IUPS 2013 Congress 2013/7/20-26 (Birmingham)

K.Inoue. P2X4 blockers: New drugs for the neuropathic pain. Invited, Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2013 2013/11/21 (Jeju)

井上和秀. 神経障害性疼痛発症メカニズムにおけるミクログリアの役割。第 87 回日本薬理学会年会 2014/3/19-21 仙台国際センター (仙台)

K.Inoue. The role of microglia in neuropathic pain after nerve injury. Invited, The 1st EMBO Workshop -Microglia: Sculptors of the brain. 2014/3/26-29(Heidelberg)

Inoue K. The role of microglial purinergic signaling in neuropathic pain. Prenaly lecture, The 17th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology. 2014/7/13-18(Cape Town, South Africa)

Inoue K. Activation of spinal microglia causing neuropathic pain. Invited, The 22nd International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2014/6/2-3 (Kobe, Japan)

Inoue K. Gene regulation in microglia in neuropathic pain. Invited, 29th CINP WORLD CONGRESS OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 2014/6/22-26(Vancouver, Canada)

Inoue K. The role of microglia in neuropathic pain. Invited, The 12th Asian-Pacific Society for Neurochemistry 2014/8/23-26 (Kaohsiung)

井上和秀. 神経障害性疼痛に關与するミクログリア分子群の発現制御. 特別講演、第 37 回日本疼痛学会 2015/7/3-7/4 (熊本)

井上和秀. 神経障害性疼痛に關与するミクログリア分子群の発現制御. 招請講演、日本

ペインクリニック学会第 49 回大会
2015/7/24 (大阪)

Kazuhide Inoue. P2X4 of microglia in neuropathic pain. Invited, Purine 2015 2015/7/24 (Hamburg, Germany)

Kazuhide Inoue. Onset Mechanisms of Neuropathic Pain. 特別講演、第 63 回国際歯科研究学会日本部会 (JADR) 学術大会 2015/10/30 (福岡)

Kazuhide Inoue. The role of microglia in neuropathic pain mechanism. Invited, NEA_ASIAHORCS symposium 2015/11/10 (Okinawa)

Kazuhide Inoue. Purinergic Regulation of Microglia in Neuropathic Pain. Invited, Keystone Symposia Conference | Purinergic Signaling 2016/1/24-28 (Vancouver, Canada)

井上和秀. 痛みの創薬最前線. 特別講演、日本麻酔科学会 : 第 63 回学術集会 2016/5/26(福岡)

井上 和秀, グリアと痛み, 特別講演、第 38 回日本疼痛学会、札幌 2016.6.24

Kazuhide INOUE. The role of microglia in neuropathic pain. Plenary Lecture, The Asian Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (Asian Congress 2016) 2016/11/17 (Fukuoka)

齊藤秀俊, 橘和志, 井上和秀, 津田誠. 転写因子 IRF8 によるミクログリアの発達制御と中枢神経系への影響. 第 26 回神経行動薬理若手研究者の集い 2017/3/14 (福岡)

齊藤秀俊, 増田潤哉, 米田聡介, 小嶋ちなみ, 川田竜, 津田誠, 井上和秀. Transcription factor MafB mediates activation process of spinal microglia that contributes to neuropathic pain development. 第 90 回薬理学会年会 2017/3/16 (長崎)

齊藤秀俊, 増田潤哉, 小嶋ちなみ, 米田聡介, 川田竜, 井上和秀, 津田誠. 転写因子 MafB は末梢神経障害後の脊髄後角ミクログリアの活性化を調節し神経障害性疼痛に関与する. 第 39 回日本疼痛学会年会 2017/6/16(神戸)

④ H. Saitoh, J. Masuda, R. Kawada, C. Kojima, S. Yoneda, T. Masuda, M. Tsuda, K. Inoue. Transcription factor MafB mediates activation of spinal microglia relating to

neuropathic pain after peripheral nerve injury. ISN-ESN Meeting 2017/8/20-24 (21) (パリ)

他 78 件

[図書](計 1 件)
1. M. Tsuda and K. Inoue. The research for the mechanism of chronically intractable pain based on the functions of microglia as brain immunocompetent cell. In Chronic Inflammation: Elucidation and Control of the Mechanisms. Editors: Kiyoshi Takatsu, Masayuki Miyasaka. Springer; 2016

[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 5 件)
名称 : ジアゼピンジオン誘導体
発明者 : 佐久間詔悟、高橋俊弘、潮田勝俊、今井利安、井上和秀
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : 米国特許 US8470814
取得年月日 : 平成 25 年 6 月 25 日
国内外の別 : 米国

名称 : ジアゼピンジオン誘導体
発明者 : 佐久間詔悟、高橋俊弘、潮田勝俊、今井利安、井上和秀
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : 欧州特許 EP 2397480
取得年月日 : 平成 25 年 8 月 14 日
国内外の別 : 欧州

名称 : 带状疱疹関連痛の急性期疼痛の予防または治療剤
発明者 : 井上和秀、津田誠、松村祐太
権利者 : 同上
種類 : 特許
番号 : US9,115,123B2
取得年月日 : 平成 27 年 8 月 25 日
国内外の別 : 米国
など

〔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

井上 和秀 (INOUE, Kazuhide)

九州大学大学院薬学研究院・特命教授

研究者番号：8 0 1 2 4 3 7 9

(2) 研究分担者

齊藤 秀俊 (SAITOH, Hidetoshi)

九州大学大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：9 0 4 4 4 7 9 4

津田 誠 (TSUDA, Makoto)

九州大学大学院薬学研究院・教授

研究者番号：4 0 3 7 3 3 9 4

H26～H27 研究分担者

H25・H28～H29 連携研究者

増田 隆博 (MASUDA, Takahiro)

Institute of Neuropathology, University

of Freiburg・Postdoc

研究者番号：8 0 6 1 5 2 8 7

H25～H26 研究分担者

H27～H29 連携研究者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

なし