

平成 31 年 4 月 19 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02522

研究課題名(和文) 新しいミクログリア細胞群を切り口とした神経障害性疼痛の慢性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Study for the mechanism underlying neuropathic pain focusing on a subpopulation of microglia

研究代表者

津田 誠 (Tsuda, Makoto)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40373394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛はモルヒネも著効しない慢性疼痛で、その慢性化機序は依然不明で特効薬もない。代表者は、これまでの研究で脊髄のミクログリアが痛みの発症に重要であることを示してきた。現在、脊髄ミクログリアは疼痛発症期に相関した即時的な活性化を示すと理解されている。本研究では、これまでミクログリアの活性化終息期とされてきた時期に活性化する新しいタイプのミクログリアサブセット(CD11c陽性)を発見し、同サブセットの除去や発現遺伝子の欠損等で神経障害性疼痛の寛解が有意に遅延することを明らかにした。今回の成果は、慢性疼痛の寛解プロセスに寄与するという、ミクログリアの新しい役割を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

機能的に異なるミクログリアサブセットの存在は、ミクログリア研究の未解決課題の一つである。本研究では、慢性疼痛プロセスに伴ってミクログリアサブセットが出現し、従来報告されてきたものとは全く異なる役割を有することを明らかにした。したがって、本研究の成果にはミクログリアHeterogeneityの実体解明に繋がる大きな学術的意義が認められる。さらに、同サブセットを標的にした新しい鎮痛薬の開発にも繋がる可能性があり、臨床的意義も大きい。ミクログリアは様々な神経疾患に関与することから、本研究の成果は、それらの神経疾患病態メカニズムの解明に向けた研究にも波及することが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain is a highly debilitating chronic pain condition that occurs after nerve damage. The underlying mechanisms remain unclear, and currently available treatments even morphine are frequently ineffective. We have previously demonstrated that spinal cord microglia are activated relatively soon after nerve injury and play an important role in the development of neuropathic pain. In this study, we identified a subset of microglia, CD11c+ cells, that are activated from a later phase of neuropathic pain. Using mice ablating these microglia or lacking a gene expressed in this subset, we found that these mice did not show such spontaneous recovery of neuropathic pain. These findings suggest that spinal cord microglia are heterogeneous and that CD11c+ microglia are a subset that has a novel role in resolving neuropathic pain.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 ミクログリア 脊髄後角

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんや糖尿病、帯状疱疹、脳梗塞などでの慢性化した堪え難い痛みは、患者のQOLを著しく低下させ、疾患の治療へも多大な悪影響を及ぼす。この慢性疼痛は、神経系の障害や機能異常に由来し、神経障害性疼痛と呼ばれ、全世界で数千万人が苦しんでいる。しかし、その発症と慢性化のメカニズムは依然未解明で特効薬もない。

痛みは末梢から脊髄後角を介して脳へ至る神経ネットワークで伝達される。研究代表者は、神経障害性疼痛モデル動物の脊髄後角において、グリア細胞の一種であるミクログリア特異的にP2X4受容体(細胞外ATPで活性化する興奮性イオンチャネル)が過剰発現し、その活性化で放出された因子が脊髄後角ニューロンを異常に興奮させて痛みを誘発することを発見した。その後、ミクログリア選択的なシグナル分子や転写因子等を特定してP2X4受容体発現機構を明らかにし、神経障害性疼痛の新しい発症メカニズムを示してきた(引用文献)。

現在まで、脊髄後角のミクログリアに注目した神経障害性疼痛の基礎研究が盛んに行われ、重要なエビデンスが徐々に蓄積されている(引用文献)。脊髄後角のミクログリアは、神経損傷後12時間以内に形態変化を起こし、2日程度かけて細胞分裂を起こし細胞数を約3倍に増やす(引用文献)。また、OX-42やIBA1など汎用ミクログリアマーカーの染色レベルも同様の経時的パターンで増加し、1週間程度をピークにその後徐々に減少していく。すなわち、脊髄後角ミクログリアは神経損傷後に速やかに活性化してその後徐々に終息する、即時的な活性化タイムコースを示すというのが現在の一般的理解である。そのタイムコースが神経障害性疼痛の発症期と相関することから、ミクログリアは疼痛の発症に重要とされている。しかしながら、従来の神経障害性疼痛の基礎研究は神経損傷後1~2週間程度という比較的短期間での検討が殆どであり、それ以降のミクログリアの役割についてはこれまで注目されてこなかった。

### 2. 研究の目的

そのような中、最近代表者はさらに長期的にミクログリアの活性化を解析し、これまでのミクログリアの早期的活性化タイムコースとは異なり、ミクログリアの活性化終息期と考えられてきた時期に活性化するミクログリア細胞サブセット(CD11c陽性)を見出した。しかし、同細胞群の役割は現在まで全く検討されていない。そこで本研究では、神経障害性疼痛におけるこのCD11c陽性ミクログリアの役割を検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験動物

CD11cプロモーター制御下で蛍光タンパク質Venusを発現するCD11c-Venusマウス(Jackson Lab)、ジフテリア毒素受容体(DTR)と蛍光タンパク質EGFPを発現するCD11c-DTR-EGFPマウス(Jackson Lab)、Creリコンビナーゼを発現するCD11c-Creマウス(Jackson Lab)等を使用した。

#### (2) 神経障害性疼痛モデルの作製と疼痛行動測定

第4腰椎脊髄神経を切断するChungモデルを用い、疼痛行動はvon Freyフィラメントを足の裏に押し当てマウスが足を退ける行動を観察し、50%逃避閾値(グラム)を算出した。

#### (3) 免疫組織染色法

氷冷した4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、L4脊髄を摘出し、浸漬固定、スクロース置換を行い、包埋した。脊髄切片を作製し、抗体染色後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

#### (4) 骨髄移植実験

線照射したレシピエントマウスヘドナーマウス骨髄細胞を移植し、骨髄キメラマウスを作製した。また、レシピエントおよびドナーマウスの体幹部皮膚をつなぎ合わせるパラバイオシスによるキメラマウスも作製した。ドナーマウスのキメリズムは、採取した末梢血を用い、フローサイトメーターにて解析した。

#### (5) マイクロアレイ解析

神経損傷2週間後の脊髄組織からVenus陽性のCD11cミクログリアをセルソーターFACS Aria IIIを用いて分取し、抽出したRNAをサンプルとしてマイクロアレイ解析を行った。

#### (6) CD11cミクログリアの除去

神経損傷CD11c-DTR-EGFPマウスの脊髄くも膜下腔内へジフテリア毒素(DTX)を投与した(神経損傷後2~7週間にわたり1週間に1回(計6回))。

### 4. 研究成果

本研究では以下の4項目を実施した。

#### 項目1) ミクログリアがCD11c陽性となる活性化メカニズム

##### <1> CD11c陽性ミクログリア出現に関する損傷神経の特定

神経障害性疼痛モデルにおけるCD11c陽性ミクログリアの出現は脊髄後角の表層からやや深層(第III層)にかけて主に観察された。TRPV1陽性神経を破壊したマウスでは、神経損傷後の同細胞の出現に変化は認められなかったことから、大型の一次求心性神経の損傷が関与している可能性がある。

## < 2 > CD11c 陽性となるミクログリアの由来細胞の特定

放射線照射後に CD11c-Venus マウスの骨髄細胞を移植した骨髄キメラマウスを作製し、神経損傷後の Venus 陽性細胞を免疫染色やフローサイトメーターにて解析した。その結果、神経損傷により常在性ミクログリアの活性化は認められたが、Venus 陽性細胞数に変化はなかった。したがって、神経損傷後に脊髄で出現する CD11c 陽性細胞は常在性ミクログリア由来である可能性が示唆された。

## 項目 2 ) CD11c 陽性ミクログリア遺伝子プロファイルと獲得細胞機能

CD11c 陽性ミクログリアが発現する遺伝子群を特定するため、脊髄 CD11c 陽性細胞をセルソーターにより分取し、マイクロアレイにて網羅的に解析し、CD11c 陽性細胞で特徴的な分子群をリストアップした。セルソーターで分取した脊髄 CD11c 陽性ミクログリアの遺伝子発現解析の結果、細胞貪食に関与する分子の発現が高値を示した。また、リアルタイム PCR で検討し、当該分子の発現増加を確認した。この結果を踏まえ、培養細胞を用いた細胞貪食機能を解析し、CD11c 陽性と陰性細胞が混在する成体脊髄ミクログリア初代培養細胞で貪食能を評価したところ、CD11c 陽性ミクログリアにおいて細胞内への取り込み能が有意に高かった。

## 項目 3 CD11c 陽性ミクログリアの神経障害性疼痛における役割

### < 1 > CD11c 陽性ミクログリア細胞を除去

神経障害性疼痛における CD11c 陽性ミクログリアの役割を明らかにするために、CD11c-DTR-EGFP マウスを用いて検討した。神経損傷 2 週間後にジフテリア毒素を脊髄くも膜下腔内投与し、その 2 日後に CD11c 陽性ミクログリアがほぼ完全に消失した。しかし、その一週間後に CD11c 陽性ミクログリア数がわずかに回復したため、ジフテリア毒素を 1 週間ごとに投与することで数週間にわたり同細胞を除去する至適条件を決定した。この条件下で、神経障害性疼痛の推移を解析した結果、疼痛の回復が著明に遅延することを明らかにした。

### < 2 > CD11c 陽性ミクログリア細胞発現分子

マイクロアレイ解析結果から、CD11c 陽性ミクログリアで高発現する分子（以降「X」）に注目し、その遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結果、X 欠損マウスにおいて、神経損傷後の疼痛の発症は野生型と比較して変化はなかったが、その後の回復が有意に遅延した。また、X 欠損マウスの脊髄後角において、神経損傷後に出現する CD11c 強陽性ミクログリア数が有意に減少することも見出した。さらに、CD11c 陽性ミクログリア選択的に転写因子（以降「Y」）を欠損させたマウスを作製し、CD11c 陽性ミクログリアの出現および神経障害性疼痛の慢性過程を検討したところ、Y 欠損マウスにおいても神経障害性疼痛の回復が有意に遅延し、脊髄後角の CD11c 強陽性ミクログリア数も有意に少なかった。

以上の結果より、CD11c 陽性ミクログリアは神経障害性疼痛の寛解プロセスに重要な役割を担っていることが示唆された。

## 項目 4 CD11c 陽性ミクログリアの異種細胞種間構造・機能的相互作用

CD11c 陽性ミクログリアの細胞内の構造と、脊髄後角内の他の細胞（ニューロンなど）との空間的相互作用について電子顕微鏡を用いた形態観察を行い、CD11c 陽性ミクログリアの内部に貪食像が確認され、損傷軸索への接触も示された。さらに、CD11c 陽性ミクログリアの三次元電顕観察を行い、神経損傷側の CD11c 陽性ミクログリア 1 細胞当たりの貪食ポイントが多数観察された。さらに、損傷した一次求心性神経線維を蛍光標識し、蛍光物質を含んでいるミクログリアを解析したところ、CD11c 陽性ミクログリアで蛍光物質を含んでいる割合が高かった。これらの結果から、同ミクログリアサブセットが高い貪食能を有している可能性が示唆された。

本研究の結果から、常在性ミクログリアサブセットである CD11c 陽性ミクログリアは、神経損傷後にこれまで知られていたミクログリアの活性化時期より遅れて出現し、さらに神経障害性疼痛の寛解プロセスに重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この結果は、脊髄後角のミクログリアは神経障害性疼痛の発症に寄与するというこれまでの考え方を変える、非常に新しい役割を示している。また、CD11c 陽性ミクログリアに高発現する遺伝子の中で、細胞貪食に関わる分子 X については、その欠損により疼痛の回復が遅延し、さらに CD11c 強陽性ミクログリアの出現も抑制されるという結果を得たことから、CD11c 陽性ミクログリアの機能として分子 X を介した貪食がこの神経障害性疼痛の回復過程に関与する可能性が考えられる。その詳細なメカニズムは今後の非常に重要な課題である。一方、ミクログリアは神経障害性疼痛だけでなく様々な疾患への関与が報告されているため、本研究により得られた成果は、今後の神経変性疾患の病態メカニズムの解明に向けた研究にも波及することが期待できる。

## < 引用文献 >

Inoue K, Tsuda M: Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Neurosci* 19: 138-152 (2018)

Kohno K, Kitano J, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M: Temporal kinetics of microgliosis in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rodents. *Biol Pharm Bull* 41: 1096-1102 (2018)

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

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

DOI:10.1016/j.jphs.2015.08.002

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

DOI:10.1038/srep14306

Tashima R, Mikuriya S, Tomiyama D, Shiratori-Hayashi M, Yamashita T, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M, Bone marrow-derived cells in the population of spinal microglia after peripheral nerve injury, *Sci Rep*, 査読あり, 6 巻, 2015, 23701  
DOI:10.1038/srep23701

Tsuda M, Inoue K, Neuron-microglia interaction by purinergic signaling in neuropathic pain following neurodegeneration, *Neuropharmacology*, 査読あり, 104 巻, 2016, 76-81

DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.08.042

Masuda T, Ozono Y, Mikuriya S, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Iwatsuki K, Uneyama H, Ichikawa R, Salter MW, Tsuda M, Inoue K, Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain, *Nat Commun*, 査読あり, 7 巻, 2016, 12529

DOI:10.1038/ncomms12529

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, Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia, *Nat Commun*, 査読あり, 7 巻, 2016, 13102

DOI:10.1038/ncomms13102

Matsumura Y, Yamashita T, Sasaki A, Nakata E, Kohno K, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Imai T, Kuraishi Y, Tsuda M, Inoue K, A novel P2X4 receptor-selective antagonist produces anti-allodynic effect in a mouse model of herpetic pain, *Sci Rep*, 査読あり, 6 巻, 2016, 324617

DOI:10.1038/srep32461

Tozaki-Saitoh H, Miyata H, Yamashita T, Matsushita K, Tsuda M, Inoue K, P2Y12 receptors in primary microglia activate nuclear factor of activated T cell signaling to induce C-C chemokine 3 expression, *J Neurochem*, 査読あり, 141 巻, 2017, 100-107  
DOI:10.1111/jnc.13968

Tsuda M, Koga K, Chen T, Zhuo M, Neuronal and microglial mechanisms for neuropathic pain in the spinal dorsal horn and anterior cingulate cortex, *J Neurochem*, 査読あり, 141 巻, 2017, 486-498

DOI:10.1111/jnc.14001

Koga K, Kanehisa K, Kohro Y, Shiratori-Hayashi M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Furue H, Tsuda M, Chemogenetic silencing of GABAergic dorsal horn interneurons induces morphine-resistant spontaneous nociceptive behaviours, *Sci Rep*, 査読あり, 7 巻, 2017, 4739

DOI:10.1038/s41598-017-04972-3

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, *J Dermatol Sci*, 査読あり, 88 巻, 2017, 251-254

DOI:10.1016/j.jdermsci.2017.05.017

Tsuda M, Astrocytes in the spinal dorsal horn and chronic itch, *Neurosci Res*, 査読あり, 126 巻, 2018, 9-14

DOI:10.1016/j.neures.2017.08.010

Tsuda M, Modulation of pain and itch by spinal glia, *Neurosci Bull*, 査読あり, 34 巻, 2018, 178-185

DOI:10.1007/s12264-017-0129-y

Tashima R, Koga K, Sekine M, Kanehisa K, Kohro Y, Tominaga K, Matsushita K, Tozaki-Saitoh H, Fukazawa Y, Inoue K, Yawo H, Furue H, Tsuda M, Optogenetic activation of non-nociceptive A fibers induces neuropathic pain-like sensory and emotional behaviors after nerve injury in rats, *eNeuro*, 査読あり, 5 巻, 2018,

ENEURO.0450-17.2018

DOI:10.1523/ENEURO.0450-17.2018

Inoue K, Tsuda M, Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential, Nat Rev Neurosci, 査読あり, 19 巻, 2018, 138-152

DOI:10.1038/nrn.2018.2

Yoshihara K, Matsuda T, Kohro Y, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Tsuda M, Astrocytic Ca<sup>2+</sup> responses in the spinal dorsal horn by noxious stimuli to the skin, J Pharmacol Sci, 査読あり, 137 巻, 2018, 101-104

DOI:10.1016/j.jphs.2018.04.007

Chen T, Taniguchi W, Chen QY, Tozaki-Saitoh H, Song Q, Liu RH, Koga K, Matsuda T, Kaito-Sugimura Y, Wang J, Li ZH, Lu YC, Inoue K, Tsuda M, Li YQ, Nakatsuka T, Zhuo M, Top-down descending facilitation of spinal sensory excitatory transmission from the anterior cingulate cortex, Nat Commun, 査読あり, 9 巻, 2018, 1886

DOI:10.1038/s41467-018-04309-2

Shiratori-Hayashi M, Hasegawa A, Toyonaga H, Andoh T, Nakahara T, Kido-Nakahara M, Furue M, Kuraishi Y, Inoue K, Dong X, Tsuda M, Role of P2X3 receptors in scratching behavior in mouse models, J Allergy Clin Immunol, 査読あり, 143 巻, 2019, 1252-1254.e8

DOI:10.1016/j.jaci.2018.10.053

Yamamoto S, Yamashita T, Ito M, Caaveiro JMM, Egashira N, Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, New pharmacological effect of fulvestrant to prevent oxaliplatin-induced neurodegeneration and mechanical allodynia in rats, Int J Cancer, 査読あり, in press, 2019

DOI:10.1002/ijc.32043

Tozaki-Saitoh H, Masuda J, Kawada R, Kojima C, Yoneda S, Masuda T, Inoue K, Tsuda M, Transcription factor MafB contributes to the activation of spinal microglia underlying neuropathic pain development, Glia, 査読あり, 67 巻, 2019, 729-740

DOI:10.1002/glia.23570

[学会発表](計 20 件)

Makoto Tsuda, Microglia as a pain maker in neuropathic pain: Rodent studies, 13th World Congress of Biological Psychiatry, 2015

Makoto Tsuda, Kazuhide Inoue, Spinal glial cells and chronic pain, 2015 Cold Spring Harbor Asia Conference, 2015

Tsuda M, Microglial purinergic signaling in the spinal cord and neuropathic pain, 6th Asian Pain Symposium, 2015

Makoto Tsuda, Takahiro Masuda, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Kazuhide Inoue, Microglial transcription factors and neuropathic pain, 第 58 回日本神経化学学会大会, 2015

津田誠, 体性感覚系疾患におけるグリア細胞の役割, 第 45 回日本神経精神薬理学会, 2015

津田誠, 難治性疼痛におけるグリア細胞 ATP 受容体の関与, 第 9 回日本緩和医療薬学会年会, 2015

津田誠, 井上和秀, 神経障害性疼痛における P2X4 受容体陽性ミクログリアの役割, 日本薬学会第 136 年会, 2016

Makoto Tsuda, Spinal Microglia Activated by Purinergic Signaling and Neuropathic Pain, Keystone Symposia on Microglia in the Brain, 2016

津田誠, 痛みの慢性化に重要なグリア細胞, 第 46 回日本神経精神薬理学会年会, 2016

Makoto Tsuda, Microglial purinergic signaling and neuropathic pain, 16th World Congress on Pain, 2016

Makoto Tsuda, Microglial purinergic signaling and neuropathic pain, 46th Annual Meeting Society for Neuroscience, 2016

津田誠, 神経障害性アロディニア研究における光遺伝学を用いた新たな道, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017

津田誠, グリア細胞から紐解く神経障害性疼痛メカニズム, 第 39 回日本疼痛学会, 2017

Makoto Tsuda, Modulation of mechanical sensitivity by spinal glial cells, 7th Asian pain symposium, 2017

Makoto Tsuda, Glial cells: key elements for the pathogenesis of neuropathic pain, Asia Dry Eye Summit 2017, 2017

Makoto Tsuda, Purinergic stimulation of spinal microglia contributes to chronic pain, XIII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, 2017

Makoto Tsuda, Microglial modulation of neuropathic pain, Translational Pain Research Symposium, 2017

津田誠, 感覚情報処理における脊髄グリア細胞の役割, 第 31 回日本顎関節学会・第 23 回日本口腔顔面痛学会・第 33 回日本歯科心身医学会 合同大会, 2018

河野敬太, 北野順子, 高露雄太, 齊藤秀俊, 井上和秀, 津田誠, 神経障害性疼痛における脊髄ミクログリアの活性化タイムコース, 第 35 回日本薬学会九州支部大会, 2018  
齊藤秀俊, 増田潤哉, 米田聡介, 小嶋ちなみ, 川田竜, 井上和秀, 津田誠, 転写因子 MafB は脊髄ミクログリアの活性化と神経障害性疼痛に関与する, 第 92 回日本薬理学会年会, 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ: <http://life-innov.phar.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 齊藤 秀俊

ローマ字氏名: TOZAKI-SAITOH, Hidetoshi

所属研究機関名: 九州大学

部局名: 薬学研究院

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 90444794

### (2) 連携研究者

研究協力者氏名: 八坂敏一

ローマ字氏名: YASAKA, Toshiharu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。